
*Zelluläre und molekulare Determinanten der Therapieresistenz
bei Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie*

vorgelegt von
Dipl.-Ing. Peter Rhein
aus Berlin

von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften
- Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss

Vorsitzender: Prof. Dr. Leif-Alexander Garbe

1. Gutachter: Prof. Dipl.-Ing. Dr. Ulf Stahl

2. Gutachter: Dr. Leonid Karawajew

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 27. August 2010

Berlin 2010

D 83

Die vorgelegte Arbeit wurde an der Charité, Campus Berlin-Buch, der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolf-Dieter Ludwig und Dr. Leonid Karawajew angefertigt.

Zur Erlangung der Doktorwürde des Fachbereiches Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin erfolgte die Einreichung am Institut für Biotechnologie, Fachgebiet Mikrobiologie und Genetik, bei Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. Ulf Stahl.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Akute Lymphoblastische Leukämien (ALL) im Kindesalter	7
1.1.1	Entstehung aus hämatopoetischen Vorläuferzellen	7
1.1.2	Diagnose und Klassifikation anhand der initialen Labordiagnostik	8
1.1.3	Therapie und risikobasierte Stratifizierung anhand von minimaler Resterkrankung (MRD)	11
1.2	Molekulare Grundlagen der antileukämischen Therapie	13
1.2.1	Molekulare Zielstrukturen der Therapeutika	13
1.2.1.1	Glucocorticoide	13
1.2.1.2	Zytostatika	17
1.2.2	Aktivierung der Zellzyklus-Kontrollpunkte	19
1.2.3	Induktion des apoptotischen Zelltodes	21
1.2.3.1	Definition der Apoptose	21
1.2.3.2	Apoptosesignalwege	22
1.2.3.3	Regulation der Apoptose auf mitochondrialer Ebene	24
1.2.4	Determinanten der Glucocorticoid-Sensitivität bei der ALL	26
1.2.5	Die Aktivierung des p53-Signalweges als zentraler Mechanismus der Zytostatikasensitivität	29
2	Problemstellung und Zielsetzung	32
3	Material und Methoden	34
3.1	Patienten	34
3.2	Zellen	34
3.2.1	Primäres Zellmaterial von ALL-Patienten	34
3.2.2	Primäres Zellmaterial von gesunden Spendern	34
3.2.3	Zelllinien	34
3.3	Präparation und Kultivierung der Zellen	35
3.3.1	Isolierung von mononukleären Zellen	35
3.3.2	Zellkultivierung und Stammhaltung	35
3.4	Durchflusszytometrische Methoden für die zellbiologische Analyse von normalen lymphatischen und leukämischen Zellen	36
3.4.1	Grundlagen der Durchflusszytometrie	36
3.4.1.1	Anwendungen	36
3.4.1.2	Fluorochrome	36
3.4.1.3	Der Messvorgang	36
3.4.1.4	Die Zellsortierung	38
3.4.2	Bestimmung von membranständiger und intrazellulärer Proteinexpression	39
3.4.2.1	Immunfärbung von membranständigen Proteinen	40
3.4.2.2	Immunfärbung von intrazellulären Proteinen	40
3.4.2.3	Immunfärbung von nukleären Proteinen	40
3.4.2.4	Quantifizierung der Proteinexpression	41
3.4.3	Durchflusszytometrische MRD-Bestimmung	41

3.4.4	Durchflusszytometrische Zellisolierung	41
3.4.5	Apoptosedetektion	42
3.4.6	Zellzyklusanalyse	42
3.5	Genexpressionsanalyse	42
3.5.1	RNA-Extraktion.....	42
3.5.2	Bestimmung von RNA-Menge und -Integrität	43
3.5.2.1	Spektrophotometrische Analyse.....	43
3.5.2.2	Gelelektrophoretische Analyse	43
3.5.2.3	Bioanalyser	43
3.5.3	Real-Time RT-PCR	44
3.5.4	Genomweite Genexpressionsanalyse mit DNA-Mikroarrays	44
3.5.4.1	Grundlagen.....	44
3.5.4.2	cRNA-Synthese für die DNA-Mikroarray-Analyse.....	46
3.5.4.3	Hybridisierung und Scannen der DNA-Mikroarrays	47
3.6	Funktionelle Assays.....	47
3.6.1	Stimulation von Zelllinien und Lymphozyten	47
3.6.2	<i>In-vitro</i> -Behandlungen zur Apoptoseinduktion und Zellzyklusinhibition	47
3.6.3	Modulation des Energiestoffwechsels von normalen lymphatischen und leukämischen Zellen	48
3.6.3.1	Bestimmung des mitochondrialen Transmembranpotentials	48
3.6.3.2	Bestimmung der intrazellulären ATP-Menge	49
3.6.3.3	Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies	49
3.6.4	Spezifische Genanalyse mittels RNA-Interferenz	50
3.7	Bioinformatische Analyse der Genexpressionsdaten	51
3.8	Statistische Methoden	54
3.9	Reagenzien	56
3.10	Antikörper	57
3.11	Fluoreszenzfarbstoffe.....	58
3.12	Software	58
3.13	Geräte.....	58
4	Ergebnisse	59
4.1	Methodische Weiterentwicklungen zur Identifizierung und molekularbiologischen Analyse von MRD-Zellen	59
4.1.1	Optimierung der multiparametrischen durchflusszytometrischen MRD-Detektion mittels bioinformatischer Algorithmen (Toedling <i>et al.</i> , 2006).....	59
4.1.2	Etablierung eines experimentellen Verfahrens zur genomweiten Genexpressionsanalyse von MRD-Zellen (Rhein <i>et al.</i> , 2007)	61
4.2	Zellbiologische Charakterisierung von MRD-Zellen (Rhein <i>et al.</i>, 2007)	63
4.2.1	Genexpression unter der Therapie persistierender leukämischer Zellen	63
4.2.1.1	Differentielle Genexpression zwischen den leukämischen Zellen am Tag 0 und am Tag 8 der Induktionstherapie.....	64

4.2.1.2	Vergleich der Genexpression von leukämischen und normalen B-Zellen am Tag 0 und am Tag 8 der Induktionstherapie.....	67
4.2.1.3	Differentielle Genexpression zwischen Prednison-Poor- und Prednison-Good-Respondern ...	68
4.2.2	Validierung der Glucocorticoid-induzierten Genexpressionsveränderungen auf zellulärer Ebene und Proteinebene	68
4.2.3	Die Bedeutung von BCL-2 für das Therapieansprechen und die Resistenz gegenüber der Induktionstherapie mit Glucocorticoiden	69
4.3	Die Bedeutung der Expression des Oberflächenrezeptors CD11b bei der B-Vorläuferzell-ALL (Rhein <i>et al.</i>, 2010).....	73
4.3.1	Die CD11b-Expression im Kontext von initialen klinischen Parametern und Therapieansprechen	74
4.3.2	Die unabhängige prognostische Bedeutung von CD11b	75
4.3.3	CD11b-Expression in MRD-Blasten während der Induktions-/ Konsolidierungstherapie	77
4.3.4	CD11b als potentielles MRD-spezifisches Antigen.....	79
4.4	Der Einfluss mitochondrialer Faktoren auf die Zytostatika-induzierte Apoptose (Karawajew <i>et al.</i>, 2005)	81
4.4.1	Die Stresssensitivität leukämischer Zellen ist vom mitochondrialen Transmembranpotential (MTMP) abhängig	81
4.4.2	Die MTMP-abhängige Stresssensitivität ist p53-spezifisch	82
4.4.3	Der Einfluss MTMP-abhängiger reaktiver Sauerstoffspezies auf das p53-System	85
4.4.4	MTMP-abhängige Zytostatikasensitivität des p53-Systems in reifen T-Lymphozyten.....	88
4.4.5	MTMP-abhängige Zytostatikasensitivität des p53-Systems in primären ALL-Zellen	89
5	Diskussion	90
5.1	Glucocorticoid-spezifische Genexpressionsprofile in MRD-Blasten während der Induktionstherapie.....	90
5.2	BCL-2 als molekularer Glucocorticoid-Resistenzfaktor bei der ALL	92
5.3	CD11b als Therapieresistenzfaktor bei der ALL	93
5.4	Genexpressionsverschiebung in Richtung terminale B-Zell-Differenzierung als potentieller Resistenzmechanismus	96
5.5	Zelluläre Determinanten der Zytostatikaresistenz	98
6	Zusammenfassung	102
7	Literaturverzeichnis.....	102
8	Abkürzungsverzeichnis.....	116
9	Anhang	123
9.1	Summary.....	123
9.2	Veröffentlichungen.....	124
9.3	Danksagung	127

1 Einleitung

Leukämien sind maligne Erkrankungen des blutbildenden Systems und wurden 1845 erstmals von Rudolf Virchow beschrieben (Virchow, 1845). Ihr Name bedeutet „weißes Blut“ und leitet sich von den griechischen Wörtern für weiß (*leukos*) und Blut (*haima*) ab. Die Namensgebung beruht auf einer meist starken Vermehrung der Leukozyten. Ursache dafür sind genetische Veränderungen, die unter anderem die physiologischen Regulationsmechanismen der Zellteilung stören (Pui *et al.*, 2004). Es kommt zur klonalen Proliferation und Akkumulation von unreifen, funktionsuntüchtigen Vorläuferzellen der Leukozyten, die als Blasten bezeichnet werden und bei der Leukämie entartet sind. Vom Knochenmark oder dem lymphatischen Gewebe ausgehend verdrängen die Blasten die übrigen Blutzellen. Die abnehmende Zahl reifer Leukozyten führt zu Beeinträchtigungen des Immunsystems. Infolge der Abnahme von Erythrozyten- und Thrombozytenzahl kommt es zur Blutarmut (Anämie) bzw. Blutungsneigung (Thrombozytopenie) (Wartenberg *et al.*, 2008). In der akuten Phase führt dieses Krankheitsbild unbehandelt innerhalb weniger Monate zum Tod der Patienten (Hersh *et al.*, 1965).

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist ein Subtyp, der vornehmlich bei Kindern auftritt und für diese die häufigste Krebserkrankung darstellt. In Deutschland liegt die jährliche Inzidenz bei etwa 3 Neuerkrankungen pro 100.000 Kindern unter 15 Jahren (Schrappe *et al.*, 2006). Die Heilungsrate konnte in den letzten 30 Jahren deutlich verbessert werden und beträgt heute durch optimierte chemotherapeutische Behandlungsstrategien bis zu 80 % (Stanulla *et al.*, 2009). Das bedeutet aber auch, dass das Risiko eines Rückfalls (Rezidivs) noch immer bei fast 20 % liegt. Die ALL-Rezidive stellen damit die vierthäufigste Krebserkrankung im Kindesalter dar. Ihre langfristige Überlebensrate ist im Vergleich zur Ersterkrankung mit 40 % erheblich reduziert (Gaynon *et al.*, 1998; Gaynon, 2005).

Bei der Chemotherapie werden verschiedene Zytostatika sowie synthetische Glucocorticoide (Steroidhormone) eingesetzt. Das Ziel ihrer Anwendung ist die Inhibition des leukämischen Zellwachstums und die Induktion eines genetischen Programms in den Leukämiezellen, das zu einer kontrollierten Ausführung der Selbsttötung führt und als Apoptose bezeichnet wird. Bei therapieresistenten Zellen ist die Regulation von Zellteilung und Apoptose oftmals gestört (Johnstone *et al.*, 2002). Aus diesem Grund ist ihre Untersuchung von zentraler Bedeutung für die Identifizierung von molekularen Determinanten der Therapieresistenz, dem Forschungsschwerpunkt der vorliegenden Dissertation.

1.1 Akute Lymphoblastische Leukämien (ALL) im Kindesalter

1.1.1 Entstehung aus hämatopoetischen Vorläuferzellen

Die Hämatopoese ist ein hierarchisch aufgebauter Prozess, der zur Entwicklung der reifen Blutzellen führt (Abb. 1). Sie wird durch eine kleine Population langlebiger, pluripotenter Stammzellen im Knochenmark ein Leben lang aufrechterhalten (Weissman, 2000). Die hämatopoetischen Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und können darüber hinaus sowohl in lymphatische als auch myeloische Vorläuferzellen differenzieren. Diese sind linienspezifisch determiniert, wobei gezeigt werden konnte, dass lymphatische Vorläuferzellen auch myeloisches Potential besitzen können (multilymphatische Vorläuferzellen) (Graf, 2008; Dorshkind, 2010). Aus den Vorläuferzellen gehen nach weiteren Proliferations- und Differenzierungsprozessen die reifen, funktionsfähigen Zellen hervor, die in das periphere Blut migrieren können (myeloische Reihe: Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Thrombozyten; lymphatische Reihe: B- und T-Lymphozyten).

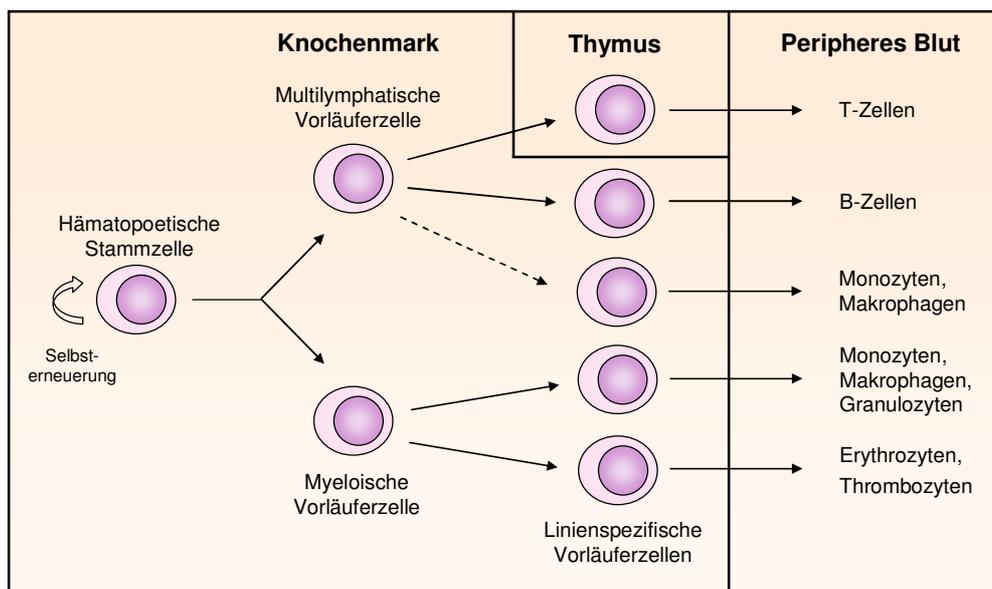


Abb. 1: Schematische Darstellung der Hämatopoese (modifiziert nach Graf, 2008).

Die Abbildung zeigt das klassische Modell der hämatopoetischen Hierarchie, das aufgrund des nachgewiesenen myeloischen Potentials lymphatischer Vorläuferzellen erweitert wurde (gestrichelte Linie) (Dorshkind, 2010).

Die Regulation der Hämatopoese erfolgt durch direkte Wechselwirkungen mit der Mikroumgebung (Stroma) und durch humorale Wachstums- und Überlebensfaktoren, die von den Stromazellen oder reifen Blutzellen produziert werden (LeBien, 2000; Garrett *et al.*, 2009). Die Signale werden von den hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen durch spezifische Rezeptoren (z. B. Adhäsionsmoleküle oder Zytokinrezeptoren) aufgenommen und prozessiert.

Die Rezeptoren bilden einen Teil der Oberflächenproteine, die als *Cluster of Differentiation* (CD) bezeichnet und zur Leukozytendifferenzierung verwendet werden (Beare *et al.*, 2008). Die CD-Antigene werden bei den hämatopoetischen Zellen vom Reifestadium abhängig exprimiert, wodurch die zelltypspezifische Versorgung mit Wachstums- und Überlebenssignalen gewährleistet ist (Shizuru *et al.*, 2005).

Bei der Leukämogenese kommt es zur Transformation der hämatopoetischen Stamm- oder Vorläuferzellen. Die Ursache bei der ALL sind vermutlich präexistierende Keimbahnmutationen und spontane somatische Mutationen (Schrappe *et al.*, 2006). Sie bewirken sequentielle genetische Veränderungen in Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen (Frohling *et al.*, 2008). Daraus resultiert die Deregulation von zellulären Prozessen wie Selbsterneuerung, Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Hanahan *et al.*, 2000). In der Folge kommt es zur Entstehung und klonalen Proliferation von leukämischen Zellen, die in einem bestimmten Stadium der Hämatopoese arretiert sind (Tenen *et al.*, 1997; Ferrando *et al.*, 2002; Jumaa *et al.*, 2005).

1.1.2 Diagnose und Klassifikation anhand der initialen Labordiagnostik

Die Diagnostik und Klassifikation der ALL erfolgt nach den Leitlinien von Studienprotokollen und wird mit Hilfe von morphologischen, immunphänotypischen, zyto- und molekulargenetischen Methoden umgesetzt (van der Does-van den Berg *et al.*, 1992).

Die initiale Diagnose wird definitionsgemäß anhand der Zytomorphologie gestellt. Hierfür werden Blut- und Knochenmark-Ausstriche panoptisch gefärbt und mikroskopisch untersucht. Für die Diagnose ALL müssen mehr als 25 % Blasten im Knochenmark identifiziert werden (Morice *et al.*, 2008). Eine Klassifizierung in biologisch und klinisch relevante Subgruppen erfolgt mit den genaueren Methoden der Immunphänotypisierung, Zyto- und Molekulargenetik.

Immunphänotypisierung

Die Immunphänotypisierung ist eine immunologische Methode, die zur Diagnostik und Klassifikation von Leukämien eingesetzt wird. Das Prinzip beruht auf der Erkenntnis, dass leukämische Zellen eine aberrante oder asynchrone Expression von CD-Antigenen spezifischer Stadien der Hämatopoese aufweisen (Hurwitz *et al.*, 1988; Campana *et al.*, 1990; Terstappen *et al.*, 1992). Mit Hilfe von fluorochrommarkierten monoklonalen Antikörpern lässt sich die Expression der CD-Antigene auf der Oberfläche und im Zytoplasma der leukämischen Zellen durchflusszytometrisch bestimmen.

Für die Klassifizierung der ALL sind in Europa die Richtlinien der *European Group for the Immunological Classification of Leukemias* (EGIL) am weitesten verbreitet (Bene *et al.*, 1995). Mit Hilfe dieser Richtlinien lassen sich jeweils vier Subtypen der T- und B-Reihe unterscheiden (T-Reihe: Pro-, Prä-, intermediäre (kortikale) und reife T-ALL, B-Reihe: Pro-, Common, Prä- und B-ALL) (Abb. 2).

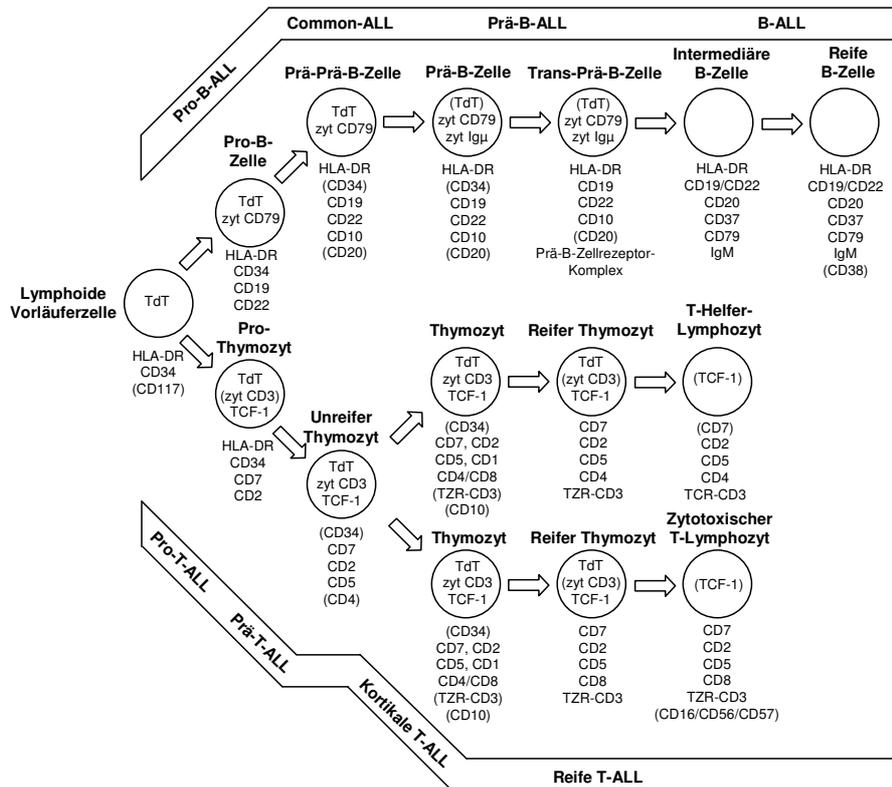


Abb. 2: Schematische Darstellung der lymphatischen Differenzierung (modifiziert nach Szczepanski *et al.*, 2006).

Für jede Differenzierungsstufe ist die Expression der relevanten immunologischen Marker dargestellt. Eingeklammert sind Marker, die nicht grundsätzlich exprimiert werden. Die Balken repräsentieren die Klassifikation lymphoblastischer Leukämien anhand der Reifungsstadien, in denen sie arretiert sind.

Ein wichtiges Antigen für die Identifizierung von Leukämiezellen ist die terminale Deoxynukleotidyltransferase (TdT) (Abb. 2). Sie ist ein gemeinsamer Marker für lymphatische Stamm- und Vorläuferzellen (Komori *et al.*, 1993). TdT ist in die somatische Rekombination der T-Zell-Rezeptor (TZR)- und Immunglobulin (Ig)-Gene involviert, deren Expression zum Aufbau der T- bzw. B-Zell-Rezeptoren führt, die von den reifen Lymphozyten exprimiert werden (Janeway *et al.*, 1999). Eine hohe intrazelluläre TdT-Expression ist für alle unreifen ALL-Subtypen kennzeichnend (Bollum, 1979) und dient der Unterscheidung von normalen Lymphozyten (Bradstock *et al.*, 1980).

Die linienspezifische Zuordnung der ALL erfolgt anhand von B- (CD19, CD79) und T-Zell-Antigenen (CD3), die an der Signaltransduktion und Aktivierung von normalen Lymphozyten beteiligt sind (Lin *et al.*, 1992; Szczepanski *et al.*, 2006; Smith-Garvin *et al.*, 2009).

Die Entwicklung der T-Zellen im Thymus ist durch Änderungen des T-Zell-Rezeptor-Status und der Expression von Korezeptoren gekennzeichnet (Janeway *et al.*, 1999). Die reifungsassoziierte Subklassifizierung der T-ALL basiert daher primär auf CD3, das während der Ausreifung der Thymozyten zusammen mit dem T-Zell-Rezeptor-Komplex exprimiert wird. Die unreifsten Formen der T-ALL (Pro- und Prä-) sind auf der Zelloberfläche CD3⁻ (Abb. 2) und werden durch die Expression der T-Zell-Antigene CD2, CD5 und CD7 genauer differenziert (Pro-T-ALL: zytoplasmatisch (zyt) CD3⁺ und CD7⁺; Prä-T-ALL: zyt CD3⁺ und CD2⁺ und /oder CD5⁺). Die kortikale T-ALL ist durch ihre CD1a-Positivität gekennzeichnet und kann aufgrund der differentiellen CD3-Oberflächenexpression in einen CD3⁻ und einen CD3⁺-Subtyp untergliedert werden. Alle reifen T-ALLs exprimieren CD3 membranständig und sind CD1a⁻ (Bene *et al.*, 1995). (Szczepanski *et al.*, 2006)

Die Entwicklung der B-Zellen erfolgt primär im Knochenmark durch Umlagerung und Expression der Gensegmente, die für die Ig kodieren und am Aufbau des B-Zell-Rezeptors beteiligt sind (Janeway *et al.*, 1999). Für die Subtypisierung der B-Zell-Leukämien wird aus diesem Grund neben dem lymphatischen Progenitorzell-Antigen CD10 die zytoplasmatische Expression der schweren μ -Kette der Ig herangezogen. Mit zunehmendem Reifungsgrad lassen sich damit die Pro-B-ALL (CD10⁻ und zyt Ig- μ ⁻), *Common-ALL* (CD10⁺ und zyt Ig- μ ⁻) und Prä-B-ALL (CD10^{+/-} und zyt Ig- μ ⁺) differenzieren (Abb. 2) (Bene *et al.*, 1995).

Bei der reifen „B-ALL“ sind die Genumlagerungen der schweren und leichten Ketten abgeschlossen und die Ig werden membranständig exprimiert (Bene *et al.*, 1995). Die reife „B-ALL“ ist eine leukämische Variante des Burkitt-Lymphoms und wird von den B-Vorläuferzell- und T-Zell-Leukämien abgegrenzt, da sie eine differierende Biologie aufweist und anders zu behandeln ist (van der Burg *et al.*, 2001).

Zyto- und Molekulargenetik

Die ALL ist durch eine Reihe von bekannten strukturellen und/oder numerischen Chromosomenanomalien gekennzeichnet, die der zytogenetischen Subtypisierung dienen. Sie können bei etwa 75 % der Patienten identifiziert werden (Pui *et al.*, 2004). Die häufigsten Chromosomenveränderungen sind die Hyperdiploidie und die Translokation t(12;21), aus der das *TEL-AML1*-Fusionsgen resultiert. Beide Anomalien treten jeweils etwa bei einem Viertel der Patienten auf (Pui *et al.*, 2004). Zu den übrigen chromosomalen Abberationen gehören unter anderem die Translokationen t(9;22) und t(11;19), die bei 3 bzw. 4 % der Patienten detektiert werden können. Sie führen zu den Fusionsgenen *BCR-ABL* und *MLL-AF4*, die mit einer schlechten Prognose einhergehen und deshalb für die Therapiestratifizierung von Bedeutung sind (Pui *et al.*, 2004; Krivtsov *et al.*, 2007; Flohr *et al.*, 2008).

1.1.3 Therapie und risikobasierte Stratifizierung anhand von minimaler Resterkrankung (MRD)

Die ALL war bis zu den 1970er Jahren eine Erkrankung, die fast ausschließlich tödlich verlaufen ist. Erst die Entwicklung der kombinierten Chemotherapie sorgte für einen signifikanten Anstieg des krankheitsfreien Überlebens (Kersey, 1997). Zusätzliche wichtige Meilensteine, die zu einer Verbesserung des Therapieausgangs beitrugen, waren die Prophylaxe für das zentrale Nervensystem und die Reinduktion der Chemotherapie nach dem Erreichen einer initialen Remission (Seibel, 2008).

Heute basiert die antileukämische Therapie im Allgemeinen auf vier aufeinanderfolgenden Blöcken (Induktions-, Konsolidierungs-, Reintensivierungs- und Erhaltungstherapie) (Schrappe *et al.*, 2006), deren Zusammensetzung von nationalen und internationalen Studiengruppen festgelegt wird. Das für die Dissertation relevante Therapieprotokoll stammt aus der aktuellen ALL-Berlin-Frankfurt-Münster (BFM)-Studie 2000 (Stanulla *et al.*, 2009). Im Rahmen dieser Studie wird die Remissionsinduktion durch eine siebentägige Steroidvorphase mit Prednison (Vorstufe des Glucocorticoids Prednisolon) eingeleitet. Die Dosierung von Prednison wird innerhalb der ersten vier Tage auf einen Endwert von 60 mg/m²/d gesteigert (Abb. 3). Die Prednison-Vorphase hat den Vorteil, dass Komplikationen infolge einer zu extensiven Lyse der leukämischen Zellen verringert werden (Stanulla *et al.*, 2009). Zusätzlich zum Prednison erhalten die Patienten am ersten Therapietag eine einmalige intrathekale Dosis Methotrexat zur Prophylaxe des zentralen Nervensystems (Abb. 3). Nach der Prednison-Vorphase erfolgt eine Randomisierung des eingesetzten Steroids (Prednison vs. Dexamethason), mit dessen Reduktion zum Ende der Induktion begonnen wird. Das Therapieregime beinhaltet außerdem die Zytostatika Daunorubicin, Vincristin sowie L-Asparaginase (Abb. 3).

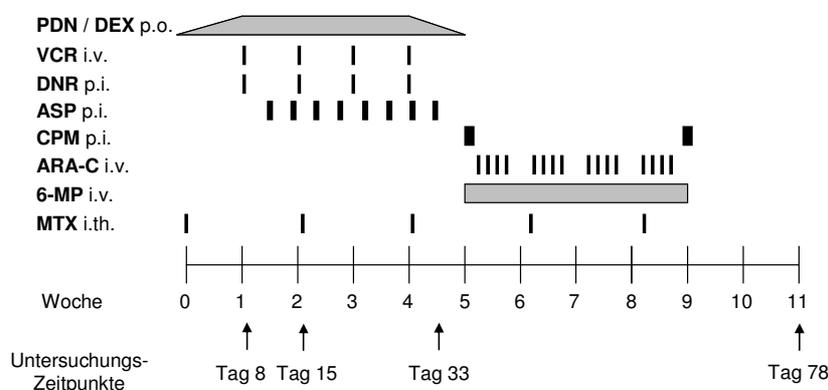


Abb. 3: Induktions-/Konsolidierungstherapie ALL-BFM 2000 (modifiziert nach Flohr *et al.*, 2008).

PDN, Prednison; DEX, Dexamethason; VCR, Vincristin; DNR, Daunorubicin; ASP, L-Asparaginase; CPM, Cyclophosphamid; ARA-C, Cytarabin; 6-MP, 6-Mercaptopurin; MTX, Methotrexat; p.o., peroral; i.v., intravenös; p.i., per Infusion.

Am Ende der Induktionsphase (Tag 33) befinden sich bereits mehr als 95 % der Patienten zytomorphologisch in Remission (weniger als 5 % Blasten im Knochenmark) (Moricke *et al.*, 2008). Die anschließende Konsolidierung und Reintensivierung dienen dazu, residuale Blasten weiter zu eliminieren. Patienten ohne diese intensive Folgebehandlung würden bereits nach wenigen Monaten rezidivieren (Stanulla *et al.*, 2009). In der Konsolidierungsphase werden Cyclophosphamid, 6-Mercaptopurin, Cytarabin und Methotrexat verabreicht (Abb. 3). Bei der Reintensivierung wird die Induktionstherapie in modifizierter Form wiederholt. Die Stabilisierung der Remission erfolgt durch die abschließende Erhaltungstherapie mit Methotrexat und 6-Mercaptopurin bis zu einer Gesamttherapiedauer von zwei Jahren (Schrappe *et al.*, 2000a; Schrappe *et al.*, 2000c).

Therapiestratifizierung

In der ALL-BFM 2000-Studie wird die risikobasierte Stratifizierung der Patienten nach der Konsolidierungsphase vorgenommen. Für eine Einteilung der Patienten sind initiale prognostische Faktoren (wie die Fusionsgene *BCR-ABL* und *MLL-AF4*) und das *In-vivo*-Therapieansprechen von zentraler Bedeutung.

Das Therapieansprechen auf die Prednison-Vorphase hat sich bereits in früheren ALL-BFM-Studien als wichtiger prognostischer Parameter herausgestellt. Die Prednison-Response ergibt sich aus der Anzahl der leukämischen Zellen, die am Tag 8 der Induktionstherapie im peripheren Blut der Patienten persistieren (Abb. 3). Patienten mit mehr als 1000 Blasten pro Mikroliter werden als Prednison-Poor-Responder bezeichnet und haben eine signifikant schlechtere Prognose als die Prednison-Good-Responder (Riehm *et al.*, 1987; Reiter *et al.*, 1994; Schrappe *et al.*, 2000b).

Ein weiterer zuverlässiger Risikofaktor, der das Therapieansprechen reflektiert, wird durch die Anzahl von residualen Blasten bestimmt, die nach Induktions- (Tag 33) und Konsolidierungsphase (Tag 78) im Knochenmark persistieren und als minimale Resterkrankung (*Minimal Residual Disease*, MRD) bezeichnet werden (Abb. 3). Das MRD-Niveau korreliert mit dem Rezidivrisiko (Flohr *et al.*, 2008) und ist ein Hauptkriterium zur Therapiestratifizierung geworden (Abb. 4). Mit zunehmendem Rezidivrisiko werden die Patienten in die Standardrisikogruppe, intermediäre Risikogruppe und Hochrisikogruppe eingeteilt. Die Separation der Patienten in gut abgrenzbare Subgruppen ermöglicht nach der Konsolidierungsphase eine risikoadaptierte Behandlung, die sich in Dosierung und Zusammensetzung der Therapieblöcke unterscheidet (Schrappe *et al.*, 2006).

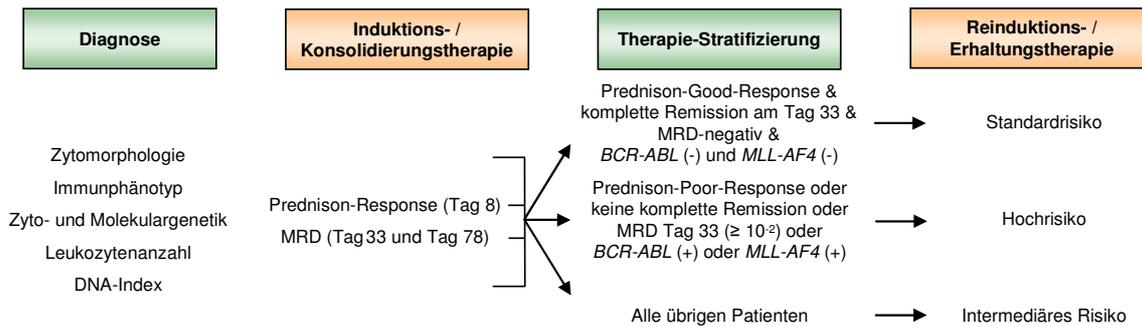


Abb. 4: Therapiestratifizierung ALL-BFM 2000.

Einteilung der Patienten in Risikogruppen nach initialen Risikofaktoren und klinischen Verlaufsparemtern.

In der ALL-BFM-Studie erfolgt die MRD-Analyse anhand der Polymerasekettenreaktion (PCR). Sie dient dazu, patientenspezifische Rearrangements der Ig- und T-Zell-Rezeptor-Gene in den Leukämiezellen zu detektieren (Flohr *et al.*, 2008). Zunehmend findet aber auch die multiparametrische Durchflusszytometrie klinischen Einsatz (Campana, 2009). In einer aktuellen Untersuchung von Basso *et al.* konnte im Rahmen der internationalen ALL-BFM-Studiengruppe gezeigt werden, dass Patienten mit mehr als 10% Blasten am Tag 15 (durchflusszytometrische Analyse) ein signifikant erhöhtes Rezidiv-Risiko besitzen (Basso *et al.*, 2009). Aus diesem Grund soll die durchflusszytometrische MRD-Bestimmung am Tag 15 bereits in die Nachfolgestudie von ALL-BFM 2000 integriert werden und die PCR-basierte Stratifizierung ergänzen.

1.2 Molekulare Grundlagen der antileukämischen Therapie

1.2.1 Molekulare Zielstrukturen der Therapeutika

1.2.1.1 Glucocorticoide

Die natürlich vorkommenden Glucocorticoide (GC) wie Cortisol leiten sich vom Cholesterol ab und werden in der Nebennierenrinde gebildet. Sie zählen zu den Steroidhormonen und haben pleiotrope physiologische Funktionen. GC beeinflussen den Kohlenhydrat-, Protein- und Fettstoffwechsel, sind an Immun- und Entzündungsreaktionen beteiligt und regulieren zelluläre Funktionen wie Wachstum, Proliferation und Zelltod (Geley *et al.*, 1996).

Die Entwicklung von ersten Syntheseverfahren in den 1940er Jahren führte dazu, dass GC aufgrund ihres breiten Wirkungsspektrums zunehmend Anwendung als Therapeutika fanden. Sie waren 1950 neben Folsäureantimetaboliten die ersten Therapeutika, deren Applikation zu einer temporären Remission bei Patienten mit ALL führte (Pearson *et al.*, 1950). Zu den synthetischen GC zählen sowohl Prednisolon als auch Dexamethason. Es handelt sich um chemisch modifizierte Formen des Cortisols mit einer höheren Spezifität zum Glucocorticoidrezeptor (GR) (Mutschler *et al.*, 2001).

Aufbau und Regulation des Glucocorticoidrezeptors

Der GR fungiert als Transkriptionsfaktor und ist für die Ausführung der GC-Wirkung auf molekularer Ebene verantwortlich. Er gehört zur Familie der nukleären Rezeptoren, genauer zur Subfamilie der Steroidhormonrezeptoren. Diese Rezeptoren besitzen alle eine evolutionär konservierte Domänenstruktur und haben sich vermutlich durch multiple Genduplikationen entwickelt (Thornton, 2001). Die dreiteilige Struktur des GR besteht aus einer DNA-Bindungs-, einer Liganden-Bindungs- und einer Aktivierungsdomäne (Abb. 5).

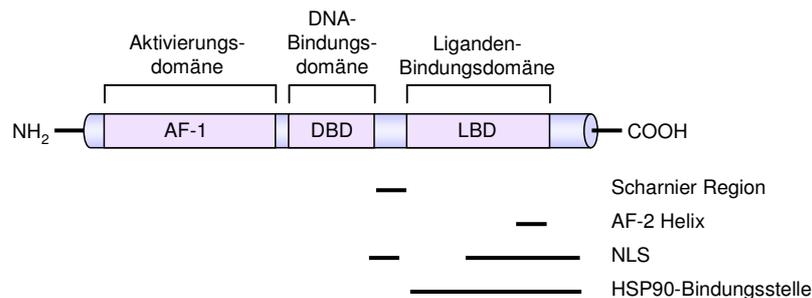


Abb. 5: Struktur des Glucocorticoidrezeptors (modifiziert nach Bledsoe *et al.*, 2002).

AF, Aktivierungsfunktion; *NLS*, nukleäre Lokalisationssequenz; *HSP90*, Hitzeschockprotein 90.

Die Aktivierungsdomäne AF-1 befindet sich am N-Terminus und vermittelt Wechselwirkungen mit Kinasen und Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie, die die Initiierung der Transkription bewirken (Hittelman *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2004). Die zentral lokalisierte DNA-Bindungsdomäne enthält zwei hochkonservierte Zinkfinger-Motive. Sie bestimmt die Bindung des GR an spezifische Erkennungssequenzen in den regulatorischen Bereichen der Zielgene und ermöglicht dessen Dimerisierung (Freedman *et al.*, 1988; Kumar *et al.*, 2005). Am C-Terminus ist die Liganden-Bindungsdomäne lokalisiert. Sie besteht aus α -Helices und β -Faltblattstrukturen, die eine hydrophobe Tasche bilden, in der die Ligandenbindung stattfindet (Bledsoe *et al.*, 2002). Darüber hinaus beinhaltet die C-terminale Domäne eine nukleäre Lokalisationssequenz und eine zweite Aktivierungsdomäne (AF-2), die für die ligandenabhängige Regulation der Transkription von Bedeutung ist (Freedman, 1999). Der Bereich zwischen DNA-Bindungsdomäne und Liganden-Bindungsdomäne wird als Scharnierregion bezeichnet und enthält eine zweite nukleäre Lokalisationssequenz (Bledsoe *et al.*, 2004).

Die Regulation der Aktivität des GR ist komplex und erfolgt auf verschiedenen Ebenen von Transkription und Translation. Eine sowohl positive als auch negative Autoregulation des GR konnte für verschiedene Zellsysteme gezeigt werden. Sie beruht auf Wechselwirkungen des GR mit der mRNA und den regulatorischen Bereichen des eigenen Gens (Gross *et al.*, 2009). Aufgrund von alternativem Spleißen existieren neben dem prädominierenden GR α weitere vier Isoformen. Ihre Expression ist allerdings gering und die physiologischen Funktionen sind

weitgehend ungeklärt (Revollo *et al.*, 2009). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass verschiedene posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung, Ubiquitinierung, SUMOylierung) des GR die zelluläre Lokalisation, Interaktionen mit anderen Proteinen und die Halbwertszeit beeinflussen können (Duma *et al.*, 2006).

Die Glucocorticoidrezeptor-vermittelte Signaltransduktion

GC sind kleine lipophile Moleküle, die in erster Linie gebunden an Albumin oder Corticosteroid-bindenden Globulinen durch den Blutkreislauf transportiert werden. Aufgrund ihres hydrophoben Charakters können sie als freie Moleküle passiv durch die Doppelmembran von Zellen diffundieren und im Zytoplasma mit dem ubiquitär verbreiteten GR assoziieren (Breuner *et al.*, 2002; Revollo *et al.*, 2009; Richard *et al.*, 2010).

Der GR liegt im Zytosol inaktiv als Multiproteinkomplex gebunden vor (Abb. 6). An der Komplexbildung beteiligt sind Immunophiline und Hitzeschockproteine, die als Chaperone fungieren, um den GR in seiner optimalen Konfiguration zur Ligandenbindung zu stabilisieren und vor proteasomalem Abbau zu schützen (Pratt *et al.*, 2003). Die Bindung des Liganden führt zu einer Konformationsänderung des GR und der Dissoziation des Hitzeschockprotein (HSP)-Komplexes. Dieser Prozess bewirkt die Exposition der nukleären Lokalisationssequenzen, die mit dem Importin-System interagieren können, das den nukleären Transport in den Zellkern vermittelt (Savory *et al.*, 1999; Revollo *et al.*, 2009). Im Zellkern reguliert der GR die Expression von Zielgenen durch direkte DNA-Bindungen oder Wechselwirkungen mit anderen Transkriptionsfaktoren (Abb. 6).

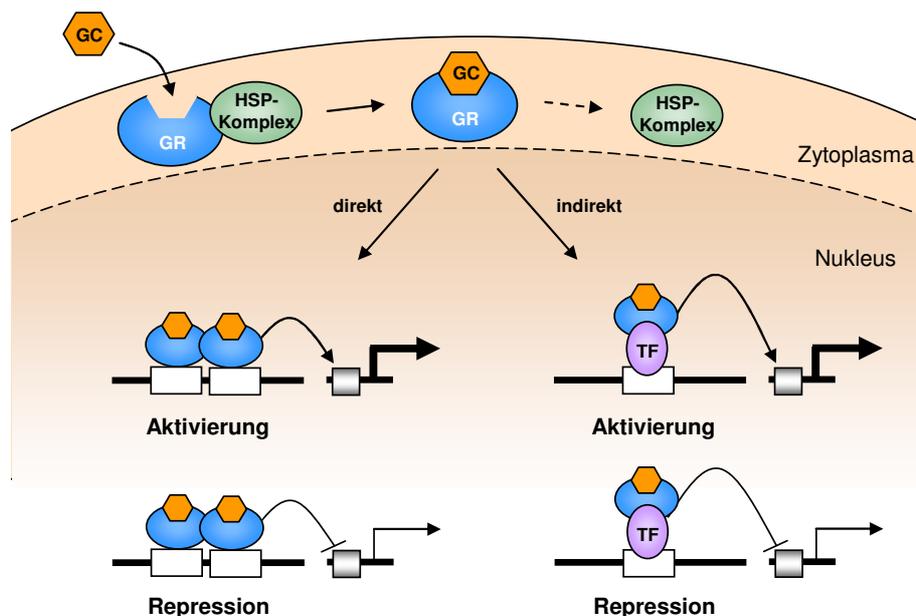


Abb. 6: Regulatorische Funktionen des GR.

*Der GR kann direkt oder indirekt mit regulatorischen Elementen von Zielgenen interagieren und damit zur Aktivierung oder Repression der Transkription beitragen.
TF, Transkriptionsfaktor.*

Die Bindung des GR an die DNA erfolgt über spezifische Sequenzmotive. Sie werden als *Glucocorticoid Responsive Elements* (GREs) bezeichnet und sind in den regulatorischen Bereichen der Zielgene lokalisiert. Die Konsensussequenz der GREs ist ein imperfektes Palindrom, das die Bindung des GR als Homodimer ermöglicht. Neben den einfachen GREs gibt es noch Halbseitige GREs (GRE1/2s) und negative regulatorische Sequenzen (nGREs) (Schoneveld *et al.*, 2004).

Die Bindung des GR an positive GREs führt zur direkten Induktion der Transkription von Zielgenen (wie der Serin/Threonin-Proteinkinase SGK1) (Schoneveld *et al.*, 2004). Die Wechselwirkungen des GR mit der DNA können aber auch Modulationen der Chromatinstruktur bewirken, wodurch die Bindung zusätzlicher Transkriptionsfaktoren in unmittelbarer Nähe ermöglicht wird (Deroo *et al.*, 2001). Die Verbunde aus regulatorischen Sequenzen von kooperierenden Transkriptionsfaktoren und GREs werden als *Glucocorticoid Responsive Units* (GRUs) bezeichnet. Sie sind für eine effiziente Transkription bestimmter Zielgene essentiell und konnten unter anderem bei Genen identifiziert werden, die für Schlüsselenzyme des Glucosestoffwechsels kodieren (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und 6-Phosphofructo-2-Kinase) (Schoneveld *et al.*, 2004).

Die Bindung des GR an negative GREs inhibiert die Transkription. Dies kann zum Beispiel durch Modulierung der Chromatinstruktur oder sterische Hinderung anderer Transkriptionsfaktoren und der Transkriptionsmaschinerie erfolgen (Edwards *et al.*, 2007; Islam *et al.*, 2008).

Wesentliche Wirkungen des GR basieren aber auf direkten Wechselwirkungen mit anderen Transkriptionsfaktoren und scheinen keine DNA-Bindung zu erfordern. Der modulierende Einfluss des GR auf Transkriptionsfaktoren kann sowohl zur Transaktivierung als auch zur Transrepression führen und ist insbesondere für die antiinflammatorische Wirkung der GC verantwortlich. Diesbezüglich konnte zum Beispiel eine repressive Wirkung des GR auf die Zielgene der proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren NF- κ B (*Nuclear Factor kappa-B*) und AP-1 (*Activator Protein 1*) beschrieben werden (Schoneveld *et al.*, 2004).

Vom zellulären Kontext abhängig werden spezifische GR-vermittelte Signalwege aktiviert, die unterschiedlichen Einfluss auf Proliferation und Zelltod haben. In Erythroblasten, neutrophilen Granulozyten und verschiedenen nichthämatologischen Geweben besitzen GC eine antiapoptotische Wirkung, wohingegen sie in lymphatischen Systemen den Zelltod induzieren können (Schmidt *et al.*, 2004). Die Grundlagen der GC-spezifischen antiproliferativen und zytotoxischen Wirkung sind in 1.2.2 und 1.2.4 ausführlich dargestellt.

1.2.1.2 Zytostatika

Die onkologische Chemotherapie hat das Ziel, maligne Zellen abzutöten, ohne andere Körperzellen zu schädigen. Als Diskriminierungsmerkmal für die Therapie dient historisch die erhöhte Proliferationsrate der malignen Zellen. Die klassischen Zytostatika sind daher in erster Linie natürliche oder synthetische Substanzen, die mit der DNA-Replikation oder dem Stoffwechsel interferieren, um die Zellteilung bzw. das Zellwachstum zu inhibieren. Sie lassen sich anhand ihrer Wirkstoffklasse einteilen. Bei der antileukämischen Therapie kommen Zytostatika wie *Antimetabolite*, *Alkylantien*, *Antibiotika* und *Alkaloide* zum Einsatz, deren primäre Zielstrukturen in Abb. 7 dargestellt sind.

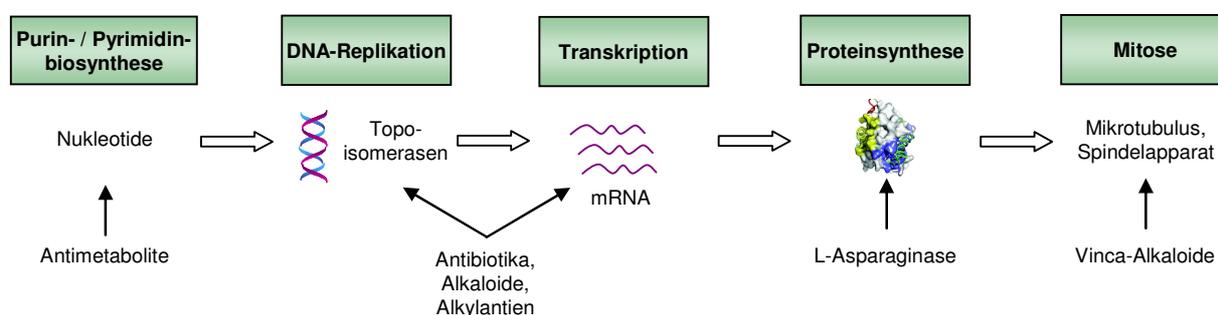


Abb. 7: Zielstrukturen klassischer Zytostatika (modifiziert nach Kager *et al.*, 2006).

Zytostatische *Antimetabolite* (6-Mercaptopurin, Methotrexat, Cytarabin) sind Strukturanaloga von essentiellen Kofaktoren und Intermediärprodukten bei der DNA-Synthese. Sie wirken als kompetitive Hemmstoffe bei der Nukleotidbiosynthese oder werden in die DNA eingebaut, wodurch die weitere Replikation inhibiert wird (Mutschler *et al.*, 2001).

Alkylantien (Cyclophosphamid) sind reaktionsfähige Verbindungen, die als Prodrugs appliziert werden, um im Organismus in die eigentliche Wirkform umgewandelt zu werden. Es handelt sich im Allgemeinen um bifunktionelle Zytostatika, die unspezifisch von der Zellzyklusphase agieren und zu DNA-Zwischenstrang- und Proteinvernetzungen führen. Sie stören damit sowohl die DNA-Replikation als auch die Transkription (Kager *et al.*, 2006).

Zu den zytostatisch wirksamen *Antibiotika* zählen unter anderem die aus Streptomyceten isolierten Anthracycline (wie Doxo- und Daunorubicin). Ihre Wirkung beruht primär auf der Interkalation in die DNA, wodurch die Aktivität von DNA- und RNA-Polymerasen inhibiert wird. Sie binden aber auch an Bestandteile (Phospholipide, Proteine) von Zellmembranen und erhöhen damit deren Permeabilität und Fluidität. Darüber hinaus induzieren Anthracycline DNA-Doppelstrangbrüche, die auf ihre Biotransformation in freie Radikale und die Inhibition der Topoisomerase II zurückzuführen sind (Mutschler *et al.*, 2001). Topoisomerasen sind Enzyme, die die Verdrillung der DNA während der Replikation und Transkription regulieren,

indem sie transiente Strangbrüche induzieren. Neben den Anthracyclinen sind insbesondere *Alkaloide* (wie das halbsynthetisch hergestellte Etoposid) wichtige Hemmstoffe von Topoisomerasen. Sie wirken zytotoxisch, in dem sie den Komplex von Topoisomerase und DNA stabilisieren, was zu dauerhaften Strangbrüchen führt (Mutschler *et al.*, 2001).

Vinca-Alkaloide (Vincristin) bewirken eine Blockade der Mitose. Bei hohen Konzentrationen assoziieren sie nach aktivem Transport in die Zelle an das Zytoskelettprotein Tubulin, wodurch die Polymerisation zu Mikrotubuli und damit die Ausbildung des Spindelapparates verhindert wird (Jordan *et al.*, 1991). Bei niedrigeren, klinisch relevanten Konzentrationen beruht die Wirkung der Vinca-Alkaloide hingegen primär auf einer Verminderung der Mikrotubulidynamik (Jordan *et al.*, 2004).

Eine weitere wichtige antileukämische Verbindung ist das Enzym *L-Asparaginase*, dessen Wirkungsmechanismus auf Differenzen im biochemischen Stoffwechselverhalten der Zellen beruht. Im Unterschied zu normalen Zellen können bestimmte Leukämiezellen die Aminosäure Asparagin nicht selber synthetisieren und sind auf die extrazelluläre Zufuhr angewiesen. Mit Hilfe von L-Asparaginase wird Asparagin im Plasma und der Extrazellulärflüssigkeit abgebaut, so dass die leukämischen Zellen im Wachstum inhibiert werden (Mutschler *et al.*, 2001).

Die von den Zytostatika verursachten Zellschäden sind meist nicht akut letal und induzieren stattdessen intrazelluläre Stresssignalwege (Abb. 8). Diese können einen Zellzyklusstopp für notwendige Reparaturen bewirken (Kastan *et al.*, 2004) oder bei irreparablen Schäden einen langzeitigen Zellzyklusarrest bzw. den apoptotischen Zelltod induzieren; Prozesse auf die im Folgenden noch genauer eingegangen wird.

