Aus der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin (Kinderklinik) Universitätsklinikum Düsseldorf Heinrich-Heine-Universität Direktor: Univ.-Professor Dr. med. A. Borkhardt

# Untersuchungen verschiedener Stufen der CD95-vermittelten Apoptose und des IAP Survivin in Vorläufer-B-Zell-Leukämieblasten von Kindern

#### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Meinolf Siepermann

> > 2009

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez: Univ.-Prof. Dr. med J. Windolf Referentin: Univ.-Prof. Dr. med D. Dilloo Korreferent: Prof. Dr. med N. Gattermann Für meinen kleinen Cousin Peter Schiessl \*07.01.1998-†22.04.2002

# Abkürzungen

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ALL	Akut Lymphoblastische Leukämie
AML	Akut Myeloische Leukämie
Apaf-1	"apoptotic protease activating factor-1"
Bak	"Bcl-2 antagonist killer"
Bax	"Bcl-2 associated protein X"
Bcl-2	"B-cell lymphoma-2"
Bcl-xL	"B-cell lymphoma-like X"
BH-Domäne	Bcl-2-Homologie-Domäne
Bid	"BH3-interacting death agonist"
BSA	Bovines Serum Albumin
CA	Carcinom
CARD	Caspase-Rekrutierungsdomäne
°C	Grad Celsius
CD	"Cluster of differentiation"
CHX	Cycloheximid
DD	Todesdomäne (death domain)
DED	Todeseffektordomäne (death effector domain)
Diablo	"direct IAP binding protein with low pI"
DISC	"death inducing signaling complex"
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid (deutsch: Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	"Ethylenediamine tetraacetic acid" (deutsch:
	Ethylendiamintetraessigsäure)
ELISA	"Enzyme linked immuno sorbent assay" (Durchflußzytometrie)
FACS	"Fluorescence activated cell sorter"
FADD	"Fas-associated-death-domain"
FAS	"Fast apoptosis signal" (CD95)
FITC	Fluorescein isothiocyanat
FLICE	"Fas-associated death domain-like IL-1-converting-enzym" (Caspase 8)
FLIP	"FLICE inhibitory protein"
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfers

FSC	"forward scatter"
FRET	"fluoreszenz resonance energy transfer"
g	Gramm
HRP	"horseradish peroxidase"
IAP's	"Inhibitors of apoptosis proteins"
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
L	Ligand
L-Zellen	Mausfibroblastenzelllinie
m	milli (1x10-3)
μ	micro (1x10 <sup>-6</sup> )
mAk	monoklonaler Antikörper
MACS	"Magnetic activated cell sorting"
MHC	"Major histocompatibility complex"
ml	Milliliter
min	Minute
mg	Milligramm
MNC	"mononuclear cells" (deutsch: Mononukleäre Zellen)
MMC	Mitomycin C
М	Molar
NGF	"nerve growth factor"
nm	Nanometer (1x-9)
PBC	"peripheral blood cells" (deutsch: periphere Blutzellen)
PBS	"phosphat buffered saline"
PA	Polyacrylamid
PE	Phycoerythrin
pg	Picogramm
R	Rezeptor
Rpm	"rounds per minute"
RNA	Ribonukleinsäure
S.	siehe
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat

SMAC	"second mitochondrial activator of caspases"
SPI	"small protein inhibitors"
SSC	"side scatter" (deutsch: Seitwärtsstreulicht)
ssDNA	"single strand" DNA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAIL	"TNF-related apotosis inducing ligand"
U	"Unit"
UV	Ultraviolett
ZL	Zelllinie

# Inhaltsverzeichnis

1	Ei	nleitun		. 10	
1.1 Akute lymphatische Leukämie					
	1.2	Der	Zelltod	. 14	
	1.2	2.1	Die "Tumor Necrosis Factor"-Superfamilie	. 15	
	1.2	2.2	Caspasen	. 18	
	1.2	2.3	"Death inducing signaling complex"(DISC)-Bildung	. 19	
	1.2	2.4	FLICE-inhibitory proteins (FLIP)	. 20	
	1.2	2.5	Familie der Apoptoseinhibitoren	. 22	
2	Zi	el diese	er Arbeit	. 26	
3	M	aterial	und Methoden	. 27	
	3.1	Pati	enten	. 27	
	3.2	Mat	erialien	. 28	
	3.2	2.1	Chemikalien	. 28	
	3.2	2.2	Enzyme	. 29	
3.2.3 3.2.4 3.2.5 3.2.6 3.2.7		2.3	Puffer	. 29	
		2.4	Antikörper	. 30	
		2.5	Antikörper für den ELISA	. 30	
		2.6	Antikörper für die Durchflusszytometrie:	. 31	
		2.7	Fertige Lösungen und Reaktionssysteme	. 31	
	3.2.8		Geräte	. 32	
	3.2	2.9	Verbrauchsmaterial	. 32	
	3.2	2.10	Eukaryontische Zelllinien	. 33	
	3.2	2.11	Kultur-, Einfriermedien und Zusätze	. 33	
	3.2	2.12	Oligonukleotide	. 33	
	3.3	Met	hoden	. 34	
	3.3	3.1	Kultivierung von Zelllinien	. 34	
	3.3	3.2	Kryokonservierung und Revitalisieren von Zellen	. 35	
	3.3	3.3	Isolation von mononukleären Zellen	. 35	
	3.3	3.4	Erythrozytenlyse	. 36	
	3.3	3.5	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität	. 36	
	3.3	3.6	Aufreinigung von Zellpopulationen mittels "magnetic activated cell sorting"	ʻ36	
	3.3	3.7	Stimulation durch CD40/CD40L-Interaktion.	. 37	

	3.3.8	Apoptoseinduktion
	3.3.9	Durchflusszytometrie
	3.3.10	Apoptosedetektion im Durchflusszytometer
3	3.4 Mol	ekularbiologische Methoden
	3.4.1	Präparation von RNA
	3.4.2	DNase Verdau
	3.4.3	RNA-Aufreinigung
	3.4.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 40
	3.4.5	Reverse Transkription
	3.4.6	Konventionelle Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)
	3.4.7	Quantitative "real time PCR"
	3.4.8	Proteinchemische Methoden
	3.4.9	SDS Polyacrylamid Gelektrophorese
	3.4.10	Western Blot
	3.4.11	Statistische Analyse
4	Ergebnis	se
4	I.1 Unt	ersuchung der CD95-vermittelten Apoptose in den unreifen Lymphom-
Z	Zelllinien D	Daudi und Raji
	4.1.1	Untersuchung der CD95-Expression in CD40-stimulierten Daudi- und Raji-
	Zellen	
	4.1.2	Untersuchung der Expression von Molekülen die an der "death-inducing-
	signaling	-complex"-(DISC)-Bildung und dem Ablauf der Apoptosekaskade in Daudi-
	und Raji-	Zellen beteiligt sind
	4.1.3	Untersuchung der CD95-vermittelten Apotose in CD40-stimulierten Daudi und
	Raji Zell	en
	4.1.4	Effekt von Cycloheximid auf die CD95-vermittelte Apoptose in CD40-
	stimulier	ten Daudi und Raji Zellen
4	I.2 Unt	ersuchung zur CD95-vermittelten Apoptose in CD40-stimulierten primären
V	/orläufer-H	3-Zell-Leukämieblasten von Kindern
	4.2.1	Untersuchung der DISC ("Death-inducing-signaling-complex")-assoziierten
	Moleküle	e in Vorläufer-B-ALL-Blasten
4	I.3 Unt	ersuchung des antiapoptotischen Moleküls Survivin in Vorläufer-B-ALL-
H	Blasten und	l gesunden reifen B-Zellen

	4	3.1 Untersuchung der Expression von Survivin-Gesamtprotein in Vorläufer-B	-
	A	LL-Blasten von Kindern	2
	4	3.2 Untersuchung einer Korrelation zwischen den klassischen Risikofaktoren und	t
	d	r Survivin-Protein-Expression	3
	4	3.3 Untersuchung einer Korrelation zwischen dem klinischen Therapieanspreche	n
	u	d der Survivin-Protein-Expression	1
	4	3.4 Untersuchung einer Korrelation zwischen dem klinischen 3-Jahre EFS, RFS	5
	u	d OS und der Survivin-Protein-Expression	5
Z	1.4	Untersuchung der mRNA-Expression von Survivin und seinen Splice-Varianten in	n
		Vorläufer-B-ALL-Blasten von Kindern	3
5	D	skussion	2
4	5.1	CD95-vermittelte Apoptose in CD40-stimulierten Lymphomzelllinien Daudi und Raji	
			3
4	5.2	CD95-vermittelten Apoptose in Vorläufer-B-ALL-Blasten von Kindern	5
4	5.3	Survivin-Expression als Prognosemarker bei pädiatrischen B-ALL-Patienten	)
6	Z	isammenfassung	5
7	L	teratur	)
8	V	eröffentlichungen	5
9	D	anksagung	3
10		Curriculum Vitae	)

# 1 Einleitung

#### **1.1** Akute lymphatische Leukämie

Eine Leukämie ist eine systemische Erkrankung des hämatopoetischen Systems und entsteht durch ungehinderte Proliferation einzelner Zellklone. Die Leukämien werden in chronisch und akute Leukämien unterschieden, was sich entsprechend in der Dynamik des Krankheitsverlauf darstellt. Die akuten Leukämien, die bei Kindern fast ausschliesslich auftreten, werden wiederum in akute lymphatische (ALL, 80-85%) und akute myeloische Leukämien (AML, 15-20%) unterteilt [1]. Die akute lymphatische Leukämie ist mit 3,3 Erkrankungen / 100.000 Einwohnern <15 Jahre und einem Anteil von 35% die häufigste onkologische Erkrankung im Kindesalter. Sie hat zwei Häufigkeitsgipfel in der Altersverteilung, einen zwischen dem 2.-5. und einen weiteren im Adoleszentenalter um das dreizehnte Lebensjahr. Das Verhältnis von Jungen zu Mädchen beträgt 1,2:1. Die erkrankten Kinder zeigen zum Zeitpunkt der Diagnose, durch die Verdrängung der Hämatopoese durch die malignen Zellen im Knochenmark, oft eine anämiebedingte Symptomatik mit Müdigkeit und Abgeschlagenheit, sowie einer vermehrten Blutungsneigung bei gleichzeitiger Thrombozytopenie. Außerdem treten durch Invasion der bösartigen Zellen sekundäre Organomegalien wie Lymphknoten-, Milz- und Lebervergrösserungen auf. Die akuten lymphatischen Leukämien werden anhand morphologischer Kriterien (FAB-Klassifikation), immunologischen, zyto- und molekulargenetischen Methoden diagnostiziert [2]. Anhand ihrer vom Ausreifungsgrad abhängigen Expression spezifischer Oberflächenantigen nach dem "cluster of differentiation" (CD)-System werden sie verschiedenen Immunphänotypen zugeteilt [3, 4]. Aufgrund ihres Ausreifungsgrades können vier Subgruppen unterschieden werden: Die frühe prä-prä-B-ALL oder pro-B-ALL, die quantitativ häufigste common-ALL (c-ALL), die prä-B-ALL und eine mature B-ALL . 15% der akuten lymphatischen Leukämien entfallen auf die T-ALL, die von den Thymozyten ausgeht und somit eine eigene Entität darstellt. Zellmorphologisch zeigen sich bei den akuten Leukämien unreife Vorläuferzellen, die in der Regel auf einer sehr frühen Entwicklungsstufe arretieren. Während der physiologischen Hämatopoese entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen sogenannte Progenitor oder Vorläuferzellen, die sich über komplexe Differenzierungsvorgänge zu hämatopoetischen oder lymphoiden Zellen ausreifen. Die pluripotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen können sich einerseits über myeloische Vorläufer in Granulozyten, Erythrozyten, Makrophagen und Megakaryozyten ausdifferenzieren oder aus bipotenten lymphoiden Progenitor-Zellen in T- oder B-Lymphozyten ausreifen. Die Kontrolle von Wachstum und Differenzierung erfolgt über lösliche und zellständige Wachstumsfaktoren und Stimuli. Leukämiezellen sind teilweise unabhängig von diesen Wachstumsfaktoren und scheinen durch Überexpression antiapoptotischer Proteine ungehindert zu proliferieren. Die komplexen Veränderungen, die zur Transformation einer gesunden in eine maligne leukämische Zelle führen, sind bis heute nicht vollständig geklärt. Eine wichtige Theorie zur Entstehung der Leukämie wird als "two-step-Modell" bezeichnet. Eine erste spontane Mutation liegt bereits in utero in der Progenitor-Zelle vor [5], während der zweite "hit" durch proliferativen Stress verschiedener Stimuli ausgelöst werden kann [6]. Diese eine beschädigte Vorläuferzelle kann durch Expansion und uneingeschränkte Fähigkeit zur Selbsterneuerung als Ursprung der malignen Vorläuferzellen agieren [7]. Durch Hochregulation von Onkogenen, Deaktivierung von Tumrosuppressorgenen sowie einer Deregulation des gezielten Zelltodes kommt es zu einer ungehinderten Proliferation, bei der die Zellteilungsfrequenz und die Selbsterneuerung der Leukämiezellen dem Abbau überwiegt. So wurde z.B. in akuten lymphatischen Leukämien und hochmalignen B-Zelllymphomen eine Überexpression des Onkogens Bcl-2 als Proliferationsstimulus nachgewiesen [8, 9], auch eine autokrine Sekretion von wachstumsfördernden Zytokinen durch die Blasten, als Folge eines chromosomalen Rearrangements, bei dem Wachstumshormon-Gene betroffen sind, wurde beschrieben [10, 11]. Immer mehr Beachtung finden diese chromosomale Aberrationen, die in den lymphoblastischen Zellen nachgewiesen werden. Chromosomale Veränderungen haben sich in den letzten Jahren von der reinen Beschreibung zu wichtigen diagnostischen und therapieentscheidenden Werkzeugen entwickelt. Wahrscheinlich liegen bei fast allen ALL-Patienten präexistierende Keimbahnmutationen oder spontane somatische Mutationen in hämatopoetischen Stammzellen und stammzellnahen Vorläuferzellen vor, in mehr als 75% der Fälle können heutzutage diese Aberrationen bereits nachgewiesen werden [12]. Zum einen können nummerische Abnormalitäten mit Hyper-, Pseudo-, Hypo- und Diploidem Chromosomensatz auftreten oder es kommt zu strukturellen Rearrangements. Bei den leukämiespezifischen Aberrationen handelt es sich um balancierte Veränderungen, meist Translokationen, selten Inversionen. Die häufigsten und wichtigsten Translokationen bei ALL Patienten sind die prognostisch günstige TEL-AML1 t(12;21) [13] oder die prognostisch eher ungünstigen Translokationen E2A-PBX1 t(1;19), MLL-AF4 t(4;11) und die BCR-ABL t(9,22)(q34;q11) [14],[15, 16]. Durch diese Translokationen und Inversionen kommt es zur Aktivierung und Deaktivierung von Molekülen der Signaltransduktion und der Zellzyklusregulation. Die verschiedenen Translokationen erlangen zunehmend mehr