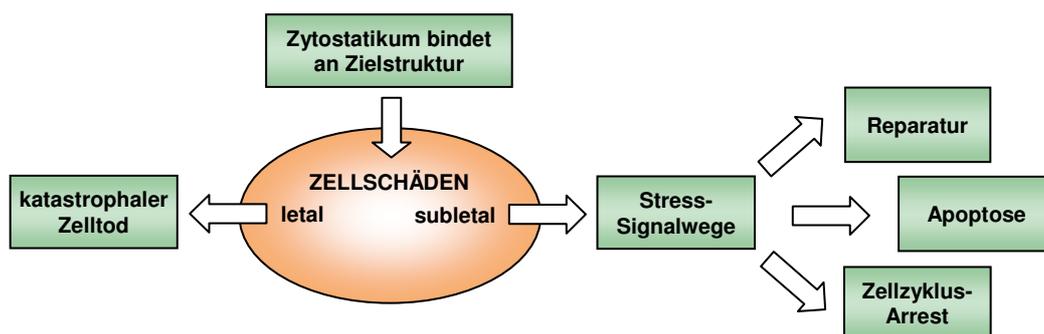


Abb. 8: Mechanismen der zytostatischen Wirkung (modifiziert nach Johnstone *et al.*, 2002).

Die Bindung der Zytostatika an ihre Zielstrukturen in der Zelle kann Schäden verursachen, die durch Stoffwechselfunktionsstörungen direkt zum Zelltod („katastrophaler Tod“) oder der Aktivierung von Stresssignalwegen führen.

1.2.2 Aktivierung der Zellzyklus-Kontrollpunkte

Der Zellzyklus beschreibt die periodisch ablaufenden Prozesse in einer Zelle, die zwischen zwei Zellteilungen stattfinden. Sie führen zur Verdopplung des Genoms und der anschließenden Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen (Lüscher *et al.*, 2006).

In Bezug auf den Zellzyklus befinden sich die meisten Zellen in einem adulten Organismus im Ruhezustand (G₀-Phase). Sie üben stattdessen, die für den Zelltyp spezifischen Stoffwechselfvorgänge aus. Zellzyklus-stimulierende (mitogene) Signale und die Aktivierung von Onkogenen in Tumorzellen ermöglichen den Eintritt in den Zellzyklus (Clark *et al.*, 2000; Massague, 2004). Dort werden vier definierte, aufeinander abfolgende Phasen unterschieden: G₁, S, G₂ und M. Als G₁ und G₂ werden die beiden Zwischenphasen bezeichnet, die die DNA-Synthese (S)- und Kernteilung (Mitose, M)-Phase voneinander trennen. Während der G₁- und G₂-Phase finden unter anderem die Vorbereitungen (Synthesen von Nukleotiden und Proteinen) für die DNA-Replikation und Mitose statt (Lüscher *et al.*, 2006).

Die Regulation des Zellzyklusses wird durch Enzyme vermittelt, die als Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) bezeichnet werden. Sie liegen in der Zelle als inaktive Monomere vor. Die Aktivierung der CDKs erfolgt nach Bindung ihrer regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen (Harper *et al.*, 2001). Für die Progression des Zellzyklusses sind nur bestimmte Komplexe aus CDKs und Cyclinen bedeutsam. Sie werden in der G₁-, S- und G₂-Phase von CDK2, CDK4 oder CDK6 gebildet, in der M-Phase von CDK1 (Abb. 9). Auf Seiten der Cycline sind 10 Moleküle der Familien A, B, D und E beteiligt. Im Gegensatz zu den CDKs selbst besitzen die Cycline eine kurze Halbwertszeit, weshalb ihr Expressionsspiegel während des Zellzyklusses durch Transkription und proteasomalen Abbau oszillieren kann, und sie die CDKs phasenspezifisch aktivieren (Harper *et al.*, 2001). Die CDKs induzieren daraufhin Schlüsselsignale, die das Fortschreiten des Zellzyklusses nach vollständigem Abschluss einer Phase ermöglichen (Lapenna *et al.*, 2009).

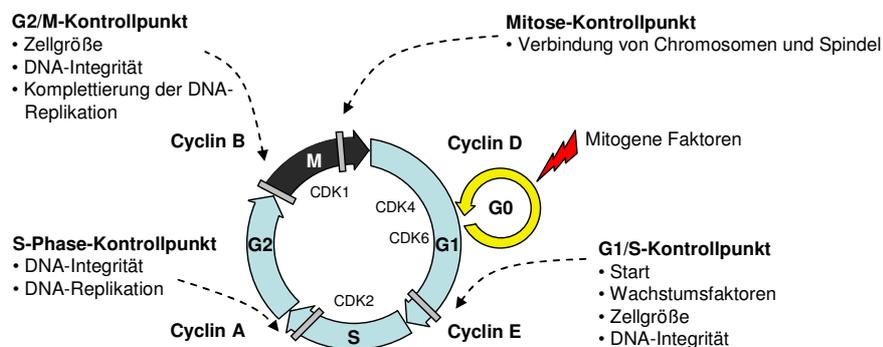


Abb. 9: Regulation des Zellzyklusses.

Mitogene Faktoren bewirken, dass ruhende Zellen (G₀) in den Zellzyklus eintreten können. Dieser wird durch die Komplexe aus Cyclinen und CDKs reguliert. Die Überwachung des Zellzyklusses erfolgt an Kontrollpunkten, die den Zustand der Zelle, insbesondere die DNA-Integrität überprüfen.

Die Überwachung des Zellzyklusses erfolgt an Kontrollpunkten (Abb. 9), die sensitiv für DNA-Schäden und Defekte sind, die bei der DNA-Replikation und Chromosomenseparation auftreten können (Aguilera *et al.*, 2008; Malumbres *et al.*, 2009). Ihre Aktivierung und die Störung des Zellzyklusses sind wichtige Mechanismen der antileukämischen Wirkungen von Zytostatika und GC (Lee *et al.*, 2003; Ausserlechner *et al.*, 2004).

Zytostatika-induzierte Zellschäden, wie die Arretierung der Replikationsgabel und DNA-Strangbrüche, führen zur Aktivierung der DNA-Schädigungskontrolle, die in allen Zellzyklusphasen stattfindet (Abb. 9). Die Kinasen ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) und ATR (*ATM and Rad3 Related*) fungieren dabei als Sensoren, die die Schäden detektieren. Im Zellkern aktivieren sie die Kontrollpunktkinasen CHEK1 und CHEK2 (*CHK checkpoint homologs*), deren Zielstrukturen unter anderem die CDC25 (*Cell Division Cycle 25*)-Phosphatasen sind. Diese werden nach Phosphorylierung aus dem Zellkern exportiert, was zur Inhibition der von ihnen zu aktivierenden Komplexe aus Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen führt, wodurch der Zellzyklus für notwendige Reparaturen arretiert wird (Clarke *et al.*, 2009). Die Kontrollpunktkinasen können darüber hinaus den Tumorsuppressor p53 aktivieren, der seinerseits für die Kontrolle der DNA-Integrität verantwortlich ist. p53 kann als Transkriptionsfaktor die Expression von zellzyklusinhibierenden Genen der CIP/KIP (*CDK Inhibitory Protein/Kinase Inhibitory Protein*)-Familie induzieren und bei nicht-reparablen Schäden den Apoptosesignalweg aktivieren (siehe 1.2.5).

Mitosehemstoffe wie Vinca-Alkaloide vermindern die Mikrotubulidynamik und bewirken damit die Aktivierung des Mitose- (oder Spindel-) Kontrollpunktes (Perez de Castro *et al.*, 2007). Dieser wird von einem Multiproteinkomplex gebildet und besteht aus Mitgliedern der MAD (*Mitotic Arrest Defective*)- und BUB (*Budding Uninhibited by Benzimidazole*)-Genfamilien. Sie sind am Aufbau des Spindelapparates beteiligt und überwachen die chromosomale Integrität. Dabei können sie mit CDC20 einen Aktivator des Anaphase-promovierenden Komplexes (APC/C) inhibieren. APC/C ist für die Induktion der Separation der Schwesterchromatiden verantwortlich. Aufgrund seiner Inhibition werden die Zellen in der Metaphase vor der Trennung der Chromosomen arretiert (Logarinho *et al.*, 2008). Die dauerhafte Aktivierung des Kontrollpunktes durch Mitosehemstoffe wird als Ursache für den von ihnen induzierten Zelltod angenommen (Perez de Castro *et al.*, 2007).

Für GC konnte *in vitro* gezeigt werden, dass sie einen G1-Arrest in leukämischen Zelllinien bewirken (Harmon *et al.*, 1979; Gaynon *et al.*, 1995; Ausserlechner *et al.*, 2004). Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf der GC induzierten Repression von Zellzyklusregulatoren wie c-MYC (*Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*) und Cyclin D3 (Rhee *et al.*,

1995; Ausserlechner *et al.*, 2004). Ihre Supprimierung führt zur Aktivierung des Zellzyklusinhibitors p27^{KIP1} (Ausserlechner *et al.*, 2004), der die Cyclin-aktivierten Komplexe von CDK2 und CDK4 inhibieren kann (Abb. 9), wodurch der Zellzyklus am G1/S-Übergang gestoppt wird (Sheaff *et al.*, 1997; Ray *et al.*, 2009).

1.2.3 Induktion des apoptotischen Zelltodes

1.2.3.1 Definition der Apoptose

Die Apoptose (griechisch für „herabfallen“, in Bezug auf das Laub im Herbst) ist ein evolutionär konserviertes, genetisches Programm, das zu einer kontrollierten aktiven Ausführung der Selbsttötung einer Zelle führt (Danial *et al.*, 2004). Die Begriffe Apoptose und „programmierter Zelltod“ werden deshalb oftmals synonym verwendet, beschreiben aber zwei Prozesse, die nach unterschiedlichen Kriterien definiert werden. Der Begriff programmierter Zelltod gilt für jede Form des Zelltodes, dem ein spezifisches, genetisches Programm zu Grunde liegt. Die Apoptose hingegen beschreibt den Vorgang des Zelltodes selbst, der durch typische morphologische Veränderungen gekennzeichnet ist, die ihn von anderen Formen des Zelltodes, wie Nekrose oder Autophagie, abgrenzen lassen (Kroemer *et al.*, 2009). Zu den morphologischen Kriterien der Apoptose zählen das Abrunden der Zellen, die Reduktion des Zell- und Kernvolumens, die Fragmentierung der nukleären DNA und die Ausbildung von blasenförmigen Ausstülpungen der Zytoplasmamembran. Im finalen Stadium kommt es zur Zellfragmentierung und der Entstehung membranumhüllter Körperchen, deren Morphologie der Apoptose ihren Namen gab. Die apoptotischen Vesikel werden *in vivo* durch Phagozyten internalisiert (Kerr *et al.*, 1972; Cotter, 2009).

Von der Apoptose grundlegend zu unterscheiden ist die Nekrose. Sie ist genetisch nicht determiniert und wird auch als „provozierter Zelltod“ bezeichnet. Ob eine Zelle durch Apoptose oder Nekrose stirbt, wird unter anderem durch die verfügbare Menge an intrazellulärer Energie bestimmt. Die Apoptose benötigt zu ihrer Ausführung eine Mindestmenge an freiem ATP, wohingegen die Nekrose durch eine vollständige ATP-Depletion induziert werden kann (Nicotera *et al.*, 1998). Morphologisch ist für die Nekrose das Anschwellen der Zellen charakteristisch, das zum Aufreißen der Zytoplasmamembran führt, woraus schließlich die Entleerung des gesamten Zellinhaltes resultiert (Kroemer *et al.*, 2009). Die Nekrose ist deshalb *in vivo* meist mit einer inflammatorischen Reaktion verbunden, die bei der Apoptose nur selten zu beobachten ist (Tesniere *et al.*, 2008).

In multizellulären Organismen dient die Apoptose dazu, unerwünschte Zellen sicher zu eliminieren, so dass Strukturen in der direkten Umgebung unbeeinträchtigt bleiben (Taylor *et al.*, 2008). Die Apoptose besitzt damit eine wichtige Rolle bei physiologischen Prozessen wie der Embryonal- und Lymphozytenentwicklung, wo sie am Auf- und Umbau von Geweben bzw. an der Eliminierung von autoreaktiven Zellen mitwirkt (Janeway *et al.*, 1999; Meier *et al.*, 2000). Darüber hinaus ist die Apoptose an der Regulation der Gesamtzellzahl beteiligt, die in adulten Organismen durch ein Gleichgewicht zwischen Zellerneuerung (mitotische Zellteilung) und Zelltod (Entfernung von gealterten oder geschädigten Zellen) konstant gehalten wird. Eine Störung von Apoptose und Zellhomöostase kann zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen und Krebs führen (Cotter, 2009). Die wichtige Bedeutung der Apoptose für physiologische und pathophysiologische Prozesse hat dazu geführt, dass ihre Untersuchung in den Fokus der medizinischen Forschung gerückt ist.

1.2.3.2 Apoptosesignalwege

Die Apoptose umfasst eine Reihe verschiedener molekularer Signalwege, die energieabhängig sind und zeitlich strukturiert ablaufen. Die beiden Hauptsignalwege sind die extrinsische und intrinsische Apoptose (Abb. 10), die sich jeweils in die drei Phasen *Initiierung*, *Entscheidung* und *Ausführung* einteilen lassen (Kroemer *et al.*, 1997; Kroemer *et al.*, 2007).

Die *Initiierungsphase* ist vom Zelltyp und der Art der apoptotischen Stimulanz abhängig. Erfolgt die Initiierung über Todesliganden (z. B. Zytokine der Tumornekrosefaktor (TNF)-Familie), die an ihre kognitiven Oberflächenrezeptoren binden, spricht man vom extrinsischen oder Todesrezeptor-vermittelten Signalweg. Er ist bedeutsam für die Erkennung von Apoptosesignalen aus der Zellumgebung und beispielsweise an der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase von spezifischen Geweben, insbesondere des Immunsystems beteiligt (Danial *et al.*, 2004). Demgegenüber wird die intrinsische Apoptose durch intrazellulär erzeugte Signale eingeleitet. Sie sind unter anderem das Ergebnis von zellulärem Stress, der durch Wachstumsfaktor-Entzug entsteht oder durch die Akkumulation von falsch gefalteten Proteinen und DNA-Schädigungen, die eine Folge der Wirkungen von Zytostatika, reaktiven Sauerstoffspezies und UV-Strahlung darstellen können. Als Stress-Mediatoren fungieren Proteine wie Transkriptionsfaktoren, Kinasen oder Phosphatasen, die die Signale an die Mitglieder der BCL-2 (*B-Cell Lymphoma 2*)-Genfamilie weiterleiten, die für die Kontrolle der Apoptose auf mitochondrialer Ebene verantwortlich ist (Fulda *et al.*, 2006; Kroemer *et al.*, 2007; Youle *et al.*, 2008).

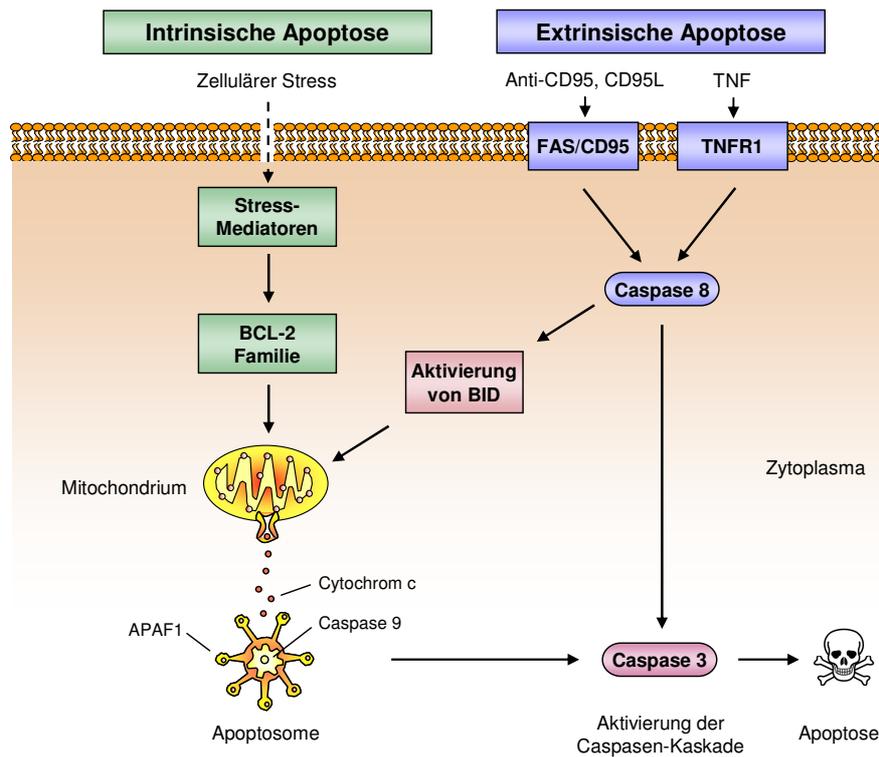


Abb. 10: Intrinsische und extrinsische Apoptose (modifiziert nach Youle *et al.*, 2008).

Apoptose kann durch zellulären Stress (intrinsischer Signalweg) oder durch die Aktivierung eines Todesrezeptors (extrinsischer Signalweg) initiiert werden. Der intrinsische Signalweg wird durch die pro- und antiapoptotischen BCL-2-Familienmitglieder reguliert. Die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran führt zur Cytochrom c-Freisetzung. In der Folge kommt es zur Bildung des Apoptosoms und der Aktivierung der Caspasenkaskade, die für die Ausführung des Zelltodes verantwortlich ist. Der extrinsische Signalweg über Fas/CD95- oder TNF-Rezeptoren führt direkt zur Aktivierung der Caspasen. Caspase-8 kann die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran über das BCL-2-Familienmitglied BID induzieren, wodurch eine direkte Verbindung zum intrinsischen Signalweg hergestellt wird.

Die *Entscheidungsphase* wird durch eine komplexe Kaskade intrazellulärer Ereignisse bestimmt, in deren Mittelpunkt die Mitochondrien stehen (Kroemer *et al.*, 2007). Bei der intrinsischen (mitochondrialen) Apoptose leiten die Mitglieder der BCL-2-Familie pro- und antiapoptotische Signale direkt an die Mitochondrien weiter und regulieren deren Permeabilisierung (siehe 1.2.3.3). Bei einem Übergewicht von proapoptotischen Signalen erfolgt die mitochondriale Freisetzung von apoptogenen Faktoren ins Zytoplasma. Zu ihnen zählt Cytochrom c. Es begünstigt eine ATP/dATP-abhängige Konformationsänderung des apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktors APAF-1, der daraufhin oligomerisieren kann und mit dem Apoptosom einen apoptotischen Signalkomplex bildet. Das Apoptosom aktiviert mit den Caspasen (*Cysteine-Containing Aspartate-Specific Proteases*) eine spezifische Klasse von Proteasen (Abb. 10) (Youle *et al.*, 2008), die beim extrinsischen Signalweg über Adapterproteine der Todesrezeptoren induziert wird. Bei der Aktivierung der Caspasen können sich beide Signalwege überschneiden. Sie stellt eine Entscheidung für den Zelltod dar, die als nicht mehr umkehrbar beschrieben wird (Hengartner, 2000; Kroemer *et al.*, 2007).

Die Caspasen sind für die *Ausführung* der Apoptose verantwortlich, die bei allen apoptotischen Signalwegen mit den gleichen biochemischen und morphologischen Veränderungen einhergeht (Kroemer *et al.*, 2007). Die Caspasen kommen als inaktive Proenzyme mit nur geringer katalytischer Aktivität in fast allen humanen Zellen vor. Ihre Namensgebung beruht auf ihrer Proteolyse-Aktivität, die von einer konservierten Cystein-Seitenkette im katalytischen Zentrum bestimmt wird. Sie besitzen eine stringente Spezifität für bestimmte Tetrapeptidmotive, an deren erster Position immer ein Aspartatrest steht, hinter dem das Substrat gespalten wird (Taylor *et al.*, 2008). Die proteolytische Aktivität der Caspasen bewirkt damit gezielte Modifikationen von Proteinen, aber keine Degradation. Ein Beispiel für eine solche Modifikation ist die Aktivierung der Caspasen selbst. Sie weisen Aspartatreste an neuralgischen Positionen ihrer Untereinheiten auf, deren Spaltung zur Dimerisation führt, wodurch das katalytische Zentrum in die aktive Konformation gelangt (Taylor *et al.*, 2008). In Bezug auf die Apoptose lassen sich die Caspasen in Initiatoren (Caspase-2, -8, -9 und -10) und Effektoren (Caspase-3, -6, und -7) gruppieren. Die Initiatoren werden von apoptotischen Signalkomplexen rekrutiert und stellen die Verbindung zwischen Signalweg und Ausführung der Apoptose dar. Sie können sich selbst und die übrigen Caspasen aktivieren. Demgegenüber sind die Effektoren zu keiner Autoregulation befähigt. Sie müssen erst durch die Initiatoren oder andere Effektoren prozessiert werden. Aufgrund der gegenseitigen Aktivierung der Caspasen wird eine Amplifikationskaskade hervorgerufen, die die Ausführung der Apoptose durch die Effektoren bewirkt (Riedl *et al.*, 2007). Von den Effektor-Caspasen werden spezifische Substrate modifiziert, die zur Aktivierung von Endonukleasen, der Inhibition von DNA-Reparaturmechanismen und dem Abbau von Zellstrukturproteinen (Laminin, Fodrin und Gelsolin) führen, wodurch das Sterben der Zelle auf biochemischer und morphologischer Ebene eingeleitet wird (Slee *et al.*, 2001).

1.2.3.3 Regulation der Apoptose auf mitochondrialer Ebene

Mitochondrien sind von einer Doppelmembran umschlossene Zellorganellen, deren Permeabilisierung eine zentrale Funktion bei dem durch GC und Zytostatika induzierten Zelltod einnimmt (Schmidt *et al.*, 2004; Fulda *et al.*, 2006).

Die intakten Mitochondrien repräsentieren das „Kraftwerk“ der Zelle und decken deren Hauptenergiebedarf durch oxidative Phosphorylierung ab. Hierbei ist die innere Mitochondrienmembran von besonderer Bedeutung. Sie ist impermeabel für Ionen und ermöglicht damit den Aufbau eines Protonengradienten durch die Enzymkomplexe (I bis IV) der Atmungskette (Abb. 11). Aus dem Protonengradienten resultiert das mitochondriale Transmembranpotential, das die ATP-Synthase zur ATP-Gewinnung antreibt (Mitchell *et al.*,

1965; Alberts *et al.*, 2008). Der Transport des ATP ins Zytoplasma erfolgt durch Kanäle (wie den *Voltage Dependant Anion Channels*, VDAC) in der äußeren mitochondrialen Membran, die den Austausch von Metaboliten mit dem Zytoplasma ermöglichen (Rostovtseva *et al.*, 2008).

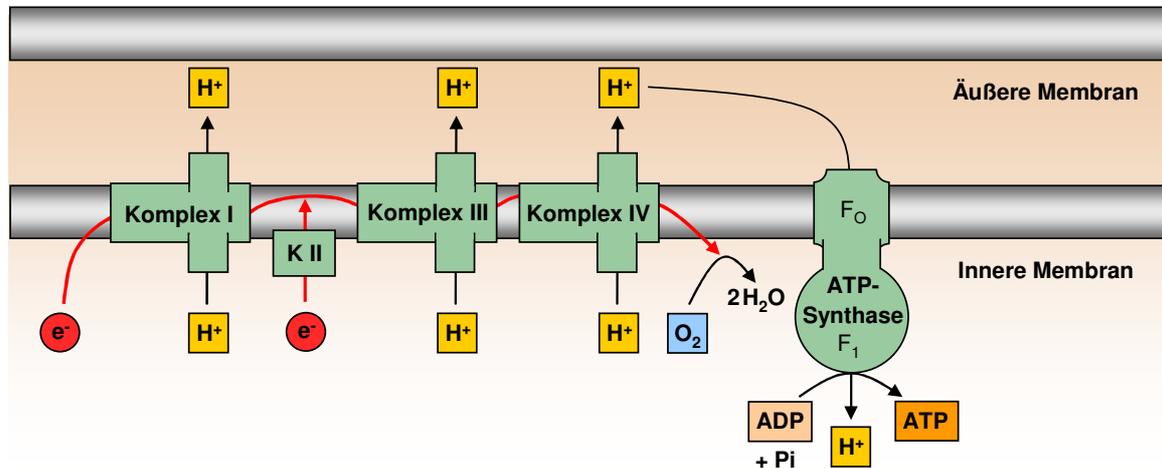


Abb. 11: Oxidative Phosphorylierung (modifiziert nach Alberts *et al.*, 2008).

Die bei der Oxidation von Nährstoffen gewonnenen Elektronen werden durch die Enzymkomplexe I bis IV der Atmungskette auf Sauerstoff übertragen. Dabei wird ein Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran aufgebaut, der die ATP-Synthase zur ATP-Gewinnung antreibt.

Für die Stresssensitivität der Mitochondrien ist die Permeabilität der äußeren Membran verantwortlich (Kroemer *et al.*, 2007). Sie wird durch die pro- und antiapoptotischen Mitglieder der BCL-2-Familie reguliert. Die Mitglieder der Genfamilie weisen mindestens eine von vier evolutionär konservierten BCL-2-Homologie (BH)-Domänen auf und lassen sich in drei Subfamilien untergliedern (Abb. 12). Eine Subfamilie bilden die antiapoptotischen BCL-2-Moleküle, zu denen BCL-2 selbst sowie BCL-XL zählen. Die proapoptotischen Familienmitglieder werden anhand der Anzahl der BH-Domänen in BH3-only- und Multidomänen-Moleküle unterteilt, zu deren wichtigsten Vertretern BAX (*BCL-2 Associated X Protein*) und BAK (*BCL-2 Homologous Antagonist/Killer*) zählen (Lessene *et al.*, 2008). Einige BCL-2-Familienmitglieder sind zusätzlich mit einer hydrophoben C-terminalen Transmembrandomäne ausgestattet, die die Verankerung in die äußere Membran ermöglicht (Abb. 12). In gesunden Zellen sind BAK und die antiapoptotischen Moleküle an der äußeren Membran lokalisiert. Bei BAX wird die Transmembrandomäne hingegen durch die Konformation von BH123 verdeckt, weshalb es sich hauptsächlich im Zytosol befindet. (Youle *et al.*, 2008).

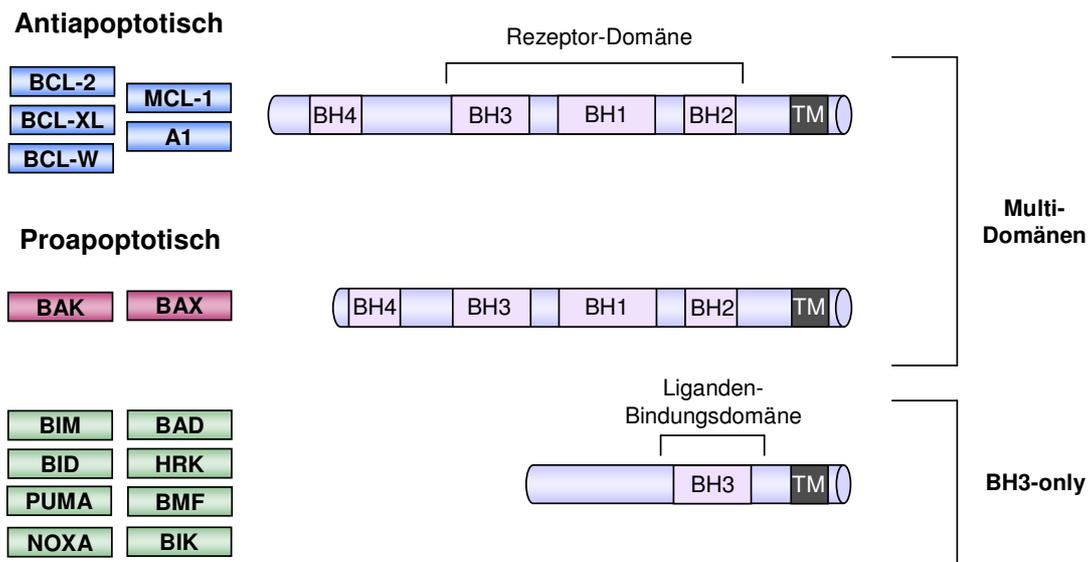


Abb. 12: Mitglieder der BCL-2-Familie (modifiziert nach Lessene *et al.*, 2008).

Die Definition der BCL-2-Familienmitglieder erfolgt strukturell anhand der vier konservierten BCL-2-Homologiedomänen (BH1-4) und funktionell durch ihre Fähigkeit, Apoptose zu inhibieren oder zu induzieren.

Die BH3-only-Proteine verteilen sich in der gesamten Zelle und übertragen Signale von Zelldefekten an die Mitochondrien. Abhängig von der Art der apoptotischen Stimulanz und dem zellulären Kontext werden die Todessignale der BH3-only-Proteine von den antiapoptotischen Mitgliedern neutralisiert oder an die Effektoren BAX und BAK weitergeleitet (Walensky, 2006). BAX und BAK sind zur Porenbildung befähigt und können die Permeabilisierung der äußeren Membran bewirken. In der Folge kommt es zum Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials und der Freisetzung von apoptogenen Faktoren, die die Maschinerie zur Ausführung der Apoptose aktivieren (Kroemer *et al.*, 2007).

1.2.4 Determinanten der Glucocorticoid-Sensitivität bei der ALL

In der Mitte des 20. Jahrhunderts konnte gezeigt werden, dass die Nebennierenrinde und die von ihr gebildeten GC einen lytischen Effekt auf Lymphozyten besitzen und die Transplantierbarkeit von lymphoblastischen Leukämien in Ratten inhibieren (Dougherty *et al.*, 1943; Murphy *et al.*, 1944). Die anschließende klinische Anwendung der GC bei der ALL führte zur Induktion von hohen Remissionsraten. Aber nicht alle Patienten reagieren auf die GC-Therapie (Gaynon *et al.*, 1995). Eine GC-Resistenz ist der Grund dafür, dass im Rahmen der ALL-BFM-Studie ca. 10% der Patienten nicht oder nur ungenügend auf die GC-Vorphase mit Prednison ansprechen. Die Prednison-Poor-Response ist ein Indikator für eine Multiresistenz der ALL-Zellen und mit einem erhöhten Rezidivrisiko assoziiert (Schrappe *et al.*, 2006; Moricke *et al.*, 2008).

Die molekularen Determinanten der GC-Wirkung und -Resistenz sind trotz umfangreicher Untersuchungen bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt (Gross *et al.*, 2009). Für verschiedene *In-vitro*-Zellsysteme konnte aber gezeigt werden, dass GC bei der ALL sowohl einen Zellzyklusarrest als auch Apoptose induzieren können (Ausserlechner *et al.*, 2004; Frankfurt *et al.*, 2004). Diese antileukämischen Wirkungen werden durch den GR vermittelt (Schmidt *et al.*, 2004).

Um zu untersuchen, ob die genetische Variabilität des GR zum differentiellen Therapieansprechen beiträgt, wurde das GR-Gen bei 57 ALL-Patienten sequenziert (Tissing *et al.*, 2005a). Hierbei konnten keine somatischen Mutationen identifiziert werden. Die genetische Variabilität beruhte stattdessen auf DNA-Polymorphismen im Genlocus, die aber nicht mit dem *In-vitro*-Ansprechen auf GC assoziiert waren (Tissing *et al.*, 2005a)

Abgesehen von der Integrität des GR ist die verfügbare Menge an GR-Molekülen bestimmend für die GC-Wirkung (Vanderbilt *et al.*, 1987). Die Anzahl der Rezeptoren kann durch eine GC-induzierte Autoinduktion erhöht werden. Der GR besitzt dafür Bindungsstellen in den regulatorischen Bereichen des eigenen Gens (Vanderbilt *et al.*, 1987; Breslin *et al.*, 2001). Für GC-sensitive Myelom- und T-Zelllinien konnte die Autoregulation des GR auf mRNA-Ebene und Proteinebene demonstriert werden (Eisen *et al.*, 1988; Gomi *et al.*, 1990; Tonko *et al.*, 2001). Resistente Zelllinien hingegen sind nicht zur Autoregulation befähigt, weshalb postuliert wurde, dass die Autoinduktion des GR eine Voraussetzung für die GC-induzierte Apoptose darstellen könnte (Schmidt *et al.*, 2004; Ploner *et al.*, 2005). Eine direkte Kopplung mit dem Ansprechen auf die GC-Therapie konnte an primären ALL-Zellen aber nicht bestätigt werden (Schmidt *et al.*, 2006; Tissing *et al.*, 2007).

Neben dem funktionellen GR α existieren mehrere Isoformen, die unter anderem aus alternativem Spleißen hervorgehen (Gross *et al.*, 2009). Die Isoformen sind teilweise nicht zur Ligandenbindung fähig oder besitzen eine geringere transkriptionelle Aktivität als die α -Form (Gross *et al.*, 2009). Aus diesem Grund wurde lange über eine inhibitorische Funktion bestimmter Isoformen spekuliert, die für die GC-Resistenz von Bedeutung sein könnte. In einer aktuellen Studie von Tissing *et al.* konnte dieser Zusammenhang aber nicht bestätigt werden, weshalb man heute davon ausgeht, dass die verschiedenen Isoformen nur eine untergeordnete Bedeutung für die GC-Sensitivität besitzen (Tissing *et al.*, 2005b).

Die Analysen des GR deuten insgesamt darauf hin, dass auch in resistenten ALL-Zellen eine generelle Funktionalität des Rezeptors gegeben ist. Daher könnte man erwarten, dass Unterschiede im Therapieansprechen in erster Linie auf der differentiellen transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen beruhen.

Mit Hilfe von DNA-Mikroarrays wurden GC-induzierte Genexpressionsveränderungen in verschiedenen *In-vitro*-Zellsystemen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass der Crosstalk des GR mit anderen Transkriptionsfaktoren zu komplexen Genexpressionsmustern führt, die vom zellulären Kontext bestimmt werden (Schmidt *et al.*, 2004). Zu den wenigen gemeinsamen GC-Zielgenen zählen Zellzyklusregulatoren wie BTG2 (*B-Cell Translocation Gene 2*) und c-MYC (Schmidt *et al.*, 2004). Ihre GC-modulierte Expression führt zur Induktion eines Zellzyklusarrestes, der in den meisten Zellsystemen beobachtet werden kann (Geley *et al.*, 1996).

Der Mechanismus des GC-induzierten Zelltodes wurde an verschiedenen Modellsystemen untersucht. Dazu zählen APAF-1-, Caspase-9-, BAX- und BAK-defiziente Mäusen, für die gezeigt werden konnte, dass der GC-induzierte Zelltod von Thymozyten auf mitochondrialer Ebene reguliert wird (Cecconi *et al.*, 1998; Hakem *et al.*, 1998; Rathmell *et al.*, 2002). Ein kausaler Zusammenhang zwischen GC-Wirkung und der Expression von BCL-2-Familienmitgliedern konnte auch für leukämische Zelllinien bestätigt werden (Ploner *et al.*, 2007). Trotzdem sind bei einer genomweiten Genexpressionsanalyse von primären ALL-Zellen *in ex vivo* keine direkten pro- oder antiapoptotischen GC-Zielgene identifiziert worden (Tissing *et al.*, 2007). Der genaue molekulare Mechanismus des GC-induzierten Zelltodes bleibt damit weiterhin unklar.

Die meisten Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der GC finden *in vitro* oder an Mausmodellen statt. Vor dem Hintergrund der gewebespezifischen pleiotropen Eigenschaften der GC könnten aber gerade *In-vivo*-Untersuchungen neue grundlegende Erkenntnisse zum Wirkungsmechanismus liefern. *In-vitro*-Studien haben nämlich den Nachteil, dass *In-vivo*-Wechselwirkungen der ALL-Zellen mit der Mikroumgebung nicht berücksichtigt werden. GC beeinflussen nachgewiesenermaßen aber auch Stromazellen. Aufgrund ihrer antiinflammatorischen Wirkung können sie die Zytokinsynthese des Stromas reprimieren und modulierenden Einfluss auf die Zelladhäsion nehmen (Pitzalis *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2005). Direkte Stroma-Zell-Kontakte und Zytokine vermitteln wichtige Überlebenssignale für Leukämiezellen (Shah *et al.*, 1998). Ihre Repression wird daher als indirekter Mechanismus der antileukämischen Wirkung von GC diskutiert (Karawajew *et al.*, 2000). Infolgedessen ist eine *In-vivo*-Untersuchung der GC-Therapie von besonderem Interesse, um die molekularen Mechanismen von GC-Wirkung und -Resistenz besser zu verstehen.

1.2.5 Die Aktivierung des p53-Signalweges als zentraler Mechanismus der Zytostatikasensitivität

Zytostatika-induzierter zellulärer Stress führt zur Aktivierung von Zellzyklus-Kontrollpunkten, DNA-Reparatur und/oder Apoptose. In der Regulation dieser Prozesse nimmt das p53-Signalsystem eine besondere Position ein. Der Tumorsuppressor p53 fungiert vor allem als Sensor, der die Stresssignale akkumuliert und den Grenzwert für die Apoptoseinduktion bestimmt (Slee *et al.*, 2004). Diesbezüglich reguliert er als Transkriptionsfaktor die Expression zellzyklusemmender und zelltodfördernder Gene. Der p53-Signalweg kann somit einerseits die Arretierung des Zellzyklusses zur Reparatur geschädigter Zellen veranlassen und andererseits bei irreparablen Schäden einen langzeitigen Zellzyklusarrest oder den Zelltod induzieren (Menendez *et al.*, 2009).

p53 weist unter normalen Bedingungen nur eine kurze Halbwertszeit auf. Seine Stabilität wird im Rahmen eines negativen Rückkopplungsmechanismus durch die E3-Ubiquitin (Ub)-Ligase MDM2 (*Murine Double Minute 2*) reguliert, die durch p53 selbst transkriptionell aktiviert werden kann. MDM2 bindet an p53, um es mit Ubiquitin zu markieren und dem proteasomalen Abbauweg im Zytoplasma zuzuführen (Toledo *et al.*, 2006). Die stressinduzierte Aktivierung von p53 erfolgt primär durch posttranslationale Modifikationen. Hierbei dienen stressinduzierbare Kinasen (ATM, ATR, CHEK1 und CHEK2) als Mediatoren, die p53 phosphorylieren. In der Folge kommt es zu Konformationsänderungen, die die Affinität zu MDM2 reduzieren. Die nachfolgende Akkumulation von p53 im Zellkern stellt den entscheidenden Schritt bei der Aktivierung des Signalweges dar. Sie führt zur Tetramerisierung des Tumorsuppressors, wodurch das nukleäre Exportsignal konformationsbedingt verdeckt wird (Toledo *et al.*, 2006). Histon-Acetyltransferasen dienen als Koaktivatoren, die p53 acetylieren und damit seine Bindungsspezifität und die Transkription der Zielgene verstärken (Abb. 13) (Toledo *et al.*, 2006).

Eine MDM2 und Ubiquitin unabhängige Ebene der Regulation der p53-Stabilität scheint über die NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase NQO1 vermittelt zu werden. Sie bindet in Gegenwart von NADH verstärkt an p53 und stabilisiert es gegen eine Degradation durch den katalytischen 20S-Kernkomplex des Proteasoms, der in der Zelle auch ohne regulatorische Untereinheit vorliegen kann (Asher *et al.*, 2005). Die Regulation von p53 durch eine Oxidoreduktase trägt vermutlich auch zu seiner Aktivierbarkeit durch reaktive Sauerstoffspezies bei (Liu *et al.*, 2008). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass in NQO1-überexprimierenden Zellen die Akkumulation von p53 in Gegenwart von reaktiven Sauerstoffspezies verstärkt wird (Asher *et al.*, 2002).

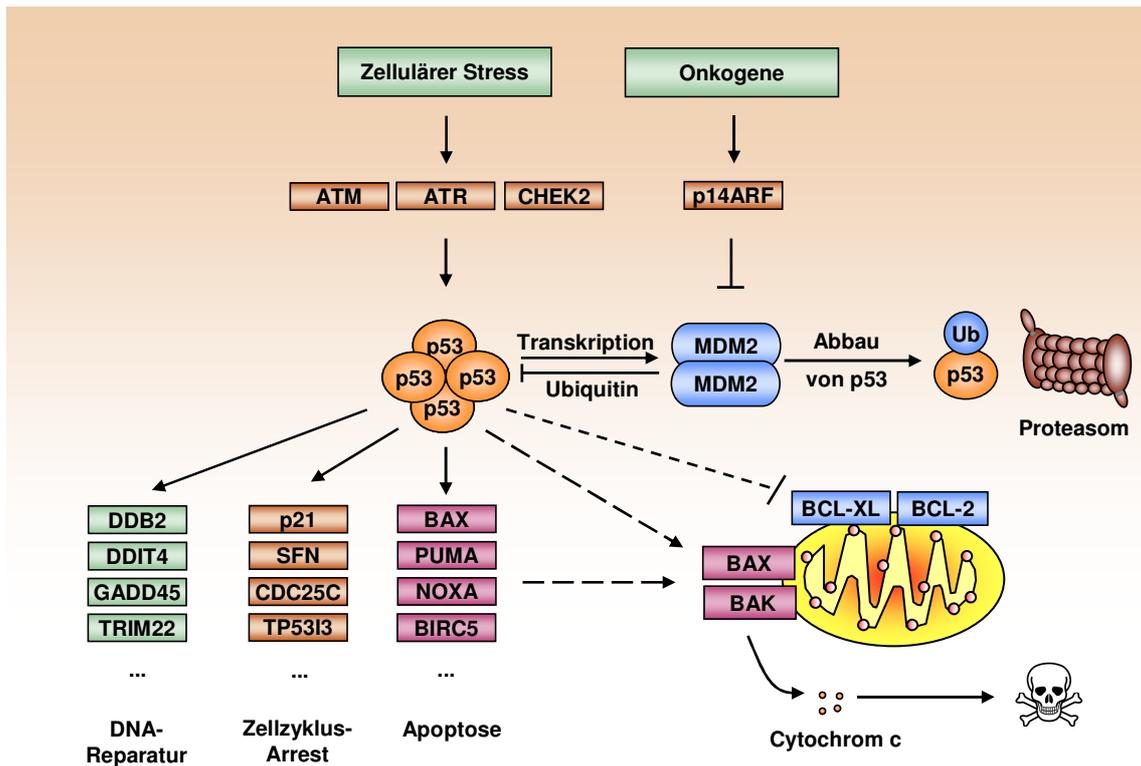


Abb. 13: Aktivierung des p53-Signalweges (modifiziert nach Riley *et al.*, 2008).

Zellulärer Stress und die deregulierte Aktivierung von Onkogenen führen zur Induktion von Signalmediatoren, die p53 stabilisieren und vor dem MDM2-vermittelten proteasomalen Abbau schützen. Das aktivierte p53 kann als Transkriptionsfaktor fungieren und die Expression von Genen der DNA-Reparatur, des Zellzyklusses und der Apoptose regulieren. Ist p53 außerhalb des Nukleus lokalisiert, kann es zudem direkte Interaktionen mit Multidomänen-Mitgliedern der BCL-2-Familie eingehen und zur Neutralisierung von BCL-2 und BCL-XL oder der Aktivierung von BAX und BAK beitragen (Zhivotovsky *et al.*, 2004).

Zu den bedeutendsten Zielgenen, die p53 direkt aktivieren kann, zählt der zur CIP/KIP-Familie gehörende Zellzyklusregulator p21 (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A*) (Zhivotovsky *et al.*, 2004). p21 inhibiert die Komplexe aus Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen durch direkte Wechselwirkungen, wodurch die Zellen am G1/S- oder G2/M-Übergang für die DNA-Reparatur gestoppt werden (Vogelstein *et al.*, 2000). Die Aufrechterhaltung eines G2-Arrestes kann durch das Protein 14-3-3 δ erfolgen, das den nukleären Export des Cyclin B-CDK1-Komplexes durchführt und dessen Expression ebenfalls durch p53 reguliert wird (Chan *et al.*, 1999). Im Mittelpunkt der p53-gesteuerten Apoptose durch Zytostatika wie Etoposid und Anthracycline steht das proapoptotische Effektormolekül BAX, das die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran bewirkt. Für verschiedene Zellsysteme konnte gezeigt werden, dass p53 die Expression von BAX direkt induzieren kann (Miyashita *et al.*, 1995; McCurrach *et al.*, 1997). Diese Abhängigkeit spiegelt sich auch bei ALL-Zelllinien wider, bei denen die BAX-Expression nach DNA-Schädigung mit p53-Status und Apoptosesensitivität korreliert (Findley *et al.*, 1997).

Die Interferenz von p53 mit anderen Transkriptionsfaktoren kann zusätzlich zur Repression von zellzyklusfördernden (*Cyclin A*, *CDC25C*, *CDK1*) und apoptoseinhibierenden Genen (*BCL2*) beitragen (Riley *et al.*, 2008). Darüber hinaus wird auch von zytoplasmatischen Funktionen des Tumorsuppressors berichtet, die auf direkte Interaktionen mit Multidomänen-Mitgliedern der BCL-2-Familie zurückzuführen sind. Sie tragen zur Neutralisierung der antiapoptotischen Moleküle BCL-2 und BCL-XL bei oder induzieren die Aktivierung der proapoptotischen Effektoren BAX und BAK (Green *et al.*, 2009). Welche molekularen Faktoren das Ziel der Stressantwort von p53 sind, ist vom zellulären Kontext und der Stressart abhängig und führt zur Aktivierung unterschiedlicher nachgeschalteter Signalwege (Zhao *et al.*, 2000).

Die zentrale Stellung von p53 bei der Kontrolle von Zellzyklus, DNA-Reparatur und Apoptose ist ein Grund dafür, dass seine Inaktivierung zur Genese und Therapieresistenz von Krebserkrankungen beiträgt (Bell *et al.*, 2007). Sie ist meist eine Folge von Mutationen im p53-Genlocus, die bei etwa 50% aller Krebsfälle auftreten. Bei den genetischen Veränderungen handelt es sich im Wesentlichen um monoallelische Missensemutationen (mehr als 70%), die die Expression eines stabilen, aber mutierten Proteins bewirken (Soussi *et al.*, 2001). Sie betreffen oftmals die DNA-Bindungsdomäne und führen zu veränderten Eigenschaften bei DNA-Bindung und Transaktivierung. Das mutierte p53 kann aber weiterhin mit dem Wildtyp-Protein oligomerisieren. Es fungiert damit als dominant negativer Faktor, der das Wildtyp-Protein inhibiert (Brosh *et al.*, 2009). Die veränderten Bindungseigenschaften können außerdem dazu führen, dass das mutierte p53-Protein mit anderen Mitgliedern der p53-Familie (p63, p73) assoziiert und sie inaktiviert (*gain-of-function*), was mit einer Chemoresistenz und schlechter Prognose bei Patienten mit soliden Tumoren einhergeht (Bergamaschi *et al.*, 2003). Bei akuten lymphoblastischen Leukämien sind p53-Mutationen hingegen selten (etwa bei 5% der Patienten) (Krug *et al.*, 2002), so dass hier andere zelluläre oder molekulare Determinanten für die p53-abhängige Zytostatikaresistenz zu vermuten sind, die beispielsweise mit seiner Aktivierbarkeit interferieren.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Bei der kindlichen ALL ist das *In-vivo*-Therapieansprechen von zentraler Bedeutung für die risikobasierte Stratifizierung der Patienten. Es erfasst neben leukämiespezifischen Resistenzmechanismen auch pharmakogenetische Wirtsfaktoren, die die Wirksamkeit der Therapie mit beeinflussen können. Die Bestimmung von minimaler Resterkrankung (MRD) während der Induktions-/Konsolidierungstherapie hat sich diesbezüglich als zuverlässiger prognostischer Parameter herausgestellt. Für die MRD-Analyse stehen mit PCR und Durchflusszytometrie zwei hochsensitive Methoden zur Verfügung, die zeigen konnten, dass viele Patienten eine residuale Blastenlast tragen. Das MRD-Niveau korreliert mit dem Rezidivrisiko und ist ein Hauptkriterium zur Therapiestratifizierung geworden.

Die MRD-Blasten sind aus biologischer Sicht die Tumorzellen, die die antileukämische Therapie überlebt haben. Ihre Untersuchung kann deshalb wertvolle Informationen über Mechanismen der Therapieresistenz liefern. Bislang sind die zellbiologischen Eigenschaften von MRD-Zellen aber noch weitgehend unbekannt. Ihre Untersuchung wird erschwert, da sie neben den normalen hämatopoetischen Zellen oftmals nur kleine Subpopulationen darstellen. Aus diesem Grund sollten neue methodische Ansätze entwickelt werden, die eine bessere Detektion und Charakterisierung von MRD-Zellen ermöglichen. Im Mittelpunkt stand dabei die Isolierung und genomweite Genexpressionsanalyse von Leukämiezellen, die nach einer Woche der Induktionstherapie mit Glucocorticoiden persistierten. Der Vergleich der Genexpressionsdaten mit klinischen Verlaufsparemtern sollte die Identifizierung von Kandidatengen ermöglichen, die für das Ansprechen und die Resistenz gegenüber Glucocorticoiden verantwortlich sind. Diese Gene waren anschließend auf Proteinebene und funktionell zu evaluieren. Sie könnten zum grundlegenden Verständnis der biologischen Eigenschaften resistenter Leukämiezellen beitragen und stellen darüber hinaus potentielle prognostische Marker und molekulare Ziele für die Therapie dar.

Im Gegensatz zu Glucocorticoiden werden Zytostatika erst im Verlauf der Induktionstherapie appliziert. Sie weisen unterschiedliche Wirkmechanismen auf, die zu letalen Schäden oder der Inhibition von Zellfunktionen führen. Der daraus resultierende zelluläre Stress bewirkt im Allgemeinen die Aktivierung des Tumorsuppressors p53, der beim Überschreiten eines Schwellenwertes Apoptose induziert. Die Bedeutung von p53 wird primär seiner Funktion als nukleärem Transkriptionsfaktor zugeschrieben, über die er an der Kontrolle von Zellzyklus, DNA-Reparatur und Apoptose beteiligt ist. Neuere Untersuchungen zeigen aber, dass p53-Funktionen auch direkt mit den Mitochondrien assoziiert sind. Sie kontrollieren die

stressinduzierte Apoptose und sind gleichzeitig das „Kraftwerk“ der Zelle, indem sie über die Atmungskette Energie in Form von ATP zur Verfügung stellen. Dazu wird ein Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran aufgebaut. Das mitochondriale Transmembranpotential (MTMP) treibt dann die ATP-Synthase an. Während der Apoptose kommt es zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran und mit dem Zusammenbruch des MTMP zu einem irreversiblen Schritt, der den Zelltod determiniert. Aufgrund der Relevanz der mitochondrialen Aktivität für die Apoptose stellte sich die Frage, ob eine Modulation des MTMP Auswirkungen auf die Signalkaskade hat, die zum Zelltod führt. Das MTMP könnte damit eine zelluläre Determinante zur Vorhersage von Zytostatikaresistenzen darstellen und sollte deshalb im Zusammenhang mit dem Therapieansprechen von primären ALL-Zellen untersucht werden.

Der generelle Arbeitsablauf zur Umsetzung der oben definierten Ziele ist in Abb. 14 dargestellt. Die Grundlage für die Untersuchungen bildeten primäre ALL-Proben, die zum Zeitpunkt der Diagnose und unter der Therapie im Rahmen der klinischen ALL-BFM-Studie akquiriert wurden. Sie dienten zur zellbiologischen Charakterisierung von MRD-Zellen und stellten das Ausgangsmaterial für funktionelle Untersuchungen zur stressinduzierten Apoptose dar. Die *in vivo* und *in vitro* gewonnenen Ergebnisse sollten mit klinischen Verlaufsparemtern korreliert werden. Potentielle Determinanten der Therapieresistenz waren anschließend an unabhängigen ALL-Proben auf molekularer und funktioneller Ebene zu evaluieren.

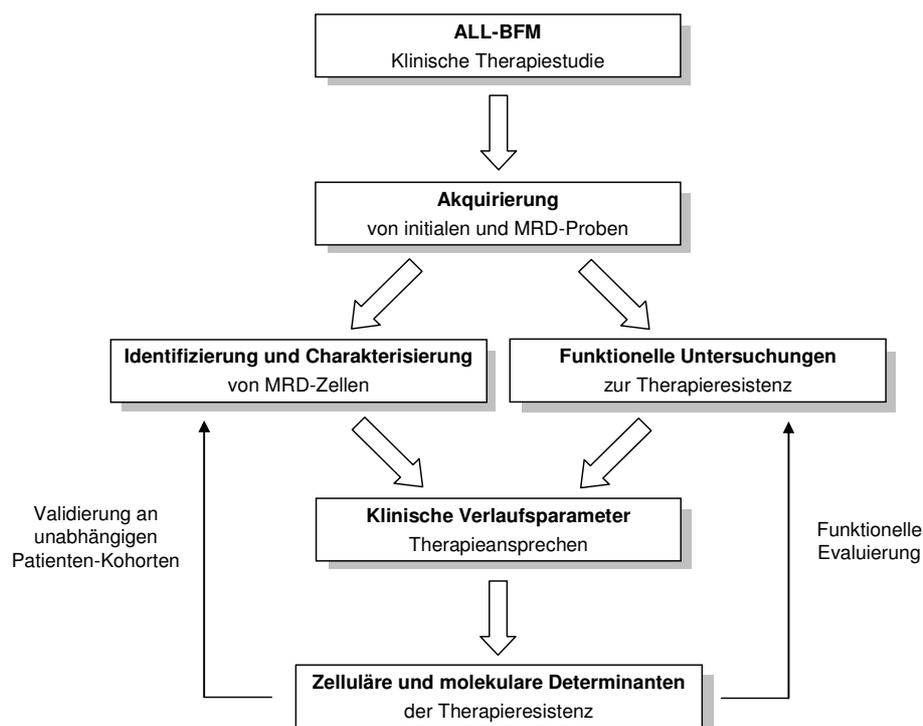


Abb. 14: Untersuchung von zellulären und molekularen Determinanten der Therapieresistenz.

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

Bei der Untersuchung von Patientenmaterial wurden die ethischen Grundsätze nach der Deklaration von Helsinki eingehalten (World Medical Association, 2000). Die Akquirierung der Proben erfolgte im Rahmen der zentralen durchflusszytometrischen MRD-Diagnostik für die multizentrische ALL-BFM-Studiengruppe (Studienleitung: Prof. M. Schrappe). Die Analyse wurde im Immunologischen Referenzlabor der Robert-Rössle-Klinik (Charité und HELIOS-Klinikum, Berlin) unter der Leitung von Prof. W.-D. Ludwig durchgeführt. Insgesamt wurden Proben von 310 Patienten (Alter: 1 bis 18 Jahre) mit B-Vorläuferzell- oder T-ALL untersucht, die nach dem aktuellen Protokoll der Studie ALL-BFM 2000 behandelt wurden (Schrappe *et al.*, 2000c). Die Bestimmung der Leukämie erfolgte anhand von morphologischen und immunphänotypischen Kriterien der *European Group for the Immunological Classification of Leukemias* (EGIL) (Bene *et al.*, 1995).

3.2 Zellen

3.2.1 Primäres Zellmaterial von ALL-Patienten

Die untersuchten Proben stammten aus dem Knochenmark oder peripherem Blut von ALL-Patienten. Sie wurden zum Zeitpunkt der Diagnose und an klinisch bedeutenden MRD-Zeitpunkten entnommen (Knochenmark: Tag 15, Tag 33 und Tag 78, peripheres Blut: Tag 8).

3.2.2 Primäres Zellmaterial von gesunden Spendern

Normale T-Lymphozyten von gesunden Spendern wurden aus Blutproben (sogenannten *Buffy coats*) gewonnen, die vom Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes (DRK, Berlin) stammten. Der Buffy coat stellt ein Nebenprodukt bei der Aufarbeitung von Blutspenden dar. Es handelt sich um die Leukozytenmanschette, die sich bei der Zentrifugation des Blutes zwischen der Erythrozytensäule und dem Blutplasma ausbildet.

3.2.3 Zelllinien

Für *In-vitro*-Untersuchungen wurden die Maus-Stromazelllinie MS-5 und die leukämischen Zelllinien MOLT-3 (T-Reihe) sowie 697, NALM-6, REH, SUP-B15 und TOM-1 (B-Reihe) verwendet. Alle Zelllinien wurden von der Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen.

3.3 Präparation und Kultivierung der Zellen

3.3.1 Isolierung von mononukleären Zellen

Mononukleäre Zellen von Patienten und gesunden Spendern wurden für funktionelle *In-vitro*-Untersuchungen aus peripherem Blut oder Knochenmark angereichert. Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation ließen sich mononukleäre Zellen (Lymphozyten, Monozyten, natürliche Killerzellen) von Granulozyten und Erythrozyten abtrennen. Hierfür wurde das primäre Zellmaterial mit isotonischer Kochsalzlösung 1:2 verdünnt und über ein gleiches Volumen Ficoll geschichtet. Abhängig vom Probenvolumen wurde die Zentrifugation in 15- oder 50-ml-Zentrifugenröhrchen durchgeführt (1000 x g, 15 min, 20 °C, ohne Bremse). Nach der Zentrifugation wurde die Interphase mit den mononukleären Zellen mittels Pasteurpipette abgenommen. Zur Reduktion von Thrombozyten und toten Zellen wurde zudem zwei Mal mit PBS (*Phosphate Buffered Saline*) gewaschen (250 x g, 10 min, 20 °C). Nach dem Waschen wurden die Zellen in dem Kulturmedium RPMI 1640 mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) aufgenommen.

3.3.2 Zellkultivierung und Stammhaltung

Für die Kultivierung der Zelllinien wurden 0,1 bis $0,3 \times 10^6$ Zellen/ml in 50- oder 150-ml-Kulturflaschen eingesät. In Abständen von 2 bis 3 Tagen wurden die Zellsuspensionen mit frischem Medium verdünnt (1:3 oder 1:4) und passagiert.

Die adhärent wachsenden MS-5 Zellen mussten vor der Passage vom Boden der Kulturflaschen abgelöst werden. Hierfür wurde zunächst das Kulturmedium entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer 0,05 %igen Trypsin-EDTA-Lösung behandelt (37 °C, 2 min). Daraufhin konnten die Zellen mit frischem Medium resuspendiert und in neue Kulturflaschen subkonfluent eingesät werden.

Die Inkubation der Zelllinien erfolgte unter Standardbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung in humider Atmosphäre (mehr als 90 % Luftfeuchtigkeit) im Brutschrank. Die Kulturmedien wurden mit 10 bis 20 % hitzeinaktiviertem FKS (56 °C, 30 min) supplementiert. Es wurden folgende Kulturmedien verwendet: alpha-MEM (MS-5), RPMI 1640 (MOLT-3, REH, TOM-1, NALM-6) und McCoy (SUP-B15).

Zur Stammhaltung wurden $0,5 - 5 \times 10^7$ Zellen in 200 µl Kulturmedium aufgenommen, das mit 700 µl FKS und 100 µl Dimethylsulfoxid ergänzt wurde. Die Zellsuspensionen wurden in Kryogefäße überführt, die in einem mit Isopropanol gefülltem Spezialbehälter (Nalgene) auf -80 °C heruntertemperiert wurden. Nach 24 h erfolgte die dauerhafte Einlagerung in flüssigem Stickstoff (-196 °C).

3.4 Durchflusszytometrische Methoden für die zellbiologische Analyse von normalen lymphatischen und leukämischen Zellen

3.4.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

3.4.1.1 Anwendungen

Die Durchflusszytometrie ist ein fluoreszenzaktiviertes zellanalytisches Verfahren, das ursprünglich der Isolierung von Einzellzellen aus Suspensionen diente (*Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS, Becton Dickinson). Sie erlaubt die simultane Untersuchung verschiedener physikalischer, biochemischer und molekularer Eigenschaften von Einzelzellen und Zellpopulationen. Die zu analysierenden Parameter werden dazu durch spezifische Fluoreszenzfärbungen detektierbar gemacht, die mit Laserlicht angeregt werden (Perfetto *et al.*, 2004). Neben zwei Streulichteigenschaften der Zellen lassen sich vom Gerät abhängig meist drei bis neun weitere Parameter messen, wie zum Beispiel Vitalität, Zellzyklus und Antigenexpression.

3.4.1.2 Fluorochrome

Bei der Fluoreszenzfärbung können neben Fluorochrom-konjugierten Antikörpern Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden, die in die Zellen diffundieren und deren intrazellulären Zustand beschreiben (z.B. DNA-interkalierende oder potentiometrische Fluoreszenzfarbstoffe). Die verwendeten Fluorochrome sind so zu wählen, dass ihre Anregungsspektren mit dem Wellenlängenbereich des Lasers übereinstimmen. Bei der Anregung werden Elektronen der fluoreszierenden Moleküle auf ein höheres Energieniveau angehoben, das sie nach kürzester Zeit (10^{-5} Sekunden) wieder verlassen, um in den stabileren Grundzustand zurückzukehren. Dabei wird die zuvor aufgenommene Energie in Form von Licht und Wärme abgegeben, was dazu führt, dass die emittierte Fluoreszenzstrahlung langwelliger als das absorbierte Laserlicht ist (Stokesche Regel). Bei der multiparametrischen Analyse werden Fluorochrome eingesetzt, die sich im Emissionsmaximum unterscheiden oder in anderen Wellenlängenbereichen angeregt werden. Hierfür sind moderne Durchflusszytometer mit drei oder mehr Lasern ausgestattet, die so positioniert sind, dass die Zellen sie nacheinander passieren.

3.4.1.3 Der Messvorgang

Der Messvorgang ist in Abb. 15 für einen Zellsortierer dargestellt, der das gleiche Messprinzip wie ein Analysegerät aufweist. Zur Messung wird die Probe als Flüssigkeitsstrahl in eine Trägerflüssigkeit injiziert, die einen laminaren Hüllstrom erzeugt.

Durch eine Querschnittsverjüngung in der Messzelle werden beide Strömungen beschleunigt, wodurch die Zellen vereinzelt und hydrodynamisch fokussiert werden. Dieser Prozess führt dazu, dass mehr als zehntausend Zellen pro Sekunde nacheinander den Kreuzungspunkt zwischen Flüssigkeitsstrom und dem Laserstrahl passieren, der auf das Messfeld gerichtet ist. Eine Zelle, die sich im Messfeld befindet, streut das Laserlicht aufgrund ihrer charakteristischen physikalischen Eigenschaften in Vorwärtsrichtung (3 bis 10°) (*Forward Scatter*, FSC) und zur Seite (90°) (*Sideward Scatter*, SSC). Außerdem werden die bei der Fluoreszenzfärbung gebundenen Fluorochrome durch den Laser angeregt. Sie emittieren daraufhin ein Lichtsignal, dessen Höhe proportional zur stöchiometrisch gebundenen Fluorochrommenge ist. Der als FSC emittierte Lichtanteil ist proportional zur Zellgröße und wird mit Hilfe eines Photodetektors gemessen, der in der Ebene des Laserstrahls positioniert ist. Der seitwärts gestreute Lichtanteil ist ein Maß für die Granularität und interne Komplexität der Zelle, die unter anderem von der Größe und Struktur des Zellkerns abhängig ist.

Das optische System für SSC und Fluoreszenzstrahlung befindet sich im rechten Winkel zum einfallenden Laserstrahl. Es besteht aus hintereinander angeordneten Linsen, Filtern und Spiegeln, die sicherstellen, dass nur ein bestimmter Wellenlängenbereich den zugehörigen Photomultiplier erreicht. Die Photomultiplier wandeln das empfangende Licht in ein elektrisches Signal um und verstärken es (Cram, 2002). Die elektrischen Signale werden dem Computersystem übermittelt, das die Zelleigenschaften zusammenfasst.

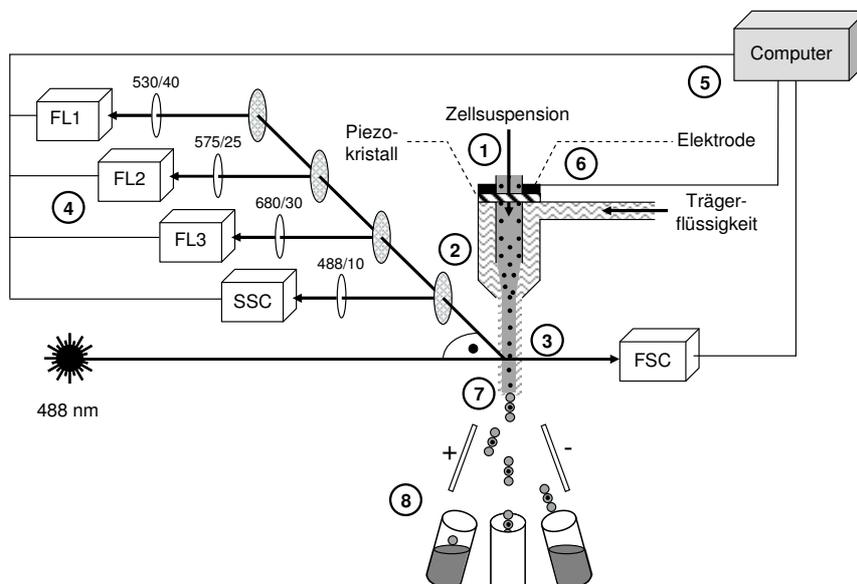


Abb. 15: Durchflusszytometrisches Prinzip am Beispiel eines Zellsortierers.

(1) Injektion der Probe in die Trägerflüssigkeit, (2) Hydrodynamische Fokussierung, (3) Messfeld, (4) Optisches System und Detektoren (FL = Fluoreszenz), (5) Computersystem zur Registrierung der Signale, (6) Schwingungsgeber (Piezokristall) und Elektrode, (7) Abbrisspunkt, (8) Ablenkungsplatten und Sammelbehälter (links und rechts von der Absaugvorrichtung positioniert).

3.4.1.4 Die Zellsortierung

Prinzip der Zellsortierung

Das Ziel der Zellsortierung ist die Isolierung von Einzelzellen anhand ihrer durchflusszytometrisch bestimmten Eigenschaften. Die methodische Herausforderung hierbei ist, dass jede Zelle in Echtzeit identifiziert, klassifiziert und selektiert werden muss.

Bei der Zellsortierung erfolgt die hydrodynamische Fokussierung des Flüssigkeitsstrahls in einer Düse (Abb. 15), die ihn beim Verlassen in einen *stream in air* umwandelt. Der in Luft befindliche Anteil des Flüssigkeitsstrahls kann mit einem Piezokristall in Schwingungen versetzt werden, so dass er ab einem definierten Abrisspunkt in regelmäßige Einzeltröpfchen zerfällt. Nachdem die Zellen das Messfeld passiert haben, werden sie vom Computersystem klassifiziert. Ist die Isolierung der Zelle erwünscht, wird der gesamte Flüssigkeitsstrahl positiv oder negativ aufgeladen. Der abreißende Tropfen in dem sich die Zelle befindet sowie der direkt vorangegangene und der nachfolgende Tropfen besitzen die gleiche Aufladung. Sie werden ihrer Ladung entsprechend von den elektrischen Ablenkungsplatten in einen der beiden Sammelbehälter gelenkt (Abb. 15). Nach dem Abreißen des dritten Tropfens wird der Flüssigkeitsstrahl durch Erdung wieder entladen. Die weiter nachfolgenden Tropfen werden deshalb ungeladen in die Absaugvorrichtung geleitet, bis der Flüssigkeitsstrahl aufgrund einer positiven Zelle wieder aufgeladen wird (Cross *et al.*, 2007).

Parameter zur Optimierung von Qualität und Quantität des Sortiervorgangs

Geschwindigkeit, Reinheit und Ausbeute des Sortiervorgangs werden von Parametern bestimmt, die sich größtenteils gegenseitig beeinflussen. Zu den wichtigsten Einflussgrößen zählen Stabilität und Frequenz der Tropfenbildung, Durchflussrate und Sortierungsstrategie.

Die Durchflussrate der Zellen und die Sortierungsgeschwindigkeit werden im Wesentlichen von der Frequenz der Tropfenbildung bestimmt. Sie ist ihrerseits von dem Durchmesser der Düse und der Durchflussgeschwindigkeit abhängig. Die Durchflussgeschwindigkeit wird über die Drücke reguliert, die auf die Probe und Trägerflüssigkeit aufgebracht werden. Bei einem üblichen Gesamtdruck von 25 psi und einer Düse mit 70 µm Durchmesser lässt sich eine stabile Frequenz von 40.000 Tropfen/s erreichen. Aufgrund der Rechenzeit des Prozessors zwischen zwei Signalen (Totzeit) und der zufälligen Verteilung von Zellen in einer Suspension können aber nicht alle Tropfen mit einer Zelle beladen werden. Aus diesem Grund sollten die Durchflussgeschwindigkeiten von Probe und Trägerflüssigkeit so eingestellt werden, dass nicht mehr als eine Zelle auf drei Tropfen verteilt ist. Damit ergibt sich eine maximale Sortierungsgeschwindigkeit von ca. 10.000 Zellen/s.

Damit das Computersystem erkennen kann, in welchem Tropfen sich eine Zelle befindet, muss die Zeit bestimmt werden, die sie benötigt, um die Strecke zwischen Messfeld und Abrisspunkt zurückzulegen (Abb. 15). Mit Hilfe eines Stroboskops wird dafür ein Standbild von der Tropfenbildung erzeugt. Anhand des Standbildes kann der Operator den Abstand zwischen Messfeld und Abrisspunkt bestimmen. Die erforderliche Zeit, die ein Tropfen für die Messstrecke benötigt, wird als *drop delay* bezeichnet, dessen Stabilität maßgebend für die Reinheit und Ausbeute des Sortiervorgangs ist (Lindmo *et al.*, 1990).

Aufgrund der zufälligen Verteilung der Zellen in einer Probe lässt es sich nicht völlig ausschließen, dass auch zwei oder mehr Zellen in direkt aufeinanderfolgende Tropfen gelangen. Die Handhabung solcher Konflikte wird durch die Sortierungsstrategie bestimmt, die sich in Anreicherungs-, Zähl- und Normalmodus gliedert. Bei der Anreicherung liegt die Priorität auf der Zellausbeute. In diesem Modus wird jeder Tropfen mit einer gewünschten Zelle in den Sammelbehälter gelenkt, was allerdings mit einer niedrigeren Reinheit bezahlt wird. Demgegenüber werden im Zählmodus nur die Zellen abgelenkt, die sich mit höchster Wahrscheinlichkeit einzeln selektieren lassen. Im Zählmodus sollte daher die Durchflussrate der Probe niedrig sein, um zu hohe Zellverluste zu vermeiden. Der normale Modus stellt einen Kompromiss aus den beiden erstgenannten dar. Im normalen Modus werden die gewünschten Zellen abgelenkt, die in einem optimal eingestellten System einzeln selektiert werden können, wodurch ein geringes Kontaminationsrisiko toleriert wird (Cross *et al.*, 2007).

3.4.2 Bestimmung von membranständiger und intrazellulärer Proteinexpression

Die durchflusszytometrische Proteinbestimmung erfolgte mit den Durchflusszytometern FACScan und FACSCalibur von Becton Dickinson (BD) sowie FC500 und CyAnADP von Beckmann Coulter (BC). Die Geräte konnten in der angegebenen Reihenfolge 3, 4, 5 und 9-Fluoreszenzfarben detektieren.

Die primären oder *in-vitro*-kultivierten Zellen wurden mit verschiedenen Kombinationen von Antikörpern untersucht, die sich gegen membranständige und intrazelluläre Antigene richteten. Die Antikörper waren zur Detektion mit einem der folgenden Fluorochrome konjugiert: Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Phycoerythrin-Cyanin 5.1 (PC5), Phycoerythrin-Cyanin 7 (PC7), Phycoerythrin-Texas Red (ECD), Allophycocyanin (APC), Allophycocyanin-Cyanin 7 (APC-Cy7), Pacific Blue (PB) oder Cascade Yellow (CY) (siehe 3.10). Die zusätzliche Anfärbung von Proben mit den Nukleinsäurefarbstoffen SYTO 16 und 41 (Invitrogen) wurde dazu verwendet, um vitale Zellen von Debris und Erythrozyten abzugrenzen.

3.4.2.1 Immunfärbung von membranständigen Proteinen

Für die Antikörperfärbung von Zelloberflächenproteinen wurde das Primärmaterial gemäß der Vollblutlysat-Methode (BD) behandelt (Dworzak *et al.*, 2008). Hierfür wurde zunächst die Anzahl der Leukozyten im Blut oder Knochenmark bestimmt (AcT-8 Coulter Counter, BC). Das Patientenmaterial wurde entsprechend der Leukozytenzahlen ($0,5$ bis 10×10^5 Zellen) in durchflusszytometrische Probenröhrchen gegeben und mit der Antikörpermenge gefärbt, die vom Hersteller (BD und BC) vorgegeben war (15 min bei 4°C). Nach der Färbung wurde das Probenmaterial ($\leq 300\ \mu\text{l}$) mit 2 ml des BD FACS-Lyse-Puffers (1 x) versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert ($250 \times g$, 5 min, RT) und zwei Mal mit 2 ml PBS ($250 \times g$, 5 min, RT) gewaschen. Zur Messung wurden die Zellen in PBS oder RPMI 1640 (mit 5 % FKS) aufgenommen.

3.4.2.2 Immunfärbung von intrazellulären Proteinen

Für die Untersuchung von intrazellulären Proteinen wurden die Zellen zunächst fixiert, anschließend permeabilisiert und mit Antikörpern gefärbt. Hierfür wurden die Lösungen A (Fixierung) und B (Permeabilisierung) der Firma Caltag/Invitrogen verwendet.

Die Fixierung von 2 bis 5×10^5 Zellen erfolgte in $50\ \mu\text{l}$ Lösung A (15 min, bei RT). Nach dem Waschen mit 2 ml PBS ($250 \times g$, 5 min, RT) wurden die Zellen in $50\ \mu\text{l}$ Lösung B resuspendiert. Der Antikörper des zu untersuchenden Antigens wurde nach den Angaben des Herstellers hinzugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und zur Messung in PBS oder RPMI 1640 (mit 5 % FKS) aufgenommen.

3.4.2.3 Immunfärbung von nukleären Proteinen

Die Messung von nukleären Proteinen (wie p53) wurde unter Verwendung von spezifischen Erstantikörpern und fluorchrommarkierten Zweitantikörpern durchgeführt. Hierfür wurde eine modifizierte Methode nach Bonsing *et al.* verwendet (Bonsing *et al.*, 1997). Zunächst wurden 2×10^5 Zellen in $100\ \mu\text{l}$ einer 0,5 %igen Formaldehyd/PBS-Lösung über Nacht fixiert (4°C). Nach der Fixierung wurden die Zellen mit 2 ml PBS ($250 \times g$, 5 min, RT) gewaschen und anschließend mit Methanol (-20°C) bei 4°C permeabilisiert (30 min). Die permeabilisierten Zellen wurden erneut gewaschen und mit $0,5\ \mu\text{g}$ des spezifischen Erstantikörpers in $50\ \mu\text{l}$ RPMI 1640 (mit 5 % FKS) inkubiert (30 min, RT). Nach der Inkubation wurden die markierten Zellen gewaschen. Zur Detektion des spezifischen Antikörpers wurde eine Sekundärfärbung mit FITC- oder PE-markierten Antikörpern gegen Maus-IgG2a oder -IgG1 ($0,5\ \mu\text{g}$) durchgeführt. Die gefärbten Zellen wurden nach 30 min Inkubation gewaschen, in PBS oder RPMI 1640 (mit 5 % FKS) resuspendiert und gemessen.

3.4.2.4 Quantifizierung der Proteinexpression

Für die Quantifizierung der Proteinexpression wurden entweder FITC-, PE-, PC5- oder ECD-markierte Antikörper verwendet. Die Bestimmung der Expression erfolgte mit Hilfe von kalibrierten Mikropartikeln (DAKO Fluorospheres, BC) als Anzahl von Fluorochrommolekülen, die der gemessenen Fluoreszenz äquivalent ist (*Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome*, MESF). Zur Berechnung des Expressionsendwertes wurde für die Hintergrundfluoreszenz korrigiert, die mit Hilfe von unspezifischen Isotypenkontrollen oder negativen Subpopulationen bestimmt wurde.

3.4.3 Durchflusszytometrische MRD-Bestimmung

Die durchflusszytometrische MRD-Bestimmung wurde im Rahmen der internationalen ALL-BFM-Studiengruppe durchgeführt. Die Erfassung der MRD-Daten erfolgte an den Therapietagen 8, 15, 33 und 78 und wurde von Dworzak *et al.* und Ratei *et al.* beschrieben (Dworzak *et al.*, 2008; Ratei *et al.*, 2009). Zum Zeitpunkt der Diagnose wurden 50.000 Ereignisse aufgenommen und zu den MRD-Zeitpunkten 300.000 bis eine Million. Die durchflusszytometrischen MRD-Ergebnisse wurden als relativer Blastenprozentanteil der kernhaltigen Zellen oder absolute Blastenzahl (*Blast Count*, BC) in Blasten pro Mikroliter dargestellt. Die Berechnung der Blastenzahl basierte auf der absoluten Zellzahl der Probe und den relativen MRD-Werten aus der durchflusszytometrischen Analyse. Die Blastenreduktionsrate berechnete sich aus dem Verhältnis der Blastenzahl unter der Therapie zur initialen Blastenzahl, beispielhaft für Tag 8: Blastenreduktionsrate Tag 8 = $(BC_{\text{Tag 0}} - BC_{\text{Tag 8}}) / BC_{\text{Tag 0}} \times 100 \%$.

3.4.4 Durchflusszytometrische Zellisolierung

Vor der Zellisolierung wurde das Primärmaterial mit Erythrozyten-Lysepuffer (siehe 3.9) im Verhältnis 1:10 behandelt und anschließend mit 20 ml PBS gewaschen. Für die Detektion von normalen und leukämischen B-Zellen wurden verschiedene Kombinationen von Antikörpern gegen CD10, CD20, CD34 und CD19 verwendet. Die Antikörper waren mit einem der drei Fluorochrome FITC, PE oder PC5 konjugiert. Die Zellsortierung erfolgte anhand des Immunphänotyps mit Hilfe des Zellsortierers FACSVantage SE (BD).

Für die Sortierung wurden die Zellen in RPMI 1640 und 10 % FKS aufgenommen (2×10^6 Zellen/ml). Die Sortierung der Zellen erfolgte im Normalmodus R bei einer Durchflussrate von 5.000 bis 10.000 Zellen pro Sekunde. Die isolierten Zellen wurden in Probengefäße aufgefangen, in denen 1 ml RPMI 1640 (mit 10 % FKS) vorgelegt war.

3.4.5 Apoptosedetektion

Die Messung von spontaner und therapieinduzierter Apoptose erfolgte nach Annexin V-FITC- und Propidiumiodid (PI)-Färbung mittels Durchflusszytometrie. Annexin V ist ein Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein und hochaffin für Phosphatidylserin. Bei nicht-apoptotischen Zellen ist die Lokalisation von Phosphatidylserin auf die Innenseite der Plasmamembran beschränkt (lebende Zellen: Annexin V⁻ und PI). Mit dem Beginn der Apoptose wird Phosphatidylserin externalisiert, wobei die Integrität der Zellmembran erhalten bleibt (frühe Apoptose: Annexin V⁺ und PI). Durch die Desintegration der Zellmembran während des weiteren Apoptoseprozesses werden die apoptotischen Zellen zusätzlich für PI permeabel (späte Apoptose/Nekrose: Annexin V⁺ und PI⁺) (Koopman *et al.*, 1994).

Für die Färbung wurden 2×10^5 Zellen mit PBS (250 x g, 5 min, RT) gewaschen und in 150 μl Annexinpuffer aufgenommen (siehe 3.9), der mit 5 μl Annexin V-FITC (Caltag, Invitrogen) und 2 μl PI (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich) ergänzt wurde. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei RT erfolgte die Messung an einem FACScan-Durchflusszytometer (BD).

3.4.6 Zellzyklusanalyse

Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung wurden 0,1 bis 2×10^5 Zellen mit PBS gewaschen (250 x g, 5 min, RT), in 70%igem Ethanol (-20 °C) fixiert und permeabilisiert. Für die zusätzliche Untersuchung von apoptosespezifischen Zellzyklusveränderungen wurden die Zellen wie in 3.4.5 beschrieben gefärbt und ohne zu waschen fixiert. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 200 μl Propidiumiodid-Färbelösung (siehe 3.9) resuspendiert. Die Messung der Zellzyklusverteilung erfolgte mit einem FACScan-Durchflusszytometer (BD). Die anschließende Auswertung wurde mit den Programmen CellQuest Pro (BD) und ModFit LT 2.0 (Verity Software House) vorgenommen.

3.5 Genexpressionsanalyse

3.5.1 RNA-Extraktion

Die Isolierung von Gesamt-RNA (>200 Nukleotide) erfolgte mit RNeasy Kits der Firma Qiagen (siehe 3.9). Das Prinzip der Methode beruht auf der Kombination eines chemischen Zellaufschlusses und der Verwendung von Silicagel-Säulen zur Nukleinsäure-Bindung. Der Zellaufschluss wird mit dem RLT-Lysispuffer (Qiagen) durchgeführt. Er enthält das chaotrope Salz Guanidiniumthiocyanat, das Zellmembranen degradiert und Proteine denaturiert. Diese Wirkung wird durch zusätzliches Vortexen verstärkt. Die Bindung der

freigesetzten RNA an die Silicamembran erfolgt in Gegenwart von Ethanol. Die Pufferbedingungen sind dazu vom Hersteller optimiert worden und selektiv für RNA-Moleküle größer als 200 Nukleotide. Die Elution der RNA erfolgte nach mehreren Waschschritten mit destilliertem Wasser.

Die Protokolle wurden durch eine DNase I-Behandlung (15 min, RT) auf der Silicagelsäule ergänzt. Damit wurden kontaminierende DNA-Reste abgebaut, die die Genexpressionsanalyse hätten beeinflussen können.

3.5.2 Bestimmung von RNA-Menge und -Integrität

3.5.2.1 Spektrophotometrische Analyse

Die Bestimmung der RNA-Konzentration in einer Lösung erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) an einem DU640 Spektrophotometer (Beckmann). Eine OD-Einheit entspricht bei einer Wellenlänge von 260 nm einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Die Reinheit wurde anhand des Verhältnisses der OD bei 260 und 280 nm abgeschätzt. Dieses Verhältnis sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen (Wilfinger *et al.*, 1997). Werte unter 1,8 deuten auf Proteinkontaminationen hin und Werte über 2,1 auf degradierte RNA und/oder einen Überschuss an freien Nukleotiden.

3.5.2.2 Gelelektrophoretische Analyse

Die Qualität der RNA wurde zusätzlich durch Gelelektrophorese überprüft (Sambrook *et al.*, 1989). Die RNA-Lösungen wurden dazu mit Probenpuffer versetzt und in 1%igen Agarosegelen (0,3 µg/ml Ethidiumbromid) horizontal aufgetrennt. Als Laufpuffer diente eine 0,5 x TAE-Lösung. Die zur Elektrophorese angelegte Spannung betrug 9 V/cm. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden RNA-Fragmente dauerten die Elektrophoresen zwischen 45 und 90 min. Die Agarosegele mit den Ethidiumbromid-gefärbten RNA-Proben wurden auf einem UV-Transilluminator (254 nm) fotografiert.

Die Integrität der RNA ließ sich anhand der ribosomalen RNA (rRNA)-Banden beurteilen. Das Intensitätsverhältnis der 28 S- zur 18 S-rRNA-Bande ist bei intakter RNA ca. 2:1 und nimmt mit zunehmender Degradation ab.

3.5.2.3 Bioanalyser¹

Bei geringen RNA-Mengen (<100 ng) wurden für jede Versuchsreihe stichprobenartig Analysen mit einem Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent) durchgeführt. Die RNA wurde dazu

¹ Die Analysen mit dem Bioanalyser wurden in einer Core-Facility (Labor für funktionelle Genomforschung) der Berliner Charité durchgeführt.

nach den Angaben des Herstellers präpariert und in einem Nano- (≥ 5 ng) oder Pico-LabChip (200-5000 pg) elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Beurteilung der RNA-Qualität wurde das Verhältnis der ribosomalen Banden bestimmt.

3.5.3 Real-Time RT-PCR

Die Anwendung einer reversen Transkription (RT) mit nachfolgender Echtzeit-PCR ist ein Analyseverfahren zur Quantifizierung der Expression spezifischer mRNA-Transkripte.

Bei der RT wurde die zuvor isolierte mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierfür wurde das Reverse Transcription System Kit (Promega) verwendet. Die generierten cDNAs wurden im TaqMan-Universal-PCR-Master-Mix (ABI) aufgenommen. Für die spezifische Detektion von Transkripten des Zielgens wurden PCR-Sonden eingesetzt (siehe 3.9). Die Durchführung der Real-Time-PCR erfolgte mit dem PCR-Gerät ABI PRISM 5700 (Applied Biosystems, ABI) und dem folgenden PCR-Programm: 1 Zyklus: 95 °C für 10 min und 40 Zyklen: 95 °C für 15 s und 60 °C für 60 s.

Die relative Genexpression wurde nach der differentiellen Ct (*Cycle threshold*)-Methode bestimmt. Der Ct-Wert entspricht der Anzahl von Zyklen, die benötigt wird, um einen gewählten Fluoreszenzschwellenwert in der linearen Amplifikationsphase zu erreichen. Bei der differentiellen Ct-Methode wird die Expression eines Zielgens X auf ein internes Referenzgen Y bezogen ($\Delta Ct = Ct(X) - Ct(Y)$, relative Genexpression = $2^{-\Delta Ct}$).

3.5.4 Genomweite Genexpressionsanalyse mit DNA-Mikroarrays

3.5.4.1 Grundlagen

Prinzip der Genexpressionsanalyse mit DNA-Mikroarrays

DNA-Mikroarrays sind ein Nachweissystem für die Genaktivität. Sie messen die relative Menge an mRNA, die als Zwischenprodukt bei der Genexpression auftritt. Im Gegensatz zum klassischen Northern-Blot-Verfahren sind bei den Mikroarrays nicht die RNA-Proben immobilisiert, sondern die Sonden, mit denen die RNA hybridisieren kann (Freeman *et al.*, 2000). Bei den von der Firma Affymetrix entwickelten Mikroarrays sind die Sonden einzelsträngige Oligonukleotide, die photolithografisch auf ein ca. 2 cm² kleines Feld aufgebracht werden (Lockhart *et al.*, 1996; Wodicka *et al.*, 1997). Mit Hilfe eines DNA-Mikroarrays lässt sich die Expression von mehreren tausend Genen parallel untersuchen. Aufgrund des hohen Informationsgehaltes auf engstem Raum werden die Mikroarrays der Firma Affymetrix, in Anlehnung an die Computertechnik, auch als GeneChips[®] (Genchips) bezeichnet.

Die Messung der Genexpression erfolgt für eine gesamte Zellpopulation, deren mRNA extrahiert und durch *In-vitro*-Transkription in komplementäre RNA (cRNA) umgeschrieben wird. Dieser Schritt beinhaltet neben einer Biotinmarkierung, die lineare Amplifikation der Ausgangs-RNA. Es können eine oder mehrere Amplifikationsrunden durchgeführt werden, wodurch eine genomweite Genexpressionsanalyse von Proben mit weniger als 2 ng Ausgangs-RNA (entsprechen ca. 2000 Zellen) ermöglicht wird (Phillips *et al.*, 1996; Baugh *et al.*, 2001; Nygaard *et al.*, 2006). Die biotinylierte cRNA hybridisiert mit den komplementären Oligonukleotideinzelsträngen auf den Genchips und lässt sich anschließend mit einem Streptavidin-PE-Konjugat detektieren (Abb. 16). Mit Hilfe eines Lasers wird der Fluoreszenzfarbstoff PE angeregt, dessen Lichtemission durch einen hochauflösenden Scanner messbar ist. Als Ergebnis wird ein Bild des gesamten Chips ausgegeben, das die Signalintensitäten aller Sonden beinhaltet (Abb. 16).

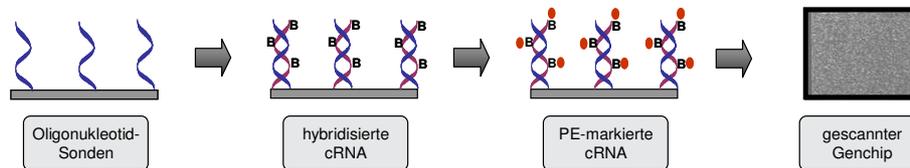


Abb. 16: Genexpressionsanalyse mit Affymetrix-Genchips.

Beschreibung der DNA-Mikroarrays

Zwei von der Firma Affymetrix hergestellte DNA-Mikroarrays sind die Genchips Human Genome U133A und Focus. Der U133A-Chip enthält 5×10^5 Sonden. Jede Sonde nimmt eine Zelle mit der Fläche von $18 \times 18 \mu\text{m}^2$ ein, in der sich 10^7 Kopien eines Oligonukleotides befinden. Die Oligonukleotide sind mit einer Länge von 25 Nukleotiden relativ kurz. Aus diesem Grund werden sie nach stringenten Syntheserichtlinien generiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Da eine genaue Voraussage über das Hybridisierungsverhalten jedoch nicht möglich ist, wird jedes zu untersuchende Transkript von einem Satz von 11 Sonden repräsentiert. Die Sonden sind so zusammengestellt, dass sie an unterschiedlichen, nicht überlappenden Regionen derselben RNA hybridisieren. Diese Redundanz erlaubt den Ausschluss extremer Ausreißerwerte bei der Berechnung des Signalmittelwertes eines SONDENSATZES (*probe set*) (Affymetrix, 2004).

Der U133A-Chip umfasst 22.283 SONDENSATZE, die ca. 13.000 Gene und 5000 *Expressed Sequence Tags* (ESTs)² repräsentieren. Der Focus-Chip enthält eine Auswahl der U133A-Sonden, mit denen die Aktivität von ca. 8400 Genen gemessen werden kann (Schuler, 1997; Affymetrix, 2004).

² ESTs sind Transkripte, deren Sequenz bekannt ist, aber noch nicht zu einem definierten Gen oder Protein zugeordnet werden konnte.

Beschreibung der Mikroarray-Rohdaten

Das von den Sonden emittierte Fluoreszenzsignal wird von der Bildanalysesoftware (Microarray Suite 5.0) in Graustufen dargestellt. Die Genchips werden dazu mit einer Auflösung von 3 µm pro Pixel gescannt. Eine Sondenzelle der Kantenlänge 18 µm lässt sich somit durch 6 x 6 Pixel darstellen. Die gesamte Bildinformation des gescannten Genchips wird als DAT-Datei gespeichert. Bei der Berechnung der Rohintensitäten wird für jede Sonde ein Durchschnittswert bestimmt, wobei die Pixel am äußeren Rand der Zelle unberücksichtigt bleiben. Die Daten der Rohintensitäten werden als CEL-Datei (*Cell Intensity File*) gespeichert und bei der Genexpressionsanalyse statistisch ausgewertet.

3.5.4.2 cRNA-Synthese für die DNA-Mikroarray-Analyse

Die Synthese der biotinylierten cRNA wurde mit zwei verschiedenen Transkriptionskits durchgeführt (BioArray High Yield RNA Transcription Labeling-Kit (Enzo Diagnostics) und MessageAmp aRNA-Kit (Ambion). Beide Kits basierten auf dem gleichen Verfahren, das in Abb. 17 schematisch dargestellt ist.

Zunächst erfolgte die reverse Transkription der mRNA in cDNA, die durch eine reverse Transkriptase katalysiert wurde (Abb. 17). Hierbei wurde ein Oligo(dT)-Primer verwendet, der den Promotor der T7-RNA-Polymerase beinhaltet. Anhand des eingebauten Promotors schrieb die T7-RNA-Polymerase die zuvor synthetisierte cDNA in cRNA um. Dieser als *In-vitro*-Transkription bezeichnete Schritt produzierte hundert bis tausend Antisense-Kopien von jeder mRNA der ursprünglichen Probe (Abb. 17). Eine zweite *In-vitro*-Transkription wurde bei allen Tag 0- und Tag 8-Proben durchgeführt. Sie diente dazu, dass auch bei geringen Zellzahlen eine ausreichende cRNA-Menge (15 µg) für die Hybridisierung generiert werden konnte.

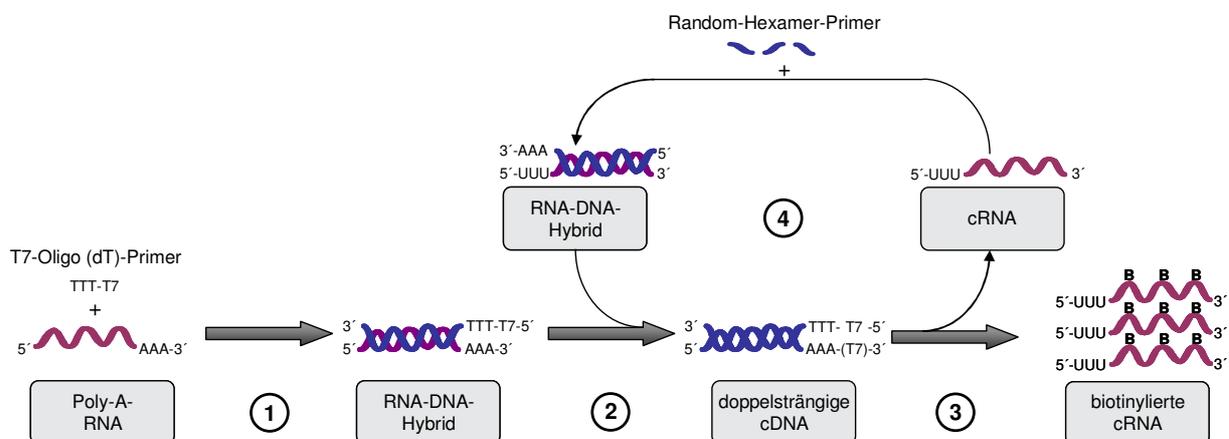


Abb. 17: cRNA-Synthese mittels einfacher oder zweifacher *In-vitro*-Transkription.

(1) Reverse Transkription, (2) Zweitstrangsynthese, (3) *In-vitro*-Transkription, (4) Zweite (optionale) Amplifikationsrunde.

3.5.4.3 Hybridisierung und Scannen der DNA-Mikroarrays³

Bei der Hybridisierung wurde die Genchips mit einem Streptavidin-PE-Konjugat (Molecular Probes) gefärbt. Zusätzlich wurde ein biotinylierter Streptavidinantikörper (Vector Laboratories) eingesetzt, der zu einer zusätzlichen Signalamplifikation beitrug. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte bei einer Wellenlänge von 570 nm mit dem GeneArray Scanner 2500 (Hewlett-Packard).

3.6 Funktionelle Assays

Die Durchführung von funktionellen *In-vitro*-Assays erfolgte in 24er- oder 96er-Multiwell-Platten mit flachem Boden. Hierfür wurden die Zellen in RPMI 1640 und 10 % FKS aufgenommen (Zelllinien: 2×10^5 Zellen/ml; Primärzellen 2×10^6 Zellen/ml). Die Inkubation der Zellen fand unter Standardbedingungen im Brutschrank (37°C , $\geq 90\%$ Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 (V/V)) statt.

3.6.1 Stimulation von Zelllinien und Lymphozyten

Aktivierung von T-Lymphozyten

Phytohämagglutinin-L (PHA-L) ist ein Lektinextrakt der roten Feuerbohne und besitzt eine hohe Affinität für die Oberflächenrezeptoren von Lymphozyten. PHA-L und der Wachstumsfaktor Interleukin-2 (IL-2) wirken primär auf T-Lymphozyten und bewirken ihre Aktivierung (Ceuppens *et al.*, 1988).

Zur Generierung von aktivierten T-Zellen wurden Lymphozyten von gesunden Spendern mit PHA-L ($1 \mu\text{g} / 10^6$ Zellen) (Roche, Mannheim) und 60 U/ml IL-2 (Strathmann Biotec, Hamburg) stimuliert und für 24, 48 und 72 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert.

Aktivierung des IL-7-Rezeptorsignalweges

Zur Aktivierung des IL-7-Rezeptorsignalweges wurden die leukämischen B-Zelllinien SUP-B15, TOM-1 und NALM-6 mit 25 ng/ml IL-7 (Strathmann Biotec, Hamburg) für 24 bis 48 h im Brutschrank inkubiert. Diese optimale Konzentration wurde bereits in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe bestimmt (Wuchter *et al.*, 2002).

3.6.2 *In-vitro*-Behandlungen zur Apoptoseinduktion und Zellzyklusinhibition

Die Supplementierung des Mediums mit Zytostatika (Doxorubicin, Etoposid, Staurosporin), GC (Dexamethason) und anderen apoptoseinduzierenden Agenzien (CD95-Antikörper, H_2O_2 , Lactacystin) erfolgte bei primären Zellen im direkten Anschluss an die Aussaat und bei

³ Die Hybridisierung der DNA-Mikroarrays wurde in einer Core-Facility des Max-Delbrück-Centrums (Berlin) durchgeführt.

Zelllinien nach 16h Vorinkubation im Brutschrank. Der Konzentrationsbereich der zur Zellzyklusinhibition und Apoptoseinduktion verwendeten Agenzien war substanz- und zelltypabhängig und wurde in Titrationsversuchen bestimmt. Die verwendeten Agenzien sind in 3.9 aufgeführt. Ihre Konzentrationen und die Inkubationszeiten sind aus den Abbildungen der Experimente ersichtlich.

3.6.3 Modulation des Energiestoffwechsels von normalen lymphatischen und leukämischen Zellen

Oxidative Phosphorylierung

Zur Modulation des MTMP wurden spezifische Inhibitoren der Enzymkomplexe der oxidativen Phosphorylierung eingesetzt: Rotenon (Komplex I), Theonyltrifluoroacetone (TTFA) (Komplex II), Antimycin A (Komplex III) und Oligomycin (ATP-Synthase). Darüber hinaus wurde mit Carbonylcyanid-p-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon (FCCP) ein Protonophor verwendet, das die Entkopplung der Atmungskette bewirkt. Die verschiedenen Agenzien wurden dem Medium direkt zugesetzt. Sie sind unter 3.9 aufgeführt und ihre Konzentrationen und Inkubationszeiten sind aus den Abbildungen der Experimente ersichtlich.

Glykolyse

Die Glykolyse wurde mit Hilfe des Glucose-Antimetaboliten 2-Deoxyglucose (0,1 bis 0,3 mM) inhibiert. Die Zellen wurden dazu mit PBS gewaschen und in RPMI 1640 mit und ohne FKS aufgenommen (2×10^5 Zellen/ml). Zur ATP-Depletion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in glucose- und serumfreiem RPMI 1640 resuspendiert. Die Inkubation erfolgte für 3 bis 6h unter Standardbedingungen.

3.6.3.1 Bestimmung des mitochondrialen Transmembranpotentials

Die Wirksamkeit von Inhibitoren der Atmungskette wurde anhand der Modulation des MTMP bestimmt. Das MTMP wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs JC-1 gemessen. JC-1 ist ein lipophiler, kationischer Cyanin-Farbstoff, der durch Zellmembranen diffundieren kann. Aufgrund seiner positiven Ladung besitzt JC-1 eine erhöhte Affinität zur mitochondrialen Matrix. In den Mitochondrien bilden die grün fluoreszierenden JC-1-Monomere reversibel Aggregate, deren Emissionsspektrum im roten Bereich liegt. Die Depolarisation der Mitochondrien (Inhibition der Atmungskette oder Apoptose) führt zur Auflösung der Aggregate und einer messbaren Verschiebung der Lichtemission vom roten (590 nm) in den grünen (525 nm) Spektralbereich (Salvioli *et al.*, 1997; Dykens *et al.*, 2001).

Zur Bestimmung des MTMP wurden 2×10^5 Zellen mit PBS (250 x g, 5 min, RT) gewaschen und in 1 ml der JC-1-Färbelösung (siehe 3.9) aufgenommen. Nach einer zehnmütigen Inkubation (lichtgeschützt bei 37 °C) wurden die Zellen erneut gewaschen und in RPMI 1640 resuspendiert. Die Messung erfolgte an einem FACScan-Durchflusszytometer (BD).

3.6.3.2 Bestimmung der intrazellulären ATP-Menge

Für die Bestimmung des ATP-Gehaltes wurde das ATPlite Luminescence ATP Detection Assay (Perkin Elmer) verwendet. Das Kit basiert auf einem Biolumineszenzverfahren, bei dem die Reaktion von ATP und D-Luciferin mit Sauerstoff zur Freisetzung von Licht führt. Die Reaktion wird durch das Luciferase-Enzym katalysiert. Die entstandene Lichtmenge ist proportional zur ATP-Konzentration.

Die Bestimmung des ATP-Gehaltes erfolgte direkt nach der Inkubation von Zellen mit Inhibitoren der Atmungskette und der Glykolyse. Von jedem Ansatz wurden 100 µl Zellsuspension (2×10^4 Zellen) in eine weiße 96er-Multiwell-Platte (96F NUNCLON DELTA, NUNC) überführt und mit 50 µl Lysierungspuffer versetzt. Die Lyse erfolgte bei RT auf einem Orbitalschüttler (5 min, 700 rpm). Anschließend wurden 50 µl Substratlösung zum Ansatz gegeben (5 min RT, 700 rpm) und die Platten für weitere 10 min lichtgeschützt inkubiert. Die Messung erfolgte mit einem Luminometer (MicroLumat LB96P, EG&G Berthold). Angegeben sind die relativen ATP-Änderungen zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen.

3.6.3.3 Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies

Die Existenz von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Zelle lässt sich mit Hilfe der Fluoreszenzfarbstoffe 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF), Hydroethidin (HE) und Nonylacridinorange (NAO) detektieren.

2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFDA) ist die reduzierte und acetylierte Form von DCF und kann durch die Zellmembran diffundieren. In der Zelle wird DCFDA von Esterasen gespalten. Das resultierende H₂DCF kann die Zellmembran nicht mehr passieren. Es fluoresziert nach Oxidation durch ROS bei 529 nm im grünen Spektralbereich (Bass *et al.*, 1983).

HE ist die um zwei Elektronen reduzierte Form von Ethidiumbromid. Es besitzt eine schwache blaue Fluoreszenz und kann durch die Zellmembran diffundieren. Nach Oxidation von HE interkaliert der Farbstoff in die DNA und fluoresziert rot (Tarpey *et al.*, 2001).

NAO ist ein für die Mitochondrien spezifischer Fluoreszenzfarbstoff und bindet bevorzugt an das in den Mitochondrien lokalisierte Phospholipid Cardiolipin. Die Bindungsaffinität ist vom

Oxidationsstatus des Cardiolipin abhängig. Die nicht oxidierte Form wird von NAO mit hoher Affinität gebunden (im Verhältnis 2:1). In der Folge dimerisiert NAO, was mit einer Verschiebung der Lichtemission vom grünen (525 nm) in den roten Spektralbereich (640 nm) verbunden ist. Nach Oxidation von Cardiolipin sinkt die Affinität von NAO und damit auch die Intensität der roten Fluoreszenz (Garcia Fernandez *et al.*, 2002).

Zur Messung von ROS wurden 2×10^5 Zellen nach der *In-vitro*-Behandlung gewaschen und in 500 μ l RPMI 1640 aufgenommen, das mit DCFDA (5 μ M), HE (10 μ M) oder NAO (0,25 μ M) supplementiert war. Die Proben wurden für 30 min (DCFDA, HE) bzw. 15 min (NAO) bei 37 °C inkubiert und anschließend an einem FACScan-Durchflusszytometer gemessen.

3.6.4 Spezifische Genanalyse mittels RNA-Interferenz

Die Transfektion von Zelllinien und primären Zellen war die Voraussetzung für die molekularbiologische Untersuchung von Kandidatengenens mittels RNA-Interferenz. Die Transfektionsexperimente wurden mit Hilfe der Nucleofector-Technologie (Amaxa) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein Elektroporationsverfahren zum transienten oder stabilen Transfer von Nukleinsäuren in das Zytoplasma und den Zellkern. Das grundlegende Prinzip beruht darauf, dass ein elektrischer Impuls kurzzeitig zur Bildung hydrophiler Zellmembranporen führt, wodurch extrazelluläre Nukleinsäuren in die Zelle diffundieren können (Ho *et al.*, 1996).