Bedeutung als Prognosemarker, zur Einteilung der Patienten in die Therapiegruppen, sowie zum sensitiven Nachweis einer Resterkrankung [17]. Durch diese genetischen Veränderungen kommt es sowohl zur Aktivierung als auch zur Deaktivierung von Genen die an der Steuerung der hämatopoetischen Reifung, der Aufrechterhaltung der Proliferation und der Selbsterneuerungskapazität, sowie Modulation der Bindungskapazität und Störung der Autoregulation kontrollieren. So sind Rearrangements oder anderweitige Mutationen die zur Deregulation der Genexpression führen eng mit der Leukemogenese verbunden, dabei kodieren die grösste Klasse an Genen die bei der ALL eine Bedeutung haben für Transkriptionsfaktoren und in der Minderheit für Tyrosinkinasen. Auch die Überexpression antiapoptotischer Proteine wie z.B. der "Inhibitors of apoptosis family" (IAP-family) können ursächlich sein [18]. Über die Bedeutung der differentiellen Expression von den todesrezeptornahen Molekülen ist hingegen weniger bekannt. Diese molekularen Mechanismen scheinen auch erheblichen Einfluss auf das Therapieansprechen der Kinder zu haben. Die Behandlung der kindlichen Leukämien wird in Deutschland in zwei prospektiven multizentrischen Studien durchgeführt, der COALL-Studie und der ALL-BFM-Studie. Die Therapieelemente und das Therapie-"Outcome" innerhalb der beiden Studien sind vergleichbar, Unterschiede gibt es lediglich in der zeitlichen Abfolge der verabreichten Medikamente und bei den Kriterien, die zur Zuteilung der Patienten zu den Risikogruppen führen, die sich von Therapieintensität und Therapiedauer unterscheiden. Im COALL-Protokoll wurden als klinische Risikofaktoren das Patientenalter, die initiale Leukozytenzahl im peripheren Blut, der Subtyp der B-Zell-Leukämie und die Translokationen [t(9;22) oder t(4;11)] festgelegt. Außerdem werden zwei Therapieresponsemarker zur Risikoeinteilung hinzugezogen. In vitro wird die Chemoresistenz der Blasten anhand eines sogenannten PVA-Score (in vitro Resistenztestung der Blasten gegenüber Prednison, Vincristin und Asparaginase) getestet und in vivo der Remissionsstatus an Tag 29 des Therapieprotokolls beurteilt. (Abbildung 1-1).

Low-Risk-Gruppe:	
-Leukozyten <25.000/µl	und
-Alter 1-10 Jahre	und
-common- oder prä-B-ALL	und
-komplette Remission an Tag 29	und
-PVA Score 3-7	und
-keine Translokation t(9;22) oder t(4;11)	
<u>High-Risk-Gruppe:</u>	
-Leukozyten >25.000/µl	oder
-Alter >10 Jahre	oder
-pro-B-ALL oder T-ALL	oder
-keine komplette Remission an Tag 29	oder
-PVA Score 8+9	oder
-Translokation t(9;22) oder t(4;11)	

Abbildung 1-1: Darstellung der Risikofaktoren, die in der COALL-Studie zur Zuteilung der Patienten in die Hoch- und Niedrigrisikogruppen führen (entnommen aus dem Therapieoptimierungsprotokoll COALL-07-03).

Trotz guter Prognose der akuten lymphatischen Leukämien im Kindesalter, mit einem statistischen Langzeitüberleben von 70-80%, bleibt die Therapie der Hochrisikogruppe und der Rezidivpatienten eine Herausforderung. Für die effektive Elimination der Blasten durch ein gutes Ansprechen auf die Chemotherapie sind intakte Mechanismen des programmierten Zelltodes, der sogenannten Apoptose, außerordentlich wichtig. Störungen der Apoptose begünstigen die Entstehung einer Leukämie durch eine verlängerte Überlebensdauer der Zellen, die wiederum die Anhäufung genetischer Aberrationen fördert, und so zu einer wachstumsfaktorunabhängigen Proliferation führt. Außerdem scheinen sich die Leukämieblasten den physiologischen zytotoxischen Immunkontrollmechanismen entziehen zu können.

#### **1.2 Der Zelltod**

Es gibt zwei Hauptwege des Zelltodes: Apoptose und Nekrose. Der Unterschied zwischen den beiden Vorgängen wurde von Kerr und Wyllie an Leberzellen (Hepatozyten) beschrieben [19]. Beim Vorgang der Nekrose handelt es sich um einen passiven Vorgang, bei dem die Zelle durch physikalische oder chemische Noxen irreparabel geschädigt wird. Die Zelle beginnt anzuschwellen, das osmotische Gleichgewicht kann nicht aufrecht erhalten werden, wodurch die Zellmembran zerreißt und die intrazellulären Bestandteile freigesetzt werden. Dabei kommt es zu einer entzündlichen Umgebungsreaktion (Inflammation). Der sogenannte "programmierte Zelltod" oder auch Apoptose genannt, wurde erstmals im Jahre 1842 von C.Vogt in seinem Werk "Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte ("Alytes obstreticans") beschrieben. Die Apoptose ist in verschiedenste physiologische Prozesse involviert. Schon während der embryonalen Entwicklung ist die Apoptose an den komplexen Umbau- und Differenzierungsvorgängen im wachsenden Organismus beteiligt. Auch bei der Regulation des Immunsystems spielt die Apoptose eine bedeutende Rolle zur Eliminierung spezifischer autoreaktiver Zellen sowie der Limitierung von Immunreaktionen. Eine fehlende bzw. fehlgesteuerte Apoptose kann zu diversen autoimmunvermittelten und neurodegenerativen Erkrankungen führen, sowie an der Entstehung von malignen neoplastischen Prozessen beteiligt sein [20, 21]. Die Apoptose wird in drei Phasen unterteilt: während der Initialphase verändern sich die Plasma- und Zellmembran, die Zelle löst sich von den Nachbarstrukturen. In der Exekutionsphase kommt es zur Schrumpfung der Zelle, zur Exposition von Phosphatidylserinen aus dem Inneren der Zellmembran auf die Zelloberfläche, zur Zeiose mit dem sogenannten "blebbing" (Ausstülpen von Membrananteilen), sowie zur Kondensierung und Fragmentierung der DNA auf 50-300 kb große Stücke. In der Umgebung der apoptotischen Zelle erfolgt ein interzellulären Kontaktverlust, ohne Schädigung der Nachbarzellen. In der Terminalphase werden apoptosetypische "apoptotic bodies" gebildet, in denen die Zelltrümmer freigesetzt werden und von Makrophagen, Phagozyten und Immunzellen phagozytiert werden, ohne dass, im Gegensatz zur Nekrose, in der Umgebung eine Entzündungsreaktion durch inflammatorische Mediatoren ausgelöst wird [22].



Abbildung 1-2: Ablauf Apoptose versus Nekrose: Schematische Darstellung der morphologischen Abläufe der Apoptose und Nekrose im Vergleich (aus Boehringer Mannheim Apoptosis Guide; Trauth und Keesey, 1995)

Die Apoptose kann durch verschiedene Stimuli initiiert werden. Exogene Stimuli können z.B. DNA-Schäden durch UV-Strahlen, chemische Substanzen und Chemotherapeutika darstellen, zu den endogenen Stimuli zählt die Abwesenheit oder der Entzug von Wachstumsfaktoren oder die Aktivierung Apoptose-vermittelnder Rezeptoren [23, 24].

#### 1.2.1 Die "Tumor Necrosis Factor"-Superfamilie

Mitglieder der Tumor Necrosis Factor (TNF)-Rezeptor-Superfamilie sind Glykoproteine die erstmalig von Ware *et al.* (2001) beschrieben wurden [25, 26]. Die ständig wachsende Superfamilie umfasst mittlerweile ca. 30 Mitglieder, zu denen CD27, CD30, CD40, CD95, TNFR-1,2,3, NGFR, CD134, TRAMP, TRIALR-1,-2,-3,-4 und weitere Proteine gehören, die mit annähernd 20 Liganden aus der korrespondierenden TNF-Superfamilie interagieren können. Durch Interaktion von Rezeptor und Ligand werden verschiedenste Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung und Einleitung von Apotpose gesteuert. Weiterhin spielen sie eine Rolle bei der Kanzerogenese und Entstehung von autoimmunvermittelten Krankheiten [27]. Die TNF-Rezeptoren enthalten eine bis mehrere homologe zysteinreiche extrazelluläre Domänen, zwischen denen die Ausbildung von Zysteinbrücken ausschlaggebend für die Bindungseigenschaft des jeweiligen Rezeptors zu sein scheint. Außerdem zeichnen sie sich durch eine Transmembrandomäne aus, an die sich im zytoplasmatischen Teil eine Todesdomäne anschließt, über die Caspasen aktiviert werden können. Der intrazelluläre Teil der Rezeptoren zeigt ein eher heterogenes Strukturmuster auf. Die TNF-Liganden stellen bis auf wenige Ausnahmen Transmembranproteine vom Typ II dar und können auch in löslicher Form vorliegen. Die extrazellulären Domänen der biologisch aktiven Trimere können durch spezifische Metalloproteinasen abgespalten [28] und so in den extrazellulären Raum freigesetzt werden. Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor kommt es entweder zur Internalisierung des Rezeptors oder zur proteolytischen Abspaltung der extrazellulären Domäne. Die beiden für diese Arbeit relevanten Mitglieder der TNF-Superfamilie CD40 und CD95 werden im Folgenden genauer beschrieben.

#### 1.2.1.1 Das CD40 Molekül

Ein wichtiges Mitglied der TNF-Superfamilie ist das CD40 Molekül mit einem Molekulargewicht von 50 kDa [29]. CD40 besteht aus drei Monomeren, die nach Bindung des Liganden trimerisieren, wodurch ein intrazellulärer Signalübertragungsweg ausgelöst wird. CD40 wird auf B-Zellen, Monozyten/ Makrophagen, Thymozyten, Fibroblasten, neuronalen Zellen, Dendritischen Zellen und verschiedenen Tumorzellen exprimiert [30, 31]. Sein korrespondierender Bindungspartner, der CD40 Ligand (33kDa), kommt transient auf aktivierten T- und B-Lymphozyten, Endothelzellen, Gefässmuskelzellen, Monozyten, Makrophagen, Thymusepithelzellen, Keratinozyten und Thrombozyten vor [32-34]. Eine zentrale Rolle spielt die CD40-CD40L-Interaktion bei der Vermittlung zwischen T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen, insbesondere mit B-Zellen [35-37]. Die B-Zell-T-Zellvermittelte Interaktion führt zu einer B-Zellproliferation. Die Bindung von CD40L an gesunde B-Zellen führt zur Ausdifferenzierung und zum Immunglobulin Subklassenswitch. Weiterhin ist sie durch eine gesteigerten MHC Expression und eine Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen [38, 39], an der Prozessierung zur Antigenpräsentation beteiligt [40, 41]. CD40 wird auch auf der Zelloberfläche einiger maligne entarteter Zellen, z.B. auf Leukämie- und Lymphomzellen exprimiert.

#### 1.2.1.2 Der Todesrezeptor CD95

CD95 ist ein Todesrezeptor über den in der Zellinteraktion eine Elimination von Zielzellen ausgelöst werden kann. CD95 spielt als Induktor der physiologischen Apoptose eine wichtige Rolle in der immunologischen Kontrolle und bei der Homöostase verschiedener Gewebe. Die Fortleitung der CD95-vermittelten Apoptose kann über einen extrinsischen, über eine Caspasenkaskade fortgeleiteten "Pathway" oder über einen intrisischen, über die Mitochondrien ablaufenden Weg, ausgeführt werden. Die Apoptoseinduktion durch CD95-CD95L Interaktion wurde erstmalig von Trauth *et al.* (1989) in einer B-lymphoblastischen Zelllinie und primären lymphoblastischen Patientenzellen gezeigt [42]. Das CD95-Molekül weist, je nach Glykosylierungszustand, ein Molekulargewicht von 45-52 kDa auf und kommt

entweder membrangebunden oder in einer durch alternatives Splicing entstandenen, löslichen zytoplasmatischen Form vor [43]. Die Bindung des korrespondierenden Liganden oder agonistischer Antikörper an den Rezeptor, führt zu einer Trimerisierung des Rezeptors und einer Zusammenlagerung der zytoplasmatischen Todesdomänen. Dadurch kann intrazellulär das Adaptormolekül FADD/Mort-1 binden [44]. FADD wiederum verfügt über eine sogenannte Todeseffektordomäne, eine Bindungsstelle für die inaktive Proform der Caspase-8. Der Komplex aus dem oligomerisierten CD95 Rezeptor, dem Adaptormolekül FADD und der Caspase-8, wird als Zelltod-induzierender Signalkomplex ("death-inducing signalling complex", DISC) bezeichnet. Nach der DISC-Bildung können abhängig vom Zelltyp zwei verschiedene Wege der Signaltransduktion induziert werden. In Typ I-Zellen, die eine hohe lokale Dichte von Caspase-8 am DISC aufweisen [45], erfolgt die direkte autoproteolytische Spaltung der Effektorcaspasen und der Ablauf der Apoptosekaskade über den extrinsischen "pathway". In den Typ II-Zellen erfolgt eine deutlich geringere DISC-Bildung, hier erfolgt die Weiterleitung des Apoptosesignals über den mitochondrialen "intrinsischen" Signalweg. Die Aktivierung der Caspase-8 führt zur Spaltung des pro-apoptotischen Moleküls Bid und im Folgenden durch Aktivierung weiterer Mitglieder der bcl-2 Familie. Die Mitglieder der bcl-2-Familie sind sowohl pro- als auch anti-apoptotische Proteine, die an der Regulation der intrinsischen, mitochondrialen Apoptose beteiligt sind. Die Proteinfamilie wurde nach dem Onkogen bcl-2 benannt, welches durch die Translokation t(14;18) in Lymphomen überexprimiert wird [46]. Ausgelöst durch die Ausschüttung pro-apoptotischer Faktoren aus dem Intermembranraum der Mitochondrien, kann es sowohl zum direkten "Caspaseunabhängigen Tod" kommen, oder vermittelt über Cytochrom C und Apaf-1 zur Aktivierung der Caspase-9 und -3 zur gemeinsamen Endstrecke mit dem extrinsischen Weg den Zelltod auslösen (Abbildung 1-4) [47]. Die Expression von CD95 wird, wie durch Vorarbeiten unserer Gruppe gezeigt werden konnte, durch CD40-Stimulation auf Vorläufer-B-Zelleukämien deutlich hochreguliert, denselben Effekt kann man auch auf reifen B-Zellen beobachten. Dies stellt komplizierten, physiologisch einen sinnvollen Regulationsmechanismus im Rahmen der Aktivierung bei immunologischen Vorgängen dar. Um nach Ablauf einer immunologischen Reaktion die Aktivierung der B-Zellen zu limitieren, wird über den durch CD40-Stimulation hochregulierten CD95-Rezeptor die Apotose der Zelle ausgelöst. Aufgrund einer fehlenden oder nur sehr schwachen CD95-Expression lässt sich in frischen primären Vorläufer B-ALL Blasten nur eine geringe Sensitivität für CD95vermittelte Apoptose nachweisen. Trotz einer identischen Hochregulation von CD95 nach CD40-Stimulation ist die CD95-vermittelte Apoptoserate in B-ALL Blasten signifikant niedriger als in normalen B-Zellen [48].