Bei der Nucleofection von siRNA (*small interfering RNA*) wurden für jedes Gen drei verschiedene spezifische siRNA-Moleküle (Ambion) gepoolt und gemeinsam transfiziert. Diese Methode hatte den Vorteil, dass die Konzentration der einzelnen siRNAs gesenkt werden konnte. Damit wurde sichergestellt, dass sich mögliche, für eine siRNA spezifische Nebeneffekte (*off-target effects*) verringerten. Als negative siRNA-Kontrolle wurde ein doppelsträngiges RNA-Oligonukleotid verwendet, das keine signifikante Ähnlichkeit zu einer bekannten humanen Gensequenz aufwies (Silencer Negative Control #1, Ambion). Der Konzentrationsbereich der eingesetzten siRNAs lag zwischen 0,1 und 3 μ M. Die Kontrolle der Transfektionseffizienz erfolgte mit dem Kontroll-Vektor pmaxGFP (Amaxa), der das *Green Fluorescent Protein* (GFP) kodiert, dessen grüne Fluoreszenz durchflusszytometrisch gemessen wurde.

Transfektion von Zelllinien

Vor der Transfektion wurden die Zellen (2 bis 4×10^6) mit PBS gewaschen und in 100 μ l einer zelltypspezifischen Nucleofectionslösung (Amaxa) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit der zu transfizierenden Nukleinsäure gemischt und in eine Elektroporationsküvette (2 mm

Spaltbreite) überführt, die anschließend in das Nucleofector-Gerät eingesetzt wurde. Die Elektroporation erfolgte mit einem für den jeweiligen Zelltyp spezifischen Programm. Nach der Nucleofection wurden die Zellen in vorgewärmtes Medium (RPMI 1640 mit 10 % FKS) aufgenommen (1×10^6 Zellen/ml) und im Brutschrank inkubiert. Die Behandlung der transfizierten Zellen mit Chemotherapeutika erfolgte fünf Stunden nach der Transfektion.

Transfektion von primären ALL-Zellen

Die Transfektion der primären ALL-Zellen erfolgte wie bei den Zelllinien zuvor beschrieben. Die optimale Nucleofectionslösung und das Nucleofector-Programm wurden für jede ALL individuell bestimmt. Nach der Transfektion wurden die Zellen in Gegenwart der Stromazelllinie MS-5 kokultiviert.

Hierzu wurden die Stromazellen am Tag zuvor in 24er-Multiwell-Platten überführt (25.000 Zellen pro Well) und unter Standardbedingungen vorinkubiert. Nach 20 h wurde das Medium entfernt und die transfizierten Primärzellen (1×10^6 Zellen/ml) mit frischem Medium auf den MS-5 Zellrasen aufgetragen. Die anschließende Inkubation erfolgte für 24h ebenfalls unter Standardbedingungen. Nach Beendigung der Kokultivierung wurde das Medium entfernt und der Zellrasen mit 1 ml PBS gewaschen. Die adhärenierten Zellen wurden mit 100 μ l einer 0,05 %igen Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco Invitrogen) behandelt (37 °C, 2 min) und ebenfalls mit 1 ml PBS abgewaschen. Die Zellen aus den einzelnen Waschschrritten wurden gesammelt und für die nachfolgenden Untersuchungen vereint.

3.7 Bioinformatische Analyse der Genexpressionsdaten⁴

Für die zellbiologische Charakterisierung von MRD-Zellen wurden Genexpressionsprofile leukämischer Proben von Tag 0 und Tag 8 der Induktionstherapie generiert. Die Durchführung der bioinformatischen Analyse erfolgte nach dem in Abb. 18 dargestellten Fließschema.

⁴ Die bioinformatische Analyse wurde in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin (Arbeitsgruppe Dr. Rainer Spang) durchgeführt

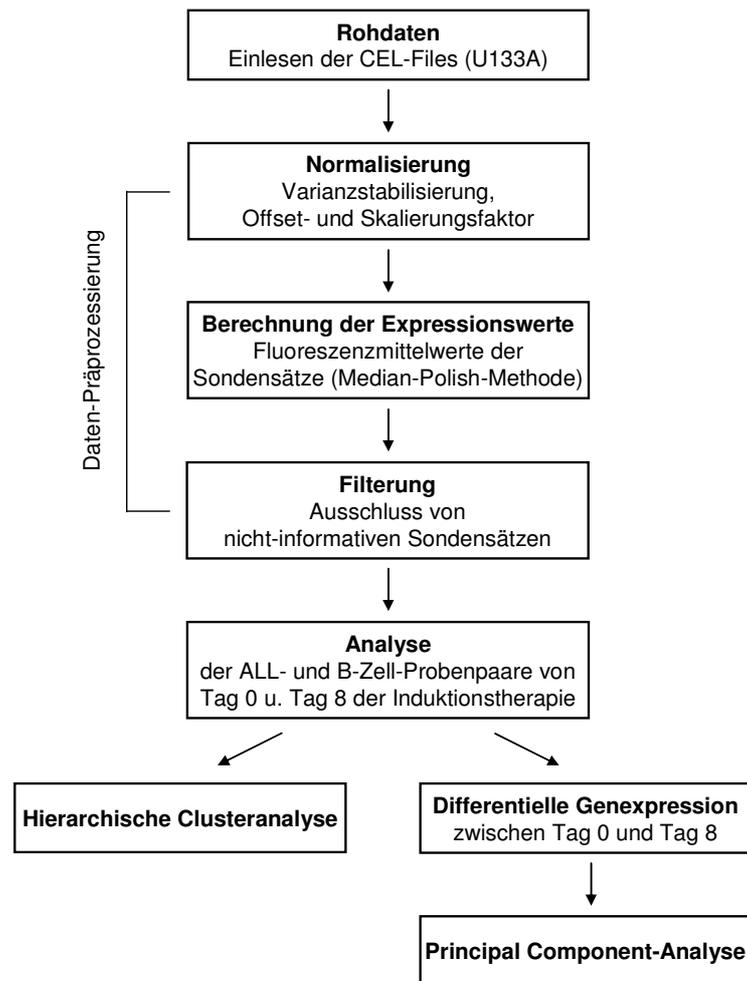


Abb. 18: Auswertungsschema der Genexpressionsdaten.

Normalisierung und Berechnung der Genexpressionswerte

Die Normalisierung der Genexpressionsdaten erhöhte die Vergleichbarkeit der Genchips, indem das Hintergrundrauschen infolge experimenteller Variabilität minimiert wurde. Beim Tag0/Tag8-Datensatz wurden alle untersuchten Genchips gemeinsam normalisiert. Hierzu wurden die Affymetrix-Rohdaten (CEL-Dateien) eingelesen und mit Hilfe der Varianz-Stabilisierungsmethode prozessiert (Huber *et al.*, 2002). Für jeden Genchip wurde zusätzlich ein individueller Offset- und Skalierungsfaktor bestimmt. Diese korrigierten die Hintergrundfluoreszenz und Messschwankungen, die etwa infolge unterschiedlich hybridisierter RNA-Mengen entstanden. Für die Berechnung der Genexpressionsendwerte wurde für jeden Sondensatz der Median aus den normalisierten Expressionswerten der Einzelsonden bestimmt. Hierfür wurde die sogenannte *Median-Polish*-Methode verwendet (Irizarry *et al.*, 2003).

Filterung

Nach der Normalisierung der Genexpressionsdaten wurde ein Filterschritt eingebaut, um nichtinformative Sondensätze aus der Analyse zu entfernen. Von den 22283 Sondensätzen eines Genchips wurden die Affymetrix-Kontrollen und Hämoglobin-Sonden ausgefiltert. Der Datensatz eines Genchips bestand danach aus 22194 Sondensätzen. Zur Vereinfachung werden diese im Folgenden als Gene bezeichnet (siehe dazu 3.5.4.1).

Differentielle Genexpression

Die Genexpressionswerte wurden für die statistische Analyse logarithmiert. Die Expressionsveränderung eines Gens am Tag 8 ergab sich danach aus der Differenz der Expression von Tag 8 und Tag 0, die als Mittelwert über alle Patienten berechnet wurde. Die Signifikanz der Veränderung wurde mit einem Permutationstest nach Scheid *et al.* überprüft (Scheid *et al.*, 2005). Bei jeder Permutation wurden bei einem oder mehreren Probenpaaren die Bezeichnungen von Tag 8 und Tag 0 zufällig ausgetauscht. Nach 100 Permutationsrunden wurde für jedes Gen der prozentuale Anteil von Permutationen berechnet, bei denen die mittlere Differenz zwischen Tag 8 und Tag 0 höher war als der beobachtete Mittelwert. Daraus ergaben sich empirische Wahrscheinlichkeitswerte (p-Werte), die anschließend für multiples Testen korrigiert und in q-Werte transformiert wurden (Scheid *et al.*, 2005). Der q-Wert ist der prozentuale Anteil an zu erwartenden falsch positiven Ergebnissen, wenn das betreffende Gen als signifikant eingestuft wird. Er wird daher auch als lokale *False Discovery Rate* (FDR) bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurden Expressionsunterschiede mit einem q-Wert kleiner als 5% als signifikant definiert. Die globale FDR einer Genliste mit q-Werten bis zu 5% entspricht dem höchsten q-Wert und war demzufolge ebenfalls 5%.

Hierarchische Clusteranalyse

Die Clusteranalyse ist ein multivariates Verfahren, das sich zur Gliederung von Genexpressionsdaten eignet. Im Gegensatz zu überwachten (*supervised*) Klassifikationsverfahren werden bei der Clusteranalyse die Objekte (Genchips oder Gene) nicht bekannten, sondern unbekannt, neuen Gruppen zugeteilt (*unsupervised*). Bei der Ermittlung der neuen Gruppen (Cluster) werden die Objekte so angeordnet, dass die Ähnlichkeiten innerhalb eines Clusters möglichst groß sind und Unterschiede zu anderen Clustern bestehen.

Bei der hierarchischen Clusteranalyse werden zunächst alle Objekte als einzelne Cluster betrachtet. In jedem weiteren Schritt werden die sich am nächsten stehenden Cluster zu einem neuen zusammengefasst und miteinander verbunden. Die sich daraus ergebende Baumstruktur wird als Dendrogramm dargestellt. Zur Bestimmung des Distanzmaßes zwischen zwei

Genchips wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson verwendet. Als Distanzfunktion zwischen zwei Clustern wurde die *Average Linkage*-Methode genutzt. Sie bestimmt den mittleren Abstand aus allen Elementpaaren zweier zu vergleichender Cluster.

Principal Component-Analyse (PCA)

Die PCA ist wie die hierarchische Clusteranalyse ein statistisches Verfahren, das zur Strukturierung und Veranschaulichung der multivariaten Genexpressionsdaten eingesetzt werden kann. Bei der PCA werden die Genexpressionsprofile in einen niedriger dimensionierten Vektorraum transformiert. Dabei werden die einzelnen Gene durch möglichst aussagekräftige Linearkombinationen (den „Hauptkomponenten“) ersetzt, wobei die Datenvarianz größtmöglich erhalten bleibt. Die erste Hauptkomponente hat den größten Anteil an der Gesamtvarianz, gefolgt von der zweiten und so weiter. Die letzten Komponenten weisen nur noch einen geringen Informationsanteil auf. Mit Hilfe der PCA lassen sich Verwandtschaftsverhältnisse von Genexpressionsprofilen im zwei- oder dreidimensionalen Raum darstellen, indem nur die aussagekräftigsten ersten beiden bzw. ersten drei Hauptkomponenten berücksichtigt werden.

3.8 Statistische Methoden

Vergleich von Mittelwerten und Korrelationen

Zu den in der vorliegenden Arbeit berechneten Mittelwerten wurde der Standardfehler angegeben. Beim Vergleich von Mittelwerten wurde von den Daten abhängig ein gepaarter oder ungepaarter t-Test durchgeführt. Beim nichtparametrischen Vergleich zweier Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Zur Beurteilung einer Korrelation zwischen zwei Variablen wurde der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient (r_s) und seine Signifikanz bestimmt.

Receiver Operating Characteristic (ROC) - Analyse

Die ROC-Analyse dient zur Grenzwertbestimmung einer Testvariablen, die in einem binären Klassifizierungssystem zur Differenzierung zweier Zustände (z.B. 0 und 1) eingesetzt wird (Zweig *et al.*, 1993). Eine ROC-Kurve stellt für die Werte der Testvariablen das Verhältnis von Richtig-positiv- („Sensitivität“) zur Falsch-positiv-Rate („1 – Spezifität“) dar, woraus sich der optimale Grenzwert zur Klassifizierung des Zustands (0 oder 1) der abhängigen Variablen ergibt. Die Vorhersagegenauigkeit der Testvariablen entspricht der relativen Fläche unter der ROC-Kurve (*Area Under the Curve*, AUC) und variiert zwischen 0,5 (keine Differenzierung möglich) und 1 (perfekte Klassifizierung).

Logistische Regressionsanalyse

Die logistische Regression wird ebenfalls für binäre Klassifizierungssysteme verwendet. Es ist ein statistisches Verfahren, das den multivariaten Einfluss auf die Voraussagefähigkeit der beiden möglichen Zustände einer abhängigen Variablen schätzt. Als Ausgabe erhält man ein Regressions-Modell, das zur Voraussage des Zustandes (0 oder 1) der abhängigen Variable dient. Für jede Testvariable des Modells wird ein Regressionsfaktor und seine Signifikanz bestimmt. Die Regressionsfaktoren beschreiben den Einfluss der einzelnen Testvariablen auf die Voraussagekraft des Modells. Darüber hinaus werden für das Modell selbst Güte und Signifikanz anhand eines Chi-Quadrat-Tests berechnet. Die praktische Anwendbarkeit des Modells wird durch eine Klassifikationstabelle beschrieben, die die erwartete und vom Modell vorausgesagte Klassifikation nebeneinander darstellt.

Für alle statistischen Analysen wurde das Softwarepaket SPSS 16.0 für Windows (SPSS) verwendet. Als Maß für das Signifikanzniveau wurde ein p-Wert kleiner oder gleich 0,05 festgelegt.

3.9 Reagenzien

Chemische und biologische Substanzen

Agarose, LE	Promega (Mannheim)
Antimycin A	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Carbonylcyanid-p-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon (FCCP)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
2-Deoxy-D-Glucose	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dexamethason	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Doxorubicin	Pharmacia, Erlangen
Etoposid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Fötale Kälberserum (FKS)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Interleukin 2 (IL-2)	Strathmann Biotec (Hamburg)
Interleukin 7 (IL-7)	Strathmann Biotec (Hamburg)
Laborchemikalien, allgemein	Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Lactacystin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
N-Acetyl-L-Cystein (NAC)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Oligomycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Phytohämagglutinin (PHA-L)	Roche (Mannheim)
Rotenon	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Staurosporin	Merck (Darmstadt)
2-Theonyltrifluoroaceton (TTFA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Oligonukleotide

Pre-designed siRNAs für BCL2	# 214532, # 214533 und # 42815, Ambion (Austin, USA)
Silencer Negative Control siRNA	# 1, Ambion (Austin, USA)
TaqMan-Sonde für TXNIP	# Hs01006900_g1, Applied Biosystems (Foster City, USA)
TaqMan-Sonde für TYMS	# Hs00426591_m1, Applied Biosystems (Foster City, USA)
TaqMan-Sonde für UBB	# Hs00430290_m1, Applied Biosystems (Foster City, USA)

Puffer und Lösungen

Annexinpuffer	10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl ₂
Erythrozyten-Lysepuffer	155 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 1 mM EDTA
JC-1-Färbelösung	5 µg/ml JC-1 in RPMI 1640
JC-1-Stammlösung	2 mg/ml JC-1 in DMSO
PBS-Dulbecco, ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺	8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,15 g/l Na ₂ HPO ₄ , 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ , Biochrom (Berlin)
Probenpuffer für Agarosegele	Blue/Orange Loading Dye, 6X (G-1881), Promega (Mannheim)
Propidiumiod-Färbelösung	PBS supplementiert mit 125 µg/ml Propidiumiodid und 500 µg/ml RNase A
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Acetat, 50 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), pH 8,3, Gibco, Invitrogen (Karlsruhe)
TE-Puffer (100x)	1 M Tris/HCl, 0,1 M EDTA, pH 8,0, Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Reaktions-Kits

ATP-Detektion	ATPlite, PerkinElmer (Rodgau-Jügesheim)
cDNA-Synthese	Reverse Transcription System Kit Promega (Madison, USA)
cRNA-Synthese	BioArray High Yield RNA Transcription-kit, Enzo Diagnostics (Farmingdale, USA); MessageAmp aRNA Kit, Ambion (Austin, USA)
Real-Time PCR	TaqMan-Universal-PCR-Master-Mix, Applied Biosystems (Foster City, USA)
RNA-Isolation	RNeasy Micro-Kit und RNeasy Mini-Kit, Qiagen (Hilden)
Zellfixierung & Permeabilisierung	Fix & Perm, Caltag (Hamburg)

Zellkulturmedien und Zusätze

alpha-MEM + L-Gln + NTP + dNTP	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
Fötales Kälberserum	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
McCoy's 5A	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
RPMI 1640	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
RPMI 1640 ohne Glucose	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)

3.10 Antikörper

Spezifität ¹	Klon	Isotyp	Konjugat ²	Hersteller
Annexin V ³	rekombinant		FITC	Caltag, Invitrogen (Karlsruhe)
Caspase 3	Polyklonal	Kaninchen (IgG)	PE	Becton Dickinson (San Jose, USA)
BCL-2	124	Maus (IgG1)	FITC	DakoCytomation (Hamburg)
CD3	UCHT1	Maus (IgG1)	CY	Coulter/Immunotech (Miami, USA)
CD10	ALB1	Maus (IgG1)	FITC	Coulter/Immunotech (Miami, USA)
CD10	ALB1	Maus (IgG1)	PC5	Coulter/Immunotech (Miami, USA)
CD10	SS2/36	Maus (IgG1)	PE	DakoCytomation (Hamburg)
CD119	GIR-208	Maus (IgG1)	PE	Becton Dickinson (San Jose, USA)
CD11b	Bear1	Maus (IgG1)	PC5	Coulter/Immunotech (Miami, USA)
CD19	J4.119	Maus (IgG1)	PC5	Coulter/Immunotech (Miami, USA)
CD19	J4.119	Maus (IgG1)	PC7	Coulter/Immunotech (Miami, USA)
CD19	HD37	Maus (IgG1)	PB	DakoCytomation (Hamburg)
CD20	L27	Maus (IgG1)	FITC	Becton Dickinson (San Jose, USA)
CD20	L27	Maus (IgG1)	APC-Cy7	Becton Dickinson (San Jose, USA)
CD34	581 (class III)	Maus (IgG1)	FITC	Coulter/Immunotech (Miami, USA)
CD34	581 (class III)	Maus (IgG1)	PE	Coulter/Immunotech (Miami, USA)
CD34	581 (class III)	Maus (IgG1)	PC5	Coulter/Immunotech (Miami, USA)
CD34	581 (class III)	Maus (IgG1)	PC7	Coulter/Immunotech (Miami, USA)
CD45	J.33	Maus (IgG1)	ECD	Coulter/Immunotech (Miami, USA)
CD45	J.33	Maus (IgG1)	PC5	Coulter/Immunotech (Miami, USA)
CD58	AICD58	Maus (IgG2a)	APC	Coulter/Immunotech (Miami, USA)
CD95	CH-11	Maus (IgM)	-	Coulter/Immunotech (Miami, USA)
Maus IgG2a	Polyklonal	Ziege	FITC	Caltag, Invitrogen (Karlsruhe)
p53	DO-1	Maus (IgG2ak)	-	Oncogene, Merck (Darmstadt)
Streptavidin	Polyklonal	Ziege	Biotin	Vector Laboratories (USA)
TdT	HT-6	Maus (IgG1)	FITC	DakoCytomation (Hamburg)

¹ Die verwendeten Antikörper sind (falls nicht anders gekennzeichnet) gegen humane Antigene gerichtet.

² Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Phycoerythrin-Cyanin 5.1 (PC5), Phycoerythrin-Cyanin 7 (PC7), Phycoerythrin-Texas Red (ECD), Allophycocyanin (APC), Allophycocyanin-Cyanin 7 (APC-Cy7), Pacific Blue (PB) und Cascade Yellow (CY).

³ Annexin-V ist ein Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität für Phosphatidylserin.

3.11 Fluoreszenzfarbstoffe

Bezeichnung ¹	Konjugat	Hersteller
DCFDA		Molecular Probes, Invitrogen (Karlsruhe)
Ethidiumbromid		Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
HE		Molecular Probes, Invitrogen (Karlsruhe)
JC-1		Molecular Probes, Invitrogen (Karlsruhe)
NAO		Molecular Probes, Invitrogen (Karlsruhe)
PI		Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
R-PE	Streptavidin	Molecular Probes, Invitrogen (Karlsruhe)
SYTO 16		Molecular Probes, Invitrogen (Karlsruhe)
SYTO 41		Molecular Probes, Invitrogen (Karlsruhe)

¹DCFDA, Dihydrofluoresceindiacetat; HE, Hydroethidin; JC-1, 5,5',6,6',-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanin-Iodid; NAO, Nonylacridinorange; PI, Propidiumiodid; R-PE, R-Phycoerythrin.

3.12 Software

Software	Anwendung	Hersteller
CellQuest Pro	Durchflusszytometrie	Becton Dickinson (San Jose, USA)
Cytomics RXP	Durchflusszytometrie	Beckman Coulter (Miami, USA)
Summit v4.3	Durchflusszytometrie	Beckman Coulter (Miami, USA)
Cluster 3.0/TreeView	Genexpressionsanalyse	Universität v. Kalifornien (Berkeley, USA) (Eisen <i>et al.</i> , 1998)
Microarray Suite 5.0	Genexpressionsanalyse	Affymetrix (Santa Clara, USA)
R	Genexpressionsanalyse	Universität v. Auckland (Auckland, Neuseeland)
SAM 2.0	Genexpressionsanalyse	Stanford Universität (Stanford, USA) (Tusher <i>et al.</i> , 2001)
SPSS 16.0	Statistik	SPSS (Chicago, USA)

3.13 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Bioanalyzer	Agilent 2100	Agilent (Palo Alto, USA)
Brutschrank	IG150	Jouan (Fernwald)
Durchflusszytometer	CyAn _{ADP} , FC500	Beckman Coulter (Miami, USA)
	FACS Calibur, Scan, Vantage	Becton Dickinson (San Jose, USA)
Gelkammer mit Spannungsgeber	Wide Mini Sub Cell 200/2.0	BioRad (München)
Scanner für DNA-Mikroarrays	GeneChip confocal scanner	Hewlett-Packard (Santa Clara, USA)
Inversmikroskop mit Hochdruckquecksilberlampe	Diaphot 300 HB-10101 AF	Nikon (Düsseldorf)
Kühlzentrifuge	Rotanta 460R	Hettich (Berlin)
Kryokonservierung	Cryogenic Freezing Container	Nalgene (Fisher Scientific, Schwerte)
Luminometer	Microlumat LB96P	EG&G Berthold (Badwildbad)
Nucleofector	Nucleofector II	Amaxa (Köln)
Orbitalschüttler	UNIMAX-1010	Heidolph Instruments (Schwabach)
Real-Time PCR-Gerät	ABI PRISM 5700	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Reinraumwerkbank	HERA safe	Heraeus (Hanau)
Spektrophotometer	DU640	Beckman (München)
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000	NanoDrop (Wilmington, USA)
Thermomixer	Comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge	Biofuge Pico	Heraeus (Hanau)
Vakuumzentrifuge mit Kältefalle	Univapo 150A Unicryo	UniEquip (Leipzig)
Videosystem zur Geldokumentation	Eagle eye ii	Stratagene (La Jolla, USA)
Zellzählgerät	AcT-8 Coulter Counter	Beckman Coulter (Miami, USA)

4 Ergebnisse

4.1 Methodische Weiterentwicklungen zur Identifizierung und molekularbiologischen Analyse von MRD-Zellen

Die durchflusszytometrische MRD-Analyse ist eine komplexe und sich noch in der Entwicklung befindende Methode. Die Detektion und Charakterisierung der MRD-Zellen erforderte daher eine Reihe von methodischen Neu- und Weiterentwicklungen.

4.1.1 Optimierung der multiparametrischen durchflusszytometrischen MRD-Detektion mittels bioinformatischer Algorithmen (Toedling *et al.*, 2006)

Der bisherige Einsatz der Durchflusszytometrie zur MRD-Diagnostik hat gezeigt, dass die Detektion der Blasten unter der Therapie wesentlich erschwert ist, wenn die Proben einen komplexen Hintergrund besitzen, wie beim regenerierenden Knochenmark (siehe 4.3.4), wo die potentiellen leukämischen Zellen von normalen Vorläufern zu differenzieren sind. Diese Tatsache erfordert neue Auswertungsstrategien, um die Methode hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zu verbessern. Die konventionelle Auswertung der multidimensionalen durchflusszytometrischen Daten erfolgt in zweidimensionalen Diagrammen, die miteinander kombiniert werden. Dabei gehen wertvolle Informationen über Einzelzellen verloren. Demgegenüber hat eine bioinformatische Auswertung den Vorteil, dass das Informationspotential vollständig ausgenutzt werden kann. Aus diesem Grund sollte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Rainer Spang (Max-Planck-Institut, Berlin) ein Algorithmus entworfen werden, der die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten im multidimensionalen Raum ermöglicht.

Von der Arbeitsgruppe Spang wurde ein überwachtes (*supervised*) Klassifizierungssystem programmiert, das auf einer sogenannten *Support Vector Machine* (SVM) basiert. Es wurde dazu verwendet, leukämische Zellen an den Therapietagen 0, 8 und 15 zu detektieren. Grundlage für die Klassifizierung war das Training der SVM mit Objekten bekannter Klasse (leukämisch/nicht-leukämisch). Aus diesem Grund mussten die normalen und leukämischen Zellen zunächst anhand von Streudiagrammen manuell identifiziert werden. Hierfür standen neben den Streulichtparametern (FSC, SSC) die Expressionswerte von CD10, CD19, CD20 und CD34 zur Verfügung, die einen sechsdimensionalen Datenraum bildeten. Nach der manuellen Gruppierung der Zellen wurde der Datensatz ($n = 37$ Patientenproben) in 50 % Trainingsset und 50 % Testset eingeteilt. In das Trainingsset wurden zusätzlich Proben mit vordefinierter Blastenzahl aufgenommen. Hierzu wurden die normale Blutzellen eines gesunden Spenders mit definierten Mengen von Ficollgradient-angereicherten ALL-Zellen ergänzt. Die Implementierung von künstlichem Rauschen verringerte zusätzlich die

Empfindlichkeit des Klassifikators gegenüber experimenteller Variabilität. Anhand der Trainingsdaten lernte die SVM eine Hyperebene in den durchflusszytometrischen Datenraum einzupassen, die die Objekte (Zellen) so trennte, dass ein möglichst breiter Bereich um die Klassengrenzen entstand, der frei von Objekten war. Hierfür wurde der sogenannte Kernel-Trick verwendet, bei dem die Trainingsobjekte in einen höher dimensionierten Raum überführt wurden, um sie linear trennen zu können. Bei der Rücktransformation wurde die lineare Hyperebene zu einer nichtlinearen, die alle Trainingsobjekte so separiert hatte, dass sie der richtigen Klasse zugehörten.

Das Testset repräsentierte Daten von 18 Patientenproben mit jeweils 10.000 Zellen. Insgesamt wurden somit 180.000 Zellen durch die SVM im Testset klassifiziert. Die automatische Detektion der Leukämiezellen gelang mit einer Sensitivität von 99,78 % und einer Spezifität von 98,87 % (Tab. 1).

Tab. 1: SVM Vorhersage für die Daten des Testsets.

	Leukämisch (SVM)	Physiologisch (SVM)	Summe
Leukämisch (manuell)	37.536 (99,78%)	83 (0,22%)	37.619
Physiologisch (manuell)	1.602 (1,13%)	140.779 (98,87%)	142.381
Summe	39.138	140.862	180.000

Die meisten missklassifizierten Zellen wurden bei der manuellen Untersuchung als nicht-leukämisch eingeordnet und von der SVM als leukämisch klassifiziert (Tab. 1). Sie lagen von den Streulichteigenschaften ausgehend im Bereich der Lymphozyten und waren größtenteils CD19⁺ (Abb. 19). Die Hauptmenge dieser Zellen zeigte zudem eine niedrige CD20- und eine intermediäre CD10-Expression. Daraus ergab sich ein Immunphänotyp, der mit dem von leukämischen Zellen vereinbar ist. Nur aufgrund einer gering schwächeren CD10-Expression, gegenüber den übrigen Leukämiezellen wurden sie manuell nicht als solche klassifiziert (Abb. 19).

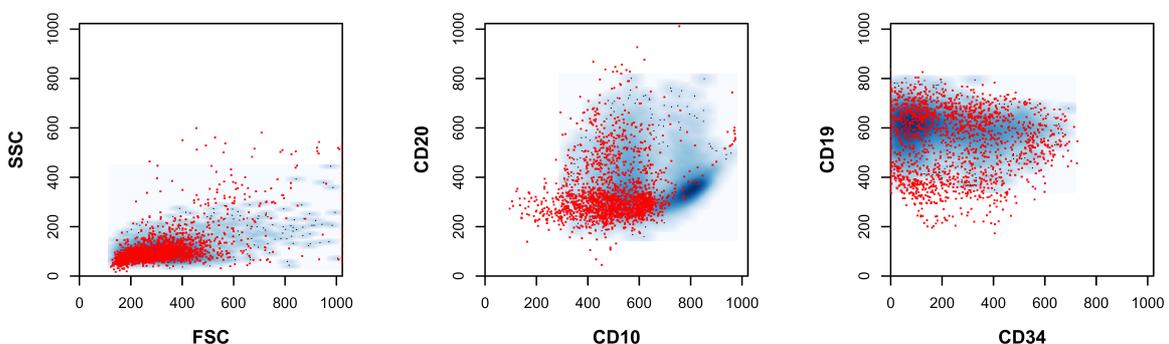


Abb. 19: Darstellung von SVM-detektierten leukämischen Zellen.

Rot dargestellt sind leukämische Zellen, die nur mit der SVM-Methode, nicht aber manuell detektiert werden konnten. Zum Vergleich ist die Dichteverteilung der leukämischen Zellen dargestellt, die von beiden Verfahren als leukämisch klassifiziert wurden (blau).

4.1.2 Etablierung eines experimentellen Verfahrens zur genomweiten Genexpressionsanalyse von MRD-Zellen (Rhein *et al.*, 2007)

Die geringe Anzahl der am Tag 8 der Induktionstherapie persistierenden Leukämiezellen stellte eine große Herausforderung für ihre molekular- und zellbiologische Charakterisierung dar. Aus diesem Grund wurde zunächst ein experimentelles Verfahren etabliert, das eine umfassende molekulare Analyse von seltenen MRD-Zellen ermöglichte.

Die molekulare Charakterisierung der leukämischen Zellen basierte auf einer Genexpressionsanalyse. Die dazu notwendigen methodischen Schritte beinhalteten die Identifizierung und durchflusszytometrische Sortierung leukämischer und normaler B-Zellen, mRNA-Isolierung und cRNA-Amplifizierung aus einer kleinen Zellzahl sowie die Hybridisierung der cRNA-Proben mit Affymetrix HG U133A-Genchips.

Für die Genexpressionsanalyse wurden von 36 Patientenproben (18 Tag0/Tag8-Probenpaare) leukämische Zellen durchflusszytometrisch isoliert. Zusätzlich wurden bei 10 Patientenproben (5 Tag0/Tag8-Probenpaare) parallel auch normale B-Zellen isoliert. Die mittlere Reinheit der leukämischen Zellen lag nach dem Sortiervorgang bei $98\% \pm 0,3\%$ am Tag0 und bei $95\% \pm 0,9\%$ am Tag8. Normale B-Zellen wurden mit einer Reinheit von $93\% \pm 0,3\%$ isoliert (Abb. 20 A).

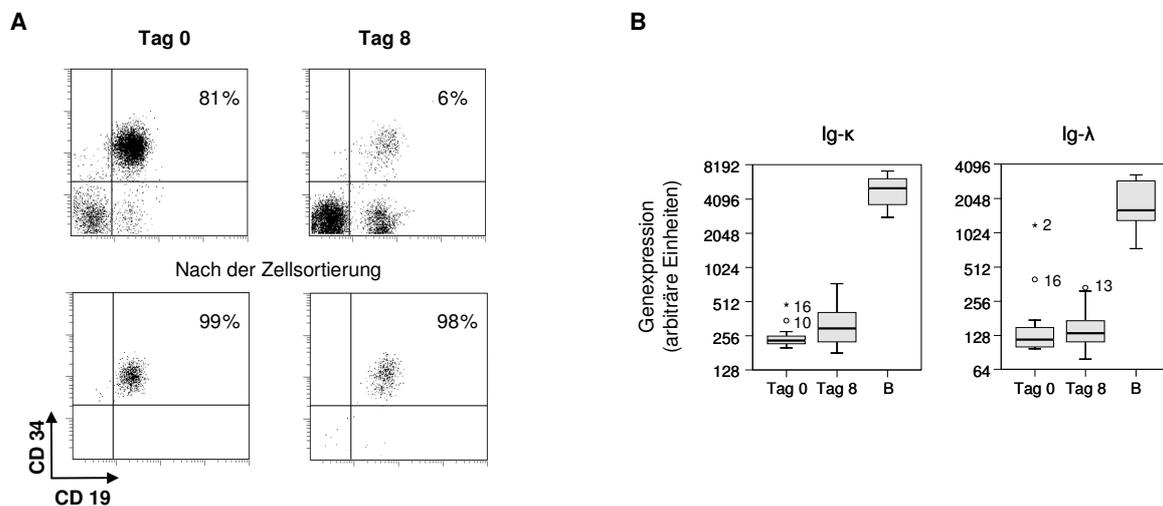


Abb. 20: Hohe Reinheit der sortierten leukämischen und normalen B-Zellpopulationen.

(A) Repräsentative durchflusszytometrische Streudiagramme, die exemplarisch für einen Patienten (Patient 3) am Tag 0 und am Tag 8 den Anteil der leukämischen Zellen vor und nach der Zellsortierung darstellen. (B) Box-Plot-Diagramme der Genexpression von Ig-κ und Ig-λ zeigen keine signifikanten Kontaminationen der isolierten leukämischen Zellen mit normalen B-Zellen.

Die Reinheit der isolierten Zellpopulationen wurde auch auf Genexpressionsebene untersucht. Hierzu wurde die Expression von Genen analysiert, die für die κ- und λ-Leichtkette der Immunglobuline (Ig) kodieren. Sie werden insbesondere von reifen B-Zellen exprimiert, die entweder nur κ⁺ oder λ⁺ sind.

In einer normalen B-Zell-Population können aufgrund der Polyklonalität beide Gene detektiert werden (Abb. 20 B). Die ALL-Zellen sind hingegen monoklonal und exprimieren entweder nur Ig- λ (wie Patient 2 am Tag 0) oder Ig- κ . Aufgrund des unreifen Zustandes der ALL-Zellen war mit Ausnahme von Patient 2 die Expression der Ig-Gene zudem signifikant niedriger als bei normalen B-Zellen und stellte einen zusätzlichen Beleg gegen eine Kontamination dar (Abb. 20 B).

Um zu überprüfen, ob der Sortiervorgang die RNA-Qualität beeinträchtigte, wurden 17 RNA-Proben mit einem Bioanalyzer untersucht. Das dabei bestimmte Verhältnis der 28S- zur 18S-rRNA lag bei $1,8 \pm 0,1$ und deutete auf keinen Verlust der RNA-Integrität hin (Abb. 21 A), was sich bei der folgenden Amplifikation und Hybridisierung bestätigte.

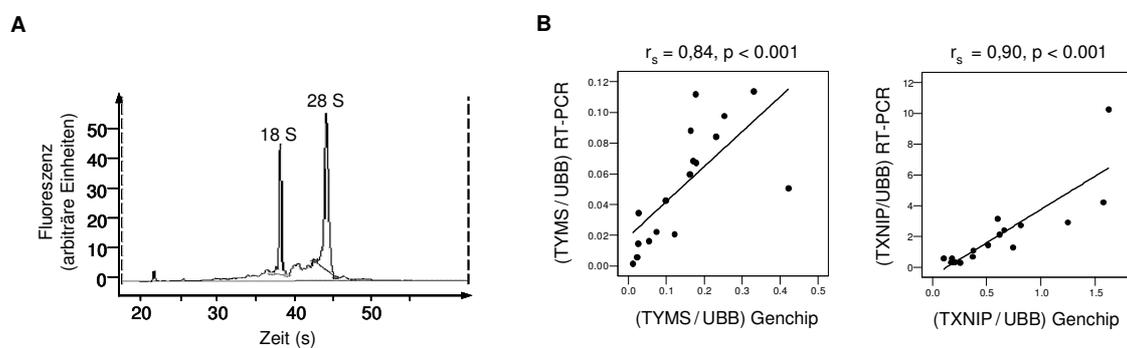


Abb. 21: RNA-Integrität und Validierung der Genchipanalyse mittels Real-Time RT-PCR.

(A) Repräsentatives Elektropherogramm der totalen RNA von durchflusszytometrisch isolierten Zellen. Das Verhältnis der Flächen unter den 28S- und 18S-Peaks liegt bei 1,7 und es sind keine auffälligen Degradationsprodukte zu erkennen. (B) Vergleich der Genchip- und PCR-Analyse für die Expression der Gene *TYMS* und *TXNIP*, die auf *UBB* normalisiert wurden.

Aufgrund der meist geringen Zellzahlen am Tag 8 wurden alle RNA-Proben mittels zweifacher *In-vitro*-Transkription amplifiziert. Bei der Genexpressionsanalyse konnten sowohl am Tag 0 als auch am Tag 8 mehr als 40 % exprimierter Gene ($41,2\% \pm 0,8\%$ bzw. $40,1\% \pm 0,8\%$) detektiert werden. Zu ihnen zählte das Haushaltsgen *GAPDH* (*Glyceraldehyde 3 Phosphate Dehydrogenase*), dessen 3' zu 5'-Signalverhältnis trotz der Amplifizierung in einem moderaten Bereich ($4,4 \pm 0,4$ am Tag 0 und $5,4 \pm 0,6$ am Tag 8) lag und eine gute Hybridisierungsqualität demonstrierte.

Um die Reproduzierbarkeit der Genexpressionsdaten nach zweifacher *In-vitro*-Transkription zu evaluieren, wurde die Expression repräsentativer Gene mit Hilfe der Real-Time RT-PCR überprüft. Aufgrund des limitierten Zellmaterials am Tag 8 wurden insgesamt drei Gene untersucht, von denen eines (*TXNIP*, *Thioredoxin Interacting Protein*) während der Therapie stärker, eines (*TYMS*, *Thymidylate Synthetase*) schwächer und eines (*UBB*, *Ubiquitin B*) unverändert exprimiert wurde. Die Streudiagramme in Abb. 21 B zeigen eine signifikante Korrelation der Genexpressionswerte von Genchipanalyse und PCR.

Das beschriebene Verfahren zur Genexpressionsanalyse ermöglichte die Untersuchung von Patientenproben mit nur 100 Blasten/ μl (Abb. 22). Damit konnten sowohl Prednison-Poor- als auch Prednison-Good-Responder analysiert werden. Für die anschließende Validierung der Ergebnisse an primärem Zellmaterial wurden durchflusszytometrische Methoden verwendet. Die Nachweisgrenzen zur Bestimmung von Zellzyklusverteilung und Proteinexpression lagen bei 10 bzw. 0,2 Blasten/ μl (Abb. 22).

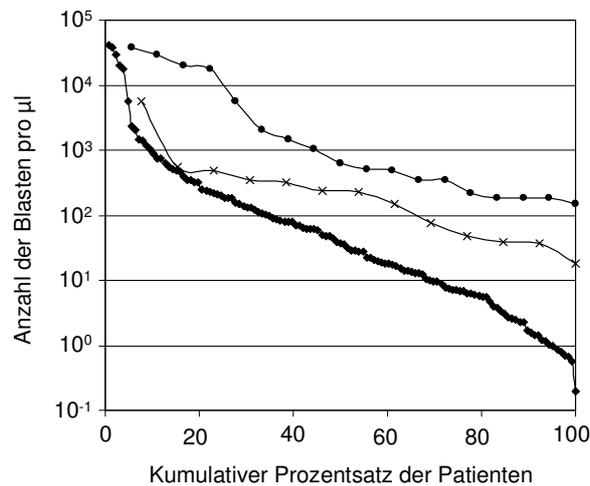


Abb. 22: Prozentuale Verteilung von ALL-Patienten nach ihrer Tag 8-Blastenlast für unterschiedliche Analysemethoden, die innerhalb der Dissertation verwendet wurden.

● Genexpressionanalyse, x Zellzyklusanalyse, ◇ durchflusszytometrische Proteinbestimmung.

4.2 Zellbiologische Charakterisierung von MRD-Zellen (Rhein *et al.*, 2007)

4.2.1 Genexpression unter der Therapie persistierender leukämischer Zellen

Um einen Überblick über die Struktur des Genexpressionsdatensatzes zu erhalten, wurde eine hierarchische Clusteranalyse mit allen Genexpressionsprofilen durchgeführt, die von leukämischen und normalen B-Zell-Proben am Tag 0 und am Tag 8 der Induktionstherapie generiert wurden. Das Dendrogramm in Abb. 23 zeigt, dass sich die Proben in zwei Hauptclustern gruppieren, wobei die normalen B-Zell-Proben von den leukämischen separiert wurden und einen eigenen Subcluster bildeten. Die Anordnung der leukämischen Proben war unabhängig vom Therapiezeitpunkt und erfolgte mit nur zwei Ausnahmen (Patient 10 und 12) patientenspezifisch in den Tag0/Tag8-Probenpaaren. Hinsichtlich der klinischen Parameter zeigten sich keine Gruppierungen für Geschlecht, Alter, Leukozytenzahl, Immunphänotyp und DNA-Index (= relativer DNA-Gehalt der ALL-Zellen bezogen auf diploide benigne Zellen). Einen eigenen Subcluster bildeten nur die Proben der beiden *TEL-AML1*-Patienten. Prednison-Poor-Responder sind in beiden Hauptclustern vertreten, wobei im oberen eine Akkumulation zu erkennen ist.

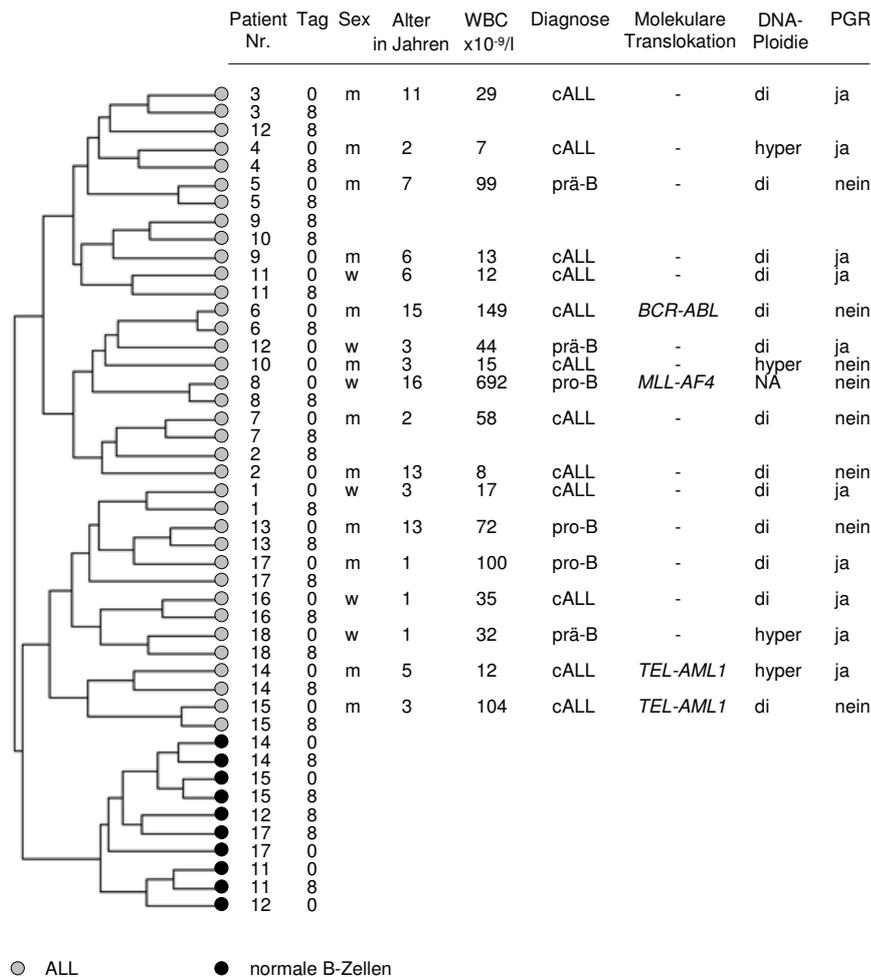


Abb. 23: Hierarchische Clusteranalyse der Genexpressionsprofile leukämischer und normaler B-Zellen generiert am Tag 0 und am Tag 8 der Induktionstherapie.

m, männlich; w, weiblich; PGR, Prednison-Good-Responder.

4.2.1.1 Differentielle Genexpression zwischen den leukämischen Zellen am Tag 0 und am Tag 8 der Induktionstherapie

Das Ergebnis der differentiellen Genexpressionsanalyse war eine Liste von 457 Genen, deren Expression sich unter der Induktionstherapie signifikant veränderte ($FDR < 0.05$). Von diesen Genen wiesen 86 (19%) eine Expressionszunahme am Tag 8 auf, 371 (81%) eine Abnahme. Zur Klassifikation der Gene wurde die *Gene Ontology* (GO)-Datenbank (Ashburner *et al.*, 2000) verwendet. Dabei zeigte sich, dass die meisten Gene (66%) zu den fünf funktionellen Gruppen Stoffwechsel ($n = 216$), Zellzyklus ($n = 47$), Zellkommunikation ($n = 104$) und/oder Apoptose ($n = 20$) gehörten. Darüber hinaus wiesen 14 Gene eine bekannte Funktion bei der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung auf. Sie wurden zusätzlich zu einer neuen Gruppe B-Zell-Entwicklung/Differenzierung zusammengefasst, die in der GO-Datenbank bislang nicht existierte. In Tab. 2 sind die Top 20-Gene der sechs funktionellen Gruppen aufgeführt.

Tab. 2: Differentielle Genexpression zwischen Tag 8 und Tag 0 (Tag 8/Tag 0-Gensatz)¹.

Gen ¹	GO ²	B ³	Tag 8/Tag 0 ⁴	good/poor ⁵	Gen ¹	GO ²	B ³	Tag 8/Tag 0 ⁴	good/poor ⁵
APEX1	2,3		0,48	0,51°	ITGB3BP	2,3,4		0,66	0,46°
BAT1	2		1,58	2,04°	KIF11	1		0,39	0,53°
BCAP31	4		0,66	0,79	KLF4	2		0,45	0,79
BCL2	1,3,4		0,63	0,37°	KNSL7	1		0,55	0,81
BIRC3	2,3,4		1,68	1,08	LAT2	3	+	0,63	0,49°
BIRC5	1,4		0,64	0,76	LY86	3,4		1,54	0,86
BLNK	3	+	0,49	0,33°	LYZ	3		2,29	0,48
BUB1B	1,2		0,53	0,54°	MAD2L1	1		0,39	0,48°
CCNB2	1		0,56	0,72	MCM2	1,2		0,56	0,64°
CCT7	1,2		0,5	0,54°	MCM5	1,2		0,53	0,57
CD10	2,3	+	0,48	1,23	MCM6	1,2		0,51	0,67
CD11b	3		2,31	0,47°	MELK	2		0,43	0,68
CD20	3	+	3,04	2,24	MIF	3,4		0,56	0,82
CD34	3	+	0,63	0,55°	NME1	1,2		0,52	0,54°
CD45	2, 3	+	1,8	0,99	NOTCH2	1,2,3,4	+	1,8	0,93
CD9	2,3	+	0,54	2,39	NPM1	1,2,3,4		0,54	0,73
CD99	3	+	0,63	0,40°	PAICS	2		0,4	0,44°
CDC2L2	1,2,4		0,63	0,96	PCNA	1,2,3		0,57	0,65
CHEK1	1,2,3		0,54	0,83	PDCD2	4		0,61	0,58°
CKS2	1		0,5	1,14	PIR51	2,3		0,38	0,43°
CREM	2,3		2,21	1,42	PRDX4	2,3		0,5	0,9
DAD1	4		0,53	0,42°	PSMA6	2		0,42	0,54°
DATF1	2,4		1,5	0,82	PTPLA	2,3		0,38	0,52°
DPYSL2	2,3		0,47	0,28°	RAD51	1,2,3		0,57	0,79
DSCR1	3		0,4	0,34°	RGS2	1,3		1,75	2,01
EBI2	3		3	0,89	RRM2	2		0,26	0,31°
EGR1	2		0,27	1,45	S100A8	3		7,97	1
EGR3	2		0,43	1,68	ST13	2		0,47	0,44°
EIF1	2,3		3,84	0,98	STMN1	3		0,48	0,68
EMP1	4		0,64	1,26	SWAP70		+	1,66	1,18
ERG	2,3		0,42	0,59	TCF12	2	+	0,64	0,53°
FLJ10849	1		0,57	0,48°	TDT	2,3	+	0,18	0,38
FOS	2,3		0,5	1	TIAF1	3,4		0,65	0,68
FOSL2	2,4		1,73	1,49	TUBB	2,4		0,51	0,49°
FXR1	4		0,63	0,68	TYMS	2		0,25	0,44
GAPDH	2		0,43	0,65	VDAC1	4		0,62	0,66
GPR65	3,4		1,9	1,02	VPREB1		+	0,58	1,39
HCAP-G	1		0,55	0,79	VPREB2		+	0,5	0,61
IFNGR1	3		1,74	1,02	WASF1	2		0,46	0,44°
IL8	1,3		2,5	1,38	ZNF165	2		2,11	1,39
IMPDH2	2		0,39	0,57					

¹Angegeben sind die Gensymbole der GenBank-Datenbank. Die vollständige Liste der Gennamen kann dem Abkürzungsverzeichnis entnommen werden.

²GO annotierte Gruppen: 1, Zellzyklus; 2, Stoffwechsel; 3, Zellkommunikation und Stressantwort; 4, Zelltod.

³Gene der Gruppe B-Zell-Entwicklung/Differenzierung

⁴Mittelwert der patientenspezifischen Quotienten aus der Genexpression am Tag 8 und der Genexpression am Tag 0 (FDR < 0,05)

⁵Quotient der Tag 8-Genexpression von Prednison-Good- und Prednison-Poor-Respondern (°signifikante Unterschiede, FDR < 0,05).

Die Gene, die am Kohlenhydrat-, Protein-, und Nukleinsäurestoffwechsel beteiligt waren, bildeten mit 47% die größte Gruppe. Bei ihnen nahm der Expressionswert in 87% der Fälle am Tag 8 ab, was auf eine verringerte Stoffwechselaktivität hindeutete.

Zur Gruppe der Zellzyklusgene (10%) gehörten eine Reihe bekannter Regulatoren⁵ (CDC2, CHEK1), die alle am Tag 8 schwächer exprimiert wurden, ebenso wie Gene mit Beteiligung

⁵ Im Folgenden sind zu den Gensymbolen nur dann zusätzlich die Gennamen angegeben, wenn die Gene im laufenden Text mehr als einmal wiederholt werden. Die übrigen Gennamen können dem Abkürzungsverzeichnis entnommen werden. Alle Gensymbole stammen aus der GenBank-Datenbank.

an der DNA-Replikation (*RRM2*, *PCNA*) und der Mitose (*KNSL7*, *KIF11*). Die Repression der Zellzyklusgene war ein Hinweis auf eine verringerte proliferative Aktivität der Tag 8-Blasten. Bei der Gruppe Zellkommunikation (23 %) war das Verhältnis von Genen mit Expressionszunahme und -abnahme ausgeglichen. Im Gegensatz zur eindeutigen funktionellen Spezifität der beiden erstgenannten Gruppen wiesen die Gene der Zellkommunikation pleiotrope Eigenschaften auf. Zu dieser Gruppe gehörten neben B-Zell-charakteristischen Genen auch solche, die im Kontext der B-Vorläuferzell-ALL bislang noch nicht beschrieben wurden. Von besonderem Interesse war hierbei die Expressionszunahme von *IFNGR1* und *ITGAM*. Sie kodieren für den Interferon- γ -Rezeptor 1 und das Integrin alpha-M, der CD11b-Untereinheit des Adhäsionsmoleküls CD11b/CD18. Sowohl *IFNGR1* als auch *CD11b* sind in die Aktivierung von Überlebenssignalwegen involviert und könnten für die Persistenz der Tag 8-Blasten von Bedeutung sein.

Zur Gruppe B-Zellentwicklung und Differenzierung gehörten neben bekannten B-Zell-spezifischen Markern auch wichtige Regulatoren der Hämatopoese (*NOTCH2*, *BLNK*, *LAT2*). Die Expressionsabnahme von Progenitorzellantigenen (*CD9*, *CD10*, *CD34*, *TDT*) und die verstärkte Expression von B-Zell- und Leukozytenantigenen (*CD20*, *CD45*) war kennzeichnend für eine Zunahme des Reifungsgrades der leukämischen Zellen am Tag 8. Darüber hinaus wurden mit *VPREB1* (*Pre-B Lymphocyte 1*) und *VPREB2* Gene herunterreguliert, die für Schlüsselkomponenten des Prä-B-Zellrezeptor-Komplexes kodieren. Bei der Weiterleitung der Prä-B-Zellrezeptor-Signale kooperieren die regulatorischen Adapter-Moleküle *BLNK* (*B-cell linker*) und *LAT2* (*Linker for Activation of T cells Family, Member 2*), die ebenfalls am Tag 8 schwächer exprimiert wurden. Insgesamt deuteten diese Ergebnisse darauf hin, dass der Differenzierungsgrad der Blasten unter der Induktionstherapie in Richtung reifer B-Zellen verschoben, und der B-Zellrezeptor-Signalweg inhibiert wurde.

Auf Apoptose-Ebene war vor allem die Expressionsabnahme von *BCL2* bedeutsam. *BCL2* ist der namensgebende Prototyp der antiapoptotischen *BCL2*-Unterfamilie und maßgeblich an der Entwicklung und dem Überleben von B-Vorläuferzellen beteiligt. Dagegen zugenommen hatte die Expression von *BIRC3*, einem Mitglied der antiapoptotischen IAP (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*)-Familie. Diese Moleküle fungieren als Caspase-Inhibitoren und könnten für die Resistenz der Tag 8-Blasten in Frage kommen.

4.2.1.2 Vergleich der Genexpression von leukämischen und normalen B-Zellen am Tag 0 und am Tag 8 der Induktionstherapie

Die spezifischen Expressionsveränderungen von Genen der B-Zellentwicklung wiesen auf eine Differenzierung der Tag 8-Blasten in Richtung reifer B-Zellen hin. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Genexpressionsprofile der leukämischen Zellen vom Tag 0 und vom Tag 8 mit normalen B-Zellen verglichen, die ebenfalls an beiden Therapietagen von denselben Patienten ($n = 5$) isoliert wurden. Für die Untersuchung wurde eine *Principal Component-Analyse* vorgenommen, die die 457 differentiellen Gene des Tag 8/Tag 0-Gensatzes berücksichtigte. Bei der Projektion der Expressionsdaten auf die ersten beiden Hauptkomponenten wurden 53 % der Datenvarianz bewahrt. Abb. 24 zeigt, dass die Blasten am Tag 8 zwischen den Blasten am Tag 0 und den normalen B-Zell-Proben positioniert wurden. Die Signifikanz dieser Anordnung konnte statistisch bestätigt werden ($p < 0,001$).

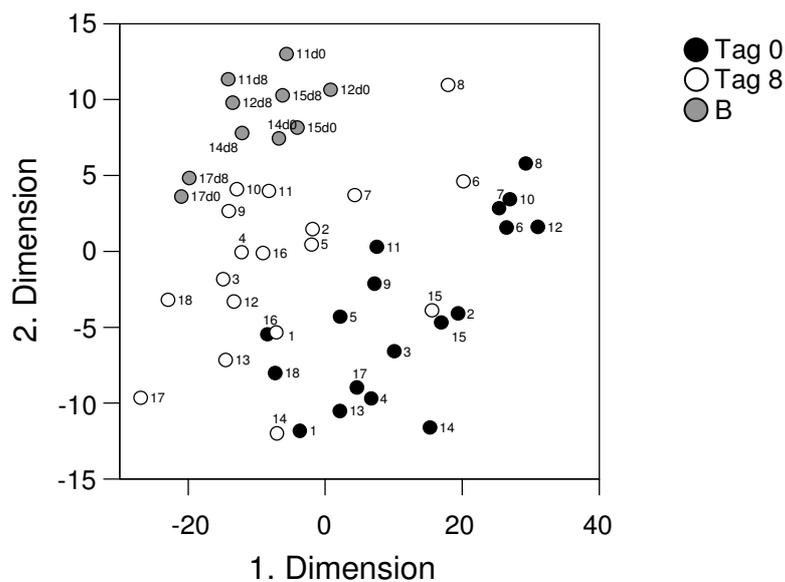


Abb. 24: Genexpressionsverschiebung der Tag 8-Blasten in Richtung reifer B-Zellen.

Vergleich der Genexpression von Tag 0- und Tag 8-Blasten sowie normalen B-Zellen mittels *Principal Component-Analyse*. Für die Untersuchung wurden nur die differentiell exprimierte Gene (Tag 8/Tag 0-Gensatz) verwendet.

4.2.1.3 Differentielle Genexpression zwischen Prednison-Poor- und Prednison-Good-Respondern

Die Sensitivität des Verfahrens, das zur Genexpressionsanalyse von MRD-Zellen etabliert wurde, ermöglichte sowohl die Untersuchung von Prednison-Poor- als auch Prednison-Good-Respondern. Um die Unterschiede des Therapieansprechens beider Gruppen auf Genexpressionsebene zu untersuchen, wurden für den Tag 8/Tag 0-Gensatz Quotienten aus Good- vs. Poor-Respondern bestimmt. Bei der Genexpression am Tag 0 zeigten die beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Am Tag 8 hingegen waren Differenzen bei der Expression von 232 Genen (51 %, FDR < 0,05) zu beobachten (Tab. 2). Diese beruhten vornehmlich auf einer geringeren Reaktion der Blasten von Prednison-Poor-Respondern auf die Glucocorticoid-Therapie. So waren die Expressionswerte von Genen, die unter der Induktionstherapie induziert wurden, bei den Poor-Respondern am Tag 8 im Allgemeinen niedriger als bei den Good-Respondern *et vice versa*. Die Unterschiede zeigten sich insbesondere auf Ebene der Stoffwechsel- (125 von 216) und Zellzyklusgene (20 von 50), die bei den Good-Respondern stärker herunterreguliert worden waren und auf eine schwächere Inhibition von Proliferation und Stoffwechselaktivität bei den Poor-Respondern hindeuteten. In Hinblick auf die Resistenz von Prednison-Poor-Respondern war die geringere Herunterregulation und damit erhöhte Tag 8-Expression des antiapoptotischen Gens *BCL2* zu beachten und erforderte weitere Untersuchungen.

4.2.2 Validierung der Glucocorticoid-induzierten Genexpressionsveränderungen auf zellulärer Ebene und Proteinebene

Zu den zentralen Genexpressionsveränderungen der Tag 8-Blasten zählten die Expressionsverschiebung in Richtung reifer ruhender B-Zellen, die *BCL2*-Expressionsabnahme sowie die verstärkte Expression von *IFNGR1* und *CD11b*. Die Validierung dieser Ergebnisse wurde an unabhängigen Patientenkohorten auf zellulärer Ebene und Proteinebene durchgeführt.

Die durchflusszytometrische Analyse der Proteinexpression bestätigte die mRNA-Expressionsabnahme von *BCL2*, *CD10*, *CD34* und *TDT* sowie die Expressionszunahme von *CD11b*, *CD20*, *CD45* und *IFNGR1*. Der Vergleich mit normalen B-Zellen belegte darüber hinaus den reiferen Zustand der Tag 8-Blasten auf Proteinebene (Abb. 25 A).

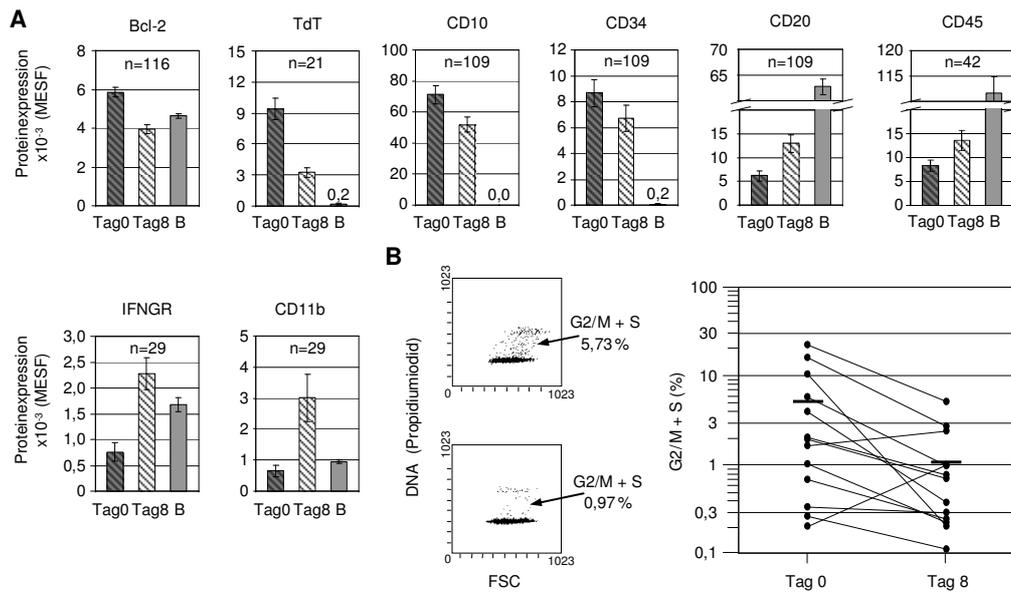


Abb. 25: Validierung des Tag 8/Tag 0-Gensatzes auf zellulärer Ebene und Proteinebene.

(A) Prospektive Untersuchung der Proteinexpression ausgewählter Gene. Angegeben sind die Mittelwerte der Proteinexpressionen von Tag 0, Tag 8 und normalen B-Zellen. Die Expressionsunterschiede Tag 8 vs. Tag 0, Tag 0 vs. B und Tag 8 vs. B sind signifikant ($p < 0,05$). (B) Abnahme der Zellproliferation am Tag 8. Die beiden Streudiagramme zeigen die Zellzyklusverteilung der Blasten eines repräsentativen Patienten (Tag 0: oben, Tag 8: unten). Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil der proliferierenden Blasten aus der G2/M- und S-Phase bei einer Serie von 13 Tag 0/Tag 8-Probenpaaren.

Die Repression der Zellzyklusgene am Tag 8 deutete auf eine Inhibition der proliferativen Aktivität der Blasten hin. Für die Validierung dieser Hypothese wurde der Zellzyklus von leukämischen Zellen am Tag 0 und am Tag 8 bestimmt. Um eine solide statistische Auswertung zu gewährleisten, wurden pro Probe mindestens 10.000 Blasten durchflusszytometrisch isoliert, fixiert und an einem FACScan-Durchflusszytometer analysiert. Insgesamt wurde von 13 Tag 0/Tag 8-Probenpaaren die Zellzyklusverteilung gemessen. Die Untersuchung bestätigte, dass die Zahl der proliferierenden Leukämiezellen am Tag 8 signifikant abnimmt ($p < 0,05$, Abb. 25 B).

4.2.3 Die Bedeutung von BCL-2 für das Therapieansprechen und die Resistenz gegenüber der Induktionstherapie mit Glucocorticoiden

Die GC-induzierte Expressionsabnahme des antiapoptotischen Gens *BCL2* könnte dazu beitragen, dass die Apoptose-Sensitivität der leukämischen Zellen unter der Induktionstherapie erhöht wird. Dafür spricht, dass die *BCL2*-mRNA-Expression am Tag 8 bei Prednison-Poor-Respondern signifikant erhöht war (Tab. 2). Zur Überprüfung der Hypothese wurde die *BCL2*-Proteinexpression mit den Zytoreduktionsraten unter der Induktionstherapie (Tag 8 und Tag 15) verglichen. Dabei zeigte sich, dass die *BCL2*-Proteinexpression am Tag 8, nicht aber am Tag 0 invers mit den Zytoreduktionsraten korrelierte (Tag 8: $r_s = 0,3$, $p < 0,001$; Tag 15: $r_s = 0,4$, $p = 0,003$).

Zur funktionellen Untersuchung der Bedeutung von BCL-2 für die GC-induzierte Apoptose wurden die B-Zelllinien Sup-B15 und TOM-1 mit Dexamethason behandelt. Sup-B15 war hochsensitiv gegenüber dem GC und reagierte bereits bei niedrigen Konzentrationen ($0,01 \mu\text{M}$ Dexamethason) mit Apoptose, die 12 bis 24h nach Beginn der Behandlung detektierbar war (Abb. 26 A). Für TOM-1-Zellen wurden höhere GC-Konzentrationen ($1 \mu\text{M}$ Dexamethason) benötigt, die den Zelltod nach ca. 24 bis 48h induzierten (Abb. 26 B). Ein G1-Zellzyklusarrest wurde in beiden Zelllinien beobachtet, war aufgrund der verzögerten Apoptose in den TOM-1-Zellen aber stärker ausgeprägt (Abb. 26 B).

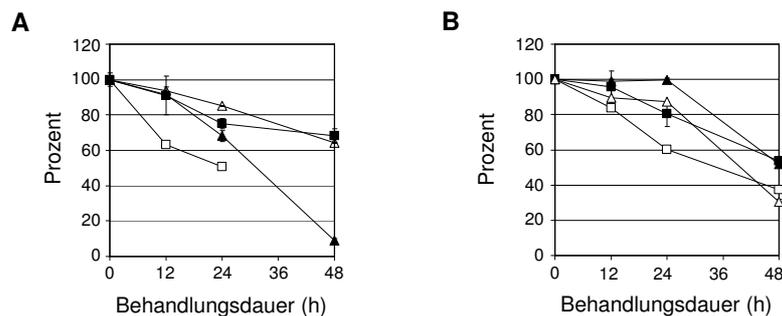


Abb. 26: Einfluss der Glucocorticoid-Behandlung auf BCL-2-Expression, Zellzyklusverteilung und Apoptose in ALL-Zelllinien.

Die ALL-Zelllinien Sup-B15 (A) und TOM-1 (B) wurden mit Dexamethason behandelt (SUP-B15: $0,01 \mu\text{M}$, TOM-1: $1 \mu\text{M}$) und nach 0, 12, 24 und 48 h untersucht. Die Vitalität der Zellen (▲), die Zellzyklusverteilung (Δ) und die BCL-2-Proteinexpression (■) wurden durchflusszytometrisch in Triplets bestimmt, die BCL-2-mRNA-Expression (□) stammt aus der Genexpressionsanalyse, die ohne Replikate durchgeführt wurde. Die angegebenen Werte sind relative Prozente bezogen auf die unbehandelten Zellen (0 h).

Mit Hilfe von Genchips wurden GC-induzierte kinetische Genexpressionsveränderungen der beiden Zelllinien untersucht (Zeitpunkte: 0, 6, 12, 24 und 48 h). Dazu wurden die vitalen Zellen an jedem Beobachtungszeitpunkt durchflusszytometrisch isoliert und anschließend auf mRNA-Ebene analysiert. Die Ergebnisse bestätigten unter anderem die *in vivo* beobachtete Herunterregulation der BCL2-Expression (Abb. 26). Darüber hinaus konnte durch zusätzliche kinetische Messungen gezeigt werden, dass nach einer frühen Herunterregulation der mRNA-Expression die BCL-2-Proteinexpression abnahm und darauffolgend Apoptose induziert wurde (Abb. 26).

Die am Tag 8 beobachtete Genexpressionsverschiebung in Richtung reifer B-Zellen war bei den beiden GC-behandelten Zelllinien hingegen weniger stark ausgeprägt. Eine Gemeinsamkeit war nur die GC-induzierte Herunterregulation des für die B-Zellentwicklung essentiellen Interleukin-7-Rezeptors (IL-7R/CD127). Der IL-7R-Signalweg vermittelt während der Lymphopoese wichtige Überlebenssignale, die mit der BCL-2-Expression gekoppelt sind (Lu *et al.*, 2000). Ihre koordinierte Herunterregulation bei der GC-induzierten Apoptose geht aus den signifikanten Korrelationen ($r_s = 0,75$ bis $0,85$, $p < 0,05$) in Abb. 27 A

hervor. Die Aktivierung des IL-7R-Signalweges hingegen verhinderte sowohl bei TOM-1-Zellen (Daten nicht gezeigt) als auch bei Sup-B15-Zellen, die Herunterregulation von BCL-2 und damit die GC-induzierte Apoptose (Abb. 27 B).

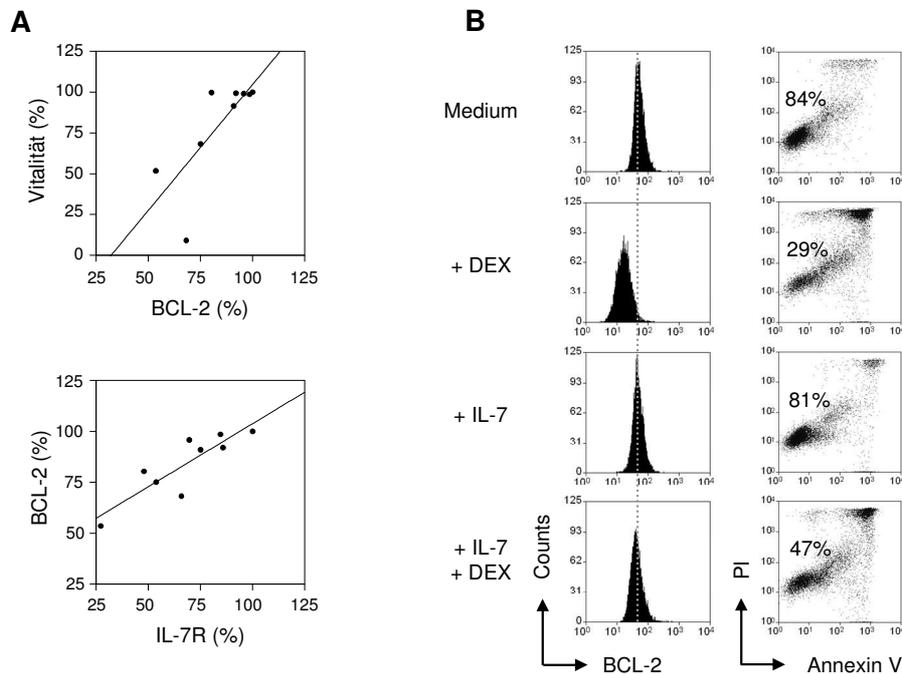


Abb. 27: Bedeutung des IL-7R-Signalweges für die BCL-2-abhängige Glucocorticoid-Sensitivität.

(A) Korrelation der BCL-2- und IL-7R-Proteinexpression mit der Vitalität von TOM-1- und SUP-B15-Zellen nach Dexamethason-Behandlung. Die angegebenen Werte sind relative Prozente bezogen auf die unbehandelten Zellen (0 h). (B) Die ALL-Zelllinie Sup-B15 wurde in Anwesenheit oder Abwesenheit von IL-7 mit 0,01 μ M Dexamethason behandelt und nach 24 h untersucht. Sowohl die Apoptose (Annexin V/PI) als auch die IL-7R- und BCL-2-Proteinexpression wurden durchflusszytometrisch bestimmt.

Zusammengefasst deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass BCL-2 ein wichtiges Ziel der GC-Wirkung darstellt. Die Herunterregulation der Expression scheint eine Voraussetzung für den GC-induzierten Zelltod und für ein frühes Therapieansprechen zu sein. Eine erhöhte BCL-2-Expression könnte demnach als antiapoptotische Schwelle fungieren, die zur Resistenz gegenüber der GC-Behandlung und der weiteren Induktionstherapie beiträgt.

Um den kausalen Zusammenhang zwischen der GC-induzierten Herunterregulation von BCL-2 und der Apoptoseinduktion in ALL-Zellen zu untersuchen, wurde in TOM-1-Zellen die BCL-2-Expression mit Hilfe spezifischer siRNAs moduliert. Dabei zeigte sich, dass die alleinige Herunterregulation der BCL-2-Expression ausreichend war, um Apoptose zu induzieren. Diesbezüglich korrelierte die BCL-2-Proteinexpression signifikant mit dem prozentualen Anteil der lebenden Zellen ($r_s = 0.81$, $p < 0,05$; Abb. 28 A).

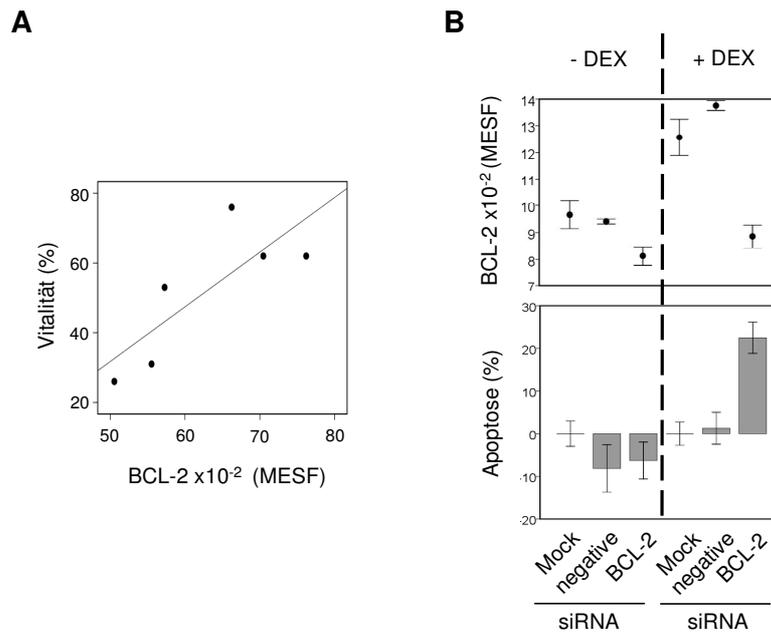


Abb. 28: BCL-2-Expression als Schwellenwert der Glucocorticoid-induzierten Apoptose.

(A) Korrelation von Zellvitalität und BCL-2-Proteinexpression in TOM-1-Zellen. TOM-1-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von siRNA gegen BCL2 transfiziert und nach 24 h auf Apoptose-Ebene untersucht (Transfektionsrate: 81 %, Vitalität: 62 % ± 1 %). (B) siRNA gegen BCL2 sensibilisiert resistente primäre ALL-Zellen für die GC-induzierte Apoptose. Primäre ALL-Zellen eines Prednison-Poor-Responders wurden mit siRNA gegen BCL2 transfiziert und für 24 h in An- oder Abwesenheit von 10 µM Dexamethason inkubiert (Transfektionsrate: 76 % ± 2 %, Vitalität: 59 % ± 2 %). Die relativen Apoptosewerte beziehen sich auf die unbehandelten (Mock) Kontrollzellen.

Die funktionelle Anwendbarkeit dieser Erkenntnis konnte an primären ALL-Zellen gezeigt werden. Sie wurden dazu mit BCL2-spezifischer siRNA transfiziert und in Gegenwart von Stromazellen kokultiviert, um die spontane Apoptoserate zu reduzieren. In diesem experimentellen Zellsystem wurden primäre Zellen eines Prednison-Poor-Responders (Patient 5) untersucht, dessen BCL2-mRNA-Expression am Tag 8 der Induktionstherapie um 7 % zunahm. Auch *in vitro* nahm die BCL2-Expression in Gegenwart von 10 µM Dexamethason zu (23 % nach 24h) und verhinderte die GC induzierte Apoptose. Mit Hilfe der siRNA wurde die Zunahme der BCL-2-Proteinexpression verhindert und die resistenten Zellen für die Dexamethason-Behandlung sensibilisiert (Abb. 28 B).

4.3 Die Bedeutung der Expression des Oberflächenrezeptors CD11b bei der B-Vorläuferzell-ALL (Rhein *et al.*, 2010)

Die erhöhte Genexpression von *CD11b* und *IFNGR1* war charakteristisch für die Tag 8-Blasten und konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden (siehe 4.2.2). Beide Rezeptoren sind an der Regulation von Apoptose- und Überlebenssignalwegen beteiligt (Hamada *et al.*, 2005; Plataniias, 2005) und könnten als potentielle Resistenzfaktoren für die Persistenz leukämischer Zellen mitverantwortlich sein. Diesbezüglich stellte sich die Frage, ob Patienten mit leukämischen Zellen, die diese Moleküle bereits zum Zeitpunkt der Diagnose exprimieren, ein schlechteres Therapieansprechen aufweisen.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde zunächst die Tag 0-mRNA-Expression mit den frühen Response-Parametern Blastenprozentanteil (Blasten-%) und Blastenreduktionsrate (BRR) am Tag 8 verglichen. Dabei zeigte sich, dass die *IFNGR1*-Expression nicht mit dem frühen Therapieansprechen assoziiert war ($p > 0,05$, nicht gezeigt). Demgegenüber korrelierte die *CD11b*-mRNA-Expression sowohl mit Blasten-% ($r_s = 0,61$, $p = 0,007$; Abb. 29) als auch mit BRR ($r_s = -0,53$, $p = 0,025$) am Tag 8.

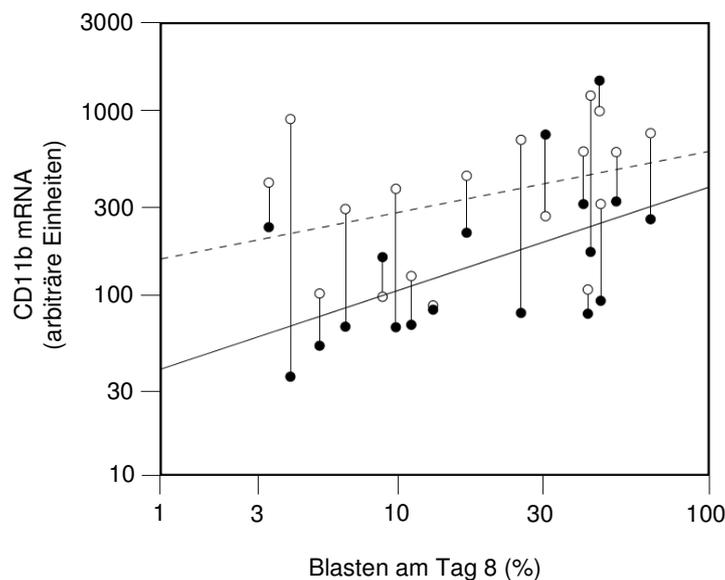


Abb. 29: Korrelation der CD11b-mRNA-Expression mit dem Prozentanteil der am Tag 8 persistierenden Blasten.

Die *CD11b*-mRNA-Expression zum Zeitpunkt der Diagnose (schwarze Kreise) korreliert signifikant mit dem Prozentanteil der Blasten am Tag 8 ($r_s = 0,61$, $p = 0,007$). Die *CD11b*-Expression am Tag 8 (weiße Kreise) ist konsistent höher als am Tag 0.

Um die klinische Bedeutung von CD11b bei der ALL zu untersuchen, wurde daraufhin eine prospektive Studie durchgeführt, bei der die Proteinexpression zum Zeitpunkt der Diagnose analysiert wurde.

4.3.1 Die CD11b-Expression im Kontext von initialen klinischen Parametern und Therapieansprechen

Insgesamt wurden Blutproben von 159 Patienten analysiert, bei denen die CD11b-Proteinexpression durchflusszytometrisch bestimmt wurde. Der Antikörper gegen CD11b war mit PC5 konjugiert und wurde in Kombination mit Antikörpern gegen CD19, CD10 und CD34 gemessen. CD11b besaß bei den ALL-Patienten ein breites Expressionsspektrum mit Intensitäten, die zwischen 0 und 77800 MESF variierten (Mittelwert: 1840 MESF; Median: 361 MESF). Tab. 3 zeigt die CD11b-Expressionsdaten im Kontext der initialen klinischen Parameter (Geschlecht, Alter, Leukozytenzahl, Immunphänotyp, molekulare Translokation, DNA-Index).

Tab. 3: CD11b-Expression im Kontext der initialen klinischen Parameter.

	Anzahl der Patienten	CD11b in MESF (SE)	P
Geschlecht			
Männlich	88	2390 (910)	0,24
Weiblich	71	1170 (250)	
Alter (Jahren)			
1 - 9	123	1930 (650)	0,76
10 - 18	36	1540 (480)	
Leukozytenzahl			
< 50.000/ μ l	132	2010 (620)	0,50
\geq 50.000/ μ l	24	1020 (370)	
Immunphänotyp			
Pro	1	1752	0,49 ²
Common	137	2000 (600)	
Prä	16	770 (340)	
Rest ¹	5		
BCR-ABL			
Positiv	7	3420 (1100)	0,52
Negativ	152	1780 (540)	
MLL-AF4			
Positiv	1	1960	
Negativ	138	2010 (590)	
TEL-AML1			
Positiv	43	260 (37)	0,002
Negativ	113	2500 (720)	
DNA-Index			
< 1,16	118	1700 (680)	0,50
\geq 1,16	33	2600 (490)	

¹Rest = biphänotypisch oder nicht spezifiziert

²Common-ALL vs. Prä-B-ALL

³durchflusszytometrisch bestimmt

SE = Standardfehler

Die statistische Untersuchung von Expressionsunterschieden zwischen klinisch und prognostisch relevanten Subgruppen (Schrappe, 2008) basierte auf dem Mann-Whitney-U-Test. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Geschlecht (männlich vs. weiblich), Alter (1 bis 9 Jahre vs. 10 bis 18 Jahre), Leukozytenzahl (kleiner vs. größer als 50.000 Zellen/ μ l), DNA-Index (kleiner vs. größer als 1,16), Immunphänotyp (*Common-* vs. *Prä-B-ALL*) oder *BCR-ABL*-Status (positiv vs. negativ) (Tab. 3). Die *TEL-AML1*-positiven Patienten hingegen waren größtenteils CD11b-negativ und ihre Expression unterschied sich signifikant von den restlichen Patienten ohne diese Translokation (260 MESF \pm 37 MESF vs. 2500 MESF \pm 720 MESF, $p = 0,002$; Tab. 3).

Darüber hinaus korrelierte die CD11b-Expression signifikant mit BRR als auch mit Blasten-% an allen klinisch bedeutenden MRD-Zeitpunkten der Induktionsphase (peripheres Blut: Tag 8; Knochenmark: Tag 15 und Tag 33, Tab. 4).

Tab. 4: Korrelation der CD11b-Expression mit dem Ansprechen auf die Induktionstherapie.

	Anzahl der Patienten	Spearman-Koeffizient	P
BRR			
Tag 8	107	-0,27	0,005
Tag 15	69	-0,26	0,030
Tag 33	71	-0,25	0,036
Blasten-%			
Tag 8	107	0,32	0,001
Tag 15	78	0,22	0,053
Tag 33	77	0,28	0,014

4.3.2 Die unabhängige prognostische Bedeutung von CD11b

Zur Untersuchung der prognostischen Bedeutung von CD11b wurden der Remissionsstatus am Ende der Induktionstherapie (durchflusszytometrische MRD-Bestimmung am Tag 33) und die Riskogruppenstratifizierung nach Ende der Konsolidierungstherapie (Tag 78) herangezogen. Beide Parameter wurden als binäre Variablen (MRD-positiv vs. MRD-negativ, Hochrisiko ja vs. nein) verwendet und mittels Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurvenanalyse untersucht.

Die ROC-Analyse diente zur Bestimmung des optimalen CD11b-Grenzwertes zur Vorhersage von MRD-positiven und Hochrisiko-Patienten. Dazu wurde für die CD11b-Expression das Verhältnis von Richtig-positiv- („Sensitivität“) zur Falsch-positiv-Rate („1 – Spezifität“) gegenübergestellt (Abb. 30). Die Flächen unter den Kurven (AUC) entsprachen der Vorhersagegenauigkeit von CD11b. Ihre Werte lagen mit 0,69 und 0,71 zwischen den Extremwerten von 0,5 (keine Differenzierung möglich) und 1 (perfekte Klassifizierung) und demonstrierten, dass CD11b Patientengruppen differenzieren kann, die sich im klinischen

Verlauf und der Prognose unterscheiden. Der optimale Grenzwert zur Vorhersage der MRD-Positivität am Tag 33 war 515 MESF. Das dazugehörige Quoten-Verhältnis (*Odds Ratio*, OR) von 5,2 besagte, dass bei einer CD11b-Expression größer als 515 MESF die Wahrscheinlichkeit für eine MRD-Positivität um das 5,2-fache erhöht war ($p = 0,003$). Patienten mit einer CD11b-Expression größer als 773 MESF besaßen zudem eine 5,5-fach höhere Wahrscheinlichkeit, in die Hochrisikogruppe anstelle der Standardrisikogruppe stratifiziert zu werden ($p = 0,004$).

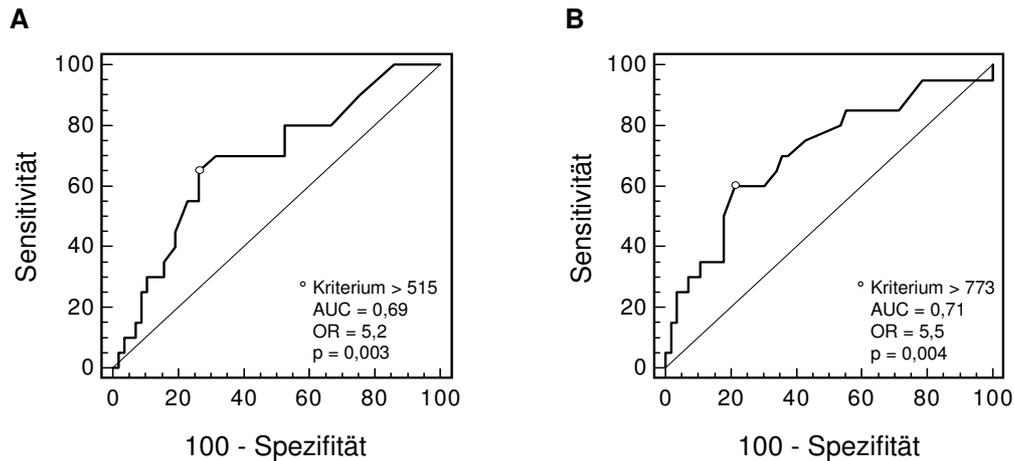


Abb. 30: ROC-Kurvenanalyse für die Diskriminierung von MRD-Status (positiv vs. negativ) und Risikogruppe (Hoch vs. Standard) anhand der CD11b-Expressionswerte.

(A) Eine CD11b-Expression von 515 MESF entspricht dem Grenzwert der MRD-positiven von MRD-negativen Patienten mit der größten Wahrscheinlichkeit (Likelihood) separiert (OR = 5,2, 95 %-Konfidenzintervall (CI): 1,7 – 15,5; $p = 0,003$). (B) Bei einer CD11b-Expression größer als 773 MESF haben Patienten eine 5,5-fach erhöhte Wahrscheinlichkeit, ein Hochrisiko aufzuweisen (OR = 5,5, 95 % CI: 1,8 – 16,5; $p = 0,003$).

In einer multivariaten Regressionsanalyse sollte die unabhängige prognostische Aussagekraft von CD11b evaluiert werden. Als weitere prognostische Faktoren dienten die klinischen Parameter, die ebenfalls zum Zeitpunkt der Diagnose zur Verfügung standen: Alter, Leukozytenzahl, DNA-Index, Geschlecht, *BCR-ABL*- und *MLL-AF4*-Status. Bei der Analyse zeigte sich, dass CD11b als unabhängiger prognostischer Faktor zur Vorhersage des MRD-Status ($p < 0,001$) und der Risikogruppe ($p = 0,004$) beitrug. In Tab. 4 ist die Vorhersagegenauigkeit der beiden Modelle dargestellt (MRD-Status: 82 %; Risikogruppenstratifizierung: 85 %). Aufgrund der meist fehlenden CD11b-Expression bei *TEL-AML1*-positiven Patienten war zudem der Einfluss der molekularen Translokation auf die prognostische Signifikanz von CD11b zu überprüfen. Hierzu wurden die beiden Regressionsanalysen ohne Patienten mit *TEL-AML1*-Translokation wiederholt. In beiden Modellen blieb CD11b ein unabhängiger prognostischer Faktor: MRD-Status ($p = 0,003$, Vorhersagegenauigkeit: 78 %), Risikogruppe ($p = 0,015$, Vorhersagegenauigkeit: 89 %) (Daten nicht gezeigt).

Tab. 4: Logistische Regressionsanalyse mit der initialen CD11b-Expression*/.**

Beobachtung	Vorhersage des MRD-Status			Vorhersage der Risikogruppe		
	Negativ	Positiv	Summe	Standard	Hoch	Summe
Negativ	48	5	53 (91%) ¹	-	-	-
Positiv	8	11	19 (58%) ²	-	-	-
Summe	56 (86%) ³	16 (69%) ⁴	72 (82%) ⁵	-	-	-
Standard	-	-	-	49	3	52 (94%) ¹
Hoch	-	-	-	8	12	20 (60%) ²
Summe	-	-	-	57 (86%) ³	15 (80%) ⁴	72 (85%) ⁵

* zusammen mit Alter, Leukozytenzahl, DNA-Index, Geschlecht, Zytogenetik (BCR-ABL und MLL-AF4)

** CD11b cut-offs: 515 MESF (MRD), 773 MESF (Risikogruppe)

¹Spezifität, ²Sensitivität, ³Negativer Vorhersagewert, ⁴Positiver Vorhersagewert, ⁵Vorhersagegenauigkeit.

4.3.3 CD11b-Expression in MRD-Blasten während der Induktions-/Konsolidierungstherapie

Der Expressionsanstieg von CD11b am Tag 8 führte zur Fragestellung, ob der Oberflächenrezeptor zur besseren Identifizierung von MRD-Zellen beitragen könnte.

Um CD11b als potentiellen MRD-spezifischen Marker zu evaluieren, wurde die Proteinexpression bei 53 Patienten an klinisch bedeutenden MRD-Zeitpunkten gemessen. Der CD11b-PC5-Antikörper wurde dazu in ein 9-Farb-Panel integriert, das zur durchflusszytometrischen MRD-Bestimmung verwendet wurde und neben dem Nukleinsäurefarbstoff SYTO-16 Fluorochrom-konjugierte Antikörper gegen CD3, CD10, CD19, CD20, CD34, CD45 und CD58 beinhaltete.

Im peripheren Blut wurde die CD11b-Expression am Tag 0 und am Tag 8 der Induktionstherapie bestimmt. Bei 88 % der Patienten (42/48) nahm die Expression in den MRD-Blasten zu und der Mittelwert am Tag 8 stieg um das 4,7-fache ($p < 0,001$) an. Im Knochenmark am Tag 15 waren 45 von 53 Patienten MRD-positiv und die CD11b-Expression erhöhte sich um das 10,5-fache von 693 auf 7296 MESF ($p < 0,001$) (Abb. 31 A). Der Prozentanteil der Patienten mit niedriger Expression (≤ 500 MESF) verringerte sich dabei von 59 % am Tag 0 auf 14 % am Tag 15. Demgegenüber erhöhte sich der Anteil von Patienten mit mittlerer (501 bis 5000 MESF) und hoher Expression (> 5000 MESF) von 41 % auf 50 % bzw. von 0 % auf 36 % (Abb. 31 B). Am Tag 33 waren neun von 50 Patienten MRD-positiv. Die mittlere CD11b-Expression betrug 7433 MESF und unterschied sich nicht von der Tag 15-Expression (7296 MESF). Diesbezüglich von besonderer Bedeutung war, dass im Fall eines CD11b-Anstiegs am Tag 15 die Expression am Tag 33 konstant blieb (Abb. 31 C). Am Tag 78 waren 2 von 53 Patienten MRD-positiv. Beim ersten Patienten nahm die CD11b-

Expression von 630 MESF am Tag 0 auf 14952 MESF am Tag 78 zu und der zweite Patient blieb während der Induktions-/Konsolidierungstherapie CD11b-negativ.

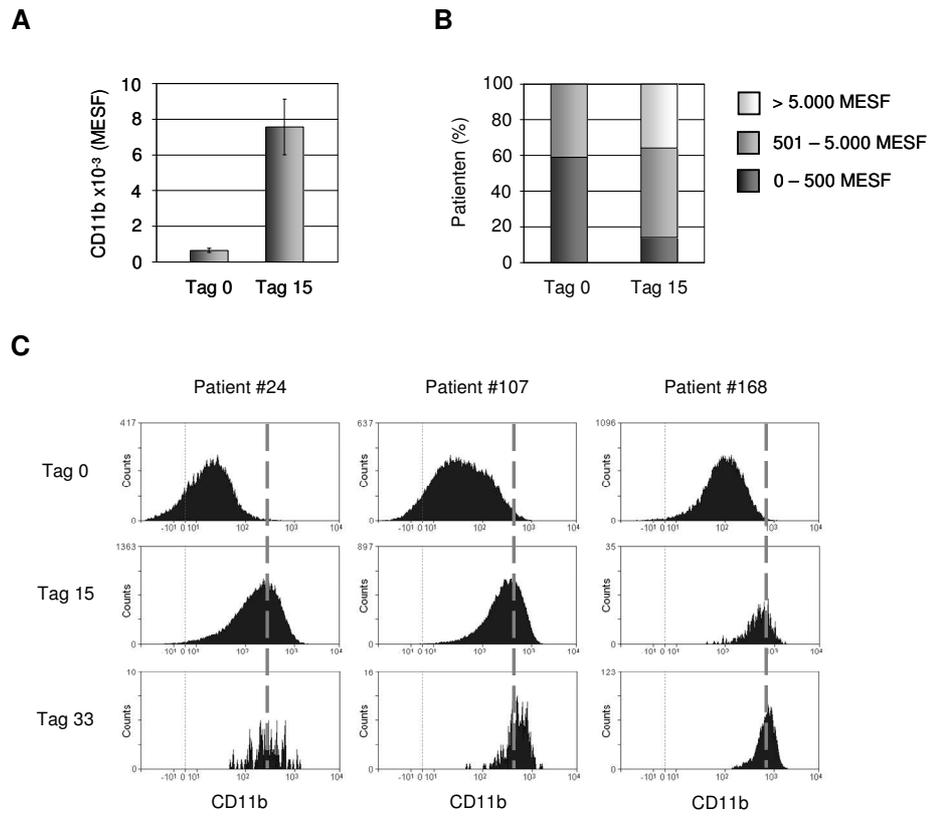


Abb. 31: Konsistent erhöhte CD11b-Expression in MRD-Blasten während der Induktionstherapie.

(A) Signifikanter Anstieg der CD11b-Expression am Tag 15 der Induktionstherapie (44 Tag 0/Tag 15-Probenpaare). (B) Prozentanteil der Patienten mit niedriger (0 – 500 MESF), mittlerer (501 bis 5000 MESF) und hoher CD11b-Expression (> 5000 MESF). (C) Repräsentative Beispiele von Patienten mit konsistent erhöhter CD11b-Expression unter der Induktionstherapie.

Die therapiebedingte Zunahme der CD11b-Expression war entweder mit der Selektion eines präexistierenden Subklons oder transkriptioneller Regulation der Genexpression zu erklären. Aufgrund der meist drastischen Zytoreduktion der Blasten unter der Induktionstherapie ließ sich eine Selektion rechnerisch nur selten ausschließen. Trotzdem war es möglich, in zwei Fällen mit mehr als 200-facher Expressionszunahme von CD11b zu zeigen, dass die absolute Blastenzahl der CD11b⁺-Zellen am Tag 15 höher war als am Tag 0 (Abb. 32, Patient 43 und 74). Die Zunahme der Blastenzahl war durch alleinige Selektion nicht erklärbar und wies auf eine zusätzliche Aktivierung der CD11b-Genexpression hin oder die Expansion CD11b⁺-leukämischer Zellen. Das dritte Beispiel in Abb. 32 (Patient 195) zeigt den seltenen Fall einer bimodalen CD11b-Expression am Tag 0. In diesem Beispiel persistierte nur die CD11b⁺-Population am Tag 15, was auf eine Selektion der CD11b-exprimierenden Blasten hindeutete.

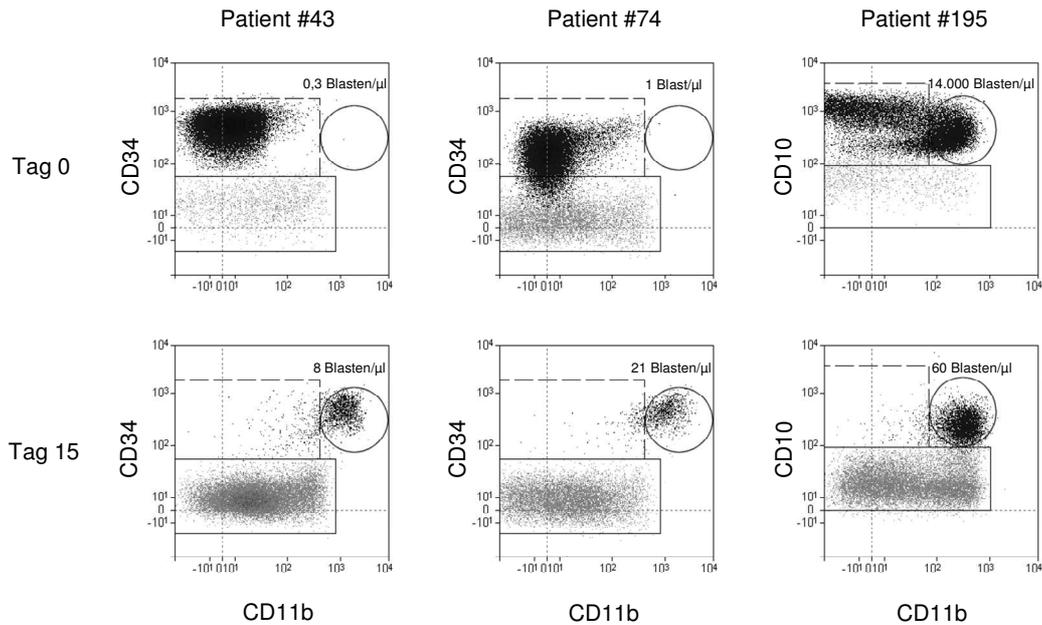


Abb. 32: CD11b-Expression in MRD-Blasten unter der Induktionstherapie: Modulation vs. Selektion.

Vergleich der absoluten Blastenzahlen (als Blasten pro μl in den Streudiagrammen angegeben) am Tag 0 und am Tag 15. In den Diagrammen sind nur die $\text{CD}19^+$ -Zellen dargestellt (schwarz: ALL-Zellen, grau: normale B-Zellen). Im linken und mittleren Beispiel demonstriert die quantitative Zunahme der $\text{CD}11\text{b}^+$ -Blasten (Kreisregion) einen therapieinduzierten Expressionsanstieg. Das rechte Beispiel zeigt eine bimodale $\text{CD}11\text{b}$ -Expression am Tag 0. Am Tag 15 persistiert nur die $\text{CD}11\text{b}^+$ -Population, was auf einen Expressionsanstieg durch Selektion hindeutet.

4.3.4 CD11b als potentielles MRD-spezifisches Antigen

Um CD11b als MRD-spezifischen Marker etablieren zu können, war zu prüfen, ob er die Diskriminierung der leukämischen Blasten von normalen reifen und unreifen B-Zellen ermöglicht. Reife B-Zellen besitzen eine bimodale Intensitätsverteilung der CD11b-Expression (Abb. 32 und Abb. 33), die durch naive ($\text{CD}11\text{b}^-$) und Gedächtnis-B-Zellen ($\text{CD}11\text{b}^+$) repräsentiert werden (Szczepanski *et al.*, 2006). Der Anteil der $\text{CD}11\text{b}^+$ -Gedächtniszellen variierte zwischen 6 und 51 % (Mittelwert: 23 % \pm 3 %, n = 20 Patienten) und besaß eine mittlere CD11b-Expression von 5700 MESF \pm 700 MESF. Zum Vergleich: Der Probenanteil mit MRD-Zellen, die eine höhere Expression aufwiesen, lag am Tag 8 bei 33 %, am Tag 15 bei 38 % und am Tag 33 bei 33 %.

Abb. 33 A zeigt ein Beispiel einer MRD-Probe vom Tag 15, die nur wenige $\text{CD}19^+\text{CD}10^+$ -Zellen beinhaltete. Diese Zellen wiesen mit Ausnahme der starken $\text{CD}10^-$ - und $\text{CD}11\text{b}^-$ -Positivität einen normalen B-Zell Immunphänotyp auf, der durch Expression von $\text{CD}20$ und $\text{CD}45$ und die Abwesenheit von $\text{CD}58$ gekennzeichnet war. In diesem Fall diente nur die aberrante $\text{CD}11\text{b}$ -Expression als zusätzlicher Marker, um die $\text{CD}19^+\text{CD}10^+$ -Zellen eindeutig als leukämisch zu identifizieren.

Normale $\text{CD}19^+\text{CD}10^+$ -Vorläuferzellen (Hämatogone) sind bei ALL-Patienten mit regenerierendem Knochenmark (MRD-Zeitpunkt: Tag 78) detektierbar und erschweren die

Diagnose. Die Untersuchung des Knochenmarks von Nicht-Leukämie-Patienten und T-ALLs am Tag 78 zeigte, dass die normalen Vorläuferzellen CD11b nicht exprimierten (Daten nicht gezeigt und Abb. 33 B). Aufgrund dieser Tatsache war die CD11b-Expression ein entscheidendes Instrument, um im Fall von Patient #143 MRD-Zellen von normaler regenerierender B-Zell-Hämatopoese abzugrenzen (Abb. 33 C). Der positive MRD-Nachweis dieser Probe wurde anschließend durch PCR bestätigt.

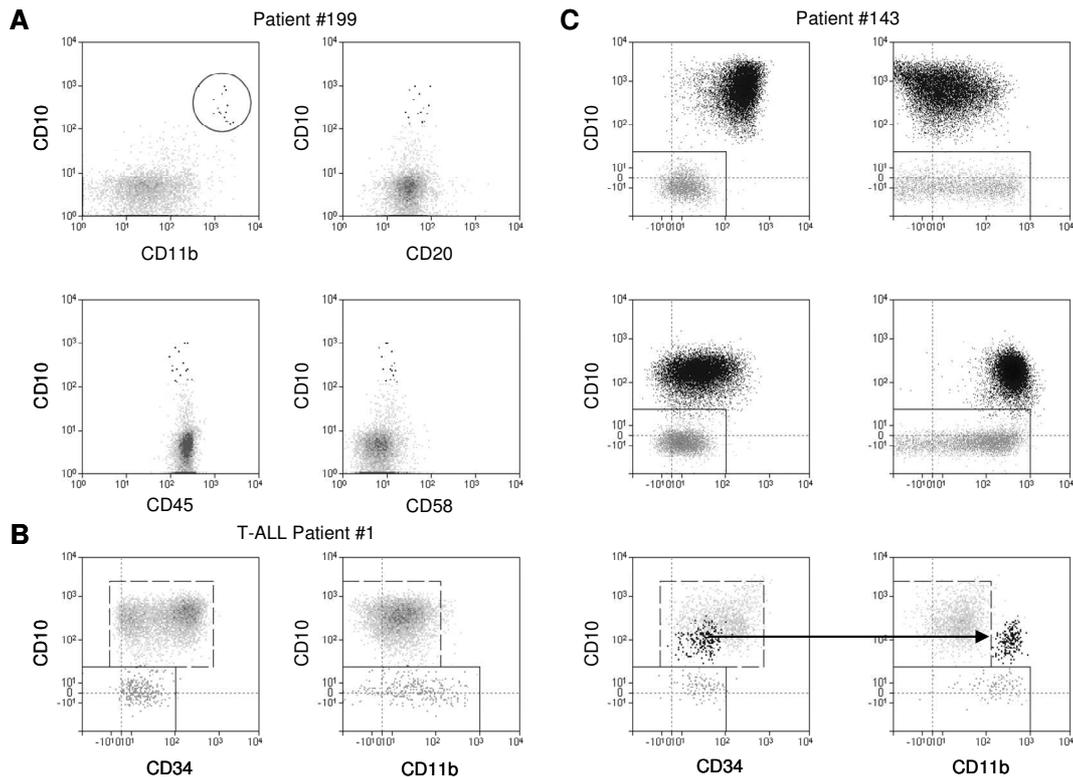


Abb. 33: CD11b verbessert die Differenzierung zwischen leukämischen und normalen reifen bzw. unreifen B-Zellen.