#### 1.2.2 Caspasen

Caspasen (cysteine-dependent aspartate-directed proteases) sind Enzyme und wirken als Schlüsselmoleküle, ihre Aktivierung triggert eine zur Apoptose führende Signalkaskade. Es handelt sich um Cystein-Proteasen, von denen bisher elf human vorkommende Caspasen beschrieben wurden [49, 50]. Caspasen werden als katalytisch inaktive Proenzyme, sogenannte Zymogene synthetisiert. Ihre Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung in eine kleine (p10) und eine große (p18) Untereinheit [49, 51]. Man unterscheidet die apikalen Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9, -10) mit einer langen Prodomäne (>10 kDa), die die Interaktionsdomänen DED (death effector domain) sowie CARD (caspase recruitment domain) enthalten, und die distalen Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7), die nur eine kurze Prodomäne (<30 AS) enthalten. Die apikalen Caspasen werden durch Dimerisierung zu Multienzymkomplexen und die distalen Caspasen durch proteolytische Spaltung aktiviert [52]. Aufgrund ihrer Substratspezifität und Spaltungsmotiv werden die Caspasen in drei Gruppen eingeteilt. [53, 54]. Nach Aktivierung können die Caspasen eine Reihe von Molekülen spalten. Diese sind beteiligt an der DNA-Reparatur, mRNA-Splicing und Regulation zellulärer Strukturproteine, sowie verschiedener Signalmoleküle, die über die Spaltung aktiviert als auch inaktiviert werden können. Einzelne Caspasen können durch virusassoziierte Proteine, wie zum Beispiel v-FLIP, gehemmt werden [50, 55, 56]. Besondere Beachtung fand in dieser Arbeit die Caspase-8, die nach CD95-vermittelter Induktion der Apoptose an den DISC anlagert und die weitere Signalkaskade initiiert. Wie alle Caspasen so wird auch Caspase-8 als katalytisch-inaktives Proenzym synthetisiert. Der erste Schritt der Spaltung von dimerer Caspase-8 im DISC verläuft autokatalytisch und führt zur Freisetzung der kleinen p10-Untereinheit in das Cytosol, während ein 43 kDa-(Caspase-8a) und ein 41 kDa- (Caspase-8b)-Intermediat im DISC verbleibt. Durch transkatalytische Prozessierung der Caspase-8-Homodimere untereinander erfolgt die Freisetzung der großen p18-Untereinheit. Heterotetramere der kleinen und großen Untereinheiten bilden letztendlich die aktive Caspase [45].

#### 1.2.3 "Death inducing signaling complex"(DISC)-Bildung

Der Komplex gebildet aus trimerisiertem CD95-Rezeptor, dem Adaptermolekül FADD/ Mort-1 und der Zymogenform der Caspase-8, wurde 1995 erstmalig von Kischkel et al, als DISC ("death inducing signalling complex") bezeichnet [57]. Scaffidi *et al.* zeigten, dass Zellen, die sensitiv gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sind, in zwei Gruppen unterteilt werden können: sogenannte Typ I- und Typ II-Zellen [58]. Typ I-Zellen zeichnen sich durch eine effiziente "death inducing signaling complex"-Bildung (DISC-Bildung) aus. Nach Trimerisierung des Rezeptors und Bindung des Adaptermoleküls FADD/Mort-1, werden große Mengen Procaspase 8 an den Rezeptorkomplex rekrutiert. Die Spaltung in die aktive Form der Caspase-8 führt ihrerseits umgehend zur Aktivierung der Caspase-3 und damit zur Auslösung der Apoptose. Im Gegensatz hierzu erfolgt in den sogenannten Typ-II-Zellen, zu denen man auch die T-Zelllinien Jurkat und CEM-Zellen zählt, nur eine geringfügige Bildung des DISC und somit eine primär geringere Aktivierung der Procaspase-8.



Abbildung 1-3.: Schematische Darstellung des CD95 Rezeptors, der durch Bindung des Liganden trimerisiert die Adaptormoleküle FADD/Mort-1 und Procaspase-8 bindet und so den DISC formiert.

Die hauptsächliche Apoptoseinduktion erfolgt in diesen Zellen unter Einbeziehung des intrinsischen mitochondrialen Pathway [58]. Durch stressinduzierte Stimuli (DNA-Schädigung, Zytostatika, Wachstumshormonmangel etc.) kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien, an das sich ein Komplex aus Procaspase-9 und Apaf-1 anlagert. Es wird die aktive Form der Caspase-9 abgespalten, die wiederum zu einer Aktivierung der Caspase-3 führt, und so in einer gemeinsamen Endstrecke mit dem CD95-vermittelten Apoptosepathway mündet.



Abbildung 1-4: Die Abbildung aus Scaffidi et al. 1999, zeigt die zwei Wege der CD95-vermittelten Apoptose in Typ I und Typ II Zellen. In den Typ I Zellen erfolgt die Trimerisierung des CD95-Rezeptors nach Bindung des Liganden. Durch Anlagerung von FADD und Procaspase-8 kommt es zur Bildung des DISC, wodurch grosse Mengen Caspase-8 in ihre aktive Form überführt werden und die Aktivierung der nachfolgenden Effektorcaspasen (Caspase-3) einleiten. Die Bindung der Procaspase-8 an den DISC kann durch c-FLIP blockiert werden. In den Typ II Zellen erfolgt eine Initiierung der Apoptose durch den mitochondrialen Signalweg. Durch Aktivierung der Caspase-8 kommt es zur Spaltung von Bid wodurch es zu einer Inhibition der anti-apoptotischen Bcl-2 familienmitglieder in den Mitochondiren kommt. Ein Verlust des Membranpotentials der Mitochondrien führt zur Freisetzung von Cytochrom C (Cyt C) und anderer apoptogener Stimuli. Eine Zusammenlagerung von Cyt C mit dem zytosolischen Apaf-1 führt zur Aktivierung von der Procaspase-9 die in der Aktivierung der Caspase-3 die gemeinsame Endstrecke mit dem extrinsischen Weg einleitet. Diese gemeinsame Endstrecke, kann durch die Familie der Apoptoseinhibitoren (IAP) gehemmt werden. Ein Mitglied der IAPs ist Survivin, welches die Aktivierung der Caspase-3 und der Caspase-9 inhibieren kann.

#### **1.2.4** FLICE-inhibitory proteins (FLIP)

Eine Inhibition der Apoptose kann auf verschiedenen Ebenen durch eine Vielzahl an Inhibitoren ausgelöst werden. Virale und zelluläre "FLICE inhibitory proteins" können in sehr frühen Schritten die Induktion der apoptotischen Signaltransduktion an Todesrezeptoren blockieren [56, 59]. Das Molekül FLIP, welches erstmals als v-FLIP (engl.: viral FLICE inhibitory proteins) beschrieben wurde [56, 60, 61], kann an den DISC binden und dadurch die Aktivierung der Procaspase-8 verhindern. Die Fähigkeit von FLIP zur Inhibition der Procaspase-8 beruht auf einer Strukturhomologie der beiden Proteine. Das Gen für c-FLIP befindet sich in naher Lokalisation der Genloci der Caspase-3 und Caspase-8 [62]. Eine Entstehung von c-FLIP durch Duplizierung wird diskutiert. Das zelluläre c-FLIP wurde Ende der neunziger Jahre erstmalig beschrieben und erhielt unterschiedliche Namen: c-FLIP, FLAME-1, Casper, Usurpin, CASH, IFLICE, CLARP [62-68]. Über die Funktion von c-FLIP gab es gegensätzliche Aussagen. So wurde c-FLIP zunächst von einigen Gruppen als pro-apoptotisches Molekül beschrieben [66, 67, 69], während andere Untersuchungen eher eine

apoptose-inhibierende Funktion von c-FLIP zeigten [61, 62, 64, 68, 70]. Auch eine duale Funktion in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie sowie dem Expressionsniveau von c-FLIP wurde diskutiert [65]. Dies konnte durch die Entdeckung verschiedener Splicevarianten mit unterschiedlichen Funktionen erklärt werden. Während auf mRNA Ebene multiple Splicevarianten von *c-FLIP* existieren, wurden auf Proteinebene bislang nur drei Isoformen nachgewiesen: eine lange Form mit einem Molekulargewicht von 55 kDa, das sogenannte *FLIP long* und zwei kurze Isoformen, *c-FLIP short* mit einem Molekulargewicht von 27 kDa und *FLIP-R* mit einem Molekulargewicht von 26 kDa [62]. Die FLIP-R Form wurde erstmalig in Raji-Zellen, einer Burkittlymphom-Zelllinie nachgewiesen, funktionell scheint sie identisch zur FLIP short-Form zu sein [71].



Abbildung 1-5.: Schematische Darstellung der Isoformen *FLIPlong*, *-short und –R*. Die verschiedenen Formen von *c-FLIP* enthalten Strukturhomologa, charakteristisch sind zwei Todesdomänen (DEDs), *FLIP long* enthält am C-terminalen Ende eine Caspase-ähnliche Domäne. Die beiden kurzen Formen *FLIP short* und –R enthalten eine kurze C-terminale Domäne.

Sowohl c-Flip long als auch c-Flip short können die Induktion der Apoptose durch die klassischen Todesrezeptor-Signalwege blockieren [56, 59]. Die Inhibition erfolgt durch die Blockierung der Spaltung von Procaspase-8 zum aktiven Enzym im DISC [72]. Hohe Konzentrationen c-Flip long oder c-Flip short im DISC können jedoch zu einer Blockierung der Caspase-8-Aktivierung führen, indem diese entweder nur unvollständig oder überhaupt nicht gespalten wird [72, 73]. Die Bildung von c-Flip long-Procaspase-8-Heterodimeren erlaubt die proteolytische Spaltung der Caspase zum p43/41-Intermediat und von c-Flip long zum p43-Fragment, welches ebenfalls im DISC verbleibt. Gleichzeitig werden die kleine p10-Untereinheit von Caspase-8 und die p12- Untereinheit von c-FLIP long in das Cytosol entlassen. Aufgrund der fehlenden katalytischen Aktivität der Caspase erfolgen und damit auch kein funktionelles Enzym in das Cytosol entlassen werden. Durch hohe lokale Konzentrationen von c-FLIP short im DISC wird eine Prozessierung der Procaspase vollständig verhindert. Da c-FLIP short keine Caspase-ähnliche Domäne besitzt, wird selbst

die Autoproteolyse der Caspase verhindert, da diese nicht die dafür notwendige Konformation einnehmen kann [73]. FLIP long verfügt über zwei Todesdomänen (DED's) und zusätzlich über eine sogenannte p12- und eine p20-Domäne. FLIP short enthält lediglich zwei Todesdomänen und einen kurzen C-terminalen Rest aus 19 Aminosäuren und ähnelt der viralen FLIP-Form. c-FLIP long besitzt trotz Strukturhomologien zur Procaspase-8 keine die äquivalente katalytische Aktivität. während short-Form durch die beiden Todeseffektordomänen an den DISC binden kann. Während c-FLIP short als auch c-FLIP-R bisher als rein anti-apoptotische Moleküle beschrieben worden sind, kann c-FLIP long bei geringem Expressionsniveau auch eine pro-apoptotische Funktion ausüben. [74-76]. In vitro Analysen konnten zeigen, dass c-FLIP long sogar als potenterer Aktivator der Caspase-8 wirken kann als die Caspase selbst, da die Heterodimerisierung von c-FLIP long mit der Caspase-8 eine geringere kinetische Hemmung aufweist als deren Homodimerisierung [73, 74, 76]. In einer Arbeit von Kataoka et al. wurde gezeigt, dass c-FLIP durch Bindung von Caspase-8 und FADD eine Resistenz für die CD95-vermittelte Apoptose verursacht, jedoch den durch andere Noxen (Chemotherapie, Gamma-Strahlen) induzierten Zelltod nicht beeinflusst [70]. In normalen reifen B-Zellen sind die meisten Komponenten des DISC konstitutiv und c-FLIP stabil exprimiert [77].

#### 1.2.5 Familie der Apoptoseinhibitoren

Neben FLIP existieren weitere Apoptose-inhibierende Moleküle. Die Regulation der Apoptose erfolgt über ein Netzwerk verschiedener kooperierender Interaktionspartner. Zu diesen Molekülen zählt die Familie Apoptoseinhibitoren, den sogenannten IAPs ("inhibitors of apoptosis"), die die Prozessierung und Aktivierung der Caspasen verhindern. Sie scheinen bei der Entstehung von Leukämien eine entscheidende Rolle zu spielen, indem sie die physiologischen Abläufe der Apoptose unterbrechen und so zur ungehinderten Proliferation der maligne entarteten Blasten beitragen. Die Familie der IAPs umfasst mittlerweile acht Mitglieder: *XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2, Livin-α* und– $\beta$ , Survivin *NAIP und ILP-2. XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2, Livin-α* und – $\beta$ , inhibieren direkt die Caspasen-3 und -7 und Procaspase-9, über *Smac* [78]. Eine Hemmung der Caspasen-3 und -7 erfolgt auch über Survivin und *NAIP, ILP-*2 hemmt isoliert die *Caspase-9* [79]. In dieser Arbeit wurde insbesondere Survivin als Mitglied er IAP-Familie untersucht.