Die durchflusszytometrischen Streudiagramme zeigen nur die CD19⁺-Zellen (schwarz: ALL-Zellen, grau: normale B-Zellen). (A) Knochenmark-Probe eines ALL-Patienten vom Tag 15. Nur die Kombination von CD11b- und CD10-Positivität ermöglicht eine sichere Identifizierung der leukämischen Zellen, die ansonsten einen normalen B-Zell-Phänotyp aufweisen. (B) Darstellung der Knochenmarkzellen eines T-ALL-Patienten am Tag 78. Das Streudiagramm CD10 vs. CD34 zeigt das für normale B-Zellen charakteristische immunphänotypische Muster eines regenerierenden Knochenmarks (durchgezogenes Quadrat: reife B-Zellen; gestricheltes Quadrat: B-Vorläuferzellen). Im Streudiagramm CD10 vs. CD11b zeigen die B-Vorläuferzellen eine niedrige CD11b-Expression. (C) Darstellung der Streudiagramm-Kombinationen aus (B) für einen ALL-Patienten an den Therapietagen 0 (oben), 33 (mittig) und 78 (unten). Auffällig sind die konsistente Abnahme der CD10- und CD34-Expression sowie die Zunahme von CD11b unter der Induktions- und Konsolidierungstherapie. Am Tag 78 lassen sich die ALL-Zellen in der Kombination CD10 vs. CD11b, nicht aber in der Kombination CD10 vs. CD34 von den normalen B-Vorläuferzellen trennen.

4.4 Der Einfluss mitochondrialer Faktoren auf die Zytostatika-induzierte Apoptose (Karawajew *et al.*, 2005)

4.4.1 Die Stresssensitivität leukämischer Zellen ist vom mitochondrialen Transmembranpotential (MTMP) abhängig

Zur Untersuchung der Bedeutung des Energiestoffwechsels für die Apoptose wurden spezifische Inhibitoren der Atmungskette auf ihre Fähigkeit getestet, das MTMP zu modulieren. Diese Untersuchungen erfolgten an der ALL-Zelllinie MOLT-3, die das p53-Wildtypprotein exprimiert.

Für die Messung des MTMP wurde der potentiometrische Fluoreszenzfarbstoff JC-1 verwendet. Bei unbehandelten Zellen (Medium) akkumulierten die grün fluoreszierenden JC-1-Monomere aufgrund ihrer positiven Ladung in den Mitochondrien. Die dabei gebildeten Aggregate fluoreszierten rot (Abb. 34). Die Inhibition der Atmungskette mit Rotenon (Komplex I), TTFA (Komplex II) und Oligomycin (Komplex V) bewirkte eine effiziente Herunterregulation des MTMP, was zu einer Auflösung der JC-1-Aggregate führte und durch eine messbare Verschiebung der Fluoreszenz detektiert wurde. Das Maß für die Depolarisation der Mitochondrien war durch die Abnahme des Quotienten aus roter und grüner Fluoreszenz gekennzeichnet (Abb. 34). Antimycin A (Komplex III) und der Elektronentransport-Entkoppler FCCP hingegen beeinflussten bei niedrigen Konzentrationen das MTMP nicht und führten bei hohen Konzentrationen zum Zelltod (Daten nicht gezeigt bzw. Abb. 34).

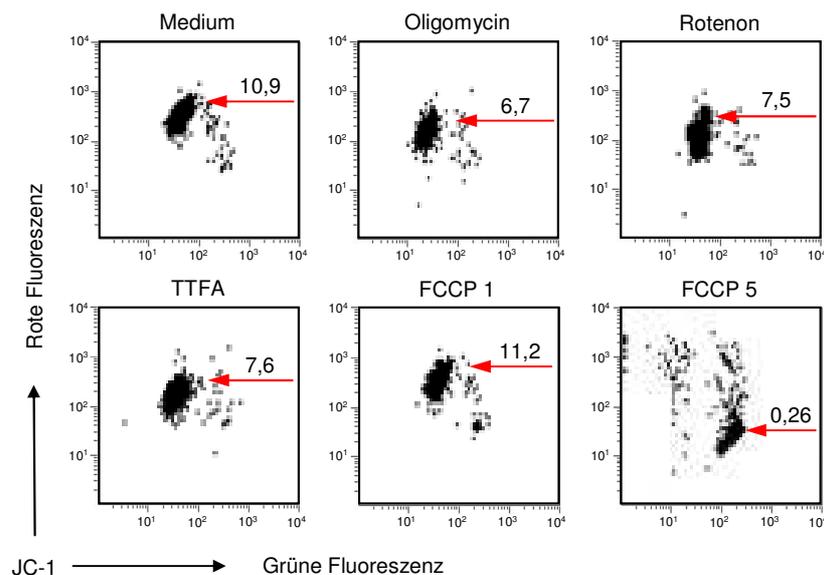


Abb. 34: Inhibitoren der Atmungskette bewirken die Herunterregulation des MTMP.

Bestimmung des MTMP von MOLT-3-Zellen mit JC-1 nach 3 h Inkubation mit Oligomycin (10 µg/ml), Rotenon (0,04 mM), TTFA (0,2 mM) und FCCP (1 bzw. 5 µM). Angegeben ist der Quotient aus roter und grüner Fluoreszenz.

Die anschließende Apoptoseinduktion erfolgte mit Etoposid, einem Topoisomerasehemmer, der DNA-Doppel- und Einzelstrangbrüche bewirkt. Die Etoposid-Behandlung führte zur schrittweisen Durchführung der Apoptose in MOLT-3-Zellen. Während ihres Verlaufs kam es zum Zusammenbruch des MTMP, der Caspase-Aktivierung und dem Beginn der Desintegration der Zytoplasmamembran (Abb. 35 A). Diese Effekte waren nach 4 h detektierbar und ließen sich durch Oligomycin signifikant inhibieren ($p < 0,01$), ohne eine Nekrose auszulösen (Abb. 35 B). Rotenon und TTFA verhinderten ebenso effektiv die apoptotischen Ereignisse, im Gegensatz zu Oligomycin waren sie jedoch nach 6 h bereits zytotoxisch. Ein Effekt, der bei Oligomycin auch nach 8 h Inkubation nicht auftrat (Daten nicht gezeigt).

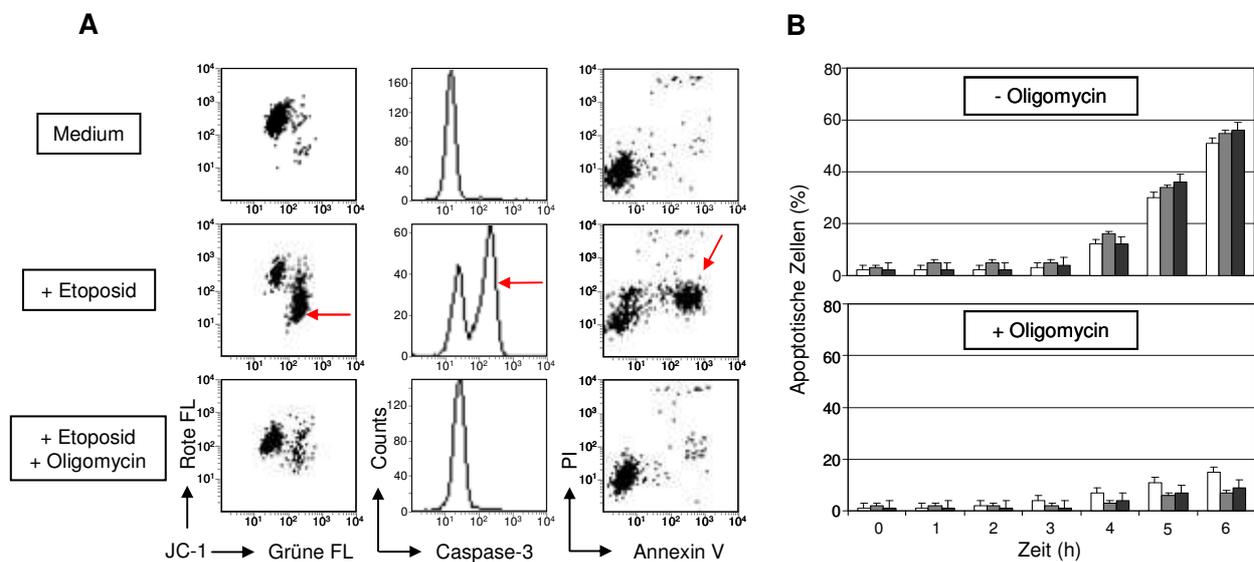


Abb. 35: Oligomycin unterbricht die Zytostatika-induzierte Apoptose.

(A) Apoptotische Signalkaskade in MOLT-3-Zellen (durch Pfeile gekennzeichnet) 6 h nach Etoposid-Behandlung ($1 \mu\text{M}$): 1. Zusammenbruch des MTMP (JC-1-Färbung), 2. Aktivierung von Caspase-3 (Immunofluoreszenz) und 3. Annexin V-Positivität (Annexin V/PI-Färbung). (B) Kinetik der Apoptose in MOLT-3-Zellen nach Inkubation mit Etoposid ($1 \mu\text{M}$) in Gegenwart oder Abwesenheit von Oligomycin ($10 \mu\text{g/ml}$). Die Bestimmung der Apoptose erfolgte anhand von MTMP-Verlust □, Caspase-3- ■ und Annexin V-Positivität ■.

4.4.2 Die MTMP-abhängige Stresssensitivität ist p53-spezifisch

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse war zu untersuchen, ob das MTMP einen generellen Einfluss auf apoptotische Prozesse ausübt. In Bezug auf diese Frage wurde die Oligomycin-Wirkung in Kombination mit verschiedenen Apoptose-induzierenden Stressfaktoren analysiert. Doxorubicin, H_2O_2 und Lactacystin bewirken durch DNA-Schäden, oxidativen Stress oder Proteasom-Inhibition die p53-Aktivierung und Apoptose. Staurosporin (Protein-Kinase C-Inhibitor) und CD95-Antikörper (Stimulation des Todesrezeptors) hingegen aktivieren das p53-System nicht und führen unabhängig davon zur Apoptose (Trauth *et al.*, 1989; Weil *et al.*, 1996; Stepczynska *et al.*, 2001).

Oligomycin konnte bei allen p53-induzierenden Agenzien die Akkumulation des Tumorsuppressors signifikant inhibieren und damit auch die Apoptose (Abb. 36). Im Gegensatz dazu wurden die p53-unabhängigen Apoptosesignalwege durch CD95-Antikörper oder Staurosporin induziert, nicht gestört (Abb. 36). Diese Ergebnisse deuteten auf einen direkten Zusammenhang zwischen mitochondrialer Aktivität und dem apoptotischen p53-Signalweg hin.

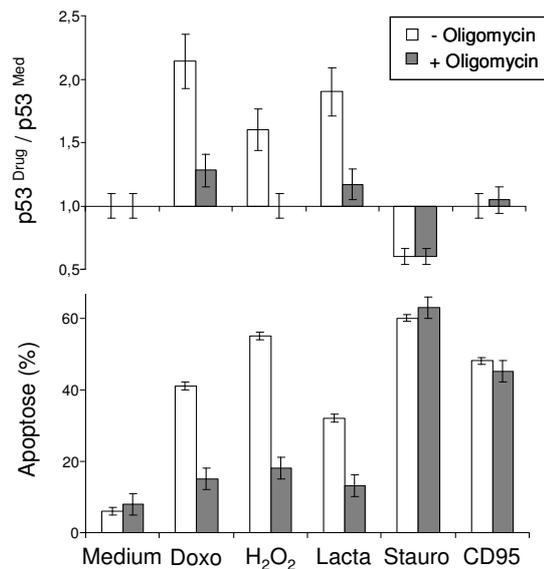


Abb. 36: Oligomycin inhibiert nicht die p53-unabhängige Apoptose.

MOLT-3-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von Oligomycin (10 µg/ml) mit verschiedenen Apoptose-induzierenden Agenzien inkubiert (1 µM Doxorubicin (Doxo), 20 µM H₂O₂, 2 µM Lactacystin (Lacta), 0,5 µM Staurosporin (Stauro), 0,1 µg/ml anti-CD95 (CD95)). Die Bestimmung von p53-Proteinexpression und Apoptose (Annexin V/PI) erfolgte nach 3 bzw. 6 h (Drug = Doxo, H₂O₂, Lacta, Stauro oder CD95, Med = Medium).

Auswirkungen des MTMP auf die Transkription von p53-Zielgenen

p53 übt seine Tumorsuppressor-Funktion primär als Transkriptionsfaktor aus. Er reguliert dabei die Expression von Genen, die für die Kontrolle der DNA-Integrität von Bedeutung sind (Lane, 1992). Mit Hilfe von Focus-Genchips sollte untersucht werden, ob die Oligomycin-induzierte Herunterregulation des MTMP auch auf Genexpressionsebene mit dem p53-System interferiert.

Für die Untersuchung wurden MOLT-3-Zellen mit Etoposid oder Doxorubicin in Anwesenheit oder Abwesenheit von Oligomycin 3 h lang inkubiert und anschließend auf Genexpressionsebene analysiert. Die unterschiedlichen Behandlungen führten bei 73 Genen zu deutlichen Expressionsveränderungen gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen (mehr als dreifacher Expressionsunterschied: 44 Gene hochreguliert, 29 Gene herunterreguliert). Tab. 5 zeigt neben p53 eine Zusammenfassung der Gene, deren Expression durch mindestens zwei Behandlungen in die gleiche Richtung verändert wurde. Etoposid und Doxorubicin

induzierten die Expression von Genen, die größtenteils als Zielgene von p53 bekannt waren und sein Wirkungsspektrum reflektierten. Dazu gehören neben der DNA-Reparatur (*DDB2* und Mitglieder der *GADD*-Familie) die Kontrolle des zellulären Redoxzustandes (*FDXR*) und des Zellzyklusses (*p21*). Auf Seite der proapoptischen p53-Zielgene waren insbesondere die Expressionszunahme des BH3-only-Proteins BIK und des Effektormoleküls BAX von Bedeutung. In Gegenwart von Oligomycin wurden diese stressinduzierten Veränderungen effektiv aber nicht vollständig inhibiert, in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass zuvor die p53-Akkumulation ebenfalls nicht vollständig inhibiert wurde. Zu den von Oligomycin herunterregulierten Genen gehörten zudem die NADH-Dehydrogenase *NDUFC1* und das Hitzeschockprotein *HSP70-2*, die am Aufbau und der Regulation von Oxidoreduktasen beteiligt sind.

Tab. 5: Stress- und Oligomycin-induzierte Genexpressionsveränderungen in MOLT-3-Zellen.

Gen	Medium	Oligomycin	Doxorubicin	Doxorubicin + Oligomycin	Etoposid	Etoposid + Oligomycin	Funktion
<i>ATF3</i>	97	825	642	1113	601	1504	Transkriptionsfaktor, Stressantwort
<i>BAX</i>	54	68	91	55	117	55	proapoptisches Zielgen von p53
<i>BIK</i>	110	136	435	159	479	160	proapoptisches BH3-only-Protein, Zielgen von p53
<i>CD69</i>	87	305	311	489	144	618	Transmembranrezeptor, Zielgen von NF- κ B
<i>CEBPb</i>	225	1713	312	2171	243	1629	Transkriptionsfaktor, Regulator der Energiehomöostase
<i>DDB2</i>	168	273	593	310	816	532	DNA-Schäden-bindendes Protein, DNA-Reparatur, Zielgen von p53
<i>EGR1</i>	90	404	58	207	86	314	Transkriptionsfaktor, frühe Stressantwort, Transkriptionsrepression durch p53
<i>FDXR</i>	60	58	326	153	321	132	Ferredoxin Reductase, Elektronentransportkette, Zielgen von p53
<i>GADD45A</i>	30	41	202	185	324	249	GADD Familie, Antwort auf Stress und DNA-Schäden, Zielgen von p53
<i>HSP70-2</i>	202	63	233	90	118	55	Hitzeschockprotein
<i>IER3</i>	105	62	1543	602	783	552	Frühe Stressantwort, Zielgen von p53 und NF- κ B/rel
<i>IKBA</i>	479	453	1974	2064	718	1666	NF- κ B Inhibitor, Zielgen von NF- κ B
<i>NDUFC1</i>	1403	745	1294	667	1312	692	NADH Dehydrogenase, Untereinheit C1
<i>p21</i>	14	8	196	18	203	47	Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinaseaktivität, Zielgen von p53
<i>p53</i>	572	491	443	473	456	519	Tumorsuppressor, proapoptische zelluläre Stressantwort
<i>PA26</i>	112	73	384	175	412	247	GADD Familie, Antwort auf Stress und DNA-Schäden, Zielgen von p53
<i>SGK</i>	20	83	117	237	50	447	Kinaseaktivität, Glucosestoffwechsel, Transkriptionsrepression durch p53
<i>TRAF4</i>	82	102	263	260	258	338	TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor, NF- κ B-Signalweg
<i>TRB3</i>	74	327	70	296	77	349	Negativer Regulator der Akt/PKB Aktivität bei der Glucosehomöostase
<i>VLDLR</i>	36	232	34	243	39	238	Lipoproteinrezeptor, Fettsäurestoffwechsel

3 h Inkubation von MOLT-3-Zellen mit Etoposid (1 μ M) oder Doxorubicin (1 μ M) in An- oder Abwesenheit von Oligomycin (10 μ g/ml). Die anschließende Messung der Genexpression erfolgte mit den Affymetrix Genchips HG Focus. Dargestellt sind die Genexpressionswerte (in arbiträren Fluoreszenzeinheiten) der Einzel- und Kombinationsbehandlungen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (Medium).

Die Oligomycin-Behandlung führte nicht grundsätzlich zur Transkriptionseinhibition. Eine Expressionszunahme zeigten neben Genen des Energie- und Fettsäurestoffwechsels (*CEBPb*, *TRB3*, *VLDLR*) auch die Serum/Glucocorticoid-regulierte Kinase *SGKI* und das *Early Growth Response Element EGR1*; beide sind in die frühe Stressantwort involviert und werden durch p53 reprimiert. Ihre Expressionszunahme zeigte, dass Oligomycin auch die transkriptionelle Repressorfunktion von p53 störte, dessen mRNA-Expression selbst aber unverändert und in allen Ansätzen konstant blieb.

Neben p53 nimmt der NF- κ B-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Stressantwort ein. Durch Doxorubicin und Etoposid wurden die NF- κ B-Zielgene *IKBA*, *TRAF4* und *CD69* hochreguliert. Im Gegensatz zu den p53-Zielgenen wurde ihre Expression durch Oligomycin aber nicht inhibiert sondern verstärkt, ebenso wie die Expression des stresssensitiven Transkriptionsfaktors *ATF3*. Diese Ergebnisse demonstrierten, dass Oligomycin nicht generell den zellulären Stresszustand reduzierte, sondern p53-spezifisch agierte.

4.4.3 Der Einfluss MTMP-abhängiger reaktiver Sauerstoffspezies auf das p53-System

Eine moderate Reduktion des intrazellulären ATP-Gehaltes hat keinen Einfluss auf die Aktivierbarkeit des p53-Signalweges

Oligomycin supprimierte durch die Inhibition der Atmungskette die ATP-Produktion durch oxidative Phosphorylierung. Aufgrund eines basalen ATP-Bedarfs während der Apoptose könnte die ATP-Abnahme, eine Ursache für die beobachtete Störung des p53-Signalweges gewesen sein. Um dieses zu untersuchen, wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt in Oligomycin-behandelten Zellen bestimmt und in einem Modellsystem imitiert.

In MOLT-3-Zellen bewirkte Oligomycin eine Abnahme des ATP-Gehaltes um 15 % ($p < 0,01$, Abb. 37 A). Eine vergleichbare Reduktion um 23 % ließ sich mit einer Konzentration von 0,3 mM des Glucose-Antimetaboliten 2-Deoxyglucose erreichen (Abb. 37 A). Der Entzug von Serum und Glucose bewirkte eine Abnahme des ATP-Wertes um 50 %. Nach zusätzlicher Supplementierung mit 2-Deoxyglucose fiel der ATP-Wert auf unter 20 % des Kontrollwertes ab (Abb. 37 A).

Die ATP-Depletion durch Glucoseentzug führte bereits nach 3 h zur Desintegration der Zellmembran und dem Auftreten von Annexin V⁺/PI⁺-Zellen (Abb. 37 B). Dieses Ergebnis deutete auf einen nekrotischen Zelltod hin, der bei einer moderaten Reduktion des ATP-Wertes durch 0,3 mM 2-Deoxyglucose nicht auftrat (Abb. 37 B).

Die Oligomycin-analoge Reduktion des intrazellulären ATP-Gehaltes (durch 0,1 bzw. 0,3 mM 2-Deoxyglucose) bewirkte eine geringe Abnahme der basalen p53-Expression um 5 % ($p > 0,05$) bzw. 22 % ($p < 0,01$) (Abb. 37 C). Im Gegensatz zu Oligomycin inhibierte die 2-Deoxyglucose aber weder den Etoposid-induzierten p53-Anstieg, noch die daraus resultierende Apoptose (Abb. 37 C). Darüber hinaus konnte die ATP-Reduktion auch keine Veränderungen des MTMP verursachen (Daten nicht gezeigt).

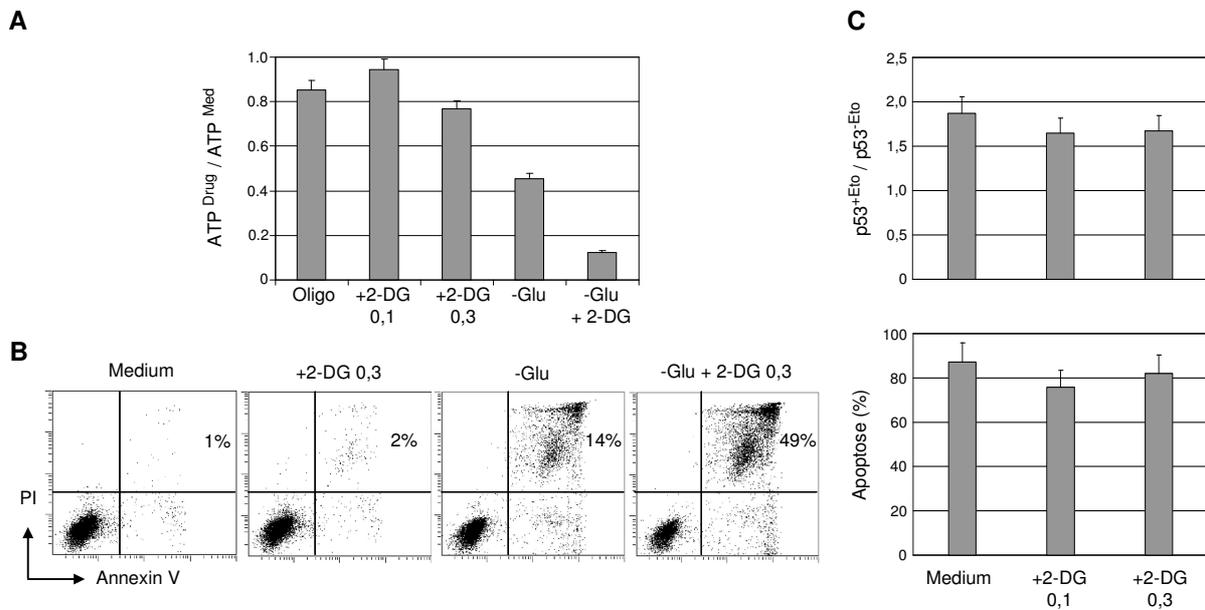


Abb. 37: Einfluss des intrazellulären ATP-Gehaltes auf Vitalität und Therapieansprechen von MOLT-3.

(A-B) 3h Inkubation von MOLT-3-Zellen in Standardmedium mit Oligomycin (Oligo 10 µg/ml), 2-Deoxyglucose (2-DG 0,1 mM und 0,3 mM) und in glucose- und serumfreiem Medium (-Glu) in Anwesenheit oder Abwesenheit von 1 mM 2-DG. (A) Luminometrische Messung des intrazellulären ATP-Gehaltes (Drug = 2-DG, -Glu, 2-DG -Glu). (B) Bestimmung von Apoptose und Nekrose durch Annexin V/PI-Färbung. Angegeben ist der prozentuale Anteil der nekrotischen Zellen (Annexin V⁺, PI⁺) nach 3h. (C) Inkubation von MOLT-3-Zellen ohne und mit 1 µM Etoposid (Eto) und 0,1 bzw. 0,3 mM 2-DG. Die p53-Expression wurde nach 3 h, Apoptose nach 6 h Inkubation bestimmt.

Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies an der stressinduzierten p53-Akkumulation

Eine weitere bedeutende Komponente des mitochondrialen Stoffwechsels und der Apoptose bilden ROS. Sie entstehen als Nebenprodukte bei der oxidativen Phosphorylierung und werden unter physiologischen Bedingungen von Antioxidantien eliminiert, so dass sich ein Redoxgleichgewicht in der Zelle einstellen kann (Dalton *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 2003). Um zu untersuchen, ob die Reduktion des MTMP den ROS-Gehalt in der Zelle beeinflusste, wurde dieser in MOLT-3-Zellen nach Oligomycin-Behandlung bestimmt. Hierzu wurden die ROS-sensitiven Moleküle DCFDA und HE verwendet. Nach Oxidation in der Zelle bildeten sie Fluoreszenzfarbstoffe, die durchflusszytometrisch detektierbar waren. Als Ergebnis zeigte sich, dass Oligomycin den zellulären ROS-Gehalt nur geringfügig reduzierte (5 bis 10 %, Daten nicht gezeigt).

Zur Untersuchung des mitochondrialen ROS-Gehaltes wurde der mitochondrienspezifische Farbstoff NAO verwendet. NAO bindet an das in den Mitochondrien lokalisierte Phospholipid Cardiolipin, dessen Bindungsaffinität vom Oxidationsstatus abhängig ist. Die nichtoxidierte Form wird von NAO mit hoher Affinität gebunden. Die NAO-Moleküle bilden Dimere, wodurch die Lichtemission vom grünen in den roten Spektralbereich verschoben wird. Nach Oxidation des Cardiolipins sinkt die Affinität von NAO und damit auch die Intensität der roten Fluoreszenz. Aus Abb. 38 A geht hervor, dass in Gegenwart von Oligomycin die rote Fluoreszenz bei der NAO-Färbung signifikant zunahm (26 %, $p < 0,001$). Demnach senkte Oligomycin vornehmlich den mitochondrialen ROS-Gehalt, wohingegen der Gesamtgehalt in der Zelle nur wenig verändert wurde.

Um den ROS-Gehalt in der Zelle zu modulieren, wurde N-Acetyl-L-Cystein (NAC) verwendet. Es ist eine Vorstufe des physiologischen Antioxidans Glutathion, das in der Zelle zur Reduktion von ROS benötigt wird (Dalton *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2007). Mit Hilfe einer NAC-Konzentration von 10mM konnte die Etoposid-induzierte Akkumulation von p53 inhibiert werden und damit auch die nachfolgenden Apoptoseereignisse (Abb. 38 B). Im Gegensatz zur Oligomycin-Wirkung hatte die NAC-Behandlung aber keine Auswirkungen auf das MTMP gehabt, das sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Etoposid unverändert blieb (Abb. 38 B).

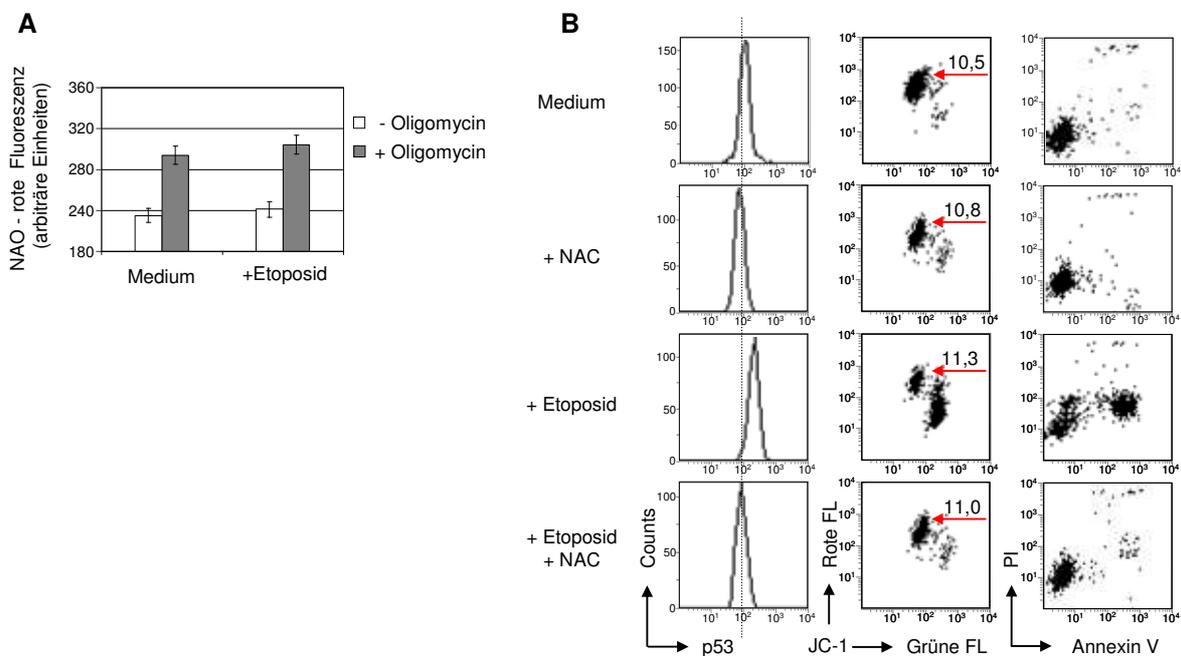


Abb. 38: Beteiligung von ROS an der stressinduzierten p53-Akkumulation.

(A) Der Anstieg der roten NAO-Fluoreszenz in Gegenwart von Oligomycin entspricht der ROS-Abnahme in den Mitochondrien. MOLT-3-Zellen wurden dazu 3 h lang mit Oligomycin (10 $\mu\text{g/ml}$) und/oder Etoposid (1 μM) behandelt. (B) NAC verhindert die Etoposid-induzierte p53 Akkumulation und Apoptose, ohne das MTMP signifikant zu verändern. Inkubation von MOLT-3-Zellen mit NAC (10 mM) in An- oder Abwesenheit von Etoposid (1 μM). p53-Messung nach 3 h, MTMP (JC-1)- und Apoptose (Annexin V/PI)-Messung nach 6 h.

4.4.4 MTMP-abhängige Zytostatikasensitivität des p53-Systems in reifen T-Lymphozyten

Die Bedeutung der Kopplung zwischen MTMP und p53-Aktivierung wurde im Folgenden an primären T-Lymphozyten evaluiert. Aktivierte T-Zellen wiesen im Vergleich zu ruhenden T-Zellen eine erhöhte mitochondriale Aktivität auf, die sich im MTMP widerspiegelte (Abb. 39 A). In Gegenwart von Oligomycin wurde das MTMP auf einen Basiswert herunterreguliert, der in ruhenden und aktivierten T-Zellen vergleichbar war (Abb. 39 A). Im ruhenden Zustand weisen T-Zellen nur eine geringe Zytostatikasensitivität auf (Stahnke *et al.*, 2001). Etoposid induzierte daher nur einen geringen Anstieg der p53-Proteinexpression (Abb. 39 B). Die Aktivierung der T-Zellen erhöhte die Etoposid-Sensitivität und die p53-Expression stieg signifikant an (Abb. 39 B). Mit Oligomycin konnte in den aktivierten T-Zellen die stressinduzierte p53-Akkumulation deutlich reduziert werden (Abb. 39 B).

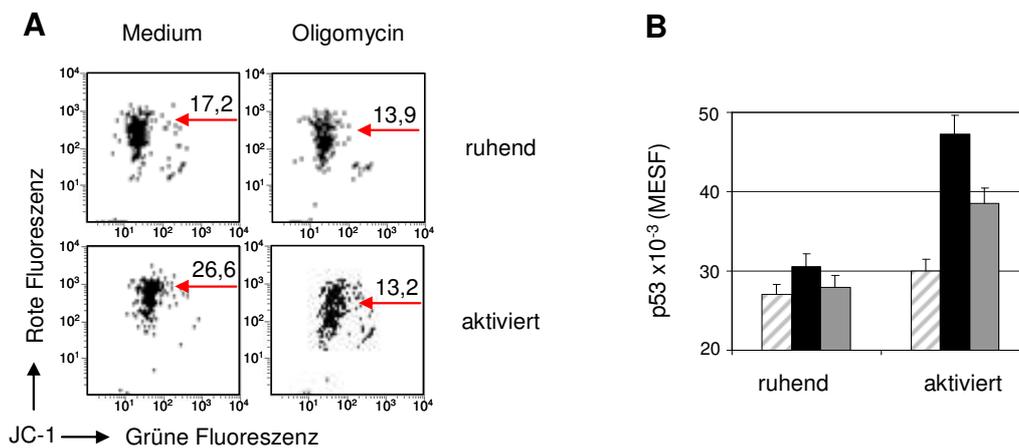


Abb. 39: Mitochondriale Abhängigkeit der Therapeutika-induzierten p53-Akkumulation in aktivierten T-Zellen.

Zur Aktivierung von T-Zellen wurden normale T-Lymphozyten für 24 h mit PHA und IL-2 behandelt. Die funktionelle Untersuchung von ruhenden und aktivierten T-Zellen erfolgte nach 6 h Inkubation mit Oligomycin (10 $\mu\text{g/ml}$) und/oder Etoposid (30 μM). Anschließend wurden das MTMP (JC-1 Färbung) und die p53-Proteinexpression bestimmt. (A) In aktivierten T-Zellen ist das MTMP erhöht und wird durch Oligomycin herunterreguliert. (B) Oligomycin inhibiert die Etoposid-induzierte p53-Akkumulation in aktivierten T-Zellen (Medium \square ; Etoposid \blacksquare ; Etoposid + Oligomycin \blacksquare).

4.4.5 MTMP-abhängige Zytostatikasensitivität des p53-Systems in primären ALL-Zellen

In unbehandelten primären ALL-Zellen war p53 nur schwach exprimiert (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung überein, dass in erster Linie p53 mutierte Zellen eine erhöhte Expression aufweisen und bei ALL-Patienten nur selten vorkommen (< 3%) (Wada *et al.*, 1993). Mit Etoposid wurde die p53-Akkumulation induziert. Sie war in den primären ALL-Zellen unterschiedlich ausgeprägt und konnte mit Oligomycin inhibiert werden (Abb. 40 A). Bemerkenswert war zudem die Heterogenität des MTMP, das mit der Aktivierbarkeit von p53 signifikant korrelierte ($r_s = 0,68$, $p < 0,05$; Abb. 40 B).

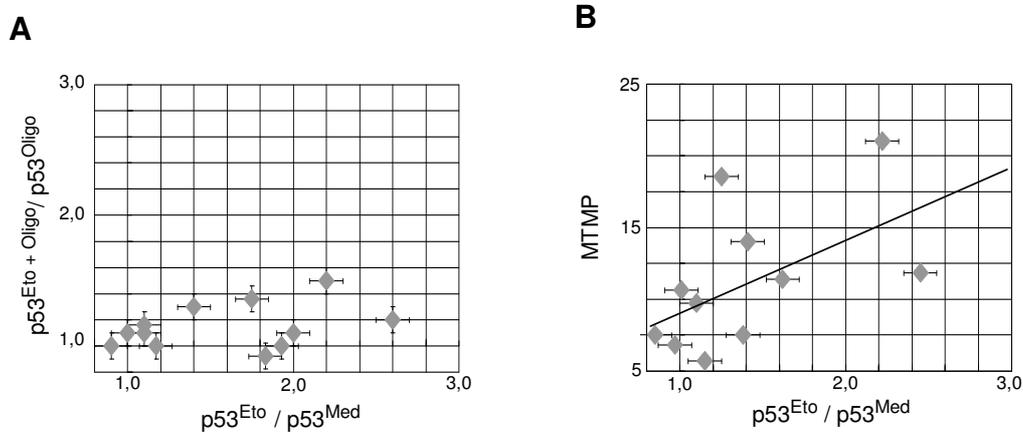


Abb. 40: Mitochondriale Abhängigkeit des p53-Systems in primären ALL-Zellen.

Primäre ALL-Zellen wurden 6 h lang ohne und mit Etoposid (Eto 30 μM) in An- oder Abwesenheit von Oligomycin (Oligo 10 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Anschließend wurden p53 und MTMP durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Heterogene Sensitivität primärer ALL-Zellen zu Oligomycin und Etoposid. Dargestellt ist die Etoposid-spezifische p53-Akkumulation in Anwesenheit (Y-Achse) oder Abwesenheit (x-Achse) von Oligomycin. (B) In primären ALL-Zellen korreliert das MTMP mit der Zytostatikasensitivität auf p53-Ebene.

5 Diskussion

5.1 Glucocorticoid-spezifische Genexpressionsprofile in MRD-Blasten während der Induktionstherapie

In der multizentrischen ALL-BFM-Studie werden die Patienten in der ersten Therapiewoche einheitlich behandelt. Das Haupttherapeutikum ist das Glucocorticoid Prednisolon, das neben einer einmaligen intrathekalen Dosis Methotrexat sieben Tage lang täglich oral appliziert wird (Stanulla *et al.*, 2009). Das Therapieansprechen auf die Prednison-Vorphase ist ein wichtiger prognostischer Risikofaktor, der durch die Anzahl leukämischer Blasten bestimmt wird, die nach einer Woche der Induktionstherapie persistieren. Patienten mit mehr als 1000 Blasten pro Mikroliter werden als Prednison-Poor-Responder bezeichnet und haben eine signifikant schlechtere Prognose als die Prednison-Good-Responder (Reiter *et al.*, 1994; Schrappe *et al.*, 1996). In Hinblick auf die klinische Relevanz der Tag 8-Blasten sollte ihre umfassende zellbiologische Charakterisierung dazu beitragen, molekulare und zelluläre Faktoren zu identifizieren, die für ihre Resistenz und das differentielle Therapieansprechen verantwortlich sind.

Die meist geringe Anzahl der Tag 8-Blasten erschwert ihre Untersuchung, was dazu geführt hat, dass sie bislang nur immunphänotypisch charakterisiert werden konnten (Gaipa *et al.*, 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein experimentelles Verfahren etabliert, das erstmals eine Genexpressionsanalyse persistierender Blasten ermöglichte. Das Verfahren beinhaltete die durchflusszytometrische Isolierung der leukämischen Zellen sowie die Generierung von cRNA aus Patientenproben mit nur 100 Blasten pro Mikroliter. Damit konnten sowohl Prednison-Poor- als auch Prednison-Good-Responder auf Genexpressionsebene analysiert werden.

Eine hierarchische Clusteranalyse der Genexpressionsdaten hat den hohen Verwandtschaftsgrad der Proben gezeigt, die sich in den Tag 0/Tag 8-Paaren patientenspezifisch anordneten. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die persistierenden Blasten aus der Masse der leukämischen Zellen am Tag 0 hervorgegangen sind und nicht das Ergebnis einer klonalen Selektion mit eigenständigem Genexpressionsprofil darstellen. Dessen ungeachtet konnten bei der differentiellen Genexpressionsanalyse zwischen Tag 0 und Tag 8 457 Gene identifiziert werden, die in den persistierenden Blasten aller Patienten gemeinsam hoch- oder herunterreguliert wurden (FDR < 0,05). Aufgrund der einheitlichen Behandlung der Patienten scheinen die kollektiven Veränderungen das gleiche genomische Ansprechen auf die GC-Therapie darzustellen. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit *In-*

vivo-Untersuchungen von GC-, 6-Mercaptopurin- und Methotrexat-basierten Therapieregimen, bei denen die Genexpressionsveränderungen nach 24h analysiert wurden (Cheok *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2006). Die Genexpressionsstudien von Cheok *et al.* und Schmidt *et al.* zeigen, dass anhand von Genexpressionsprofilen unterschiedliche therapeutische Regime diskriminiert werden können.

Der molekulare Wirkungsmechanismus der GC wird durch ihren spezifischen Rezeptor vermittelt, der nach GC-Bindung in den Zellkern transloziert, wo er als Transkriptionsfaktor fungiert. Der GR reguliert die Expression von Zielgenen, indem er selbst an regulatorische DNA-Regionen bindet oder mit anderen Transkriptionsfaktoren Protein-Protein-Wechselwirkungen eingeht (Distelhorst, 2002; Schoneveld *et al.*, 2004). Der Crosstalk des GR mit anderen Signalwegen führt zu komplexen Genexpressionsmustern, die von den gerade aktiven Transkriptionsfaktoren und damit vom zellulären Kontext bestimmt werden. Diese Tatsache hat dazu beigetragen, dass vom Zellsystem abhängig eine Vielzahl unterschiedlicher GC-regulierter Gene identifiziert werden konnte (Schmidt *et al.*, 2004).

In der Liste der am Tag 8 signifikant veränderten Gene befinden sich eine Reihe von Kandidaten, die bereits als Ziele der Wirkung von GC bei hämatopoetischen Zellen beschrieben wurden. Expressionsveränderungen dieser Gene konnten auch bei Prednison-Poor-Respondern und bei Patienten mit niedriger Zytoreduktionsrate beobachtet werden. Eine zweifache Genexpressionsveränderung zeigen zum Beispiel die GC-Zielgene *FOS*, *JUN*, *GLUL* und *CXCR4* bei Patient 6 (33 % Zytoreduktion), die Gene *CXCR4*, *GLUL*, *ZNF165*, *TXNIP* bei Patient 7 (48 % Zytoreduktion) und die Gene *DUSP5*, *ZNF165*, *GLUL* und *CXCR4* bei Patient 5 (68 % Zytoreduktion) (Geley *et al.*, 1996; Chauhan *et al.*, 2002; Kolbus *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004; Ebert *et al.*, 2005).

Diese Daten belegen, dass die Genexpression des gesamten Patientenkollektivs durch die GC-Wirkung beeinflusst wurde. Aufgrund der generellen Funktionalität des GR kann davon ausgegangen werden, dass die GC-Resistenz der persistierenden Blasten nicht auf Verlust oder inaktivierende Mutationen im GR-Gen zurückzuführen ist. Das Ergebnis stimmt mit Sequenzierungen des GR-Gens von ALL-Patienten überein, die von Tissing *et al.* durchgeführt wurden. Bei diesen Untersuchungen konnten keine somatischen Mutationen im GR-Gen identifiziert werden. Stattdessen beruhte die genetische Variabilität des GR auf DNA-Polymorphismen im Genlokus, die aber nicht mit dem Therapieansprechen assoziiert waren (Tissing *et al.*, 2005a).

5.2 BCL-2 als molekularer Glucocorticoid-Resistenzfaktor bei der ALL

Die Herunterregulation der BCL-2-Expression ist ein wesentliches Ergebnis der Genexpressionsveränderungen am Tag 8. BCL-2 ist der negative Hauptregulator der mitochondrialen Apoptose, die durch verschiedene Stimuli, beispielsweise Entzug von Wachstumsfaktoren, induziert werden kann (Youle *et al.*, 2008).

Während der B-Zell-Entwicklung wird BCL-2 differentiell zwischen den Entwicklungsstufen exprimiert. Zudem konnte beobachtet werden, dass die Höhe der Expression mit der GC-Sensitivität *in vitro* korreliert. Im Gegensatz zu Pro-B- und reifen B-Zellen weisen Prä-B-Zellen eine niedrige BCL-2-Expression auf und zeigen gleichzeitig die höchste GC-Sensitivität (Lill Elghanian *et al.*, 2002; Igarashi *et al.*, 2005). ALL-Zellen besitzen eine höhere BCL-2-Expression als normale B-Zellen (Menendez *et al.*, 2004). BCL-2 könnte damit als Faktor fungieren, der den Grenzwert zur Apoptoseinduktion festlegt. Bestätigung findet diese Hypothese darin, dass BCL-2-defiziente Mäuse, denen dieser apoptotische Widerstand fehlt, eine ausgeprägte Lymphozyten-Apoptose aufweisen (Veis *et al.*, 1993). Die Existenz eines BCL-2-Grenzwertes zur Apoptoseinduktion in ALL-Zellen folgt auch aus den hier gezeigten Ergebnissen, die belegen, dass die alleinige Herunterregulation von BCL-2 mit Hilfe von siRNA ausreichend ist, um in der Zelllinie TOM-1 Apoptose zu induzieren.

Die GC-induzierte Herabsetzung der basalen BCL-2-Expression könnte dazu beitragen, dass die Apoptoseresistenz in den leukämischen Zellen gesenkt wird, wodurch diese für die weitere Therapie sensibilisiert werden. In diesem Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass in Fällen mit fehlender oder unzureichender BCL-2-Abnahme die Zytoreduktionsrate am Tag 8 und am Tag 15 der Induktionstherapie signifikant vermindert wurde. Um die leukämischen Zellen dieser Patienten *in vitro* für die GC-Behandlung zu sensibilisieren, wurden sie mit BCL-2-spezifischen siRNAs behandelt, was zu einer signifikanten Apoptoseinduktion führte. Diese Daten deuten auf BCL-2 als wichtigen Resistenzfaktor hin.

Ein Einsatz von gezielten Therapien gegen BCL-2 könnte somit bei refraktären ALL-Patienten zu einem besseren Therapieansprechen beitragen. Für eine zielgerichtete Herunterregulation von BCL-2 gibt es bereits potentielle Therapeutika, die sich derzeit in der klinischen Prüfung zur Therapie verschiedener Krebserkrankungen befinden (Kang *et al.*, 2009). Das erste klinisch getestete Therapeutikum gegen BCL-2 ist Olibmersen gewesen, ein *BCL2*-Antisense-Oligodesoxynukleotid. Es hat sich allerdings funktionell als wenig wirksam erwiesen, um die BCL-2-Expression herunterzuregulieren (Kang *et al.*, 2009). Die nächste Generation von zielgerichteten Therapeutika gegen BCL-2-Familienmitglieder bilden eine

Reihe von natürlichen und synthetischen niedermolekularen Substanzen (*small molecules*), die als Antagonisten fungieren (Lessene *et al.*, 2008). Sie wurden in Screening-Verfahren identifiziert oder dafür entwickelt, dass sie anstelle der BH3-only-Proteine an die hydrophobe Bindungsfurche der antiapoptotischen BCL-2-Moleküle assoziieren. Daraufhin werden BAX und BAK freigesetzt, die oligomerisieren können und die Apoptoseinduktion bewirken (Kang *et al.*, 2009). Solche Agenzien sind die BH3-Mimetika ABT-737 und Obatoclox. Sie können neben BCL-2 auch BCL-X_L, BCL-W sowie MCL1 (nur Obatoclox) inhibieren. Ihre synergistische Wirkung mit GC und anderen Therapeutika bei der ALL konnte *in vitro* und im Mausmodell gezeigt werden (Kang *et al.*, 2007; Bonapace *et al.*, 2010; High *et al.*, 2010).

5.3 CD11b als Therapieresistenzfaktor bei der ALL

Bei der Genexpressionsanalyse konnten mit *ITGAM* und *IFNGR1* zwei Gene identifiziert werden, die für Rezeptoren (CD11b und Interferon- γ -Rezeptor 1) kodieren, die bislang noch nicht im Zusammenhang mit der B-Vorläuferzell-ALL beschrieben wurden. Aufgrund ihrer konsistent erhöhten Expression in den therapieresistenten Leukämiezellen hat sich die Frage gestellt, ob IFNGR1- und CD11b-positive Blasten bereits zum Zeitpunkt der Diagnose vorhanden sind und ein differentielles Therapieansprechen gegenüber Blasten ohne diese Rezeptoren aufweisen.

Beide Moleküle haben eine heterogene mRNA-Expression in den initialen Blasten gezeigt, aber nur die *CD11b*-Expression korrelierte signifikant mit Parametern, die das Therapieansprechen auf die Induktionsphase reflektierten (BRR und Blasten-% am Tag 8). Diesbezüglich war die *CD11b*-Expression mit einer geringeren Zytoreduktionsrate unter der Induktionstherapie assoziiert und könnte damit zu einem höheren Blastenprozentanteil am Tag 8 beigetragen haben. Die Signifikanz der Korrelation mit dem Therapieansprechen ging bei den leukämischen Zellen am Tag 8 verloren, was darauf zurückzuführen ist, dass die *CD11b*-Expression in nahezu allen persistierenden Blasten angestiegen war.

Zur Evaluierung von CD11b als Therapieresistenzfaktor wurde die Proteinexpression bei 159 Patienten durchflusszytometrisch bestimmt. Die Analyse bestätigte die initial heterogene CD11b-Expression auf Proteinebene, die mit dem Therapieansprechen, gemessen an allen klinisch bedeutenden MRD-Zeitpunkten, assoziiert war. In Bezug darauf konnte gezeigt werden, dass die CD11b-Expression nicht nur nach Abschluss der GC-Vorphase (Tag 8), sondern auch noch an späteren Zeitpunkten der Induktionstherapie (Tag 15 und Tag 33) mit dem Prozentanteil der persistierenden Blasten positiv und deren Zytoreduktionsrate negativ korrelierte. Neben der CD11b-Expression wurde in derselben Patientenkohorte auch die Expression von IFNGR1 untersucht. In diesem Fall konnten aber keine signifikanten

Korrelationen mit klinischen Verlaufsparemern beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), was die ebenfalls negativen Ergebnisse auf mRNA-Ebene bestätigt und demonstriert, dass nicht alle in MRD-Zellen verstärkt exprimierte Gene von klinischer Relevanz sein müssen.

Um CD11b als Risikofaktor zur Therapiestratifizierung in der klinischen Praxis verwenden zu können, war es notwendig, den optimalen Grenzwert zu bestimmen, der die Diskriminierung von Patienten mit hohem und niedrigem Rezidivrisiko ermöglicht. Zu diesem Zweck wurde eine ROC-Kurvenanalyse durchgeführt. Sie hat gezeigt, dass der optimale Grenzwert zur Vorhersage der MRD-Positivität am Tag 33 bei 515 MESF und zur Vorhersage von Hochrisiko-Patienten nach der Konsolidierungsphase (Tag 78) bei 773 MESF liegt. Die Größenordnungen der Grenzwerte sind somit vergleichbar und befinden sich im dritten Quartil der CD11b-Expressionsverteilung. Eine CD11b-Expression größer als 515 MESF erhöhte die Wahrscheinlichkeit für eine MRD-Positivität am Tag 33 um das 5,2-fache. Patienten, die eine Expression höher als 773 MESF aufwiesen, besaßen zudem eine 5,5-fach höhere Wahrscheinlichkeit, in die Hochrisikogruppe stratifiziert zu werden. Bei einer Berücksichtigung von CD11b zur Risikoklassifizierung der Patienten würde ein Grenzwert von 773 MESF bedeuten, dass 21 % der derzeitigen Standardrisiko-Patienten sowie 35 % der Patienten mit intermediärem Risiko zusätzlich zur Hochrisikogruppe zugeordnet werden würden.

Der Vergleich mit initialen klinischen Parametern demonstrierte die unabhängige prognostische Signifikanz von CD11b. Mit Ausnahme von *TEL-AML1*-positiven Patienten, deren Blasten CD11b nicht exprimierten, gab es keine signifikanten Korrelationen mit anderen initialen zytogenetischen, diagnostischen oder Labor-Parametern. Die Unabhängigkeit der prognostischen Signifikanz wurde durch eine multiparametrische Analyse validiert, die zudem zeigen konnte, dass CD11b auch ohne Berücksichtigung von *TEL-AML1*-positiven Patienten signifikant zur Vorhersage von MRD-Status und Risikogruppe der Patienten beiträgt.

Der CD11b-Rezeptor wird unter physiologischen Bedingungen primär von Zellen der myeloischen Reihe (neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen) exprimiert, aber auch von natürlichen Killerzellen, zytotoxischen T- und Gedächtnis-B-Zellen (Szczepanski *et al.*, 2006). CD11b gehört zur Familie der Integrine, die als $\alpha\beta$ -Heterodimere funktionell aktiv sind und primär als Adhäsionsmoleküle fungieren. Diesbezüglich ist CD11b an der spezifischen Bindung von löslichen und auf der Zelloberfläche befindlichen Liganden beteiligt, wie zum Beispiel den interzellulären Adhäsionsmolekülen ICAM (Mayadas *et al.*, 2005). Eine funktionelle Bedeutung von Adhäsionsmolekülen für die ALL konnte bereits für

verschiedene Integrine gezeigt werden, zu denen das *Leukocyte Function Associated Antigen 1* (CD11a/CD18) und *Very Late Antigen 4* (CD49d/CD29) zählen (Teixido *et al.*, 1992; Liesveld *et al.*, 1993; Geijtenbeek *et al.*, 1999). CD11b ist bislang aber nicht mit dem Therapieansprechen bei der ALL in Verbindung gebracht worden und konnte auch bei genomweiten Genexpressionsanalysen nicht als Response-Parameter identifiziert werden (Holleman *et al.*, 2004; Cario *et al.*, 2005; Lugthart *et al.*, 2005; Flotho *et al.*, 2006; Flotho *et al.*, 2007). Ein möglicher Grund dafür ist, dass, im Gegensatz zu der hier vorgestellten Studie, die Untersuchungen an leukämischen Zellen vorgenommen wurden, die vorher nicht spezifisch isoliert worden waren. CD11b wird aber insbesondere von reifen Granulozyten und Monozyten verstärkt exprimiert, was bei ungereinigten Proben zu einem Hintergrundrauschen führen kann, das eine genauere Analyse der CD11b-Expression verhindert.

CD11b bildet die α -Untereinheit des Integrins MAC-1 (CD11b/CD18) und kann eine Reihe von Liganden binden, zu denen neben ICAM-1 und -2, Fibrinogen und das Komplement-Protein iC3b zählen. CD11b ist damit an verschiedenen zellulären Prozessen wie Adhäsion, Migration, Komplementbindung und Zelltod beteiligt (Mayadas *et al.*, 2005; Takada *et al.*, 2007). Aufgrund der Tatsache, dass Integrin-vermittelte Signale in normalen Zellen zur Apoptose-Inhibition benötigt werden (Hynes, 1992), liegt es nahe zu spekulieren, dass CD11b funktionell zum Überleben und zur Resistenz von MRD-Zellen beiträgt. Andererseits jedoch ist die konstitutive Expression von Integrinen nicht direkt mit ihrer Funktionalität gekoppelt, denn neutrophile Granulozyten, die MAC-1 verstärkt exprimieren, sind nicht grundsätzlich adhärenz und können im Blutsystem zirkulieren (Springer, 1994). Die Aktivierung von Integrinen ist vielmehr von den Konformationen der Einzelketten abhängig, die durch sogenannte Inside-Out-Signale reguliert werden (Takada *et al.*, 2007). Die Aktivierung der Integrine untersteht damit einer stringenten Kontrolle, bei der verschiedene Bedingungen erfüllt sein müssen, bevor sie adhärenzfähig werden. An der Regulation von CD11b beteiligt sind unter anderem das Zytokin IL-8 und das calciumbindende Protein S100A8, zwei Moleküle, die zu den am stärksten hochregulierten Genen am Tag 8 zählten (2,5- bzw. 8,0-fach). Sie bewirken in neutrophilen Granulozyten die Expression und Aktivierung von MAC-1 (Detmers *et al.*, 1990; Ryckman *et al.*, 2003; Chakrabarti *et al.*, 2008), die in differenzierten U937-Zellen zur Adhärenz und der Rettung vor dem apoptotischen Zelltod führt (Hamada *et al.*, 2005).

Der kollektive Anstieg der CD11b-Expression in den leukämischen Zellen unter der Induktions-/Konsolidierungstherapie scheint sowohl auf therapieinduzierte Modulation der Genexpression als auch auf Selektion von resistenten Subklonen zu beruhen. In 30 % der an

verschiedenen Zeitpunkten untersuchten MRD-Proben war die CD11b-Expression bei leukämischen Zellen höher als bei CD11b-positiven Gedächtnis-B-Zellen. Ein praktischer Nutzen dieser Erkenntnis ist, dass CD11b zur besseren Identifizierung von leukämischen Zellen beiträgt, wenn sich diese in Gegenwart von einem starken Hintergrund von normalen reifen B-Zellen befinden. Im Gegensatz zu leukämischen Zellen sind normale B-Vorläuferzellen CD11b-negativ, weshalb sich das Antigen auch für Untersuchungen des regenerierenden Knochenmarks (Tag 78) eignet, wo leukämische und normale B-Vorläuferzellen schwer zu diskriminieren sind.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit CD11b ein molekularer Marker identifiziert werden konnte, der mit verschiedenen Parametern des Therapieansprechens assoziiert ist, die das Rezidivrisiko widerspiegeln. Die Korrelation der CD11b-Expression mit dem MRD-Niveau zu verschiedenen Therapiezeitpunkten deutet zudem auf eine Funktion als Resistenzfaktor bei der ALL hin. Zusammen mit anderen molekularen und funktionellen Parametern, die den MRD-Verlauf vorhersagen (Cario *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2006; Mullighan *et al.*, 2009), könnte CD11b zu einer früheren risikoadaptierten Stratifizierung der Patienten beitragen. Damit soll in zukünftigen Studien eine schnellere und patientenspezifische Intensivierung oder Deeskalation der Therapie ermöglicht werden. Darüber hinaus sind Integrine wie CD11b aufgrund ihrer Funktion als Übermittler von Überlebenssignalen und der erhöhten Expression auf Tumorzellen potentielle Zielstrukturen für neue Therapeutika (Desgrosellier *et al.*, 2010). Hierzu zählen insbesondere humanisierte monoklonale Antikörper, die die Funktion von Integrinen blockieren oder direkt Apoptose induzieren können (Desgrosellier *et al.*, 2010).

5.4 Genexpressionsverschiebung in Richtung terminale B-Zell-Differenzierung als potentieller Resistenzmechanismus

Die Expressionsveränderungen von Genen der B-Zellentwicklung und Differenzierung deuten auf eine Ausreifung der unter der GC-Therapie persistierenden Blasten hin. Der höhere Reifegrad der leukämischen Zellen am Tag 8 wurde durch den Vergleich mit normalen B-Zellen auf mRNA-Ebene und Proteinebene validiert. Für eine Differenzierung in Richtung ruhender reifer B-Zellen spricht zudem, dass eine Reihe von bekannten Regulatoren und Effektoren des Zellzyklusses am Tag 8 schwächer exprimiert wurden. Die Herunterregulation der Zellzyklusgene führte zu einer verringerten Proliferationsrate der persistierenden Blasten. Eine solche antiproliferative Wirkung der GC wurde bereits für verschiedene experimentelle Zellsysteme beschrieben (Greenstein *et al.*, 2002), konnte aber erst im Rahmen der vorliegenden Arbeit für ein klinisches System *in vivo* bestätigt werden. Ruhende reife B-Zellen sind im Vergleich zu lymphatischen Progenitoren und aktivierten reifen B-Zellen

resistenter gegenüber GC (Merino *et al.*, 1994; Ferraro *et al.*, 2000; Ferraro *et al.*, 2000; Stahnke *et al.*, 2001). Damit könnte die Genexpressionsverschiebung in Richtung ausreifender Blasten einen physiologischen Resistenzmechanismus darstellen.

Auf molekularer Ebene wird die Apoptoseresistenz während der B-Zellenwicklung durch den B-Zell-Rezeptor (BZR)-Signalweg bestimmt (Rathmell, 2004). Tatsächlich weist auch die Liste der gemeinsamen Genexpressionsveränderungen am Tag 8 mehr Komponenten dieses Signalweges auf. Zu ihnen gehören *CD20*, *CD45*, *VPREB1/2*, *BLNK* und *LAT2*. *CD20* und *CD45* sind zwei der für reife B-Zellen charakteristischen Antigene, die von den persistierenden Blasten am Tag 8 verstärkt exprimiert wurden. *CD20* ist ein nicht glykosyliertes Phosphoprotein, das zur MS4A1-Familie der Transmembranproteine gehört. Es ist an der Kontrolle des intrazellulären Calciumgehaltes beteiligt, eine Funktion, die eng mit dem BZR verknüpft ist (Walshe *et al.*, 2008). *CD45* ist ebenfalls ein Transmembranprotein. Es fungiert als Tyrosinphosphatase und ist ein positiver Koregulator der Signalwege, die durch den Prä-BZR und BZR induziert werden (Huntington *et al.*, 2004; Huntington *et al.*, 2006). Sowohl *CD20* als auch *CD45* könnten somit funktionell an Differenzierung und Persistenz der Tag 8-Blasten beteiligt sein. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine initial erhöhte Expression dieser beiden Antigene mit einem schlechteren Therapieverlauf bei der kindlichen ALL assoziiert ist (Borowitz *et al.*, 1997).

Im Gegensatz zu *CD20* und *CD45* wurden mit *VPREB1/2* sowie *BLNK* und *LAT2* wesentliche Komponenten des prä-BZR und seiner nachgeschalteten Signalwege auf mRNA-Ebene am Tag 8 herunterreguliert. Welche Funktion diese potentiellen Mediatoren von Überlebenssignalen für ALL-Zellen bei der GC-Therapie haben, bleibt noch zu untersuchen. Für *BLNK*-defiziente Mäuse ist allerdings bekannt, dass sie eine erhöhte Anzahl von Prä-B-Zellen aufweisen und dazu neigen, spontane B-Vorläuferzell-ALLs zu entwickeln (Jumaa *et al.*, 2005). Darüber hinaus ist bei primären ALLs die *BLNK*-Proteinexpression oftmals reprimiert (Jumaa *et al.*, 2003), weshalb angenommen wird, dass es als Tumorsuppressor fungieren könnte (Nakayama *et al.*, 2009). Die Herunterregulation von *BLNK* könnte damit auch für die Persistenz der Tag 8 Blasten von Bedeutung sein.

Die Wachstums- und Überlebenssignale aus der Mikroumgebung, die während der B-Zellentwicklung vom Prä-BZR transduziert werden, scheinen zudem mit der Expression von *BCL-2* gekoppelt zu sein (Opferman *et al.*, 2003), dessen Resistenzfunktion gegenüber GC bereits in 5.2 diskutiert worden ist.

Der höhere Differenzierungsgrad der Tag 8-Blasten ist auch mit der verstärkten Expression von *CD11b* in Einklang zu bringen. Sie deutet darauf hin, dass die Expressionsverschiebung

in Richtung des Gedächtnis B-Zell-Kompartiments erfolgt, für das die Expression von CD11b charakteristisch ist (Szczepanski *et al.*, 2006). Diesbezüglich wäre es interessant zu untersuchen, ob Gedächtnis-B-Zellen und normale naive B-Zellen im Therapieansprechen differieren.

Über eine Interferenz der GC mit dem Differenzierungsprogramm von B-Zellen wurde bislang noch nicht berichtet. Aus diesem Grund kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Genexpressionsveränderungen am Tag 8 neben der direkten GC-Wirkung auch die Folge einer Selektion von resistenten Subpopulationen mit höherem Differenzierungsgrad darstellen. Unabhängig vom zugrunde liegenden Mechanismus hat der ruhende, reifere Zustand der Tag 8-Blasten prinzipielle Auswirkungen auf die weitere Therapie der ALL-Patienten. Auf die GC-Vorphase folgend werden genotoxische Agenzien eingesetzt. Die verringerte proliferative Aktivität der persistierenden Leukämiezellen könnte unter anderem mit Therapeutika wie Vincristin, Methotrexat und Etoposid interferieren, deren primärer Wirkungsmechanismus auf den Zellzyklus abzielt (Arnon *et al.*, 2001). Demgegenüber ist der Einsatz von zellzyklusunabhängigen Agenzien begünstigt. Ein solches Therapeutikum ist beispielsweise L-Asparaginase, dessen Anwendung zur Inhibition der Proteinbiosynthese führt (Pinheiro *et al.*, 2004).

5.5 Zelluläre Determinanten der Zytostatikaresistenz

Zytostatikaresistenzen werden in erster Linie auf genetische Abberationen zurückgeführt, die zur Inhibition der Apoptose in malignen Zellen führen. Hierbei ist oftmals der Genlokus des Tumorsuppressors p53 betroffen (Johnstone *et al.*, 2002). p53 ist ein Stresssensor, der durch subletale Zellschäden, hervorgerufen durch Zytostatika, aktiviert werden kann und beim Überschreiten eines Schwellenwertes Apoptose induziert. Inaktivierende p53-Mutationen führen insbesondere bei soliden Tumoren zu Therapieresistenzen (Brosh *et al.*, 2009). Bei der ALL sind p53-Mutationen hingegen selten (Krug *et al.*, 2002), weshalb hier andere zelluläre oder molekulare Determinanten der Zytostatikaresistenz zu vermuten sind.

Physiologische Resistenzmechanismen sind in normalen Körperzellen determiniert. Im Gegensatz zu Leukämiezellen verweilen normale Lymphozyten im Allgemeinen in einem ruhenden Zustand, der sie resistenter gegen Agenzien macht, die mit Stoffwechsel, DNA-Replikation oder Zellteilung interferieren (Stahnke *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang konnte im Rahmen der Dissertation gezeigt werden, dass ruhende reife T-Zellen im Gegensatz zu aktivierten eine niedrige mitochondriale Aktivität besitzen und damit resistenter gegenüber stressinduzierter Apoptose sind. Die mitochondriale Aktivität wird durch das MTMP

reflektiert, dessen kritischer Einfluss auf die Induktion von Wachstumsarrest und Apoptose bei Krebszellen von Heerdt *et al.* beschrieben wurde (Heerdt *et al.*, 1997; Heerdt *et al.*, 2003). Zur Untersuchung des Einflusses der mitochondrialen Aktivität auf die p53-Apoptose wurde mit Oligomycin ein spezifischer Inhibitor der Atmungskette verwendet. Oligomycin bindet an die F₀-Untereinheit der ATP-Synthase und verhindert damit den Rückfluss der Protonen aus dem Intermembranraum, der die ATP-Synthase antreibt (Ackerman *et al.*, 2007). In den hier untersuchten zellulären Systemen mit endogener Wildtyp-p53-Expression führte die Oligomycin-Wirkung zur Herunterregulation des MTMP und der Inhibition von p53-Aktivierung und Apoptose. Dieses Ergebnis war der erste Hinweis auf die Sensitivität des p53-Systems gegenüber dem MTMP.

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses des MTMP auf die Apoptose wurden auch p53-unabhängige Signalwege analysiert, die durch Staurosporin (intrinsisch) und CD95-Antikörper (extrinsisch) induziert werden können (Trauth *et al.*, 1989; Weil *et al.*, 1996; Stepczynska *et al.*, 2001). Ihre Apoptoseinduktion konnte in MOLT-3-Zellen durch Oligomycin nicht inhibiert werden, wodurch dessen selektive Wirkung auf den p53-Signalweg belegt wurde.

Die p53-spezifische Wirkung von Oligomycin wurde auch auf Genexpressionsebene deutlich. Diesbezüglich konnte im Rahmen einer Genexpressionsanalyse demonstriert werden, dass Oligomycin lediglich die Expression von p53-spezifischen Genen inhibiert, wohingegen die Expression von anderen stressinduzierbaren Genen, wie denen des NF- κ B-Signalweges, sogar verstärkt wurde.

Die Oligomycin-Konzentration, die zur Inhibition der p53-Apoptose führte, bewirkte neben der Abnahme des MTMP auch eine moderate Reduktion des intrazellulären ATP-Gehaltes. Aufgrund der Tatsache, dass ATP für die Durchführung der Apoptose essentiell ist (Eguchi *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997), war zu untersuchen, ob bereits die geringe Abnahme des ATP-Niveaus ausreicht, um Apoptose zu inhibieren. Die Glykolyse ist neben der oxidativen Phosphorylierung ein weiterer wichtiger Prozess zur ATP-Gewinnung. Mit Hilfe von 2-Deoxyglucose wurde die Glykolyse von MOLT-3-Zellen moduliert, um eine mit Oligomycin vergleichbare ATP-Reduktion zu erreichen. Der niedrigere ATP-Wert konnte aber weder die stressinduzierte Aktivierung von p53, noch die Apoptose verhindern. Darüber hinaus bewirkte eine vollständige ATP-Depletion die Nekrose der MOLT-3-Zellen. Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit Untersuchungen, die zeigen konnten, dass Oligomycin p53-unabhängige ATP-abhängige Apoptoseprozesse nicht inhibieren kann und aufgrund der

geringen ATP-Abnahme auch keinen Wechsel zum nekrotischen Zelltod herbeiführt (Eguchi *et al.*, 1997; Leist *et al.*, 1997; Eguchi *et al.*, 1999).

Neben der ATP-Synthese führt die mitochondriale Aktivität auch zur Entstehung von ROS. Sie werden als Nebenprodukte bei der oxidativen Phosphorylierung durch die Atmungskette freigesetzt (Murphy, 2009), was durch Oligomycin und die Senkung des MTMP inhibiert wurde.

ROS dienen unter anderem als sekundäre Botenstoffe und modulieren die Aktivität von Zielproteinen, indem sie kritische Thiolgruppen oxidieren, wodurch die Eigenschaften von Enzymen, Kinasen, Phosphatasen und Transkriptionsfaktoren verändert werden (Droge, 2002; Hurd *et al.*, 2007). Auch das p53-System ist vom ROS-Zustand der Zelle abhängig und kann durch ROS-sensitive Signalwege, wie dem der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK), induziert werden (Bragado *et al.*, 2007). Darüber hinaus besitzt p53 selbst auch redox-sensitive Thiolgruppen in der DNA-Bindungsdomäne, deren Oxidationsstatus die p53-Funktion reguliert (Liu *et al.*, 2008).

Die ROS-Abhängigkeit des stressinduzierten p53-Signalweges bei der ALL wurde mit Hilfe von NAC untersucht, einer Vorstufe des Antioxidans Glutathion. NAC senkte den mitochondrialen ROS-Gehalt und inhibierte die Etoposid-induzierte Akkumulation von p53 und damit auch die nachfolgenden Apoptoseereignisse. Diese Daten deuten darauf hin, dass ROS oberhalb der p53-Aktivierung in den stressinduzierten Signalweg involviert sind. Die Ergebnisse sind konform mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die an unterschiedlichen Zellsystemen zeigen konnten, dass NAC die ROS-induzierte p53-Akkumulation inhibieren kann (Johnson *et al.*, 1996; Ye *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2004). Der Einfluss von NAC und Oligomycin auf den p53-Signalweg war in allen untersuchten Zellsystemen vergleichbar. Im Gegensatz zu NAC hat die Oligomycin-Wirkung aber indirekt zur Senkung des ROS-Wertes geführt, indem zuvor die mitochondriale Aktivität herunterreguliert wurde, die durch NAC unbeeinflusst blieb.

Die Ergebnisse zeigen, dass die intakte mitochondriale Funktion und die Freisetzung von ROS Voraussetzungen dafür sind, dass Wildtyp-p53 unter Stressbedingungen aktiviert werden kann. ROS könnten die Verbindung zwischen Atmungskette und p53-Signalweg darstellen, indem sie in ihrer Funktion als sekundäre Botenstoffe die Aktivität von p53 direkt oder indirekt regulieren.

Diese Verbindung wirkte sich auch auf die Zytostatikaresistenz von primären lymphatischen und leukämischen Zellen aus, deren p53-Aktivierbarkeit mit dem MTMP abnahm. Ein Einfluss des MTMP auf die Therapieresistenz von Tumorzelllinien konnte auch von Harper *et*

al. gezeigt werden (Harper *et al.*, 2002). Resistente Zelllinien wiesen ein niedrigeres MTMP auf als sensitive. Um die geringere ATP-Produktion durch die Atmungskette auszugleichen, besaßen sie eine höhere Anzahl von Mitochondrien und der Stoffwechsel war in Richtung zytosolischer Glykolyse und mitochondrialer Fettsäureoxidation verschoben. Der proglykolytische Phänotyp in den resistenten Zellen war zudem mit einer geringeren stressinduzierten ROS-Freisetzung assoziiert (Harper *et al.*, 2002). Ursache für das niedrige MTMP in den resistenten Zelllinien könnte die erhöhte Expression des Entkopplerproteins UCP2 (*Uncoupling Protein 2*) gewesen sein (Harper *et al.*, 2002). Es ist an der Regulation von Glucose- und Fettsäurestoffwechsel beteiligt (Pecqueur *et al.*, 2008) und wird verstärkt von leukämischen Zellen exprimiert, wenn sie in Gegenwart von Stromazellen kokultiviert werden (Samudio *et al.*, 2008). Von besonderer Bedeutung ist, dass durch die Kokultivierung in den Leukämiezellen das MTMP sinkt, der Energiestoffwechsel moduliert wird und die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika zunimmt (Konopleva *et al.*, 2002; Samudio *et al.*, 2008).

In Bezug auf die zuvor beschriebenen Ergebnisse könnte eine Umprogrammierung des Energiestoffwechsels auch für Wildtyp-p53-Zellen als Ursache für ein niedriges MTMP, eine verringerte ROS-Freisetzung und eine erhöhte Zytostatikaresistenz in Frage kommen. Der Energiestoffwechsel ist damit aber auch gleichzeitig Angriffspunkt für neue Therapiestrategien. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von Glucose- und Fettsäurestoffwechsel die Wirkungen von Chemotherapeutika signifikant erhöhen (Hernlund *et al.*, 2008; Hulleman *et al.*, 2009; Samudio *et al.*, 2010). Aus diesem Grund wäre es interessant zu untersuchen, ob die bei den primären ALL-Zellen beobachteten Unterschiede im MTMP und die damit verbundene differentielle Aktivierbarkeit von p53 ebenfalls auf Veränderungen im Energiestoffwechsel zurückzuführen sind.

6 Zusammenfassung

Bei der kindlichen akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) ist die Persistenz der leukämischen Zellen unter der Therapie (minimale Resterkrankung, MRD) von entscheidender prognostischer Bedeutung. Um Determinanten der Therapieresistenz bei der ALL zu identifizieren, wurden MRD-Zellen mittels genomweiter Genexpressionsanalyse eingehend charakterisiert. Die bioinformatische Auswertung der Genexpressionsdaten deutete daraufhin, dass sich die persistierenden Blasten in Richtung ruhender reifer B-Zellen entwickelt haben. Die Differenzierung der MRD-Zellen und ihre verringerte proliferative Aktivität konnte durch den Vergleich mit normalen B-Zellen auf zellulärer Ebene und Proteinebene bestätigt werden. Der ruhende, reifere Zustand der MRD-Zellen könnte die Therapieresistenz erklären und Auswirkungen auf den weiteren Verlauf der Chemotherapie haben, die in erster Linie auf proliferierende Zellen abzielt.

Die Wirksamkeit der antileukämischen Chemotherapie wird durch die Aktivierbarkeit des Signalweges des Tumorsuppressors p53 bestimmt. Im Rahmen der Dissertation wurde der Einfluss mitochondrialer Faktoren auf den p53-Signalweg untersucht. Die Ergebnisse wiesen daraufhin, dass die p53-Aktivierbarkeit an den mitochondrialen Aktivitätszustand und die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies gekoppelt ist, wodurch die erhöhte Chemoresistenz von Zellen in einem ruhenden Zustand erklärt werden kann.

Darüber hinaus konnten bei der Evaluierung der experimentellen Ergebnisse an unabhängigen Patientenkohorten neue potentielle Resistenzfaktoren identifiziert werden. Diesbezüglich zeigte sich die Expression des Adhäsionsmoleküls CD11b (*ITGAM*) von prognostischer Bedeutung und war mit einem ungünstigen Therapieansprechen assoziiert.

Die präsentierten Ergebnisse tragen zum grundlegenden Verständnis der molekularen und zellbiologischen Eigenschaften therapieresistenter Leukämiezellen bei und könnten einen Ausgangspunkt für individualisierte Therapiestrategien bei der pädiatrischen ALL darstellen.

7 Literaturverzeichnis

- Ackerman, S. H., and Tzagoloff, A. Methods to determine the status of mitochondrial ATP synthase assembly. *Methods Mol Biol* **372**: 363-77 (2007).
- Affymetrix GeneChip Expression Analysis: Data Analysis Fundamentals. *Manual*: 1-108 (2004).
- Affymetrix GeneChip Human Genome Arrays. *Data Sheet*: 1-3 (2004).
- Aguilera, A., and Gomez-Gonzalez, B. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* **9**: 204-17 (2008).
- Alberts, B., Johnson, A., Walter, P., Lewis, J., Raff, M., and Roberts, K. Chapter 14: Energy Conversion: Mitochondria and Chloroplasts. *Molecular Biology of the Cell*. London, Taylor & Francis Ltd.: 813-878 (2008).
- Arnon, J., Meirou, D., Lewis-Roness, H., and Ornoy, A. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Hum Reprod Update* **7**: 394-403 (2001).
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., and Sherlock, G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* **25**: 25-9 (2000).
- Asher, G., Lotem, J., Kama, R., Sachs, L., and Shaul, Y. NQO1 stabilizes p53 through a distinct pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3099-104 (2002).
- Asher, G., and Shaul, Y. p53 proteasomal degradation: poly-ubiquitination is not the whole story. *Cell Cycle* **4**: 1015-8 (2005).
- Ausserlechner, M. J., Obexer, P., Bock, G., Geley, S., and Kofler, R. Cyclin D3 and c-MYC control glucocorticoid-induced cell cycle arrest but not apoptosis in lymphoblastic leukemia cells. *Cell Death Differ* **11**: 165-74 (2004).
- Bass, D. A., Parce, J. W., Dechatelet, L. R., Szejda, P., Seeds, M. C., and Thomas, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* **130**: 1910-7 (1983).
- Basso, G., Veltroni, M., Valsecchi, M. G., Dworzak, M. N., Ratei, R., Silvestri, D., Benetello, A., Buldini, B., Maglia, O., Masera, G., Conter, V., Arico, M., Biondi, A., and Gaipa, G. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol* **27**: 5168-74 (2009).
- Baugh, L. R., Hill, A. A., Brown, E. L., and Hunter, C. P. Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. *Nucleic Acids Res* **29**: E29 (2001).
- Beare, A., Stockinger, H., Zola, H., and Nicholson, I. Monoclonal antibodies to human cell surface antigens. *Curr Protoc Immunol* **Appendix 4**: 4A (2008).
- Bell, H. S., and Ryan, K. M. Targeting the p53 family for cancer therapy: 'big brother' joins the fight. *Cell Cycle* **6**: 1995-2000 (2007).
- Bene, M. C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W. D., Matutes, E., Orfao, A., and van't Veer, M. B. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* **9**: 1783-6 (1995).
- Bergamaschi, D., Gasco, M., Hiller, L., Sullivan, A., Syed, N., Trigiant, G., Yulug, I., Merlano, M., Numico, G., Comino, A., Attard, M., Reelfs, O., Gusterson, B., Bell, A. K., Heath, V., Tavassoli, M., Farrell, P. J., Smith, P., Lu, X., and Crook, T. p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell* **3**: 387-402 (2003).
- Bledsoe, R. K., Montana, V. G., Stanley, T. B., Delves, C. J., Apolito, C. J., McKee, D. D., Consler, T. G., Parks, D. J., Stewart, E. L., Willson, T. M., Lambert, M. H., Moore, J. T., Pearce, K. H., and Xu, H. E. Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* **110**: 93-105 (2002).
- Bledsoe, R. K., Stewart, E. L., and Pearce, K. H. Structure and function of the glucocorticoid receptor ligand binding domain. *Vitam Horm* **68**: 49-91 (2004).
- Bollum, F. J. Terminal deoxynucleotidyl transferase as a hematopoietic cell marker. *Blood* **54**: 1203-15 (1979).

- Bonapace, L., Bornhauser, B. C., Schmitz, M., Cario, G., Ziegler, U., Niggli, F. K., Schafer, B. W., Schrappe, M., Stanulla, M., and Bourquin, J. P. Induction of autophagy-dependent necroptosis is required for childhood acute lymphoblastic leukemia cells to overcome glucocorticoid resistance. *J Clin Invest* **120**: 1310-23 (2010).
- Bonsing, B. A., Corver, W. E., Gorsira, M. C., van Vliet, M., Oud, P. S., Cornelisse, C. J., and Fleuren, G. J. Specificity of seven monoclonal antibodies against p53 evaluated with Western blotting, immunohistochemistry, confocal laser scanning microscopy, and flow cytometry. *Cytometry* **28**: 11-24 (1997).
- Borowitz, M. J., Shuster, J., Carroll, A. J., Nash, M., Look, A. T., Camitta, B., Mahoney, D., Lauer, S. J., and Pullen, D. J. Prognostic significance of fluorescence intensity of surface marker expression in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. A Pediatric Oncology Group Study. *Blood* **89**: 3960-6 (1997).
- Bradstock, K. F., Papageorgiou, E. S., Janossy, G., Hoffbrand, A. V., Willoughby, M. L., Roberts, P. D., and Bollum, F. J. Detection of leukaemic lymphoblasts in CSF by immunofluorescence for terminal transferase. *Lancet* **1**: 1144 (1980).
- Bragado, P., Armesilla, A., Silva, A., and Porras, A. Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis* **12**: 1733-42 (2007).
- Breslin, M. B., Geng, C. D., and Vedeckis, W. V. Multiple promoters exist in the human GR gene, one of which is activated by glucocorticoids. *Mol Endocrinol* **15**: 1381-95 (2001).
- Breuner, C. W., and Orchinik, M. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol* **175**: 99-112 (2002).
- Brosh, R., and Rotter, V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* **9**: 701-13 (2009).
- Campana, D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* **46**: 100-6 (2009).
- Campana, D., Coustan-Smith, E., and Janossy, G. The immunologic detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* **76**: 163-71 (1990).
- Cario, G., Stanulla, M., Fine, B. M., Teuffel, O., Neuhoff, N. V., Schrauder, A., Flohr, T., Schafer, B. W., Bartram, C. R., Welte, K., Schlegelberger, B., and Schrappe, M. Distinct gene expression profiles determine molecular treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **105**: 821-6 (2005).
- Cecconi, F., Alvarez-Bolado, G., Meyer, B. I., Roth, K. A., and Gruss, P. Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* **94**: 727-37 (1998).
- Ceuppens, J. L., Baroja, M. L., Lorre, K., Van Damme, J., and Billiau, A. Human T cell activation with phytohemagglutinin. The function of IL-6 as an accessory signal. *J Immunol* **141**: 3868-74 (1988).
- Chakrabarti, S., and Patel, K. D. The Atypical Zeta (zeta) Isoform of Protein Kinase C Regulates CD11b/CD18 Activation in Human Neutrophils. *Microcirculation*: 1 (2008).
- Chan, T. A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* **401**: 616-20 (1999).
- Chauhan, D., Auclair, D., Robinson, E. K., Hideshima, T., Li, G., Podar, K., Gupta, D., Richardson, P., Schlossman, R. L., Krett, N., Chen, L. B., Munshi, N. C., and Anderson, K. C. Identification of genes regulated by dexamethasone in multiple myeloma cells using oligonucleotide arrays. *Oncogene* **21**: 1346-58 (2002).
- Chen, Y., Yang, Y., Miller, M. L., Shen, D., Shertzer, H. G., Stringer, K. F., Wang, B., Schneider, S. N., Nebert, D. W., and Dalton, T. P. Hepatocyte-specific Gclc deletion leads to rapid onset of steatosis with mitochondrial injury and liver failure. *Hepatology* **45**: 1118-28 (2007).
- Cheok, M. H., Yang, W., Pui, C. H., Downing, J. R., Cheng, C., Naeve, C. W., Relling, M. V., and Evans, W. E. Treatment-specific changes in gene expression discriminate in vivo drug response in human leukemia cells. *Nat Genet* **34**: 85-90 (2003).
- Clark, W., Black, E. J., MacLaren, A., Kruse, U., LaThangue, N., Vogt, P. K., and Gillespie, D. A. v-Jun overrides the mitogen dependence of S-phase entry by deregulating retinoblastoma protein phosphorylation and E2F-pocket protein interactions as a consequence of enhanced cyclin E-cdk2 catalytic activity. *Mol Cell Biol* **20**: 2529-42 (2000).
- Clarke, P. R., and Allan, L. A. Cell-cycle control in the face of damage--a matter of life or death. *Trends Cell Biol* **19**: 89-98 (2009).
- Cotter, T. G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer* **9**: 501-7 (2009).
- Cram, L. S. Flow cytometry, an overview. *Methods Cell Sci* **24**: 1-9 (2002).

- Cross, M., and Döbel, V. Durchflusszytometrische Zellsortierung. *Zelluläre Diagnostik*. U. Sack, A. Tárnok and G. Rothe. Freiburg, KARGER: 178 - 190 (2007).
- Dalton, T. P., Shertzer, H. G., and Puga, A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 67-101 (1999).
- Danial, N. N., and Korsmeyer, S. J. Cell death: critical control points. *Cell* **116**: 205-19 (2004).
- Deroo, B. J., and Archer, T. K. Glucocorticoid receptor-mediated chromatin remodeling in vivo. *Oncogene* **20**: 3039-46 (2001).
- Desgrosellier, J. S., and Cheresch, D. A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* **10**: 9-22 (2010).
- Detmers, P. A., Lo, S. K., Olsen-Egbert, E., Walz, A., Baggiolini, M., and Cohn, Z. A. Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med* **171**: 1155-62 (1990).
- Distelhorst, C. W. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death Differ* **9**: 6-19 (2002).
- Dorshkind, K. Not a split decision for human hematopoiesis. *Nat Immunol* **11**: 569-70 (2010).
- Dougherty, T. F., and White, A. Influence Of Adrenal Cortical Secretion On Blood Elements. *Science* **98**: 367-369 (1943).
- Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**: 47-95 (2002).
- Duma, D., Jewell, C. M., and Cidlowski, J. A. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol* **102**: 11-21 (2006).
- Dworzak, M. N., Gaipa, G., Ratei, R., Veltroni, M., Schumich, A., Maglia, O., Karawajew, L., Benetello, A., Potschger, U., Husak, Z., Gadner, H., Biondi, A., Ludwig, W. D., and Basso, G. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Multicentric assessment is feasible. *Cytometry B Clin Cytom* **74**: 331-40 (2008).
- Dykens, J. A., and Stout, A. K. Assessment of mitochondrial membrane potential in situ using single potentiometric dyes and a novel fluorescence resonance energy transfer technique. *Methods Cell Biol* **65**: 285-309 (2001).
- Ebert, B. L., Lee, M. M., Pretz, J. L., Subramanian, A., Mak, R., Golub, T. R., and Sieff, C. A. An RNA interference model of RPS19 deficiency in Diamond-Blackfan anemia recapitulates defective hematopoiesis and rescue by dexamethasone: identification of dexamethasone-responsive genes by microarray. *Blood* **105**: 4620-6 (2005).
- Edwards, M. R., Haas, J., Panettieri, R. A., Jr., Johnson, M., and Johnston, S. L. Corticosteroids and beta2 agonists differentially regulate rhinovirus-induced interleukin-6 via distinct Cis-acting elements. *J Biol Chem* **282**: 15366-75 (2007).
- Eguchi, Y., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* **57**: 1835-40 (1997).
- Eguchi, Y., Srinivasan, A., Tomaselli, K. J., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. ATP-dependent steps in apoptotic signal transduction. *Cancer Res* **59**: 2174-81 (1999).
- Eisen, L. P., Elsasser, M. S., and Harmon, J. M. Positive regulation of the glucocorticoid receptor in human T-cells sensitive to the cytolytic effects of glucocorticoids. *J Biol Chem* **263**: 12044-8 (1988).
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14863-8 (1998).
- Ferrando, A. A., Neuberg, D. S., Staunton, J., Loh, M. L., Huard, C., Raimondi, S. C., Behm, F. G., Pui, C. H., Downing, J. R., Gilliland, D. G., Lander, E. S., Golub, T. R., and Look, A. T. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **1**: 75-87 (2002).
- Ferraro, C., Quemeneur, L., Fournel, S., Prigent, A. F., Revillard, J. P., and Bonnefoy-Berard, N. The topoisomerase inhibitors camptothecin and etoposide induce a CD95-independent apoptosis of activated peripheral lymphocytes. *Cell Death Differ* **7**: 197-206 (2000).
- Ferraro, C., Quemeneur, L., Prigent, A. F., Taverne, C., Revillard, J. P., and Bonnefoy-Berard, N. Anthracyclines trigger apoptosis of both G0-G1 and cycling peripheral blood lymphocytes and induce massive deletion of mature T and B cells. *Cancer Res* **60**: 1901-7 (2000).

- Findley, H. W., Gu, L., Yeager, A. M., and Zhou, M. Expression and regulation of Bcl-2, Bcl-xl, and Bax correlate with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **89**: 2986-93 (1997).
- Flohr, T., Schrauder, A., Cazzaniga, G., Panzer-Grumayer, R., van der Velden, V., Fischer, S., Stanulla, M., Basso, G., Niggli, F. K., Schafer, B. W., Sutton, R., Koehler, R., Zimmermann, M., Valsecchi, M. G., Gadner, H., Masera, G., Schrappe, M., van Dongen, J. J., Biondi, A., and Bartram, C. R. Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **22**: 771-82 (2008).
- Flotho, C., Coustan-Smith, E., Pei, D., Cheng, C., Song, G., Pui, C. H., Downing, J. R., and Campana, D. A set of genes that regulate cell proliferation predicts treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **110**: 1271-7 (2007).
- Flotho, C., Coustan-Smith, E., Pei, D., Iwamoto, S., Song, G., Cheng, C., Pui, C. H., Downing, J. R., and Campana, D. Genes contributing to minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic significance of CASP8AP2. *Blood* **108**: 1050-7 (2006).
- Frankfurt, O., and Rosen, S. T. Mechanisms of glucocorticoid-induced apoptosis in hematologic malignancies: updates. *Curr Opin Oncol* **16**: 553-63 (2004).
- Freedman, L. P. Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell* **97**: 5-8 (1999).
- Freedman, L. P., Luisi, B. F., Korszun, Z. R., Basavappa, R., Sigler, P. B., and Yamamoto, K. R. The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature* **334**: 543-6 (1988).
- Freeman, W. M., Robertson, D. J., and Vrana, K. E. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques* **29**: 1042-6, 1048-55 (2000).
- Frohling, S., and Dohner, H. Chromosomal abnormalities in cancer. *N Engl J Med* **359**: 722-34 (2008).
- Fulda, S., and Debatin, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**: 4798-811 (2006).
- Gaipa, G., Basso, G., Maglia, O., Leoni, V., Faini, A., Cazzaniga, G., Bugarin, C., Veltroni, M., Michelotto, B., Ratei, R., Coliva, T., Valsecchi, M. G., Biondi, A., and Dworzak, M. N. Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection. *Leukemia* **19**: 49-56 (2005).
- Garcia Fernandez, M., Troiano, L., Moretti, L., Nasi, M., Pinti, M., Salvioli, S., Dobrucki, J., and Cossarizza, A. Early changes in intramitochondrial cardiolipin distribution during apoptosis. *Cell Growth Differ* **13**: 449-55 (2002).
- Garrett, R. W., and Emerson, S. G. Bone and blood vessels: the hard and the soft of hematopoietic stem cell niches. *Cell Stem Cell* **4**: 503-6 (2009).
- Gaynon, P. S. Childhood acute lymphoblastic leukaemia and relapse. *Br J Haematol* **131**: 579-87 (2005).
- Gaynon, P. S., and Lustig, R. H. The use of glucocorticoids in acute lymphoblastic leukemia of childhood. Molecular, cellular, and clinical considerations. *J Pediatr Hematol Oncol* **17**: 1-12 (1995).
- Gaynon, P. S., Qu, R. P., Chappell, R. J., Willoughby, M. L., Tubergen, D. G., Steinherz, P. G., and Trigg, M. E. Survival after relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: impact of site and time to first relapse--the Children's Cancer Group Experience. *Cancer* **82**: 1387-95 (1998).
- Geijtenbeek, T. B., van Kooyk, Y., van Vliet, S. J., Renes, M. H., Raymakers, R. A., and Figdor, C. G. High frequency of adhesion defects in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **94**: 754-64 (1999).
- Geley, S., Fiegl, M., Hartmann, B. L., and Kofler, R. Genes mediating glucocorticoid effects and mechanisms of their regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **128**: 1-97 (1996).
- Gomi, M., Moriwaki, K., Katagiri, S., Kurata, Y., and Thompson, E. B. Glucocorticoid effects on myeloma cells in culture: correlation of growth inhibition with induction of glucocorticoid receptor messenger RNA. *Cancer Res* **50**: 1873-8 (1990).
- Graf, T. Immunology: blood lines redrawn. *Nature* **452**: 702-3 (2008).
- Green, D. R., and Kroemer, G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* **458**: 1127-30 (2009).

- Greenstein, S., Ghias, K., Krett, N. L., and Rosen, S. T. Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. *Clin Cancer Res* **8**: 1681-94 (2002).
- Gross, K. L., Lu, N. Z., and Cidlowski, J. A. Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance. *Mol Cell Endocrinol* **300**: 7-16 (2009).
- Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G. S., Henderson, J. T., Woo, M., Soengas, M. S., Elia, A., de la Pompa, J. L., Kagi, D., Khoo, W., Potter, J., Yoshida, R., Kaufman, S. A., Lowe, S. W., Penninger, J. M., and Mak, T. W. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* **94**: 339-52 (1998).
- Hamada, K., and Utiyama, H. Functional cytoplasmic domains of the Mac-1 integrin receptor in phorbol ester-treated U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **335**: 858-64 (2005).
- Han, D. C., Lee, M. Y., Shin, K. D., Jeon, S. B., Kim, J. M., Son, K. H., Kim, H. C., Kim, H. M., and Kwon, B. M. 2'-benzoyloxycinnamaldehyde induces apoptosis in human carcinoma via reactive oxygen species. *J Biol Chem* **279**: 6911-20 (2004).
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70 (2000).
- Harmon, J. M., Norman, M. R., Fowlkes, B. J., and Thompson, E. B. Dexamethasone induces irreversible G1 arrest and death of a human lymphoid cell line. *J Cell Physiol* **98**: 267-78 (1979).
- Harper, J. W., and Adams, P. D. Cyclin-dependent kinases. *Chem Rev* **101**: 2511-26 (2001).
- Harper, M. E., Antoniou, A., Villalobos-Menuet, E., Russo, A., Trauger, R., Vendemelio, M., George, A., Bartholomew, R., Carlo, D., Shaikh, A., Kupperman, J., Newell, E. W., Bespalov, I. A., Wallace, S. S., Liu, Y., Rogers, J. R., Gibbs, G. L., Leahy, J. L., Camley, R. E., Melamede, R., and Newell, M. K. Characterization of a novel metabolic strategy used by drug-resistant tumor cells. *Faseb J* **16**: 1550-7 (2002).
- Heerdt, B. G., Houston, M. A., and Augenlicht, L. H. Short-chain fatty acid-initiated cell cycle arrest and apoptosis of colonic epithelial cells is linked to mitochondrial function. *Cell Growth Differ* **8**: 523-32 (1997).
- Heerdt, B. G., Houston, M. A., Wilson, A. J., and Augenlicht, L. H. The intrinsic mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) is associated with steady-state mitochondrial activity and the extent to which colonic epithelial cells undergo butyrate-mediated growth arrest and apoptosis. *Cancer Res* **63**: 6311-9 (2003).
- Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-6 (2000).
- Hernlund, E., Ihlund, L. S., Khan, O., Ates, Y. O., Linder, S., Panaretakis, T., and Shoshan, M. C. Potentiation of chemotherapeutic drugs by energy metabolism inhibitors 2-deoxyglucose and etomoxir. *Int J Cancer* **123**: 476-83 (2008).
- Hersh, E. M., Bodey, G. P., Nies, B. A., and Freireich, E. J. Causes Of Death In Acute Leukemia: A Ten-Year Study Of 414 Patients From 1954-1963. *Jama* **193**: 105-9 (1965).
- High, L. M., Szymanska, B., Wilczynska-Kalak, U., Barber, N., O'Brien, R., Khaw, S. L., Vikstrom, I. B., Roberts, A. W., and Lock, R. B. The Bcl-2 homology domain 3 mimetic ABT-737 targets the apoptotic machinery in acute lymphoblastic leukemia resulting in synergistic in vitro and in vivo interactions with established drugs. *Mol Pharmacol* **77**: 483-94 (2010).
- Hittelman, A. B., Burakov, D., Iniguez-Lluhi, J. A., Freedman, L. P., and Garabedian, M. J. Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *Embo J* **18**: 5380-8 (1999).
- Ho, S. Y., and Mittal, G. S. Electroporation of cell membranes: a review. *Crit Rev Biotechnol* **16**: 349-62 (1996).
- Holleman, A., Cheok, M. H., den Boer, M. L., Yang, W., Veerman, A. J., Kazemier, K. M., Pei, D., Cheng, C., Pui, C. H., Relling, M. V., Janka-Schaub, G. E., Pieters, R., and Evans, W. E. Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med* **351**: 533-42 (2004).
- Huber, W., von Heydebreck, A., Sultmann, H., Poustka, A., and Vingron, M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* **18 Suppl 1**: S96-104 (2002).
- Hulleman, E., Kazemier, K. M., Holleman, A., VanderWeele, D. J., Rudin, C. M., Broekhuis, M. J., Evans, W. E., Pieters, R., and Den Boer, M. L. Inhibition of glycolysis modulates prednisolone resistance in acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* **113**: 2014-21 (2009).
- Huntington, N. D., and Tarlinton, D. M. CD45: direct and indirect government of immune regulation. *Immunol Lett* **94**: 167-74 (2004).

- Huntington, N. D., Xu, Y., Puthalakath, H., Light, A., Willis, S. N., Strasser, A., and Tarlinton, D. M. CD45 links the B cell receptor with cell survival and is required for the persistence of germinal centers. *Nat Immunol* **7**: 190-8 (2006).
- Hurd, T. R., Prime, T. A., Harbour, M. E., Lilley, K. S., and Murphy, M. P. Detection of reactive oxygen species-sensitive thiol proteins by redox difference gel electrophoresis: implications for mitochondrial redox signaling. *J Biol Chem* **282**: 22040-51 (2007).
- Hurwitz, C. A., Loken, M. R., Graham, M. L., Karp, J. E., Borowitz, M. J., Pullen, D. J., and Civin, C. I. Asynchronous antigen expression in B lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **72**: 299-307 (1988).
- Hynes, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**: 11-25 (1992).
- Igarashi, H., Medina, K. L., Yokota, T., Rossi, M. I., Sakaguchi, N., Comp, P. C., and Kincade, P. W. Early lymphoid progenitors in mouse and man are highly sensitive to glucocorticoids. *Int Immunol* **17**: 501-11 (2005).
- Inoue, M., Sato, E. F., Nishikawa, M., Park, A. M., Kira, Y., Imada, I., and Utsumi, K. Cross talk of nitric oxide, oxygen radicals, and superoxide dismutase regulates the energy metabolism and cell death and determines the fates of aerobic life. *Antioxid Redox Signal* **5**: 475-84 (2003).
- Irizarry, R. A., Bolstad, B. M., Collin, F., Cope, L. M., Hobbs, B., and Speed, T. P. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* **31**: e15 (2003).
- Islam, K. N., and Mendelson, C. R. Glucocorticoid/glucocorticoid receptor inhibition of surfactant protein-A (SP-A) gene expression in lung type II cells is mediated by repressive changes in histone modification at the SP-A promoter. *Mol Endocrinol* **22**: 585-96 (2008).
- Janeway, A. J., Travers, P., Walport, M., and Capra, J. D. (1999). *Immunobiology: The Immune system in Health and Disease*. New York, Elsevier. Pages (1999).
- Johnson, T. M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Lowenstein, R. A., and Finkel, T. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 11848-52 (1996).
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., and Lowe, S. W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* **108**: 153-64 (2002).
- Jordan, M. A., Thrower, D., and Wilson, L. Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. *Cancer Res* **51**: 2212-22 (1991).
- Jordan, M. A., and Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* **4**: 253-65 (2004).
- Jumaa, H., Bossaller, L., Portugal, K., Storch, B., Lotz, M., Flemming, A., Schrappe, M., Postila, V., Riikonen, P., Pelkonen, J., Niemeyer, C. M., and Reth, M. Deficiency of the adaptor SLP-65 in pre-B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **423**: 452-6 (2003).
- Jumaa, H., Hendriks, R. W., and Reth, M. B cell signaling and tumorigenesis. *Annu Rev Immunol* **23**: 415-45 (2005).
- Kager, L., Langebrake, C., and Kastner, U. Chemotherapie. *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. H. Gadner, G. Gaedicke, C. Niemeyer and J. Ritter. Berlin, Heidelberg, Springer: 560-577 (2006).
- Kang, M. H., Kang, Y. H., Szymanska, B., Wilczynska-Kalak, U., Sheard, M. A., Harned, T. M., Lock, R. B., and Reynolds, C. P. Activity of vincristine, L-ASP, and dexamethasone against acute lymphoblastic leukemia is enhanced by the BH3-mimetic ABT-737 in vitro and in vivo. *Blood* **110**: 2057-66 (2007).
- Kang, M. H., and Reynolds, C. P. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res* **15**: 1126-32 (2009).
- Karawajew, L., Rhein, P., Czerwony, G., and Ludwig, W. D. Stress-induced activation of the p53 tumor suppressor in leukemia cells and normal lymphocytes requires mitochondrial activity and reactive oxygen species. *Blood* **105**: 4767-75 (2005).
- Karawajew, L., Ruppert, V., Wuchter, C., Kosser, A., Schrappe, M., Dorken, B., and Ludwig, W. D. Inhibition of in vitro spontaneous apoptosis by IL-7 correlates with bcl-2 up-regulation, cortical/mature immunophenotype, and better early cyto-reduction of childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **96**: 297-306 (2000).
- Kastan, M. B., and Bartek, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**: 316-23 (2004).
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239-57 (1972).
- Kersey, J. H. Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia. *Blood* **90**: 4243-51 (1997).

- Kolbus, A., Blazquez Domingo, M., Carotta, S., Bakker, W., Luedemann, S., von Lindern, M., Steinlein, P., and Beug, H. Cooperative signaling between cytokine receptors and the glucocorticoid receptor in the expansion of erythroid progenitors: molecular analysis by expression profiling. *Blood* **102**: 3136-46 (2003).
- Komori, T., Okada, A., Stewart, V., and Alt, F. W. Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* **261**: 1171-5 (1993).
- Konopleva, M., Konoplev, S., Hu, W., Zaritsky, A. Y., Afanasiev, B. V., and Andreeff, M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia* **16**: 1713-24 (2002).
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., and van Oers, M. H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84**: 1415-20 (1994).
- Krivtsov, A. V., and Armstrong, S. A. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* **7**: 823-33 (2007).
- Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* **87**: 99-163 (2007).
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., and Melino, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**: 3-11 (2009).
- Kroemer, G., Zamzami, N., and Susin, S. A. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* **18**: 44-51 (1997).
- Krug, U., Ganser, A., and Koeffler, H. P. Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene* **21**: 3475-95 (2002).
- Kumar, R., and Thompson, E. B. Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship. *J Steroid Biochem Mol Biol* **94**: 383-94 (2005).
- Kumar, R., Volk, D. E., Li, J., Lee, J. C., Gorenstein, D. G., and Thompson, E. B. TATA box binding protein induces structure in the recombinant glucocorticoid receptor AF1 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 16425-30 (2004).
- Lane, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**: 15-6 (1992).
- Lapenna, S., and Giordano, A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov* **8**: 547-66 (2009).
- LeBien, T. W. Fates of human B-cell precursors. *Blood* **96**: 9-23 (2000).
- Lee, S., and Schmitt, C. A. Chemotherapy response and resistance. *Curr Opin Genet Dev* **13**: 90-6 (2003).
- Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kuhnle, S., and Nicotera, P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* **185**: 1481-6 (1997).
- Lessene, G., Czabotar, P. E., and Colman, P. M. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **7**: 989-1000 (2008).
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**: 479-89 (1997).
- Liesveld, J. L., Winslow, J. M., Frediani, K. E., Ryan, D. H., and Abboud, C. N. Expression of integrins and examination of their adhesive function in normal and leukemic hematopoietic cells. *Blood* **81**: 112-21 (1993).
- Lill Elghanian, D., Schwartz, K., King, L., and Fraker, P. Glucocorticoid-induced apoptosis in early B cells from human bone marrow. *Exp Biol Med (Maywood)* **227**: 763-70 (2002).
- Lin, J., and Justement, L. B. The MB-1/B29 heterodimer couples the B cell antigen receptor to multiple src family protein tyrosine kinases. *J Immunol* **149**: 1548-55 (1992).
- Lindmo, T., Peters, D. c., and Sweet, R. G. Flow Sorters for Biological Cells. *Flow Cytometry and Sorting*. New York, Wiley-Liss, Inc.: 145 - 170 (1990).
- Liu, B., Chen, Y., and St Clair, D. K. ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radic Biol Med* **44**: 1529-35 (2008).