Abbildung 1-6: Übersicht der IAP Familie (modifiziert nach Nachmias et al. 2004)

#### 1.2.5.1 Das IAP - Survivin

Survivin ein Mitglied der IAP-Familie, blockiert die Endstrecke sowohl des extrinsischen, als auch des intrinsischen Apoptose-Pathways durch Inhibition der Effektorcaspasen-3, -7 und -9. Das Survivin Gen ist auf Chromosom 17q25 lokalisiert und umfasst vier Exone. Das translatierte Survivin-Protein hat ein Molekulargewicht von 15 kDa [80]. Neben seiner antiapoptotischen Funktion spielt Survivin eine wichtige Rolle in der Zellzykluskontrolle. In der G2/M-Phase wird Survivin ca. 40-fach hochreguliert, um nach dem Zellzyklusarrest wieder umgehend herunterreguliert zu werden [80]. Die essentielle Rolle von Survivin während der Mitose konnte durch den funktionellen Ausfall des Proteins gezeigt werden [81-84]. Neben der klassischen Survivinvariante wurden bisher vier durch alternatives Splicen generierte Isoformen, Survivin- $\Delta$ -Ex3, Survivin-2B, Survivin-2 $\alpha$  und Survivin-3B, nachgewiesen (Abbildung 1-7) [85, 86]. Wie durch in vitro Transfektionsversuche in der prä-B-Zelllinie BaF3 und der hepatozellulären Carcinomzelllinie HEP G2 gezeigt wurde, inhibiert Survivin den programmierten Zelltod signifikant nach IL-3-Entzug [85, 87]. Es konnte eine unterschiedliche Wirkung der bekannten Splicevarianten auf den Ablauf der Apoptose gezeigt werden. Surivivin und Survivin- $\Delta$ -Ex3 inhibieren die Apoptose signifikant, wohingegen Survivin-2B die anti-apoptotische Funktion verloren zu haben scheint und als pro-apoptotisches Molekül wirkt. Die funktionelle Bedeutung von Survivin -2a und -3B ist noch nicht geklärt [85]. Da Survivin mit seinen Splicevarianten als anti-apoptotisches Molekül speziell in neoplastischen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt, indem es durch Kontrolle des Zellzyklus und Inhibition der physiologischen Elimination der malingen Zellen einen Proliferationsvorteil schafft, besteht ein hohes klinisches Interesse, inwiefern die Höhe der Survivin-Expression mit der Prognose korreliert und außerdem, ob es als tumorspezifisches Zielantigen therapeutisch genutzt werden kann. Survivin wurde von verschiedenen Gruppen als tumorspezifisches Protein beschrieben, da es nicht in terminal differenzierten humanen Geweben exprimiert wird [87-89]. Als Ausnahme gilt eine transiente Expression in Fetal-, Uterus- und Thymusgewebe. Survivin wird in einer Vielzahl verschiedener maligner Gewebe wie Bronchial-, Kolon-, Nierenzell- und Magen-Carcinomen, wie auch in Leukämien, Lymphomen und diversen anderen Tumorentitäten nachgewiesen Es wurde gezeigt, dass bei verschiedenen bösartigen Erkrankungen die [81]. Survivinüberexpression mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. Bei hämatologischen Erkrankungen, z.B. bei erwachsenen Patienten mit akuten myeloischen (AML) und akuten lymphatischen Leukämien (ALL) [90] oder diffus großzelligen B-Zell Lymphomen [91], korreliert die Survivinüberexpression mit einer verkürzten Überlebens- und Remissionsrate. Auch bei Kindern mit AML scheint eine hohe Survivinexpression ebenfalls mit einem schlechteren "overall-survival" zu korrelieren [92-95]. In einer aktuellen Studie zu Vorläufer B-Zellleukämien bei Kindern wurde die Survivingenexpression mittels "Microarray" analysiert und ein Zusammenhang zwischen hoher Survivinexpression und einem frühzeitigen Rückfall gezeigt [96]. Während bei der adulten ALL eine Überexpression von Survivin als prognostisch ungünstiger Marker gilt, liegen derzeit kaum Daten über die prognostische Relevanz bei der Vorläufer-B-Zellleukämie, der häufigsten bösartigen Erkrankung des Kindesalters vor.



Abbildung 1-7 Splice-Varianten der Survivin mRNA Die abgebildeten Splicevarianten können mit dem Survivinmolekül Heterodimere bilden und unterscheiden sich hinsichtlich ihres anti-apoptotischen Potentials. Während Survivin  $\Delta$ Exon 3 anti-apoptotisch wirkt, hat die Survivn2B Variante eine attenuierende Wirkung auf das anti-apoptotische Potential von Survivin. Die funktionelle Beduetung der Variante 3B ist noch nicht geklärt (aus Caldas *et al.* Oncogene 2005 24,1994-2007)

#### 1.2.5.2 Die Bcl-2 Familie

Die Mitglieder der Bcl-2 Familie ("b-cell-lymphoma 2") sind Onkogene und spielen eine wichtige Rolle beim Ablauf des programmierten Zelltod. Das 230 kb große humane bcl-2-Gen ist auf dem q-Arm des Chromosoms 18 lokalisiert. Das Bcl-2-Protein umfaßt 239 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 26kD [97]. Funktionell wichtig sind die Protein-Domänen BH1 und BH2, die durch Bildung von Heterodimeren mit anderen Mitgliedern der Bcl-2 Familie interagieren. Die Mitglieder der Bcl-2-Familie sind pro- sowie antiapoptotischer Proteine, die den intrinsischen, über die Mitochondrien ablaufenden Apoptoseweg regulieren. Namensgeber der Proteinfamilie war das Onkogen Bcl-2, welches als chromosomale Translokation, t(14;18), in humanen B-Zell-Lymphomen überexprimiert wird [98]. Es führt zu einer Blockierung der Apoptose im Verlauf einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Stimuli [99]. Gemeinsamkeit der Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie ist eine konservierte, alpha-helikale Struktur, die Bcl-2-Homologie-Domäne (BH). Die Mitglieder der Bcl-2-Familie werden in drei Subklassen aufgeteilt. Gruppe 1 umschreibt die antiapoptotischen Mitglieder Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1 (drei oder vier BH-Domänen). Sie sind auf der cytosolischen Seite intrazellulärer Membranen lokalisiert und weisen eine Transmembrandomäne auf. Die proapoptotischen Mitglieder gehören zur Gruppe 2 der Bax-Subfamilie (Bax, Bak, Bok/Mtd, drei BH-Domänen) und Gruppe 3 der BH3-Subfamilie (Bad, Bid, Bim, Noxa, Puma, kurze BH3-Domäne) [46].

# 2 Ziel dieser Arbeit

Trotz guter Prognose der pädiatrischen Vorläufer B-Zellleukämien durch Behandlung nach einer Standardprotokolltherapie, bleibt die Heilung von Patienten mit Rezidiven und besonders agressiven und therapieresistenten Erkrankungen eine Herausforderung. Um diese Patienten früh zu erkennen und neue therapeutische Strategien zur Behandlung der pädiatrischen B-Zellleukämien zu erarbeiten, ist es wichtig, die physiologischen Abläufe zu verstehen und Störungen dieser Abläufe im Rahmen einer malignen Transformation zu erkennen und zu lokalisieren. Ziel der Arbeit ist es, Mechanismen zu untersuchen, die es den Leukämiezellen ermöglichen, sich der physiologischen Kontrolle durch Entwicklung von Apoptoseresistenzen zu entziehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Schwerpunkt auf die Untersuchung der CD95-vermittelten Apopotose gelegt.

Es erfolgte zum einen die Untersuchung der frühen intrazellulären Schritte, die auf die CD95 Ligation folgen. Es wurde eine besondere Aufmerksamkeit auf die an der DISC-Bildung beteiligten Moleküle gelegt. Insbesondere das Molekül c-FLIP, welches als einziges regulatorisches Protein direkt am DISC die Apoptose moduliert und durch Konkurrenz mit der Caspase-8 am DISC, die Aktivierung der Effektor-Caspasen inhibiert, wurde untersucht.

Ein zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung des anti-apoptotischen Moleküls Survivin und seiner funktionell wirksamen Splicevarianten Survivin-2B und Survivin-Δ-Ex3. Survivin wurde als tumorspezifisches Protein beschrieben und in zahlreichen neoplastischen Erkrankungen nachgewiesen. Bei verschieden Erkrankungen wurde eine Korrelation zwischen der Survivinexpression und dem klinischen "Outcome" der Patienten gezeigt. In dieser Arbeit sollte die Survivinexpression auf Protein- und mRNA- Ebene in kindlichen Vorläufer-B-Zellleukämien gemessen werden, um eine mögliche Korrelation zwischen dem Expressionsniveau von Survivin und den klinischen Daten der Patienten zu untersuchen.

# **3** Material und Methoden

#### 3.1 Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proben von insgesamt 86 Patienten im Alter zwischen 1 und 17 Jahren untersucht, die an einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) der B-Zellreihe erkrankt waren und zwischen Mai 1980 und März 2004 in den Kinderkliniken zu Düsseldorf und Hamburg nach der mutlizentrischen Therapieoptimierungsstudie für Kinder mit ALL "COALL-97 und -07/03" behandelt wurden. Die Blut- und Knochenmarkproben, welche in die Versuche Eingang erhielten, wurden im Rahmen der Initialdiagnostik und routinemäßigen Abnahmen gewonnen. Die Patienten hatten alle eine schriftliche Einverständnis zur Asservierung der Proben gegeben und es lag ein Ethikvotum vor. Die Diagnose der ALL wurde anhand morphologischer Kriterien sowie immunphänotypischer Methoden mittels Durchflusszytometrie gestellt. Das Patientenkollektiv, bei denen die Proteinkonzentration des Survivin-Protein untersucht wurde (n=66), unterteilte sich in 44 Kinder, die an einer c-ALL, 17 Patienten mit einer prä-B-ALL, und fünf Kinder, die an einer prä-prä-B-ALL erkrankt waren. Auf mRNA Ebene wurden 20 Patientenproben von Kindern mit Vorläufer-B-ALL untersucht. Der Mittelwert des relativen Blastenanteils in den Leukämieprobenproben betrug 86% (50-96%). 81% der Proben enthielten einen Blastenanteil  $\geq$  80%, in den restlichen Proben wurde ein Blastenanteil von 50-70% nachgewiesen. Nach Meldung an die Studienzentrale wurden die Patienten nach den festgelegten Kriterien in eine Hoch- und Niedrigrisikogruppe eingeteilt. Diese Einteilung erfolgte nach initialer Leukozytenzahl, Alter bei Diagnose, PVA Score, Immunphänotyp und Vorliegen von genetischen Aberrationen. Die Nachbeobachtungszeit der Patienten betrug im Median 34 Monate.

# 3.2 Materialien

#### 3.2.1 Chemikalien

**Bio-Rad** Acrylamid Agarose **Bio-Rad** Aqua ad injectabile Braun β-Mercaptoethanol Merck Ammoniumchlorid Apotheke HHU Bovines Serum Albumin (BSA) Sigma Cycloheximide (CHX) Sigma Diethylpyrocarbonat (DEPC) Sigma Dimethylsulfoxid (DMSO) Sigma Ethidiumbromid Sigma Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Biochrom Ethanol abs. Merck Ficoll Paque<sup>TM</sup> Plus Amersham Fetal Calf Serum (FCS) Gibco BRL Gene Ruler DNA Ladder Mix **MBI** Fermentas Merck Isopropanol L-Glutamin Gibco Loading Dye Solution 6x **MBI** Fermentas Magic Mark XP Längenstandard Invitrogen PAA Phosphat buffered saline (PBS) Penicillin/Streptomycin Gibco **PMSF** Sigma Pepstatin Roche Santa Cruz Propidiumiodid **RPMI 1640** Gibco Sheep erythrocytes Behring TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylen-Amin) Roth TMB (Tetramethyl-benzidine) Sigma Trypan Blau Sigma

Trypsin/EDTA	Gibco
Triton-X100	Merck
Tween 20	Merck
3.2.2 Enzyme	
DNAse	Qiagen
Neuraminidase	Behring
Uracil-DNA-Glykosylase	Roche
Taq DNA-Polymerase	Qiagen

# 3.2.3 Puffer

## 3.2.3.1 Puffer für Westernblot:

Lysepuffer:	150mM NaCl 30mM Tris-HCl, pH 7,5 1mM PMSF 10% (w/v) Glycerol 1% (w/v) Triton X-100 0,5 μg/ml Antipain 0,5 μg/ml Chymostatin A 0,5 μg/ml Leupeptin 0,5 μg/ml Pepstatin
PBST:	PBS + 0,05% Tween 20
TBE (10 x):	0,45 M Tris 0,45 M Borsäure 10mM EDTA pH 8,3
Probenpuffer reduz. (5 x):	50% (v/v) Glycerol 10% (w/v) SDS 50mM Tris, pH = 6,8 25% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol 0,25mg/ml Bromphenolblau
Sammelgel (5%):	24mM Tris-HCl, pH 6,8 5% (w/v) Acrylamid 0,1% (w/v) SDS 0,1% (w/v) APS 0,1% (w/v) TEMED
Trenngel:	37,5mM Tris-HCl, pH 8,8 7,5-15 % (w/v) Acrylamid 0,1% (w/v) SDS 0,03% (w/v) APS 0,1% (w/v) TEMED

Laufpuffer (SDS-PAGE):

25mM Tris-Base 0,19M Glycin 1% (w/v) SDS

Transferpuffer:

25mM Tris 0,19M Glycin 20% (v/v) Methanol 0,037 % (w/v) SDS

## 3.2.3.2 Lysepuffer zur Proteinlysatherstellung für ELISA

#### 3.2.4 Antikörper

#### 3.2.4.1 Antikörper für den Westernblot:

1.AK	Firma	Verdünn ung	Auf- bewahrung	2.AK	Firma	Verdünnung	Aufbewahrung
Mab to FLIP (human) (NF6)	Alexis Biochemicals	1:500	4°C	Goat α- mouse IgG1a	Southern Biotech Cat.1070-05	1:20000	4°C Aliquotiert bei -20°C
Rabbit α-Caspase 3 Polyclonal Ab	BD Pharmingen Cat.552785	1:4000	4°C	Goat α- rabbit IgG	Chemicon Cat.AP132P	1:5000	4°C Aliquotiert -20°C
Mab to Caspase 8 (12F5)	Alexis Cat.ALX- 804-242	1:1000	4°C	Goat α- mouse IgG2b	Southern Biotech Cat.1090-05	1:20000	4°C
α-Caspase 8	MBL Cat.JM- 3020-100	1:100	4°c Aliquotiert -20°C	Goat α- rabbit IgG	Chemicon Cat.AP132P	1:5000	4°C Aliquotiert -20°C
Mab Anti-ß- Actin(Clone AC- 74)	Sigma Cat.A5316	1:5000	-20°C (ausgeliehen MolMed)	Goat α- mouse IgG2a	Southern Biotech	1:20000	4°C
Bcl-2(c-2):sc-7382	Santa Cruz	1:1000	4°C	Goat α- mouse IgG1a	Southern Biotech Cat.1070-05	1:20000	4°C Aliquotiert -20°C
Rabbit polyclonalAntibody to Survivin	Novus Biologicals Cat.NB 500- 201	1:1000	-20°C	Goat α- rabbit IgG	Chemicon Cat.AP132P	1:5000	4°c Aliquotiert -20°C
Anti-FADD	BD Transduction Laboratories	1 :250	-20°C	Goat α- mouse IgG1a	Southern Biotech Cat.1070-05	1:20000	4°c Aliquotiert -20°C

**Tabelle 3-1:**Die Tabelle zeigt die in dieser Arbeit benutzten Westernblotantikörper, die verwendeten Verdünnungen, die gelabelten Zweitantikörper, die Hersteller und die Temperatur der Aufbewahrung.

#### 3.2.5 Antikörper für den ELISA

Anti-human Survivin-AK (#840471)

R&D Systems

# 3.2.6 Antikörper für die Durchflusszytometrie:

IgG1 PE/FITC Isotypenkontrolle	Immunotech
CD3-PE/FITC	Immunotech
CD4-FITC	Immunotech
CD8-PE	Immunotech
CD10-PE/FITC	Immunotech
CD14-FITC	Immunotech
CD-19-PE	Immunotech
CD56-PE/FITC	Immunotech
CD66b-FITC	Immunotech
CD40-PE	Immunotech
CD40L-PE	Immunotech
CD95-FITC	Immunotech
CD95-PE	Becton Dickinson
Anti-Bcl-2	Dako

# 3.2.7 Fertige Lösungen und Reaktionssysteme

Apoptosis detection kit	
(Annexin-FITC/Propidiumiodid)	Immunotech
BCA Protein Assay	Pierce
DNase Kit (RNAse frei)	Qiagen
Duo Set IC, Humanes Survivin	R&D
ECL Western Blotting Analysis System	Amersham
First strand cDNA synthesis Kit	Amersham
IntraPrep Permeabilization Kit	Immunotech
LC FastStart DNA Master Hybridization Kit	Roche
MACS	Milteny Biotec
Molekulargewicht Standard Magic Mark XP	Invitrogen
QiaShredder Mini columns	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RNA Blood Kit	Qiagen
Taq PCR Core Kit	Qiagen

#### 3.2.8 Geräte

Durchflusszytometer FACS-Scan/ Calibur Elektrophoresekammer Flour-S Multiimager Gefrierschränke Gelkammer/Blotkammer Heizbad thermomix 1420 Light Cycler Mikroskop axiovert 25 Photometer Pipettboy Pipetten Platten Lesegerät Röntgenfilmentwickler Spannungsgerät Sterilbank Lamin Air Thermomixer Brutschrank Zentrifuge 5417R Zentrifuge Multifuge Neubauer Zählkammer

#### 3.2.9 Verbrauchsmaterial

Cryoröhrchen Filterpapier Küvetten 96well Flachbodenplatten Polypropylen Reaktionsgefässe Röntgenfilme (Hyperfilm ECL) Blot Membran PCR Reaktionsgefäss (0,5ml) Pipettenspitzen Reaktionsgefässe (1,5ml,2ml) Zellkulturflaschen **Becton Dickinson Bio-Rad Bio-Rad** Heraeus, Revco **Bio-Rad** Braun Roche Zeiss **Biometra** Integra Boscience Eppendorf Magellan Agfa Biometra Holten Eppendorf Forma Scientific Eppendorf Heraeus Zeissglas

Nunc Whatman Eppendorf Nunc Falcon Amersham Amersham Eppendorf Star Lab Eppendorf Corning Costar TY75

## 3.2.10 Eukaryontische Zelllinien

Daudi	humane Burkittlymphom-Linie (ACC78)
Raji	humane Burkittlymphom-Linie (ACC 319)
AD	Vorläufer B-Zelllinie
RS	Vorläufer B-Zelllinie
murine L-Fibroblasten	ATCC Katalog Nr.56-X
murine CD40L L- Zellen Fibroblasten	Zur Verfügung gestellt von M.Roskrow,
	München

Jurkat

## humane T-Zell-Leukämie-Linie

## 3.2.11 Kultur-, Einfriermedien und Zusätze

## Kulturmedium R-10:

RPMI 1640 (-L-Glutamin) +10% FCS +10U/ml Penicillin +10U/ml Streptomycin +2mM L-Glutamin

# Einfriermedium für 10ml:

5ml RPMI 1640

4,5ml FCS

0,5ml DMSO

# 3.2.12 Oligonukleotide

## Konventionelle PCR:

Bezeichnung	Sequenz	Richtung
GAPDH F	TTGGTATCGTGGAAGGACTCA	5`-3`
GAPDH R	TGTCATCATATTTGGCAGGTTT	5`-3`
Survivin s	GCATGGGTGCCCGCGACGTTG	5`-3`
Survivin as	GCTGCCGGCCAGAGGCCTCAA	5`-3`

# **Real-Time-PCR:**

Bezeichnung	Sequenz	Richtung
GAPDH F	TTGGTATCGTGGAAGGACTCA	5`-3`
GAPDH R	TGTCATCATATTTGGCAGGTTT	5`-3`
Survivin F	GACCACCGCATCTCTACATTC	5`-3`

Survivin R	TGCTTTTTATGTTCCTCTATGGG	5`-3`
Survivin 2B	AAGTGCTGGTATTACAGGCGT	5`-3`
Survivin ΔEx3	ATTGTTGGTTTCCTTTGCATG	5`-3`

## Sonden für Real-Time-PCR:

Bezeichnung	Sequenz	Richtung
GAPDH LC	LC Red705-GGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGA p	5`-3`
GAPDH FL	TGTCCCCACTGCCAACGTGTCAG X	5`-3`
Survivin LC	LC Red640-CCC AGTGTTTCTTCTGCTTCAAGG p	5`-3`
Survivin FL	CCACTGAGAACGAGCCAGACTTG X	5`-3`

#### **RT-Primer**

Bezeichnung	Sequenz	Richtung
GAPDH RT	CTC CTGGAAGATGGTGATGG	5`-3`
Survivin RT	AGGAACCTGCAGCTCAGA	5`-3`

# 3.3 Methoden

## 3.3.1 Kultivierung von Zelllinien

Alle Arbeiten zur Kultivierung eukaryontischer Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen, um eine Kontamination mit z.B. Bakterien oder Pilzen zu vermeiden. Die eingesetzten Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen in 12ml R-10 Medium im Inkubator bei 37°C und 5%CO2 kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde abhängig vom Proliferationsverhalten der Zellen ein- bis zweimal pro Woche gewechselt. Um die Zellen zu splitten wurden die adhärenten Zellen bei einer Konfluenz von 80-90% im Mikroskop nach Abnahme des Mediums durch Inkubation mit 5ml Trypsin/EDTA-Lösung für 3min bei 37°C vom Untergrund abgelöst. Die CD40L L-Zellen wurden mit 0,01% EDTA gelöst, da Trypsin den stabil transfizierten CD40-Liganden beschädigen kann. Die Suspensionszellen wurden nach visueller Dichtekontrolle im Medium abgenommen. Alle Zellen wurden in 10ml Medium resuspendiert und durch Zentrifugation bei 1600 rpm, 5 min bei Raumtemperatur pelletiert. Das Pellet wurde in frisches Medium aufgenommen, und zellzahlabhängig in einer 1:2 bis 1:10 Verdünnung in eine neue Zellkulturflasche überführt. Für den Stimulationsversuch wurden die L-Zellen und CD40L-Zellen nach dem Ablösen pelletiert und in 2ml Medium (+1%L-Glut,+1%Pen/Strep, ohne FCS) aufgenommen. Um eine Proliferation der "Feeder"-Zellen zu verhindern, wurden die Zellen mit dem Spindelgift Mitomycin C (0,01mg/ml) für 2 Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Medium (ohne FCS) gewaschen und in R-10-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden dann in einer Konzentration von  $5x10^4$  Zellen/ml in 24-well Platten ausplattiert und für mindestens 2 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank gelagert, um eine Adhärenz zu erreichen.

#### 3.3.2 Kryokonservierung und Revitalisieren von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen aus der Kulturflasche entnommen, bei 1600rpm, 5min, RT, pelletiert, in 1,5ml Einfriermedium aufgenommen und in 1,8ml fassende Einfrierröhrchen überführt. Um eine schonende Temperatursenkung zu gewährleisten wurden die Zellen in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox im Gefrierschrank auf -80°C abgekühlt, und nach 12 bis 24 Stunden in einen Stickstofftank (-196°C) überführt.

Um die Zellen aufzutauen, wurden sie nach Entnahme aus dem flüssigen  $N_2$  im Einfrierröhrchen in einem Wasserbad bei 37°C geschwenkt, danach in ein Falconröhrchen überführt und in 10ml R-10-Medium gewaschen. Es erfolgte eine Zählung und Vitalitätsbestimmung der Zellen, wonach sie in ausreichender Dichte in eine neue Zellkulturflasche gegeben wurden.

#### 3.3.3 Isolation von mononukleären Zellen

Die bei den Untersuchungen eingesetzten ALL-Zellen wurden entweder aus frischen oder aus kryokonservierten Knochenmarkaspiraten, oder aus peripheren Blutproben gewonnen, bei denen der Anteil der leukämischen Zellklone am Gesamtzellbild mehr als 80% betrug. Als Kontrolle dienten gesunde mononukleäre Zellen, die durch Seperation aus "buffy coats", frisch abgenommenen peripheren Blutproben oder aus Knochenmarkaspiraten von gesunden Spendern gewonnen wurden. Um die mononukleären Zellen zu isolieren, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation über das Fiqoll Hypaque System durchgeführt. Hierbei werden die Lymphozyten und Monozyten von den Erythrozyten und Granulozyten getrennt. Das Blut bzw. KM wurde 1:2 mit PBS verdünnt und danach vorsichtig in ein 50ml Falcon Gefäß, ohne dass sich die Phasen vermischen, im Verhältnis 1:1 (Ficoll : Zellgemisch) auf den Ficoll gegeben und bei 2000rpm, ohne Bremse, 20min bei RT zentrifugiert. Die MNC bilden im Anschluss an die Zentrifugation zwischen der Ficollflüssigkeit und dem verbliebenen Plasma eine Interphase. Die Erythrozyten und Granulozyten haben sich aufgrund ihrer Grösse und Gewicht als Pellet abgesetzt. Der Überstand wurde bis zur Interphase vorsichtig abgesaugt und die Interphase mit Hilfe einer Pipette vorsichtig abgenommen, in ein steriles, frisches Falconröhrchen überführt, in 10ml PBS gewaschen.

#### 3.3.4 Erythrozytenlyse

Die mit den mononukleären Zellen in der Interphase verbliebenen Erythrozyten, wurden durch Zugabe von 5ml Ammoniumchlorid und 3min Inkubation auf Eis lysiert und durch anschliessendes zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die so gewonnenen Zellen wurden in 12ml R-10-Medium resuspendiert.

#### 3.3.5 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Zur Bestimmung der Vitalität der Zellen wurde eine Färbung mit Trypanblau durchgeführt. Der Farbstoff gelangt über geschädigte Zellmembranen in das Zytoplasma und erlaubt so eine Unterscheidung der nicht gefärbten "vitalen" Zellen von den angefärbten "avitalen" Zellen. Die Zellen wurden anschliessend unter dem Mikroskop in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Je nach Zelldichte wurde die Zellsuspension so mit Trypanblau verdünnt, dass eine Auszählung der Zellen gut möglich war und eine repräsentative Zellzahl in der Zählkammer vorlag. Ausgezählt wurden immer alle vier großen Felder mit ihren sechzehn Unterfeldern und nachträglich die Gesamtsumme durch die vier Felder geteilt und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

#### 3.3.6 Aufreinigung von Zellpopulationen mittels "magnetic activated cell sorting"

Um eine reine Zellpopulation aus einem heterogenen Zellgemisch zu gewinnen, wurde die Methode der magnetischen Zellseperation "magnetic activated cell sorting" (MACS) angewandt. Um B-Zellen aus PB, KM, buffy coats oder Nabelschnurblut aufzureinigen, wurden die mononukleären Zellen nach Dichtegradientenzentrifugation in MACS Puffer aufgenommen (80µl Puffer/10<sup>7</sup>Zellen). Danach wurden die Zellen und mit magnetischen anti-CD19-Antikörpern, den sogenannten "beads", für 20 Minuten auf Eis inkubiert (20µl MACS-beads/10<sup>7</sup>Zellen). Die Zellsuspension wurde danach über eine MS-Säule gegeben, die in eine magnetische Halterung eingespannt war. Die Zellen, die den Antikörper gebunden hatten, wurden über die magnetischen beads an die Säule gebunden, die ungekoppelten Zellen bildeten den Durchfluss. Um die Zellen von der Säule zu lösen wurde diese aus der magnetischen Halterung genommen, wodurch die bead-gekoppelten Zellen den Halt an der Säule verlieren, und nach Zugabe von 500µl Macspuffer mit einem Stempel aus der Säule gedrückt. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und danach in R-10-Medium zur Kultivierung bzw. in Lysepuffer zur weiteren Analyse aufgenommen. Um die
Reinheit der isolierten Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen vor und nach jeder Isolation mittels Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper auf CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD66b<sup>+</sup>, und CD95<sup>+</sup> gefärbt.

#### 3.3.7 Stimulation durch CD40/CD40L-Interaktion

Die Stimulation der CD40-positiven Patientenzellen sowie auch der Zelllinien, erfolgte durch Kokultivierung mit CD40L-transfizierten Mausfibroblasten (Abbildung 3-1) Als Kontrolle wurden parallel in einem Ansatz die Zellen auf CD40-negativen L-Zellen kultiviert und in einem dritten Ansatz nur in Medium, ohne Fibroblasten (Abbildung 3-2). Die Patientenzellen wurden in einer Konzentration von 1x10<sup>6</sup> Zellen/well in 1,5ml R-10-Medium, die Zelllinien mit 0,5x10<sup>6</sup> Zellen/well in 1,5ml R-10-Medium auf die MMC-behandelten Fibroblasten gegeben. Nun wurden die Zellen für drei Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und täglich unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach drei Tagen wurden die Zellen durch vorsichtiges umspülen in den wells resuspendiert, gewaschen und entweder für die verschiedenen Analysen spezifisch weiterverarbeitet, oder für eine Apoptoseinduktion erneut ausgesät. Um einen Effekt der CD40-Stimulation auf die Oberflächenexpression von CD95 beurteilen zu können, wurden die Zellen an Tag 0 und 3 im Durchflusszytometer analysiert (CD19FITC/CD95PE).



**Abbildung 3-1: Kultivierung von Daudi-Zellen mit CD40L-transfizierten Fibroblasten.**Gezeigt wird in einem mikroskopischen Bild (x40) die Kokultivierung der Daudi-Zellen (X) auf den "Feederzellen"(O) L-Zellen (Mausfibroblasten), die mit dem CD40Liganden stabil transfiziert wurden. Die Kokultivierung erfolgte für drei Tage in R-10-Medium bei 37°C und 5%Co<sub>2</sub>.



Abbildung 3-2: Schematische Übersicht über den Versuchsaufbau zur Vorbereitung der Kokultivierung der ALL-Blasten auf CD40L transfizierten Feederzellen.

#### 3.3.8 Apoptoseinduktion

Zur Apoptoseinduktion wurden die Zellen mit CD95-Antikörper (clone CH-11) behandelt. Durch Cycloheximid wird eine Proteinsynthesehemmung und ein Arrest im Zellzyklus erreicht.

Zur Apoptoseinduktion wurden die stimulierten und unstimulierten B-Zellen nach drei Tagen aus den verschiedenen Bedingungen abgenommen, gewaschen, in frisches Medium aufgenommen und in frische 24-well Platten ( $1x10^6$  Zellen/ml/well) ausgesät.

Der Versuchsaufbau bestand aus vier verschiedenen Bedingungen:

- 1. Zellen in Medium ohne Zusätze
- 2. Zellen in Medium + anti-CD95 (CH-11) Antikörper[1µg/ml]
- 3. Zellen in Medium + anti-CD95 (CH-11)Ak[1µg/ml] + Cycloheximide [0,1µg/m]l
- 4. Zellen in Medium + *Cycloheximide (CHX)* [0,1µg/m]l

Die Zellen wurden für definierte Zeiträume (4h oder 16h) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert, danach vorsichtig resuspendiert, abgenommen, gewaschen und für Folgeanalysen zügig weggefroren.