- Lockhart, D. J., Dong, H., Byrne, M. C., Follettie, M. T., Gallo, M. V., Chee, M. S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., and Brown, E. L. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* **14**: 1675-80 (1996).
- Logarinho, E., and Bousbaa, H. Kinetochore-microtubule interactions "in check" by Bub1, Bub3 and BubR1: The dual task of attaching and signalling. *Cell Cycle* **7**: 1763-8 (2008).
- Lu, L., and Osmond, D. G. Apoptosis and its modulation during B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *Immunol Rev* **175**: 158-74 (2000).
- Lugthart, S., Cheok, M. H., den Boer, M. L., Yang, W., Holleman, A., Cheng, C., Pui, C. H., Relling, M. V., Janka-Schaub, G. E., Pieters, R., and Evans, W. E. Identification of genes associated with chemotherapy crossresistance and treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **7**: 375-86 (2005).
- Lüscher, B., and Nordheim, A. Zellproliferation, Zellzyklus und Apoptose. *Kompendium Internistische Onkologie*. H.-J. Schmoll, K. Höffken and K. Possinger. Berlin, Heidelberg, Springer. **1**: 6-17 (2006).
- Malumbres, M., and Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* **9**: 153-66 (2009).
- Massague, J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* **432**: 298-306 (2004).
- Mayadas, T. N., and Cullere, X. Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions. *Trends Immunol* **26**: 388-95 (2005).
- McCurrach, M. E., Connor, T. M., Knudson, C. M., Korsmeyer, S. J., and Lowe, S. W. bax-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2345-9 (1997).
- Meier, P., Finch, A., and Evan, G. Apoptosis in development. *Nature* **407**: 796-801 (2000).
- Menendez, D., Inga, A., and Resnick, M. A. The expanding universe of p53 targets. *Nat Rev Cancer* **9**: 724-37 (2009).
- Menendez, P., Vargas, A., Bueno, C., Barrena, S., Almeida, J., De Santiago, M., Lopez, A., Roa, S., San Miguel, J. F., and Orfao, A. Quantitative analysis of bcl-2 expression in normal and leukemic human B-cell differentiation. *Leukemia* **18**: 491-8 (2004).
- Merino, R., Ding, L., Veis, D. J., Korsmeyer, S. J., and Nunez, G. Developmental regulation of the Bcl-2 protein and susceptibility to cell death in B lymphocytes. *EMBO J* **13**: 683-91 (1994).
- Meyer, L. H., Karawajew, L., Schrappe, M., Ludwig, W. D., Debatin, K. M., and Stahnke, K. Cytochrome c-related caspase-3 activation determines treatment response and relapse in childhood precursor B-cell ALL. *Blood* **107**: 4524-31 (2006).
- Mitchell, P., and Moyle, J. Stoichiometry of proton translocation through the respiratory chain and adenosine triphosphatase systems of rat liver mitochondria. *Nature* **208**: 147-51 (1965).
- Miyashita, T., and Reed, J. C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**: 293-9 (1995).
- Moricke, A., Reiter, A., Zimmermann, M., Gadner, H., Stanulla, M., Dordelmann, M., Loning, L., Beier, R., Ludwig, W. D., Ratei, R., Harbott, J., Boos, J., Mann, G., Niggli, F., Feldges, A., Henze, G., Welte, K., Beck, J. D., Klingebiel, T., Niemeyer, C., Zintl, F., Bode, U., Urban, C., Wehinger, H., Niethammer, D., Riehm, H., and Schrappe, M. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood* **111**: 4477-89 (2008).
- Mullighan, C. G., Su, X., Zhang, J., Radtke, I., Phillips, L. A., Miller, C. B., Ma, J., Liu, W., Cheng, C., Schulman, B. A., Harvey, R. C., Chen, I. M., Clifford, R. J., Carroll, W. L., Reaman, G., Bowman, W. P., Devidas, M., Gerhard, D. S., Yang, W., Relling, M. V., Shurtleff, S. A., Campana, D., Borowitz, M. J., Pui, C. H., Smith, M., Hunger, S. P., Willman, C. L., and Downing, J. R. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* **360**: 470-80 (2009).
- Murphy, J. B., and Sturm, E. The Effect Of Adrenal Cortical And Pituitary Adrenotropic Hormones On Transplanted Leukemia In Rats. *Science* **99**: 303 (1944).
- Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* **417**: 1-13 (2009).

- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., and Schäfer-Korting, M. (2001). *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. Pages (2001).
- Nakayama, J., Yamamoto, M., Hayashi, K., Satoh, H., Bundo, K., Kubo, M., Goitsuka, R., Farrar, M. A., and Kitamura, D. BLNK suppresses pre-B-cell leukemogenesis through inhibition of JAK3. *Blood* **113**: 1483-92 (2009).
- Nicotera, P., Leist, M., and Ferrando-May, E. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* **102-103**: 139-42 (1998).
- Nygaard, V., and Hovig, E. Options available for profiling small samples: a review of sample amplification technology when combined with microarray profiling. *Nucleic Acids Res* **34**: 996-1014 (2006).
- Opferman, J. T., and Korsmeyer, S. J. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol* **4**: 410-5 (2003).
- Pearson, O. H., and Eliel, L. P. Use of pituitary adrenocorticotropic hormone (ACTH) and cortisone in lymphomas and leukemias. *J Am Med Assoc* **144**: 1349-53 (1950).
- Pecqueur, C., Bui, T., Gelly, C., Hauchard, J., Barbot, C., Bouillaud, F., Ricquier, D., Miroux, B., and Thompson, C. B. Uncoupling protein-2 controls proliferation by promoting fatty acid oxidation and limiting glycolysis-derived pyruvate utilization. *Faseb J* **22**: 9-18 (2008).
- Perez de Castro, I., de Carcer, G., and Malumbres, M. A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy. *Carcinogenesis* **28**: 899-912 (2007).
- Perfetto, S. P., Chattopadhyay, P. K., and Roederer, M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol* **4**: 648-55 (2004).
- Phillips, J., and Eberwine, J. H. Antisense RNA Amplification: A Linear Amplification Method for Analyzing the mRNA Population from Single Living Cells. *Methods* **10**: 283-8 (1996).
- Pinheiro, J. P., and Boos, J. The best way to use asparaginase in childhood acute lymphatic leukaemia--still to be defined? *Br J Haematol* **125**: 117-27 (2004).
- Pitzalis, C., Pipitone, N., and Perretti, M. Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci* **966**: 108-18 (2002).
- Platanias, L. C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* **5**: 375-86 (2005).
- Ploner, C., Rainer, J., Niederegger, H., Eduardoff, M., Villunger, A., Geley, S., and Kofler, R. The BCL2 rheostat in glucocorticoid-induced apoptosis of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* (2007).
- Ploner, C., Schmidt, S., Presul, E., Renner, K., Schrocksnadel, K., Rainer, J., Riml, S., and Kofler, R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia. *J Steroid Biochem Mol Biol* **93**: 153-60 (2005).
- Pratt, W. B., and Toft, D. O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**: 111-33 (2003).
- Pui, C. H., Relling, M. V., and Downing, J. R. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* **350**: 1535-48 (2004).
- Ratei, R., Basso, G., Dworzak, M., Gaipa, G., Veltroni, M., Rhein, P., Biondi, A., Schrappe, M., Ludwig, W. D., and Karawajew, L. Monitoring treatment response of childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction. *Leukemia* **23**: 528-34 (2009).
- Rathmell, J. C. B-cell homeostasis: digital survival or analog growth? *Immunol Rev* **197**: 116-28 (2004).
- Rathmell, J. C., Lindsten, T., Zong, W. X., Cinalli, R. M., and Thompson, C. B. Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat Immunol* **3**: 932-9 (2002).
- Ray, A., James, M. K., Larochelle, S., Fisher, R. P., and Blain, S. W. p27Kip1 inhibits cyclin D-cyclin-dependent kinase 4 by two independent modes. *Mol Cell Biol* **29**: 986-99 (2009).
- Reiter, A., Schrappe, M., Ludwig, W. D., Hiddemann, W., Sauter, S., Henze, G., Zimmermann, M., Lampert, F., Havers, W., Niethammer, D., and et al. Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood* **84**: 3122-33 (1994).

- Revollo, J. R., and Cidlowski, J. A. Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* **1179**: 167-78 (2009).
- Rhee, K., Bresnahan, W., Hirai, A., Hirai, M., and Thompson, E. A. c-Myc and cyclin D3 (CcnD3) genes are independent targets for glucocorticoid inhibition of lymphoid cell proliferation. *Cancer Res* **55**: 4188-95 (1995).
- Rhein, P., Mitlohner, R., Basso, G., Gaipa, G., Dworzak, M. N., Kirschner-Schwabe, R., Hagemeyer, C., Stanulla, M., Schrappe, M., Ludwig, W. D., Karawajew, L., and Ratei, R. CD11b is a therapy resistance- and minimal residual disease-specific marker in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **115**: 3763-71 (2010).
- Rhein, P., Scheid, S., Ratei, R., Hagemeyer, C., Seeger, K., Kirschner-Schwabe, R., Moericke, A., Schrappe, M., Spang, R., Ludwig, W. D., and Karawajew, L. Gene expression shift towards normal B cells, decreased proliferative capacity and distinct surface receptors characterize leukemic blasts persisting during induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **21**: 897-905 (2007).
- Richard, E. M., Helbling, J. C., Tridon, C., Desmedt, A., Minni, A. M., Cador, M., Pourtau, L., Konsman, J. P., Mormede, P., and Moisan, M. P. Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. *Endocrinology* **151**: 649-59 (2010).
- Riedl, S. J., and Salvesen, G. S. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 405-13 (2007).
- Riehm, H., Reiter, A., Schrappe, M., Berthold, F., Dopfer, R., Gerein, V., Ludwig, R., Ritter, J., Stollmann, B., and Henze, G. [Corticosteroid-dependent reduction of leukocyte count in blood as a prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia in childhood (therapy study ALL-BFM 83)]. *Klin Padiatr* **199**: 151-60 (1987).
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., and Levine, A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 402-12 (2008).
- Rostovtseva, T. K., and Bezrukov, S. M. VDAC regulation: role of cytosolic proteins and mitochondrial lipids. *J Bioenerg Biomembr* **40**: 163-70 (2008).
- Ryckman, C., Vandal, K., Rouleau, P., Talbot, M., and Tessier, P. A. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol* **170**: 3233-42 (2003).
- Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C., and Cossarizza, A. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett* **411**: 77-82 (1997).
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA. Pages (1989).
- Samudio, I., Fiegl, M., McQueen, T., Clise-Dwyer, K., and Andreeff, M. The warburg effect in leukemia-stroma cocultures is mediated by mitochondrial uncoupling associated with uncoupling protein 2 activation. *Cancer Res* **68**: 5198-205 (2008).
- Samudio, I., Harmancey, R., Fiegl, M., Kantarjian, H., Konopleva, M., Korchin, B., Kaluarachchi, K., Bornmann, W., Duvvuri, S., Taegtmeier, H., and Andreeff, M. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J Clin Invest* **120**: 142-56 (2010).
- Savory, J. G., Hsu, B., Laquian, I. R., Giffin, W., Reich, T., Hache, R. J., and Lefebvre, Y. A. Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol* **19**: 1025-37 (1999).
- Scheid, S., and Spang, R. twilight; a Bioconductor package for estimating the local false discovery rate. *Bioinformatics* **21**: 2921-2 (2005).
- Schmidt, S., Rainer, J., Ploner, C., Presul, E., Riml, S., and Kofler, R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ* **11 Suppl 1**: S45-55 (2004).
- Schmidt, S., Rainer, J., Riml, S., Ploner, C., Jesacher, S., Achmuller, C., Presul, E., Skvortsov, S., Crazzolara, R., Fiegl, M., Raivio, T., Janne, O. A., Geley, S., Meister, B., and Kofler, R. Identification of glucocorticoid-response genes in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **107**: 2061-9 (2006).
- Schoneveld, O. J., Gaemers, I. C., and Lamers, W. H. Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim Biophys Acta* **1680**: 114-28 (2004).

- Schrapppe, M. Risk-adapted stratification and treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Radiat Prot Dosimetry* **132**: 130-3 (2008).
- Schrapppe, M., Camitta, B., Pui, C. H., Eden, T., Gaynon, P., Gustafsson, G., Janka-Schaub, G. E., Kamps, W., Masera, G., Sallan, S., Tsuchida, M., and Vilmer, E. Long-term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **14**: 2193-4 (2000a).
- Schrapppe, M., Harbott, J., and Riehm, H. Akute lymphoblastische Leukämien. *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. H. Gadner, G. Gaedicke, C. Niemeier and J. Ritter. Berlin, Heidelberg, Springer: 656-679 (2006).
- Schrapppe, M., Reiter, A., Ludwig, W. D., Harbott, J., and Zimmermann, M. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **95**: 3310-22 (2000b).
- Schrapppe, M., Reiter, A., and Riehm, H. Cytoreduction and prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* **14**: 2403-6 (1996).
- Schrapppe, M., Reiter, A., Zimmermann, M., Harbott, J., Ludwig, W. D., Henze, G., Gadner, H., Odenwald, E., and Riehm, H. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster. *Leukemia* **14**: 2205-22 (2000c).
- Schuler, G. D. Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. *J Mol Med* **75**: 694-8 (1997).
- Seibel, N. L. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: peaks and pitfalls. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 374-80 (2008).
- Shah, N., Oseth, L., and LeBien, T. W. Development of a model for evaluating the interaction between human pre-B acute lymphoblastic leukemic cells and the bone marrow stromal cell microenvironment. *Blood* **92**: 3817-28 (1998).
- Sheaff, R. J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J. M., and Clurman, B. E. Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev* **11**: 1464-78 (1997).
- Shizuru, J. A., Negrin, R. S., and Weissman, I. L. Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. *Annu Rev Med* **56**: 509-38 (2005).
- Slee, E. A., Adrain, C., and Martin, S. J. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* **276**: 7320-6 (2001).
- Slee, E. A., O'Connor, D. J., and Lu, X. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* **23**: 2809-18 (2004).
- Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A., and Jordan, M. S. T cell activation. *Annu Rev Immunol* **27**: 591-619 (2009).
- Soussi, T., and Beroud, C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* **1**: 233-40 (2001).
- Springer, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**: 301-14 (1994).
- Stahnke, K., Fulda, S., Friesen, C., Strauss, G., and Debatin, K. M. Activation of apoptosis pathways in peripheral blood lymphocytes by in vivo chemotherapy. *Blood* **98**: 3066-73 (2001).
- Stanulla, M., and Schrapppe, M. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* **46**: 52-63 (2009).
- Stepczynska, A., Lauber, K., Engels, I. H., Janssen, O., Kabelitz, D., Wesselborg, S., and Schulze-Osthoff, K. Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation. *Oncogene* **20**: 1193-202 (2001).
- Szczepanski, T., van der Velden, V. H., and van Dongen, J. J. Flow-cytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes. *Clin Chem Lab Med* **44**: 775-96 (2006).
- Takada, Y., Ye, X., and Simon, S. The integrins. *Genome Biol* **8**: 215 (2007).
- Tarpey, M. M., and Fridovich, I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res* **89**: 224-36 (2001).
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., and Martin, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 231-41 (2008).

- Teixido, J., Hemler, M. E., Greenberger, J. S., and Anklesaria, P. Role of beta 1 and beta 2 integrins in the adhesion of human CD34hi stem cells to bone marrow stroma. *J Clin Invest* **90**: 358-67 (1992).
- Tenen, D. G., Hromas, R., Licht, J. D., and Zhang, D. E. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* **90**: 489-519 (1997).
- Terstappen, L. W., Safford, M., Konemann, S., Loken, M. R., Zurlutter, K., Buchner, T., Hiddemann, W., and Wormann, B. Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Part II. Phenotypic heterogeneity at diagnosis. *Leukemia* **6**: 70-80 (1992).
- Tesniere, A., Panaretakis, T., Kepp, O., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Zitvogel, L., and Kroemer, G. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ* **15**: 3-12 (2008).
- Thornton, J. W. Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 5671-6 (2001).
- Tissing, W. J., den Boer, M. L., Meijerink, J. P., Menezes, R. X., Swagemakers, S., van der Spek, P. J., Sallan, S. E., Armstrong, S. A., and Pieters, R. Genomewide identification of prednisolone-responsive genes in acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* **109**: 3929-35 (2007).
- Tissing, W. J., Lauten, M., Meijerink, J. P., den Boer, M. L., Koper, J. W., Sonneveld, P., and Pieters, R. Expression of the glucocorticoid receptor and its isoforms in relation to glucocorticoid resistance in childhood acute lymphocytic leukemia. *Haematologica* **90**: 1279-81 (2005b).
- Tissing, W. J., Meijerink, J. P., den Boer, M. L., Brinkhof, B., van Rossum, E. F., van Wering, E. R., Koper, J. W., Sonneveld, P., and Pieters, R. Genetic variations in the glucocorticoid receptor gene are not related to glucocorticoid resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* **11**: 6050-6 (2005a).
- Toedling, J., Rhein, P., Ratei, R., Karawajew, L., and Spang, R. Automated in-silico detection of cell populations in flow cytometry readouts and its application to leukemia disease monitoring. *BMC Bioinformatics* **7**: 282 (2006).
- Toledo, F., and Wahl, G. M. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* **6**: 909-23 (2006).
- Tonko, M., Ausserlechner, M. J., Bernhard, D., Helmberg, A., and Kofler, R. Gene expression profiles of proliferating vs. G1/G0 arrested human leukemia cells suggest a mechanism for glucocorticoid-induced apoptosis. *FASEB J* **15**: 693-9 (2001).
- Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M., and Krammer, P. H. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* **245**: 301-5 (1989).
- Tusher, V. G., Tibshirani, R., and Chu, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 5116-21 (2001).
- van der Burg, M., Barendregt, B. H., van Wering, E. R., Langerak, A. W., Szczepanski, T., and van Dongen, J. J. The presence of somatic mutations in immunoglobulin genes of B cell acute lymphoblastic leukemia (ALL-L3) supports assignment as Burkitt's leukemia-lymphoma rather than B-lineage ALL. *Leukemia* **15**: 1141-3 (2001).
- van der Does-van den Berg, A., Bartram, C. R., Basso, G., Benoit, Y. C., Biondi, A., Debatin, K. M., Haas, O. A., Harbott, J., Kamps, W. A., Koller, U., and et al. Minimal requirements for the diagnosis, classification, and evaluation of the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) in the "BFM Family" Cooperative Group. *Med Pediatr Oncol* **20**: 497-505 (1992).
- Vanderbilt, J. N., Miesfeld, R., Maler, B. A., and Yamamoto, K. R. Intracellular receptor concentration limits glucocorticoid-dependent enhancer activity. *Mol Endocrinol* **1**: 68-74 (1987).
- Veis, D. J., Sorenson, C. M., Shutter, J. R., and Korsmeyer, S. J. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* **75**: 229-40 (1993).
- Virchow, R. Weisses Blut. *Frorieps Notizen* **36**: 151-156 (1845).
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J. Surfing the p53 network. *Nature* **408**: 307-10 (2000).
- Wada, M., Bartram, C. R., Nakamura, H., Hachiya, M., Chen, D. L., Borenstein, J., Miller, C. W., Ludwig, L., Hansen-Hagge, T. E., Ludwig, W. D., and et al. Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. *Blood* **82**: 3163-9 (1993).
- Walensky, L. D. BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death Differ* **13**: 1339-50 (2006).

- Walshe, C. A., Beers, S. A., French, R. R., Chan, C. H., Johnson, P. W., Packham, G. K., Glennie, M. J., and Cragg, M. S. Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B Cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem* **283**: 16971-84 (2008).
- Wartenberg, D., Groves, F. D., and Adelman, A. S. Acute Lymphoblastic Leukemia: Epidemiology and Etiology. *Acute Leukemias, Part II*. Berlin, Heidelberg, Springer: 77-93 (2008).
- Weil, M., Jacobson, M. D., Coles, H. S., Davies, T. J., Gardner, R. L., Raff, K. D., and Raff, M. C. Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol* **133**: 1053-9 (1996).
- Weissman, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* **100**: 157-68 (2000).
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., and Chomczynski, P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* **22**: 474-6, 478-81 (1997).
- Wodicka, L., Dong, H., Mittmann, M., Ho, M. H., and Lockhart, D. J. Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* **15**: 1359-67 (1997).
- World Medical Association World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *Jama* **284**: 3043-5 (2000).
- Wu, S., Korte, A., Kebelmann-Betzing, C., Gessner, R., Henze, G., and Seeger, K. Interaction of bone marrow stromal cells with lymphoblasts and effects of prednisolone on cytokine expression. *Leuk Res* **29**: 63-72 (2005).
- Wu, W., Chaudhuri, S., Brickley, D. R., Pang, D., Karrison, T., and Conzen, S. D. Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. *Cancer Res* **64**: 1757-64 (2004).
- Wuchter, C., Ruppert, V., Schrappe, M., Dorken, B., Ludwig, W. D., and Karawajew, L. In vitro susceptibility to dexamethasone- and doxorubicin-induced apoptotic cell death in context of maturation stage, responsiveness to interleukin 7, and early cytoreduction in vivo in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **99**: 4109-15 (2002).
- Ye, J., Wang, S., Leonard, S. S., Sun, Y., Butterworth, L., Antonini, J., Ding, M., Rojanasakul, Y., Vallyathan, V., Castranova, V., and Shi, X. Role of reactive oxygen species and p53 in chromium(VI)-induced apoptosis. *J Biol Chem* **274**: 34974-80 (1999).
- Youle, R. J., and Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 47-59 (2008).
- Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, W. H., Tom, E., Mack, D. H., and Levine, A. J. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev* **14**: 981-93 (2000).
- Zhivotovsky, B., and Kroemer, G. Apoptosis and genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 752-62 (2004).
- Zweig, M. H., and Campbell, G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* **39**: 561-77 (1993).

8 Abkürzungsverzeichnis⁶

A

ABI	Applied Biosystems
<i>ABL/ABL1</i>	<i>Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AF-1	<i>Activation Function 1</i>
AF-2	<i>Activation Function 2</i>
<i>AF4</i>	<i>ALL1-Fused Gene from Chromosome 4 Protein</i>
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
<i>AML1</i>	<i>Acute Myeloid Leukemia 1 Protein</i>
<i>API</i>	<i>Activator Protein 1</i>
<i>APAF-1</i>	<i>Apoptosis Protease Activating Factor 1</i>
APC	Allophycocyanin
APC/C	<i>Anaphase-Promoting Complex (Cyclosome)</i>
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cyanin 7
<i>APEX1</i>	<i>Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1</i>
aRNA	amplifizierte RNA
ASP	L-Asparaginase
<i>ATF3</i>	<i>Activating Transcription Factor 3</i>
<i>ATM</i>	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>ATR</i>	<i>ATM and Rad3 Related (ATR)</i>
AUC	Fläche unter der Kurve

B

<i>BAD</i>	<i>BCL-2 Associated Agonist of Cell Death</i>
<i>BAK</i>	<i>BCL-2 Homologous Antagonist/Killer</i>
<i>BAT1</i>	<i>HLA-B Associated Transcript 1</i>
<i>BAX</i>	<i>BCL-2 Associated X Protein</i>
BC	Beckmann Coulter
BC	Blastenanzahl
<i>BCAP31</i>	<i>B-Cell Receptor-Associated Protein 31</i>
<i>BCL2/BCL-2</i>	<i>B-Cell Lymphoma 2</i>
<i>BCL2L1/BCL-XL</i>	<i>BCL-2-Like Protein 1</i>
<i>BCL-W</i>	<i>BCL-2-Like Protein 2</i>
<i>BCR</i>	<i>Breakpoint Cluster Region</i>
BD	Becton Dickinson
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
BH-Domäne	BCL-2-Homologie-Domäne
<i>BID</i>	<i>BH3 Interacting Domain Death Agonist</i>
<i>BIK</i>	<i>BCL2 Interacting Killer</i>
<i>BIRC3, BIRC5</i>	<i>Baculoviral IAP Repeat-Containing 3 and 5</i>
Blasten-%	Blastenprozentanteil
<i>BLNK</i>	<i>B-Cell Linker Protein</i>
BRR	Blastenreduktionsrate
<i>BTG2</i>	<i>B-Cell Translocation Gene 2</i>

⁶ Bei gleichen Gen- und Proteinsymbolen sind nur die Gensymbole (kursiv) aufgeführt.

<i>BUB, BUB1b</i>	<i>Budding Uninhibited by Benzimidazole, 1 homolog, beta (S. cerevisiae)</i>
BZR	B-Zell-Rezeptor
C	
°C	Grad Celsius
c	Zenti (Präfix für Maßeinheiten)
CaCl ₂	Calciumchlorid
Caspase	<i>Cysteine-Containing Aspartate-Specific Proteases</i>
<i>CCNB2</i>	<i>Cyclin B2</i>
<i>CCT7</i>	<i>Chaperonin Containing TCP1, Subunit 7 (eta)</i>
CD + Nummer	<i>Cluster of Differentiation</i>
<i>CDC25</i>	<i>Cell Division Cycle 25</i>
<i>CDC2L2</i>	<i>Cell Division Cycle 2-Like 2</i>
<i>CDK</i>	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
cDNA	komplementäre DNA
<i>CEBPb</i>	<i>CCAAT/Enhancer-Binding Protein beta</i>
CEL	<i>Cell Intensity File</i>
<i>CHEK1, CHEK2</i>	<i>CHK1 and 2 checkpoint homologs (S. pombe)</i>
CI	Konfidenzintervall
<i>CKS2</i>	<i>CDC28 Protein Kinase Regulatory Subunit 2</i>
c-MYC	<i>Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog</i>
CPM	Cyclophosphamid
<i>CREM</i>	<i>cAMP Responsive Element Modulator</i>
cRNA	komplementäre RNA
Ct	<i>Cycle treshold</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
<i>CXCR4</i>	<i>C-X-C Chemokine Receptor Type 4</i>
Cy	Cyanin
CY	Cascade Yellow
D	
Δ	Differenz
d	Tag(e)
<i>DAD1</i>	<i>Defender Against Cell Death 1</i>
<i>DATF1</i>	<i>Death Associated Transcription Factor 1</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
DCFDA	2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat
<i>DDB2</i>	<i>Damage-Specific DNA Binding Protein 2</i>
DEX	Dexamethason
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNR	Daunorubicin
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>DPYSL2</i>	<i>Dihydropyrimidinase-Like 2</i>
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
<i>DSCR1</i>	<i>Down Syndrome Candidate Region 1</i>
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
dT	Desoxythymidin
<i>DUSP5</i>	<i>Dual Specificity Phosphatase 5</i>

E

<i>EBI2</i>	<i>Epstein-Barr virus induced gene</i>
ECD	Phycoerythrin-Texas Red
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGIL	<i>European Group for the Immunological Classification of Leukemias</i>
<i>EGR1, EGR3</i>	<i>Early Growth Response 1 and 3</i>
<i>EIF1</i>	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 1</i>
<i>EMPI</i>	<i>Epithelial Membrane Protein 1</i>
<i>ERG</i>	<i>V-Ets Eerythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog (Avian)</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
et al.	und andere
<i>ETS</i>	<i>E26 Transformation-Specific</i>

F

FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCCP	Carbonylcyanid-p-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
<i>FDXR</i>	<i>Ferredoxin-NADP(+) Reductase</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FL	Fluoreszenz
<i>FLJ10849</i>	<i>Hypothetical protein</i>
<i>FOS</i>	<i>FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
<i>FOSL2</i>	<i>FOS-Like Antigen 2</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht
<i>FXR1</i>	<i>Fragile X Mental Retardation, Autosomal Homolog 1</i>

G

g	Gravitationskonstante
g	Gramm
G0-, G1-, G2-Phase	Zwischenphasen des Zellzyklusses
<i>GADD</i>	<i>Growth Arrest and DNA-Damage-Inducible</i>
<i>GADD45A</i>	<i>Growth Arrest and DNA-Damage-Inducible, Alpha</i>
<i>GAPDH</i>	<i>Glyceraldehyde 3 Phosphate Dehydrogenase</i>
GC	Glucocorticoid(e)
<i>GFP</i>	<i>Green Fluorescent Protein</i>
Glu	Glucose
<i>GLUL</i>	<i>Glutamate-Ammonia Ligase</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
<i>GPR65</i>	<i>G protein-coupled receptor 65</i>
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
GRE	<i>Glucocorticoid Responsive Element</i>
GRU	<i>Glucocorticoid Responsive Units</i>

H

h	Stunde(n)
<i>HCAP-G</i>	<i>Non-SMC Condensin I Complex, Subunit G</i>
HCl	Salzsäure
HE	Hydroethidin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HSP	Hitzeschockprotein

<i>HSP70-2</i>	<i>Heat Shock 70kDa Protein 1B</i>
I	
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Proteins</i>
<i>iC3b</i>	<i>Proteolytisch inaktives Produkt des Komplement-Fragmentes C3b</i>
ICAM1, ICAM2	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1, 2</i>
<i>IER3</i>	<i>Immediate Early Response 3</i>
<i>IFNGR</i> , <i>IFNGR1</i>	<i>Interferon Gamma Receptor 1</i>
Ig	Immunglobulin
<i>IKBA</i>	<i>NF-kappa-B Inhibitor Alpha</i>
<i>IL2</i> , <i>IL-2</i>	<i>Interleukin 2</i>
<i>IL7</i> , <i>IL-7</i>	<i>Interleukin 7</i>
<i>IL8</i> , <i>IL-8</i>	<i>Interleukin 8</i>
<i>IL7R</i> , <i>IL-7R</i>	<i>Interleukin-7-Receptor</i>
<i>IMPDH2</i>	<i>Inosine Monophosphate Dehydrogenase Type II</i>
<i>ITG3BP</i>	<i>Integrin Beta 3 Binding Protein (Beta3-Endonexin)</i>
<i>ITGAM</i>	<i>Integrin, Alpha M</i>
i.v.	intravenös
J	
JC-1	5,5',6,6',-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin-Iodid
<i>JUN</i>	<i>V-Jun Avian Sarcoma Virus 17 Oncogene Homolog</i>
K	
KCl	Kaliumchlorid
KHCO_3	Kaliumhydrogencarbonat
KH_2PO_4	Kaliumhydrogenphosphat
<i>KIF11</i>	<i>Kinesin Family Member 11</i>
<i>KIP</i>	<i>Kinase Inhibitory Protein</i>
<i>KLF4</i>	<i>Kruppel-Like Factor 4</i>
<i>KNSL7</i>	<i>Kinesin-Like Protein 7</i>
L	
l	Liter
L	<i>laevus</i>
<i>LAT2</i>	<i>Linker for Activation of T-cells Family Member 2</i>
L-Gln	L-Glutamin
<i>LY86</i>	<i>Lymphocyte Antigen 86</i>
<i>LYZ</i>	<i>Lysozyme</i>
M	
μ	Mikro (als Präfix für Maßeinheiten)
m	Milli (als Präfix für Maßeinheiten)
m	Meter
M	Molarität (mol/l)
<i>MAC1</i>	<i>Macrophage-1 Antigen</i>
<i>MAD</i>	<i>Mitotic Arrest Defective</i>
<i>MAD2L1</i>	<i>MAD2 Mitotic Arrest Deficient-Like 1 (yeast)</i>
<i>MCL1</i>	<i>Myeloid Cell Leukemia Sequence 1</i>
<i>MCM1</i> , <i>MCM5</i> , <i>MCM6</i>	<i>Minichromosome Maintenance Complex Component 1, 5, 6</i>
<i>MDM2</i>	<i>Murine Double Minute 2</i>
<i>MELK</i>	<i>Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase</i>
MEM	Minimal Essential Medium

MESF	<i>Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome</i>
MIF	<i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>
min	Minute(n)
MLL	<i>Mixed Lineage Leukemia</i>
6-MP	6-Mercaptopurin
M-Phase	Mitose-Phase
MPI	Max-Planck-Institut
MRD	minimale Resterkrankung
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS4A	<i>Membrane-Spanning 4-Domains, Subfamily A</i>
MTMP	Mitochondriales Transmembranpotential
MTX	Methotrexat
N	
n	Anzahl
n	Nano (als Präfix für Maßeinheiten)
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NAO	Nonylacridinorange
<i>NDUFC1</i>	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa-B</i>
NGFN	Nationales Genomforschungsnetz
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
<i>NME1</i>	<i>Non-Metastatic Cells 1, Protein</i>
<i>NOTCH2</i>	<i>Notch Homolog 2 (Drosophila)</i>
<i>NPM1</i>	<i>Nucleophosmin</i>
<i>NQO1</i>	<i>NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase</i>
NTP	Nukleosidtriphosphat
O	
OD	optische Dichte
P	
p	Piko (als Präfix für Maßeinheiten)
p	Wahrscheinlichkeitswert
p21	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>
p53	<i>Tumor Protein p53 (TP53)</i>
p63	<i>Tumor Protein p63 (TP63)</i>
p73	<i>Tumor Protein p73 (TP73)</i>
<i>PA26</i>	<i>p53 Regulated PA26 Nuclear Protein</i>
<i>PAICS</i>	<i>Phosphoribosylaminoimidazole Carboxylase</i>
PB	Pacific Blue
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PC5	Phycoerythrin-Cyanin 5.1
PC7	Phycoerythrin-Cyanin 7
PCA	<i>Principal Component-Analyse</i>
<i>PCNA</i>	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>PDCD2</i>	<i>Programmed Cell Death 2</i>

PDN	Prednison
PE	Phycoerythrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PHA-L	Phytohämagglutinin-L
p.i.	per Infusion
PI	Propidiumiodid
<i>PIR51</i>	<i>RAD51 associated protein 1</i>
p.o.	peroral
<i>PRDX4</i>	<i>Peroxiredoxin 4</i>
psi	pounds per square inch
<i>PSMA6</i>	<i>Proteasome Subunit, Alpha Type, 6</i>
<i>PTPLA</i>	<i>Protein Tyrosine Phosphatase-Like Member A</i>
Q	
q	lokale FDR
R	
<i>RAD51</i>	<i>RAD51 homolog (S. cerevisiae)</i>
<i>RGS2</i>	<i>Regulator of G-Protein Signaling 2</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
<i>RRM2</i>	<i>Ribonucleotide Reductase M2</i>
rRNA	ribosomale RNA
r_s	Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient
RT	Raumtemperatur
S	
s	Sekunde(n)
S	Svedberg (Sedimentationseinheit, die die Größe von Ribosomen beschreibt)
<i>S100A8</i>	<i>S100 Calcium Binding Protein A8</i>
SE	Standardfehler
<i>SGK1</i>	<i>Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
S-Phase	DNA-Synthese-Phase
SR	Standardrisiko
SSC	Seitwärtsstreulicht
<i>ST13</i>	<i>Suppression of Tumorigenicity 13</i>
<i>STMN1</i>	<i>Stathmin 1</i>
SVM	<i>Support Vector Machine</i>
<i>SWAP70</i>	<i>SWAP Switching B-cell Complex 70kDa Subunit</i>
T	
t	Translokation
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCF-1	<i>Transcription Factor 1</i>
<i>TCF12</i>	<i>Transcription Factor 12</i>
<i>TDT, TdT</i>	<i>Terminale Deoxynukleotidyltransferase</i>
TE	Tris-EDTA

<i>TEL = ETV6</i>	<i>ETS Translocation Variant 6</i>
<i>TIAF1</i>	<i>TGFBI-Induced Anti-Apoptotic Factor 1</i>
<i>TNF</i>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
<i>TRAF4</i>	<i>TNF Receptor-Associated Factor 4</i>
<i>TRB3</i>	<i>Tribbles Homolog 3 (Drosophila)</i>
<i>TTFA</i>	<i>Theonyltrifluoroacetone</i>
<i>TUBB</i>	<i>Tubulin, beta</i>
<i>TXNIP</i>	<i>Thioredoxin Interacting Protein</i>
<i>TZR</i>	<i>T-Zell-Rezeptor</i>
U	
<i>Ub</i>	<i>Ubiquitin</i>
<i>UBB</i>	<i>Ubiquitin B</i>
<i>UV</i>	<i>Ultraviolett</i>
V	
<i>V</i>	<i>Volt</i>
<i>VCR</i>	<i>Vincristin</i>
<i>VDAC</i>	<i>Voltage Dependant Anion Channel</i>
<i>VLDLR</i>	<i>Very Low Density Lipoprotein Receptor</i>
<i>VPREB1, VPREB2</i>	<i>Pre-B Lymphocyte 1 and 2</i>
<i>vs.</i>	<i>gegen</i>
<i>V/V</i>	<i>Volumenprozent</i>
W	
<i>WASF1</i>	<i>Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Family Member 1</i>
Z	
<i>ZNF165</i>	<i>Zinc Finger Protein 165</i>
<i>zyt</i>	<i>zytoplasmatisch</i>

9 Anhang

9.1 Summary

In childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL), persistence of leukemic cells during therapy (minimal residual disease, MRD) is of crucial prognostic significance. From a biological point of view MRD cells are the tumor cells, which survived anti-leukemic therapy. Therefore, the cell biologic characterization of these rare cells may considerably contribute to the identification of cellular and molecular determinants of therapy resistance in ALL.

In order to approach this issue experimentally, a procedure has been established, which enabled a gene expression profiling of MRD cells persisting after one week of induction glucocorticoid therapy. The expression changes indicated a shift towards mature B cells, inhibition of cell cycling, and an increase of expression of adhesion (CD11b/ITGAM) and cytokine (CD119/IFNGR1) receptors. The differentiation shift and low proliferative activity in MRD cells has been confirmed by direct comparison with normal B cells at cellular and protein levels. Given that normal B cells are largely therapy resistant, the differentiation shift and low proliferative activity may account for the persistence of blasts during therapy and affect their sensitivity to further therapeutic treatment.

Evaluation of the gene expression data in a clinical context indicated a prognostic significance of the CD11b-receptor. The expression of CD11b was inversely correlated with cyto-reduction rates measured at clinically important timepoints of induction therapy. Moreover, due to the consistently increased expression levels in leukemic cells under therapy and to the cell surface allocation, CD11b has a promising potential as an MRD-specific marker to improve sensitivity and specificity of flow cytometric MRD detection.

With regard to chemotherapy-specific mechanisms of action, activation of the tumor suppressor p53-signaling pathway has been reported in response to a large variety of drugs. The p53 system is highly stress-sensitive and integrates diverse intracellular signals in a complex and poorly defined manner. In this work, the role of mitochondrial activity has been investigated as one of the critical intracellular determinants involved in the regulation of energy metabolism, cellular redox state and apoptosis. Using cellular systems with endogenously expressed wild-type p53, including ALL blasts and normal lymphocytes, a linkage between mitochondrial activity and cellular stress responsiveness upstream of p53 activation could be identified. Through this linkage, resting cells with a downregulated mitochondrial activity have been found to acquire stress- and chemoresistance at p53 level.

The presented data offer new insights into the mechanisms of therapy resistance and sensitivity of leukemic blasts. The identified parameters may be useful in predicting MRD status and clinical outcome after induction therapy and potentially provide a part for a future basis for more individually designed treatment strategies in upcoming clinical trials.

9.2 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden als folgende Originalartikel veröffentlicht

Rhein, P., Mitlohner, R., Basso, G., Gaipa, G., Dworzak, M. N., Kirschner-Schwabe, R., Hagemeyer, C., Stanulla, M., Schrappe, M., Ludwig, W.-D., Karawajew, L., and Ratei, R. CD11b is a therapy resistance- and minimal residual disease-specific marker in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **115**, 3763-71 (2010).

Rhein, P., Scheid, S., Ratei, R., Hagemeyer, C., Seeger, K., Kirschner-Schwabe, R., Moericke, A., Schrappe, M., Spang, R., Ludwig, W.D., and Karawajew, L. Gene expression shift towards normal B cells, decreased proliferative capacity and distinct surface receptors characterize leukemic blasts persisting during induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **21**, 897-905 (2007).

Toedling, J., **Rhein, P.**, Ratei, R., Karawajew, L., and Spang, R. Automated in-silico detection of cell populations in flow cytometry readouts and its application to leukemia disease monitoring. *BMC Bioinformatics* **7**, 282 (2006).

Karawajew, L., **Rhein, P.**, Czerwony, G., and Ludwig, W.-D. Stress-induced activation of the p53 tumor suppressor in leukemia cells and normal lymphocytes requires mitochondrial activity and reactive oxygen species. *Blood* **105**, 4767-75 (2005).

Weitere Publikationen

Ratei, R., Basso, G., Dworzak, M., Gaipa, G., Veltroni, M., **Rhein, P.**, Biondi, A., Schrappe, M., Ludwig, W.-D., and Karawajew, L. "Monitoring treatment response of childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction." *Leukemia* **23**, 528-34 (2009).

Cario, G., Izraeli, S., Teichert, A., **Rhein, P.**, Skokowa, J., Moricke, A., Zimmermann, M., Schrauder, A., Karawajew, L., Ludwig, W. D., Welte, K., Schunemann, H. J., Schlegelberger, B., Schrappe, M., and Stanulla, M. High interleukin-15 expression characterizes childhood acute lymphoblastic leukemia with involvement of the CNS. *J Clin Oncol* **25**, 4813-20 (2007).

Kirschner-Schwabe, R., Lottaz, C., Todling, J., **Rhein, P.**, Karawajew, L., Eckert, C., von Stackelberg, A., Ungethum, U., Kostka, D., Kulozik, A.E., Ludwig, W.D., Henze, G., Spang, R., Hagemeyer, C., and Seeger, K. Expression of late cell cycle genes and an increased proliferative capacity characterize very early relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* **12**, 4553-61 (2006).

Vorträge (nur Erstautorenschaft)

- Rhein, P.**, Ratei, R., Scheid, S., Hagemeyer, C., Seeger, K., Kirschner, R., Schrappe, M., Spang, R., Ludwig, W.-D., and Karawajew, L. Gene expression in leukemic blasts persisting at day 8 of induction therapy in childhood ALL displays a common shift towards terminally differentiated B cells and a cyto-reduction-associated impairment of the translational machinery. *47th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, USA. Blood* **106** (2005).
- Rhein, P.**, Scheid, S., Ratei, R., Hagemeyer, C., Seeger, K., Kirschner-Schwabe, R., Schrappe, M., Spang, R., Ludwig, W.-D., and Karawajew, L. Gene expression in leukemic blasts persisting at day 8 of induction therapy in childhood ALL is shifted towards terminally differentiated B cells. *Gemeinsame Jahrestagung der DGHO, ÖGHO und SGHO, Hannover, Germany. Onkologie* **28** (Suppl. 3) (2005).
- Rhein, P.***, Kirschner-Schwabe, R.*, Karawajew, L., Lottaz, C., Scheid, S., Tödling, J., Ratei, R., Ungethüm, U., Schrappe, M., Eckert, C., Henze, G., Stackelberg, A., Kulozik, A., Schröck, E., Spang, R., Ludwig, W.-D., Seeger, K., and Hagemeyer, C. Gene expression profiling of resistant and relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia points to defects in cell cycle regulation. *NGFN-2 Annual CancerNet Meeting, Berlin, Germany* (2005). *beide Autoren haben gleichermaßen zur Arbeit beigetragen
- Rhein, P.**, Ratei, R., Scheid, S., Hagemeyer, C., Seeger, K., Kirschner, R., Schrappe, M., Spang, R., Ludwig, W.-D., and Karawajew, L. Gene expression analysis of leukemic blasts persisting at day 8 of induction therapy in childhood ALL. *Gemeinsame Jahrestagung der DGHO, ÖGHO und SGHO, Innsbruck, Austria. Onkologie* **27** (Suppl. 3) (2004).
- Rhein, P.**, Ratei, R., Scheid, S., Hagemeyer, C., Seeger, K., Kirschner, R., Schrappe, M., Spang, R., Ludwig, W.-D., and Karawajew, L. Gene expression analysis of leukemic blasts persisting at day 8 of induction therapy in childhood ALL. *46th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, USA. Blood* **104** (2004).
- Rhein, P.**, Ratei, R., Scheid, S., Hagemeyer, C., Seeger, K., Kirschner, R., Schrappe, M., Spang, R., Ludwig, W.-D., and Karawajew, L. Gene expression analysis of leukemic blasts persisting during induction therapy. *4th Biennial Hannover Symposium on Childhood Leukemia, Celle, Germany* (2004).
- Rhein, P.***, Ratei, R., Scheid, S., Hagemeyer, C., Seeger, K., Kirschner, R., Schrappe, M., Spang, R., Ludwig, W.-D., and Karawajew, L. Gene expression analysis of minor subpopulations in acute leukemia. *45th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, USA. Blood* **102** (2003). *präsentiert von L. Karawajew

Posterpräsentationen (nur Erstautorenschaft)

- Rhein, P.,** Ratei, R., Mitlohner, R., Basso, G., Gaipa, G., Dworzak, M. N., Kirschner-Schwabe, R., Hagemeyer, C., Stanulla, M., Schrappe, M., Ludwig, W.-D., and Karawajew, L. Integrin alpha M chain expression at diagnosis is inversely correlated with cyto reduction rate and is consistently up-regulated during therapy in acute lymphoblastic leukemia (ALL). *50th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, USA. Blood.* **112** (2008).
- Rhein, P.,** Ratei, R., Mitlohner, R., Basso, G., Gaipa, G., Dworzak, M. N., Kirschner-Schwabe, R., Hagemeyer, C., Stanulla, M., Schrappe, M., Ludwig, W.-D., and Karawajew, L. CD11b is a therapy-induced marker for monitoring minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *49th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, USA. Blood.* **110** (2007).
- Rhein, P.,** Ratei, R., Mitlohner, R., Moericke, A., Hagemeyer, C., Seeger, K., Kirschner-Schwabe, R., Scheid, S., Spang, R., Schrappe, M., Ludwig, W.D., and Karawajew, L. Cyto reduction rates positively correlate with BCL-2 protein downregulation during induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Gemeinsame Jahrestagung der DGHO, ÖGHO und SGHO, Basel, Switzerland. Onkologie* **30** (Suppl. 3), 147 (2007).
- Rhein, P.,** Ratei, R., Mitlohner, R., Moericke, A., Hagemeyer, C., Seeger, K., Kirschner-Schwabe, R., Scheid, S., Spang, R., Schrappe, M., Ludwig, W.D., and Karawajew, L. Cyto reduction rates are associated with BCL-2 protein expression in ALL blasts persisting during induction therapy. *12th Congress of the European Hematology Association, Vienna, Austria. Haematologica* **92** (Suppl. 1) (2007).
- Rhein, P.,** Scheid, S., Ratei, R., Hagemeyer, C., Seeger, K., Kirschner-Schwabe, R., Schrappe, M., Spang, R., Ludwig, W.D., and Karawajew, L. Glucocorticoid therapy targets proliferation, differentiation and BCL-2 dependent survival signaling in ALL blasts. *48th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, USA. Blood* **108** (2006).
- Rhein, P.,** Scheid, S., Ratei, R., Hagemeyer, C., Seeger, K., Kirschner-Schwabe, R., Schrappe, M., Spang, R., Ludwig, W.D., and Karawajew, L. Cell biological features of blasts persisting at day 8 of induction therapy in childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *11th Congress of the European Hematology Association, Amsterdam, The Netherlands. Haematologica* **91** (Suppl. 1) (2006).
- Rhein, P.,** Scheid, S., Ratei, R., Hagemeyer, C., Seeger, K., Kirschner-Schwabe, R., Schrappe, M., Spang, R., Ludwig, W.-D., and Karawajew, L. Glucocorticoid therapy targets proliferation, differentiation and BCL-2 dependent survival signaling in ALL blasts. *Gemeinsame Jahrestagung der DGHO, ÖGHO und SGHO, Leipzig, Germany. Onkologie* **29** (Suppl. 3), 76 (2006).
- Rhein, P.,** Ratei, R., Scheid, S., Hagemeyer, C., Seeger, K., Kirschner, R., Schrappe, M., Spang, R., Ludwig, W.-D., and Karawajew, L. Differential gene expression in leukemic cells from bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *46th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, USA. Blood* **104** (2004).

9.3 Danksagung

Herrn Prof. Dipl.-Ing. Dr. Ulf Stahl danke ich für seine freundliche Unterstützung bei der Durchführung meines Studiums und für seine Bereitschaft, eine externe Dissertation zu betreuen.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. Leonid Karawajew, der das Thema der Dissertation vorschlug und mich bei der Durchführung hervorragend betreute. Er stand mir tagtäglich mit fachlichen und freundschaftlichen Ratschlägen zur Seite. Die Freiheiten, die ich bei der Planung und Durchführung meiner Arbeiten genoss, haben maßgeblich zum Gelingen der Dissertation beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolf-Dieter Ludwig und Herrn Dr. Richard Ratei bedanke ich mich für die intensive Zusammenarbeit und die wertvolle Unterstützung bei Forschungsprojekten und klinischen Fragestellungen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Rosemarie Hoffmann, Frau Grit Czerwony und Frau Dipl.-Ing. Rita Mitlöhner, die für eine freundschaftliche Arbeitsatmosphäre im Labor sorgten, mich bei Experimenten immer hilfsbereit unterstützen und sich Zeit zum Korrekturlesen nahmen.

Bedanken möchte ich mich auch für die tatkräftige Unterstützung und die vielen fachlichen Ratschläge der Mitarbeiterinnen des Zellmarkerlabors: Marianne Dunken, Birgit Östereich, Karin Liebezeit, Sabine Witte, Monika Grundmann, Mathilde Martin und Christina Feiler.

Wie viele Forschungsarbeiten ist auch diese nur in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen möglich gewesen. Im Rahmen des Nationalen Genomforschungsnetzes (NGFN) sind vor allem die erfolgreichen Zusammenarbeiten mit Herrn Prof. Dr. Christian Hagemeier (Charité Campus Mitte), Frau Dr. Renate Kirschner-Schwabe (Charité Campus Virchow-Klinikum) und Herrn Prof. Dr. Dr. Karl-Heinz Seeger (Charité Campus Virchow-Klinikum) zu erwähnen. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rainer Spang (Universität Regensburg) half bei vielen bioinformatischen Problemlösungen. Hervorzuheben sind insbesondere Dr. Stephanie Scheid, die mich bei der Analyse der Genexpressionsdaten wesentlich unterstützte und Dr. Jörn Tödling, der einen bioinformatischen Algorithmus programmierte, mit dessen Hilfe die automatische Analyse durchflusszytometrischer Daten ermöglicht wurde.

Darüber hinaus möchte ich mich für eine enge und vertrauensvolle Zusammenarbeit bei den Mitarbeitern und der Leitung der ALL-BFM-Studienzentrale bedanken. Herr Prof. Dr. Martin Schrappe, Herr Prof. Dr. Martin Stanulla, Herr Dr. Gunnar Cario und Frau Dr. Anja Möricke stellten klinische Daten der untersuchten Patienten zur Verfügung und halfen stets konstruktiv bei der kritischen Bewertung der wissenschaftlichen Ergebnisse.

Der Deutschen José Carreras Leukämie-Stiftung (Stipendium DJCLS-F05/09), der Wilhelm Sander-Stiftung (Forschungsprojekt 2004.072.1), der Berliner Krebsgesellschaft und der Gutmuth-Stiftung danke ich für Ihr Vertrauen und die großzügige Unterstützung von Forschungsprojekten und Tagungsreisen.

Die Arbeit wurde zudem in Teilen durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des NGFN gefördert (Forschungsprojekt 01GS0443 und 01GS0870).

Großer Dank gilt meiner Familie, insbesondere Sabrina, die mir in den letzten Jahren viel Geduld entgegen brachte und mich fortwährend unterstützte...