#### 3.3.9 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, zellspezifische Strukture, Antigene auf und in den Zellen nach zu weisen. Dazu werden die Antigene mit antigenspezifischen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten monoklonalen Antikörpern angefärbt. Es lassen sich

Aussagen über das Expressionsmuster von Proteinen und Nukleinsäuren bis hin zur Detektion von Stoffwechselvorgängen machen. Zur Messung werden die Zellen aus der Zellsuspension durch eine Kapillare eingezogen, und in einer Messkammer von einem fokussierten Argonlaser ( $\lambda$ = 488nm) angeregt. Das von den gebundenen Fluoreszenzmolekülen emittierte Licht wird über Sammellinsen an drei Detektoren weitergeleitet. Der "forward scatter" (FSC) macht eine Aussage über die Größe der Zelle, der "side scatter" (SSC) über die Granularität. Der Fluoreszenz Detektor (FL) kann bei dem hier zum Einsatz gekommenen BD Facs Scan erfassen: Fluoresceinthioisocyanat (FITC), drei verschiedene Farbstoffe ein grünfluoreszierender Farbstoff, Phycoerithrin (PE, orange-rotfluoreszierend) und Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), hellrot-fluoreszierend. Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm Cell Quest (Version 5.5 von Becton Dickinson). Die Zellen werden mit bis zu drei fluoreszenzgekoppelten Antikörpern für 15min bei 4°C in Dunkelheit inkubiert, danach zweimal mit PBS gewaschen, für die Messung in 200µl PBS (1% Formaldehyd) aufgenommen und auf Eis gelagert.

#### 3.3.10 Apoptosedetektion im Durchflusszytometer

Zur Apoptosemessung wurde der Annexin V Kit gemäß herstellerangeben verwendet. Zellen, die sich im Vorgang der Apoptose befinden, verändern die Konformation verschiedener Moleküle der Zellmembran. Das Protein Phosphatidylserin (PS), welches bei vitalen Zellen innerhalb der Zytoplasmamembran lokalisiert ist, tritt als frühes Zeichen der Apoptose durch Beschädigung der Zellmembran an die Aussenseite. Das Protein Annexin-V bindet an das nun extrazellulär gelagerte PS und kann, da es fluoreszenzmarkiert ist, mit dem Durchflusszytometer bestimmt werden. Bei Zellen deren Zellwand im Rahmen der Nekrose durchlässig wird, kann Annexin-V auch in der Zelle an PS binden. Um die apoptotischen Zellen von den nekrotischen Zellen unterscheiden zu können, wurde parallel eine Propidiumiodid (PI)-Färbung durchgeführt. PI ist ein Farbstoff der ausschliesslich durch eine defekte Zellmembran in die Zelle gelangt und dort in der fragmentierten DNA-Helix interkaliert. Lebende Zellen sind also Annexin-V<sup>-</sup> und PI<sup>-</sup>, apoptotische Zellen Annexin-V<sup>+</sup> und PI<sup>-</sup> und nekrotische Zellen Annexin-V<sup>+</sup> und PI<sup>-</sup> dargestellt.

### 3.4 Molekularbiologische Methoden

#### 3.4.1 Präparation von RNA

Die Präparation der RNA erfolgte standardisiert aus Vollblut mit dem QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen) und aus ficollisierten Zellen oder Zellkulturzellen mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen), nach Angaben des Herstellers.

#### 3.4.2 DNase Verdau

Um eine Kontamination der RNA durch genomische DNA auszuschliessen, die in der PCR als falsch positive Vorlage ("template") dienen könnte, wurde ein enzymatischer Verdau verbliebener DNA mit dem RNase free DNase Set (Qiagen) durchgeführt (Tabelle 3-2). Hierbei wurde die RNA für 10min bei 25°C im Heizblock inkubiert. Der Verdau wurde durch eine elektrophoretische Auftrennung der RNA kontrolliert.

Menge	Reagenz
10µl	RDD Puffer
2,5µl	DNase I
25µl	RNA Eluat
62,5µl	H <sub>2</sub> O RNase frei

Tabelle 3-2: 1x Ansatz für Verdau

#### 3.4.3 RNA-Aufreinigung

Nach dem Verdau wurde die RNA erneut mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) durch mehrere Waschvorgänge von den Abfallprodukten der enzymatischen Reaktion befreit. Eluiert wurde die RNA in 30µl RNase freiem Wasser. Da RNA sehr anfällig für Abbauvorgänge ist, wurde darauf geachtet, dass Transporte auf Eis und die Verarbeitung möglichst schnell erfolgten. Die RNA wurde entweder direkt in die cDNA Synthese eingesetzt oder bei -80°C gelagert. Unnötiges Auftauen und erneutes Einfrieren wurde vermieden.

#### 3.4.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäuren, in diesem Fall RNA, wurde quantitativ in einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Für die Messung wurden 3µl RNA mit 47µl DEPC Wasser verdünnt und in einer Einmalküvette gemessen. Bei einem Durchmesser der Küvette von 1cm entspricht eine Absorptionseinheit (10D) einer

Konzentration von 40µg RNA pro ml. Die Reinheit der Nukleinsäure wird durch das Verhältnis der Absorptionen bei 260nm und 280nm angegeben, welches zwischen 1,8 und 2,1 liegen sollte. Die Qualität der RNA wurde ebenfalls in der Minigelektrophorese mittels Bioanalyzer überprüft.

#### 3.4.5 Reverse Transkription

In diesem Schritt wird die RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase und spezifischen Primern für Survivin und GAPDH in cDNA umgeschrieben (Tabelle 3-3). Die cDNA Synthese erfolgte mit dem Bulk First Strand cDNA Synthesis Kit nach Angaben des Herstellers. Das Reaktionsgemisch wurde für 1 Stunde bei 37°C in einem Thermomixgerät (Eppendorf, Hamburg) inkubiert, danach zur Beendigung der Reaktion auf Eis gelagert und entweder direkt in die PCR Reaktion eingesetzt oder bei -80°C eingefroren.

Menge	Reagenz
1µl	DTT
1µ1	GAPDH RT Primer (5pmol)
1µl	Survivin RT Primer (5pmol)
11µl	Bulk First Strand Mix
2µg	RNA
ad 33µl	H <sub>2</sub> O

Tabelle 3-3: 1x Ansatz für Reverse Transkription

#### 3.4.6 Konventionelle Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

In der konventionellen PCR wurden mit Hilfe von spezifischen Primern und dem Enzym Polymerase definierte Abschnitte der cDNA vervielfältigt (Tabelle 3-4). Im ersten Schritt werden die Proben auf 96°C erhitzt (denaturiert), die Doppelstränge der cDNA dadurch getrennt. Im zweiten Schritt, dem sogenannten "annealing", lagern sich die Primer bei einer spezifischen Temperatur an die entstandenen Einzelstränge an und bilden einen doppelsträngigen Startpunkt für die DNA-Polymerase. Im dritten Schritt der Elongation oder Extensionwird bei 72°C eine Temperatur erreicht, bei der eine thermostabile Taq-Polymerase aktiviert wird, die einen komplementären Strang der einzelsträngigen Matrize synthetisiert. Diese doppelsträngige DNA wird nachfolgend wiederholt durch die hohe Temperatur in zwei Einzelstränge aufgetrennt, die mit den Primern hybridisieren und durch die DNA-Polymerase in einen komplementärer Tochterstrang abgeschrieben werden. Hierdurch kommt es zu einer

exponentiellen Amplifikation der Teilstücke. Die Reaktionen erfolgen auf Eis in 0,5ml Tubes. Um eventuelle Kontaminationen der Reagenzien durch genomische oder versehentlich zugeführte cDNA auszuschliessen, wird als Negativkontrolle eine Wasserkontrolle mitgeführt.

Schritt	Zyklenanzahl	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1x	96°C	2 Min
Denaturierung		96°C	30 Sec
Annealing	35x	58°C	1 Min
Elongation		72°C	1 Min
Thermosynthese	1x	72°C	7 Min
Abkühlung	1x	4°C	00

Tabelle 3-4: Reaktionsschritte bei der konventionellen PCR

	Volumen
dNTP	1µ1
10x Puffer	5µ1
5x Puffer	10µ1
Survivivn sense	0,5µl
Survivin antisense	0,5µl
H <sub>2</sub> O	29,5µl
Taq-Polymerase	0,5µl
Template (cDNA)	3µ1
Gesamtvolumen	50µ1

	Volumen
dNTP	1µl
10x Puffer	5µl
5x Puffer	10µl
GAPDH forward	0,25µl
GAPDH reverse	0,25µl
H <sub>2</sub> O	30µl
Taq-Polymerase	0,5µl
Template (cDNA)	3µl
Gesamtvolumen	50µl

Tabelle 3-5 Survivin Mix für die konv. PCR

Tabelle 3-6 GAPDH Mix für die konv. PCR

#### 3.4.7 Quantitative "real time PCR"

Zur Quantifizierung spezifischer RNA-Mengen in den Leukämiezellen, wurde die "real time" PCR-Methode eingesetzt. Alle Reagenzien entstammten dem LC Fast Start DNA Hybridization Probes-Kit der Fa. Roche. Das Light Cycler System arbeitet mit fluoreszenzmarkierten DNA-Hybridisierungssonden. Die Technik basiert auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfers. Das FRET-System nutzt die unmittelbare Nachbarschaft (1-5 Bp) zweier fluoreszenzmarkierter Hybridisierungssonden, die spezifisch an einen jeweiligen Vorwärts- und Rückwärtsprimer binden. Dabei wird durch die Emmisionsenergie des Donormoleküls (3'Fluorescein) ein Akzeptormolekül (5'LC RED 640) angeregt, welches ein messbares Fluoreszenzsignal aussendet, das proportional zur Amplifikation der synthetisierten PCR-Produkte zunimmt. Die Reaktion läuft in einer 20µl fassenden Glaskapillare ab, die im Light Cycler in einem rotierenden Karussell positioniert ist. Der Vorteil der Glaskapillare ist ein günstiges Verhältnis von Oberfläche zu Volumen; sie gewährleistet so eine optimale und schnelle Temperaturregulation. Im Gegensatz zur konventionellen PCR können die Zyklen in wesentlich kürzerer Zeit durchgeführt werden. Die Fluoreszenz wird in einem Rotationsverfahren für jede Kapillare nach jedem Zyklus gemessen, so dass eine Kinetik der amplifizierten Fragmente anhand der Fluoreszenzentwicklung ermittelt werden kann. Zur Vorbereitung wurden vier Stammlösungen der Reaktionsgemische jeweils mit den Primern für das Housekeeping-Gen GAPDH, Survivin sowie den Splicevarianten Survivin 2B und Survivin-∆Exon3 angesetzt. Alle Schritte wurden gekühlt, im dazugehörigen Aluminiumblock bzw. auf Eis durchgeführt. Im letzten Schritt wurde die cDNA als Template bzw. Wasser als Negativkontrolle zu dem Reaktionsgemisch hinzupipettiert. Als weiterer Schutz vor Kontaminationen wurde in diesem System Uracil-N-Glykosylase (UNG) eingesetzt und dTTP durch dUTP ersetzt. Dies ermöglicht einen selektiven enzymatischen Verdau potentiell kontaminierender dUTP-haltiger Amplifikate. Vor dem PCR-Lauf wurden die Proben deshalb für 10 min bei RT (optimale Reaktionstemperatur der Uracil-DNA-Glykosylase) inkubiert. Bei jedem PCR-Lauf wurden GAPDH-Plasmide von 10<sup>4</sup> bis 10<sup>9</sup> Kopien mitamplifiziert und eine GAPDH-Standardkurve erstellt. Die Standardkurve diente als Bezugspunkt zur Quantifizierung. Zum Ausschluß potentieller Kontaminationen wurde eine Wasserkontrolle mitgeführt.

	Volumen
dUTP Glykosylase	1µl
10x fast start Mix	2µl
MgCl2	1,6µl
Survivivn F	2µl
Survivin R,2B,Ex3	2µl
H <sub>2</sub> O	4µl
Surv LC Sonde	2,7µl
Surv FL Sonde	2,7µl
cDNA	2µl
Gesamtvolumen	20µl

Volumen dUTP Glykosylase 1µl 10x fast start Mix 2µ1 MgCl2 1,6µl GAPDH F 2µ1 2µ1 GAPDH R H<sub>2</sub>O 2,4µl GAPDH LC Sonde 2,7µl 2,7µl GAPDH FL Sonde Standard 5µl 2µl+3µl  $cDNA (+3\mu lH2O)$ 20µl Gesamtvolumen

Tabelle 3-7: Survivin und Splice Varianten Mix für die "real-time" PCR

 Tabelle 3-8: GAPDH Standard und Proben Mix

 für die "real-time" PCR

Schritt	Zyklenanzahl	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1x	96°C	10 Min
Denaturierung		96°C	30 Sec
Annealing	50x	58°C	1 Min
Elongation	JUX	72°C	1 Min
		95°C	1 sec
Schmelzkurve	1x	45°C	60sec
		85°C	1sec
Abkühlung	1x	4°C	30

Tabelle 3-9: Reaktionsschritte "real-time" PCR

#### 3.4.8 Proteinchemische Methoden

#### 3.4.8.1 Survivin ELISA

Die in Leukämiezellen vorhandene Survivin Proteinmenge wurde in einem ELISA bestimmt. Dazu wurden 1x10<sup>6</sup> Zellen gewaschen (gemäss 3.4.9.1) und in 100µl Lysepuffer (gemäss 3.2.3.2) resuspendiert. Die Proben wurden entweder direkt weiterverwendet oder aber bei -20°C gelagert. Zunächst wurde der "capture" Antikörper gemäss den Herstellerangaben in einem Volumen von 100µl/well (0,4 µg/ml) auf eine 96 well Platte pipettiert und bei 4°C über Nacht beschichtet. Nachdem die Platte viermal gewaschen wurde erfolgte eine Inkubation mit einem "Blocking"-Puffer (1% BSA und 1M Urea), um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Gemäss Herstellerangaben wurden pro Well 16,6µl Proteinlysat mit dem ELISA-Probenverdünnungspuffer auf 100µl Volumen aufgefüllt und nach einem weiteren Waschschritt ausgesät. Es folgte eine Inkubation für 2h bei 37°C im Inkubator. Im Anschluss an drei weitere Waschvorgänge erfolgte die Zugabe von 100 ng/ml biotinyliertem Survivin Detection Antikörper für 2h und nach einem erneuten Waschschritt die Zugabe einer streptavidinkonjugierten Meerrettich-Peroxidase für 20 min. Die Reaktion wurde durch 100µl/well 3,3', 5,5'-Tretramethylbenzidin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestartet und nach 20 min mit 50µl einer 0,5M Schwefelsäure gestoppt. Die Proteinbestimmung erfolgte über Absorptionsmessung in einen Plattenreader bei 450nm, die Auswertung mit der Magellan® Software. Die relative Survivinkonzentration (pg/ml) wurde anhand einer Standardkurve bestimmt. Als Standardkurve diente eine seriell verdünnte Survivinstandard. Als Negativkontrolle wurde ein Doppelansatz mit allen in den Proben enthaltenen Reagenzien ohne Zelllysat oder Standardlösung auf die Platte pipettiert.

#### 3.4.8.2 Lumineszenzassay Caspase-3/-7, Caspase-8

Zum Nachweis der Caspasen Aktivierung wurde der Caspase-Glo-Assay der Fa. Promega verwandt. Die Zellen wurden für die Lumineszenzmessung in einer weißen 96-well Platte mit 1x10<sup>4</sup>Zellen/well für den Caspase-3/-7 und 2,5x10<sup>4</sup> Zellen/well für den Caspase-8 Assay in je 100µl Medium ausplattiert. Nach Zugabe von 100µl Reaktionssubstrat wurden die Zellen zur Durchmischung 15 Sekunden geschüttelt und danach bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Anschliessend wurde die enzymatische Aktivität anhand der Lumineszenz gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der "Ascent Lumino Scan Software".

#### 3.4.9 SDS Polyacrylamid Gelektrophorese

Aufgrund ihrer Ladung können Proteine im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dabei entscheiden Ladung, Masse und Konformation die jeweilige Richtung im Feld und damit die Wanderungsstrecke. Polyacrylamid, ein verzweigtes Polymer, dient hier als eine Matrix, in dem die Proteine proportional zu ihrer Masse abgebremst werden. Durch die Zugabe von SDS werden die Proteine nach ihrer Grösse, nicht aber nach ihrer Ladung aufgetrennt. SDS verursacht ein hohe negative Nettoladung und verändert die native Konformation der Proteine durch Denaturierung, so dass alle Proteine eine ähnliche Konformation aufweisen.

#### 3.4.9.1 Probenverarbeitung

Zur Isolierung des Gesamtproteins wurden ALL-Zellen nach ihrer Aufreinigung aus PB oder KM mittels Ficoll isoliert. Die Zelllinienzellen wurden aus der aus der Zellkulturflasche entnommen. Die Zellen wurden im ersten Schritt mit PBS gewaschen und bei 1600rpm für 5min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20µl Lysepuffer unter Zugabe der Proteinaseinhibitoren PMSF, Natrium Vanadat und SPI aufgenommen und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Zelllysat in der vorgekühlten Zentrifuge bei 14000 rpm/min bei 4°C für 15 min abzentrifugiert, der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und eine Proteinbestimmung (s.u.) durchgeführt. Zeitnah wurde dem Lysat der 5-fach Laufpuffer zugefügt, danach für 3 min bei 100°C aufgekocht und auf Eis abgekühlt. Die Proben wurden entweder direkt in einen Gellauf eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

#### 3.4.9.2 Proteinbestimmung

Um vergleichbare Proteinmengen auf das Gel aufzutragen, wurde eine Proteinbestimmung der Proben mit dem "BCA Assay" der Fa. Pierce nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Auswertung erfolgte photometrisch mit dem "ELISA reader" der Fa. Tecan bei 492 nm. Die Auswertung erfolgte mit der Magellan Software.

#### 3.4.9.3 Polyacrylamid-Gel:

Zur Trennung von Proteingemischen im diskontinuierlichen SDS-Gel wurden die Proteine erst über ein 5%-iges Sammelgel (pH 8,8) fokussiert, anschließend über ein 12% Trenngel (pH 6,8) aufgetrennt.

Reagenz	Menge
H <sub>2</sub> O	3,3 ml
30% Acrylamid	4,0 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml
10% APS	0,1 ml
TEMED	0,004 ml

Tabelle 3-10: Zusammensetzung Trenngel: 12% Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid Gel

Zur Herstellung des Trenngels wurden die einzelnen Reagenzien (Tabelle 3-10) in ein Falconröhrchen gegeben, zum Start der Polymerisation wurde TEMED zuletzt hinzupipettiert. Das Gel wurde nun zügig, in die vorbereitete Gelkammer gegossen und mit 1ml Isopropanol überschichtet, um eine plane Oberfläche zu erhalten. Nach ca. 30 min polymerisiert das Gel und das Isopropanol konnte wieder entfernt werden.

Reagenz	Menge
H <sub>2</sub> O	2,1 ml
30% Acrylamid	0,5ml
1 M Tris (pH 6,8)	0,38ml
10% SDS	0,03ml
10% APS	0,03ml
TEMED	0,003ml

Tabelle 3-11: Zusammensetzung 4% Sammelgel (3ml):

Anschliessend wurde das Trenngel mit dem Sammelgel (Reagenzien siehe Tabelle 3-11) überschichtet und ein Kamm eingesetzt.

#### 3.4.9.4 Gellauf

Die Gelkammer wurde mit ca. 900ml Laufpuffer aufgefüllt und das Gel vorsichtig eingesetzt. Zur gelelektrophoretischen Auftrennung wurden je nach Ausgangsmaterial (Zelllinie, Patientenzellen) zwischen 10 und 20 µg Protein pro Tasche auf das Gel aufgetragen. Zur Bestimmung der Größe der aufgetrennten Proteine, wurde auf jedem Gel ein Molekulargewichtstandard mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanten 35mA über 1h.

#### 3.4.10 Western Blot

Zum Proteintransfer aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran, wurde die Methode des Nassblotting verwendet. In einer mit 900ml Transfer-Puffer gefüllten Blotting Kammer wurden bei 100mA über 1h die Proteine auf die Membran überführt. Die Membran wurde anschließend vorsichtig vom Gel befreit, mit PBST gewaschen und um unspezifische Proteinbindungstellen auf der Membran zu blockieren, für mindestens eine Stunde mit 5% Magermilch bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBST für je 10 Minuten, folgte die Zugabe des Primärantikörpers (Konzentration nach Angaben des Herstellers) hinzu zugegeben. Die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C, danach wurde der Blot erneut dreimal 10 Minuten mit PBST gewaschen, und für mindestens eine Stunde mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterem dreimaligen Waschvorgang wurde der Blot zur Detektion für 1 Minute in ECL Reagenz bei Dunkelheit inkubiert. Die Luineszenz wurde mittels eines Röntgenfilmes detektiert. Und in einem konventionellen Entwicklergerätes sichtbar gemacht.

#### 3.4.11 Statistische Analyse

Die Unterscheidung der Expressionslevel und spezifischen Ergebnisse in den verschiedenen Zellen und Zelllinien wurden mit dem Mann-Whitney Test erstellt und nach Bonferoni adjustiert. Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe des SPSS Programm (Version 12.0) ausgewertet. Ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant definiert. Die Cox-Analyse ist ein Regressionsmodell, welches zur Modellierung von Überlebenzeiten in der Überlebensanalyse genutzt wird. Mittels Kaplan Meyer Analyse erfolgte die statistische Analyse zur Dokumentation von Überlebensraten der untersuchten Patienten.

## 4 Ergebnisse

# 4.1 Untersuchung der CD95-vermittelten Apoptose in den unreifen Lymphom-Zelllinien Daudi und Raji

## 4.1.1 Untersuchung der CD95-Expression in CD40-stimulierten Daudi- und Raji-Zellen

In einem ersten Schritt erfolgte die Untersuchung des todesrezeptorvermittelten Apoptosepathways und einer Modulation der CD95-vermittelten Apoptose nach Reifungsstimulus durch CD40-Ligand in den unreifen Lymphomzelllinien Daudi und Raji. Diese beiden Zelllinien wurden zur Methodenetablierung für die späteren Experimente mit primären Vorläufer-B-ALL-Blasten ausgewählt, da sie aufgrund ihrer Oberflächenmarkerexpression dem unreifen Phänotyp (CD10/19) von Leukämiezellen ähneln. Zunächst wurde die **CD95-Expression** auf den unreifen **B-Zellen** untersucht. Die durchflusszytometrische Analyse (s. 3.3.9) der beiden Zellinien ergab bei den Daudi-Zellen nur eine geringe Oberflächenexpression von CD95 (~25%), auf Raji-Zellen wurde hingegen eine hohe CD95-Expression nachgewiesen (>80%) (Abbildung 4-1). Beide Zelllinien wurden für drei Tage auf CD40L-positiven L-Zellen, auf CD40L-negativen L-Zellen und als weitere Kontrolle ohne L-Zellen ausgesät. Die Kontrollen mit CD40-negativen L-Zellen und ohne Feederzellen wurden durchgeführt um eine Beeinflussung durch die Feederzellen auszuschliessen (s. 3.3.7). Nach CD40-Stimulation zeigte sich bei den Daudi-Zellen eine deutliche Hochregulation von CD95 (>80%). Demgegenüber war eine initial schon hohe CD95-Expression (>80%) auf den Raji-Zellen durch die CD40- Stimulation nicht weiter zu steigern (Abbildung 4-1).



Abbildung 4-1: Durchflusszytometrische Analyse unstimulierter und CD40-stimulierter Daudi und Raji-Zellen Die Daudi und Raji-Zellen wurden nach 3-tägiger Kultivierung auf L-Zellen bzw. CD40L-L-Zellen mit einem monoklonalen anti-CD95-Ak angefärbt und die CD95-Expression durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt ist die CD95-Expression im Balkendiagramm. Bei den Daudi-Zellen zeigt sich eine initial niedrige CD95-Expression die nach CD40-Stimulation deutlich zunimmt, bei den Raji Zellen zeigt sich ein Effekt der initial schon hohen CD95-Expression nach CD40-Stimulation. Gezeigt werden die Ergebnisse aus jeweils fünf Versuchen (n=5).

Nach Apoptoseinduktion (s. 3.3.8) der beiden Zelllinien durch "Crosslinking" mit monoklonalem CD95-Antikörper zeigte sich nach durchflusszytometrischer Analyse (s. 3.3.10) bei den CD40-stimulierten Daudi-Zellen ein Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zu den unstimulierten Zellen um ca. 20%. In den CD40-stimulierten Raji-Zellen war nach Apoptoseinduktion der Prozentsatz apoptotischer Zellen ebenfalls nur geringfügig höher (30% vs. 20%) als im unstimulierten Ansatz. In den CD40-stimulierten Daudi Zellen liess sich der Anteil apoptotischer Zellen durch die Kombination von CD95-Antikörper und CHX um 10% nur leicht steigern. Bei den CD40-stimulierten Raji-Zellen konnte die Zugabe von Cycloheximid die Apoptoserate der Zellen um 30% auf 60% jedoch deutlich steigern (Daten nicht gezeigt).

## 4.1.2 Untersuchung der Expression von Molekülen die an der "death-inducingsignaling-complex"-(DISC)-Bildung und dem Ablauf der Apoptosekaskade in Daudi- und Raji-Zellen beteiligt sind

Nun wurde untersucht, wie die rezeptornahen, an der "death-inducing-signaling-complex" (DISC)-Bildung beteiligten Moleküle in der CD95-vermittelten Apoptosekaskade nach CD40-Stimulation in Daudi und Raji moduliert werden. Von besonderem Interesse waren die Modulationen der am DISC-beteiligten Moleküle FADD, Procaspase-8 und c-FLIP sowie die an der Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen "pathways" lokalisierte Effektorcaspase-3. Außerdem wurden die am Ablauf des mitochondrialen Apoptosepathway beteiligten Moleküle bcl-2, bcl-x sowie Bax überprüft. Die Versuche erfolgten wie in 3.3.7

beschrieben in drei Ansätzen Nach CD40-Stimulation wurden die Zellen aus den drei Ansätzen für die nachfolgende Western-Blot-Analyse (s. 3.4.9.1) aufgearbeitet. Die hergestellten Zelllysate wurden (s. 3.4.9.4) in einer SDS-PAGE aufgetrennt und eine Western-Blot-Analyse (s. 3.4.10) durchgeführt. Es zeigte sich, dass die beiden DISC-nahen Moleküle FADD und Procaspase-8, sowie die distale zymogene Proform der Caspase-3 in unstimulierten als auch in CD40-stimulierten Daudi-Zellen konstitutiv exprimiert wurden. In einer parallel durchgeführten Aktivitätsmessung der Caspase-8 und der Caspasen-3/-7 mittels Lumineszenzassay wurde ebenfalls keine Aktivierung detektiert. In den unstimulierten Daudi-Zellen war nur eine sehr schwache FLIP short und eine nur marginale Expression von FLIP long nachweisbar. In den CD40-stimulierten Daudi-Zellen erfolgte allerdings eine deutliche Hochregulation von FLIP long und FLIP short (Abbildung 4-2). Die Hochregulation war hierbei für die Isoform *short* deutlich stärker als die für c-FLIP *long*. Eine Expression des im mitochondrialen Apoptosepathway lokalisierten antiapoptotischen Moleküls bcl-2 wurde weder in stimulierten noch unstimulierten Daudi-Zellen nachgewiesen (Abbildung 4-2). Die konsitutive Expression von bcl-XL und bax wurde nach CD40-Stimulation der Daudi-Zellen nicht moduliert (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 4-2: Western-Blot-Analysen unstimulierter und CD40-stimulierter Daudi-Zellen. Die Western-Blot-Analysen mit Proteinlysat aus unstimulierten und CD40-stimulierten Daudi-Zellen zeigen die Expression der Caspasen 8 und –3 und FADD sowie der beiden Isoformen *FLIP long* und short. Das anti-apoptotische Protein bcl-2 wurde nicht exprimiert. Als Kontrolle diente Proteinlysat aus Daudi-Zellen, die ohne Fibroblasten kultiviert worden waren. (Ko= Kontrolle ohne Fibroblasten, LZ=Kokultivierung mit CD40L negativen Fibroblasten, CD40L= Kokultivierung mit CD40L postiven Fibroblasten). Gezeigt sind exemplarisch zwei Western-Blot-Analysen. In den Raji-Zellen zeigte sich in den Western-Blot-Analysen, im Unterschied zu den Daudi-Zellen, für keines der zuvor beschriebenen Moleküle (FADD, Procaspase-8, Procaspase-3, FLIP, bcl-2, bcl-xl, bax) eine Modulation durch die CD40-Stimulation (Abbildung 4-3). Die Moleküle wurden bereits in unstimulierten Raji-Zellen exprimiert. Die Expression von FLIP long und –short war stabil und in einem ausgeglichenen Verhältnis. Interessant war eine diskrepante Expression der kurzen Isofrom von c-FLIP in den Daudi und Raji Zellen. In den Daudi Zellen wurde die klassische FLIP short und in den Raji-Zellen die FLIP-R Form nachgewiesen. Es lag jeweils nur eine antiapoptotisch wirksame "kurze" Form von c-FLIP vor, keine der beiden Zelllinien exprimierte "short" und "–R".



Abbildung 4-3: Western-Blot-Anaylsen unstimulierter und CD40-stimulierter Raji-Zellen. Die Western-Blot-Analysen mit Proteinlysat aus unstimulierten und CD40-stimulierten Raji-Zellen zeigen die Expression der Caspasen 8 und –3 und FADD sowie der beiden Isoformen *FLIP long* und R. Im Gegensatz zu Daudi-Zellen zeigte sich eine deutliche Expression des anti-apoptotischen Proteins bcl-2. Als Kontrolle diente Proteinlysat aus Raji-Zellen, die ohne Fibroblasten kultiviert worden waren. (Ko=Kontrolle ohne Fibroblasten, LZ=Kokultivierung mit CD40L negativen Fibroblasten, CD40=Kokultivierung mit CD40L-positiven Fibroblasten). Gezeigt sind exemplarisch zwei Western-Blot-Analysen.

## 4.1.3 Untersuchung der CD95-vermittelten Apotose in CD40-stimulierten Daudi und Raji Zellen

In den folgenden Experimenten wurde die Expression der beschriebenen Apoptosemodulierenden Moleküle in den beiden Zelllinien Daudi und Raji nach Induktion CD95vermittelter Apotose untersucht. Dazu wurden die beiden Zellinien Daudi und Raji nach einer dreitägigen CD40-Stimulation für 16 Stunden mit dem monoklonalen anti-CD95 Antikörper inkubiert (s. 3.3.8). Als Kontrolle wurden unstimulierte Zellen und Zellen ohne Kokultivierung auf L-Zellen eingesetzt. Anschliessend erfolgte eine Proteinextraktion (s. 3.4.9.1) aus den Zellen der verschiedenen Ansätze. Die Western-Blot-Analyse der verschiedenen Proteinlysate zeigte, dass nach CD95-induzierter Apoptose in unstimulierten, als auch in CD40-stimulierten Daudi-Zellen eine partielle Spaltung von FLIP *long* in das Spaltprodukt p43 nachweisbar war. FLIP short wurde durch die Einleitung der CD95vermittelten Apoptose nicht reguliert. Eine Spaltung der DISC-nahen zymogenen Caspase-8 und der distalen Procaspase-3 in die aktiven Untereinheiten wurde in der Western-Blot-Analyse ebenfalls nicht detektiert (Abbildung 4-5), was sich durch eine unveränderte Caspasenaktivität im begleitend durchgeführten Lumineszenzassay bestätigte (Daten nicht gezeigt).

In den Raji-Zellen wurde analog zu den Daudi-Zellen in allen Kultivierungsbedingungen eine Spaltung von FLIP *long* in die p43-Form nachgewiesen. Die FLIP-R Expression wurde durch die CD40-Stimulation nicht reguliert. Im Gegensatz zu Daudi-Zellen zeigte sich nach CD95-induzierter Apoptose in unstimulierten und CD40-stimulierten Raji-Zellen eine Spaltung der inaktiven Proformen von Caspase-8 und -3. Caspase-8, als Proform mit einem apparenten Gewicht von 55kDa vorliegend, wurde in den Raji-Zellen nach CD95-induzierter Apoptose in allen Versuchsbedingungen in die aktive Form (p18+p10) gespalten. Bei der Caspase-3 wurde die zymogene 32kDa grosse Proform nach Zugabe des CD95-Antikörpers in die 17 kDa schwere, aktive Form der Caspase-3 gespalten. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 4-6 dargestellt. Die Aktivierung der Caspase-8 und der Caspasen-3/-7 bestätigte sich in der Lumineszenzbestimmung durch eine Aktivitätszunahme (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 4-4: Expression von c-FLIP, Caspase-8 und –3 nach dreitägiger CD40-Stimulation und 16 stündiger Inkubation mit anti-CD95-Ak in Daudi-Zellen. Die Western-Blot-Analyse zeigt die Spaltung von *FLIP long* in die p43 Form nach CD95-induzierter Apoptose in CD40-stimulierten Zellen (CD40). Weder Caspase-8 noch Caspase-3 wurden nach Apoptoseinduktion gespalten. Die Zugabe des anti-CD95-Ak ist mit einem + , die Kontrollansätze sind mit einem – gekennzeichnet. Als weitere Kontrolle wurden Zellen nach Kultivierung mit L-Zellen (LZ) und Zellen ohne L-Zell-Kokultivierung (Kontrolle) überprüft. Dargestellt sind exemplarisch die Western-Blot-Anaylsen aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten.



Abbildung 4-5: Expression von c-FLIP, Caspase-8 und -3 nach dreitägiger CD40-Stimulation und 16 stündiger Inkubation mit anti-CD95-Ak in Raji-Zellen Die Western-Blot-Analyse zeigt die Spaltung von FLIP long in die p43 Form nach CD95-induzierter Apoptose sowohl in CD40-stimulierten als auch in unstimulierten Zellen. Die Spaltung war zudem auch in Raji-Zellen, die nicht auf L-Zellen kultiviert worden waren, nachweisbar. Eine Regulation von FLIP-R war nicht zu detektieren. Eine Spaltung der Caspasen-8 und -3 wurde nach Zugabe von anti-CD95-Ak in allen drei Versuchsbedingungen nachgewiesen. In Blot 2 liess sich die aktive gespaltene Form der Caspasen nachweisen, die in Blot 1 nicht sichtbar wurde, da in diesem Experiment ein anderer Antikörperklon zur Detektion der Spaltform verwendet worden war. Die Zugabe des anti-CD95-Ak ist mit einem + , die Kontrollansätze sind mit einem gekennzeichnet. Als weitere Kontrolle wurden Zellen nach Kultivierung mit L-Zellen (LZ) und Zellen ohne L-Zell-Kokultivierung (Kontrolle) überprüft.

## 4.1.4 Effekt von Cycloheximid auf die CD95-vermittelte Apoptose in CD40stimulierten Daudi und Raji Zellen

Durch die Zugabe des Proteinsynthesehemmers Cycloheximid (0,1mg/ml) zu den in 4.1.3 beschriebenen Versuchsansätzen kam es in den beiden CD40-stimulierten Zellinien Daudi und Raji zu einer Abnahme der Expression von c-FLIP. In den CD40-stimulierten Daudi-Zellen scheint nach Zugabe von CHX die kurze antiapoptotische Isoform Flip short weiterhin zu überwiegen. In den CD40-stimulierten Raji-Zellen hingegen, kommt es zu einem Überwiegen der proapoptotischen Flip long Isoform (Abbildung 4-6).



Abbildung 4-6 Expression von c-FLIP nach Zugabe von Cycloheximid zu den CD40-stimulierten Daudiund Raji-Zellen Dargestellt ist in zwei exemplarischen Westernblots die Expression von Flip long und short nach Zugabe vom CHX in CD40-stimulierten Daudi- und Raji-Zellen. Es zeigt sich nach Zugabe von CHX eine Abnahme der Expression beider Flip-Isoformen in beiden Zellinien.

## 4.2 Untersuchung zur CD95-vermittelten Apoptose in CD40-stimulierten primären Vorläufer-B-Zell-Leukämieblasten von Kindern

## 4.2.1 Untersuchung der DISC ("Death-inducing-signaling-complex")-assoziierten Moleküle in Vorläufer-B-ALL-Blasten

Analog zu den an den beiden Lymphomzellinien durchgeführten Experimenten wurden in den folgenden Versuchen Vorläufer-B-ALL-Blasten von Kindern untersucht. Tröger at al. (2007) aus unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass CD95 auf ALL-Blasten nicht exprimiert wird, sich jedoch nach CD40-Stimulation deutlich hochregulieren lässt [48]. Dieser Befund ist analog zu normalen B-Zellen bei denen CD95 ebenfalls erst nach CD40-Stimulation exprimiert wird. Im Gegensatz zu normalen B-Zellen liess sich jedoch die Apoptose in CD40stimulierten Vorläufer-B-ALL-Blasten nach Zugabe von anti-CD95-Ak nur in geringem Ausmass induzieren. Dieser Befund veranlasste in der vorliegenden Arbeit dazu die Regulation verschiedener an der Apoptose-beteiligten Moleküle in ALL-Blasten zu untersuchen. Vorläufer-B-ALL-Blasten sowie normale B-Zellen wurden hierzu für 3 Tage auf CD40L-positiven bzw. –negativen L-Zellen kultiviert (s. 3.3.7) und aus diesen so kultivierten Zellen Proteinextrakte hergestellt. Die Kultivierung auf den Feeder-Zellen erfolgte um einen Proliferationsstimulus auszulösen, da die nativen Vorläufer-B-ALL-Blasten ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren nur wenige Tage in Kultur gehalten werden können. Die als Kontrolle verwendeten B-Zellen wurden aus Buffy Coat gesunder Spender durch Positivselektion isoliert (s. 3.3.3 und 3.3.6). Es wurden reife B-Zellen verwendet, da die unreifen B-Zell-Vorstufen die den Vorläufer-B-ALL-Blasten vom Reifungsstadium ähnlicher sind, nur in äusserst geringen Mengen im Knochenmark vorkommen und deshalb nicht in ausreichender Anzahl zur Verfügung standen. Nach einer SDS-PAGE (s. 3.4.9.4) wurde eine Western-Blot-Analyse (s. 3.4.10) durchgeführt. Es zeigte sich sowohl für unstimulierte als auch für CD40stimulierte ALL-Blasten eine Expression der zymogenen Proform der Caspase-8 sowie von FADD (Abbildung 4-7). Die konstitutive Expression der Moleküle war ebenfalls in normalen B-Zellen nachweisbar. Abbildung 4-7 und Abbildung 4-8 zeigen die Western-Blot-Analyse exemplarisch für insgesamt fünf untersuchte ALL-Patienten und vier Normalpersonen.



Abbildung 4-7: Western-Blot-Analyse unstimulierter und CD40-stimulierter ALL-Blasten und normaler B-Zellen mit Ak zur Detektion der Procaspase 8 und FADD. Proteinlysate von unstimulierten (-) und CD40stimulierten (+) ALL-Blasten und normalen B-Zellen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit monklonalen Ak gegen die Procaspase-8 und FADD detektiert. Gezeigt sind exemplarisch die Ergebnisse aus insgesamt fünf getesteten ALL-Patienten und vier Gesundkontrollen.

Nach Untersuchung der Apoptose-induzierenden Moleküle wurde anschliessend die Expression von c-FLIP als Apoptose-inhibierender Faktor in unstimulierten sowie CD40stimulierten ALL-Blasten (n=8) in Western-Blot-Analysen überprüft. Im Vergleich dazu wurde die c-FLIP Expression in normalen B-Zellen untersucht. Die durchgeführten Western-Blot-Analysen ergaben, dass c-FLIP long in malignen als auch in normalen B-Zellen sowohl in unstimuliertem wie stimuliertem Zustand in gleicher Weise exprimiert wurde. FLIP short und FLIP-R waren in unstimulierten ALL-Blasten als auch in unstimulierten normalen B-Zellen kaum exprimiert. Nach CD40-Stimulation zeigte sich für ALL-Blasten eine deutliche Hochregulation von FLIP short und FLIP-R. Im Gegensatz dazu liess im Falle von FLIP short nur eine schwache Hochregulation in CD40-stimulierten normalen B-Zellen nachweisen. FLIP-R wurde in keinem der Versuche in den gesunden B-Zellen detektiert (Abbildung 4-8).



Abbildung 4-8: Western-Blot-Analyse unstimulierter und CD40-stimulierter ALL\_Blasten und normaler B-Zellen mit Ak gegen die *FLIP* Isoformen. Proteinlysate von unstimulierten (-) und CD40-stimulierten (+) ALL-Blasten und normalen B-Zellen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit monklonalen Ak gegen die Isoformen c-FLIP long, FLIP short und FLIP-R detektiert. Gezeigt sind exemplarisch die Ergebnisse aus insgesamt fünf getesteten ALL-Patienten und vier Gesundkontrollen.

In einem weiteren Experiment wurde die Modulation von c-FLIP long und FLIP short sowie der Procaspase-8 in normalen CD40-stimulierten und unstimulierten B-Zellen nach CD95induzierter Apoptose überprüft. Normale B-Zellen wurden hierfür zur Apoptoseinduktion nach 3-tägiger Kokultivierung mit CD40-L- bzw. L-Zellen (gemäss 3.3.7) für 16h mit einem anti-CD95-Ak inkubiert (gemäss 3.3.8) und danach Proteinlysat hergestellt (gemäss 3.4.9.1). Die anschliessend durchgeführte Western-Blot-Analyse zeigte, dass in unstimulierten normalen B-Zellen auch nach Zugabe von anti-CD95Ak weder eine Spaltung von c-FLIP long noch der Procaspase-8 nachweisbar war. Die schwache FLIP short-Expression blieb in unstimulierten B-Zellen auch nach Apoptoseinduktion bestehen. Im Gegensatz dazu zeigten CD40-stimulierte B-Zellen nach Induktion der CD95-vermittelten Apoptose eine Spaltung von FLIP long in das Spaltprodukt p43 und eine Spaltung der Procaspase-8 in aktive Caspase-8. Die Spaltprodukte waren nicht nachweisbar, wenn keine Zugabe von anti-CD95Ak erfolgte. Abbildung 4-9 zeigt exemplarisch eine Western-Blot-Analyse für insgesamt vier voneinander unabhängig durchgeführte Analysen in B-Zellen von gesunden Spendern.



Abbildung 4-9: Western-Blot-Analyse unstimulierter und CD40-stimulierter normaler B-Zellen nach Apoptoseinduktion mit anti-CD95-Ak. Normale unstimulierte und CD40-stimulierte normale B-Zellen wurden entweder mit (+) oder ohne (-) Zugabe von anti-CD95-Ak für 16h inkubiert und Proteinlysate hergestellt. In der nachfolgend durchgeführten Western-Blot-Analyse wurden Ak gegen c-FLIP long, FLIP short, die Procaspase-8 und die aktive Form der Caspase-8 wurden zur Detektion verwendet. Gezeigt sind exemplarisch die Ergebnisse aus insgesamt vier getesteten Gesundkontrollen.

Analog zu den getesteten normalen B-Zellen wurde die Modulation von c-FLIP long, FLIP short und FLIP-R in unstimulierten und CD40-stimulierten ALL-Blasten nach Apoptoseinduktion mit anti-CD95-Ak untersucht. Im Gegensatz zu den normalen B-Zellen wurde FLIP long weder in den unstimulierten noch in den CD40-stimulierten Vorläufer-B-ALL-Blasten nach Zugabe von anti-CD95-Ak in die p43-Form gespalten. Die FLIP short und –R-Expression blieb in den CD40-stimulierten Vorläufer-B-ALL-Blasten auch nach Apoptoseinduktion unverändert bestehen. Abbildung 4-10 zeigt exemplarisch eine Western-Blot-Analyse für insgesamt fünf voneinander unabhängig durchgeführte Analysen.

Gemäss dem in 3.3.8 beschriebenen Versuchsaufbau wurden die unstimulierten und CD40stimulierten Vorläufer-B-ALL-Blasten in insgesamt vier Ansätzen inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen nach CD40 Stimulation im ersten Ansatz nur mit Medium, im zweiten Ansatz mit anti-CD95-Ak, im dritten Ansatz in Kombinbation von anti-CD95-Ak mit Cycloheximid ( $o,1\mu g/ml$ ) und in einem vierten Ansatz nur mit CHX kultiviert. Die Zugabe von CHX bewirkte eine Abschwächung der Banden für die kurzen Formen von FLIP. FLIP short zeigt eine leichte Abnahme, wohingegen FLIP-R nach Zugabe von CHX nahezu nicht mehr nachweisbar ist (Abbildung 4-10).



Abbildung 4-10: Expression von c-FLIP in CD40-stimulierten Vorläufer-B-ALL-Blasten nach "crosslinking" mit CD95 und Zugabe von Cycloheximid (CHX). CD40 aktivierte ALL-Zellen wurden mit CD95 Antikörper inkubiert, zusätzlich unter An- oder Abwesenheit von  $0,1\mu$ g/ml des Proteinsynthesehemmers CHX. Die Expression der long und short Isoformen von c-FLIP wurden in der Westernblot-Analyse untersucht. Es zeigte sich die Abschwächung der kurzen FLIP Isoformen, insbesondere von FLIP-R

Die Aktivität der Procaspase-8 und der Procaspase-3 wurde in unstimulierten und CD40stimulierten normalen B-Zellen und ALL-Blasten mit und ohne anti-CD95-Ak-Zugabe in einem Lumineszenzassay (s. 3.4.8.2) untersucht. Es wurden unstimulierte und CD40stimulierte normale B-Zellen mit B-ALL Blasten verglichen. Abbildung 4-11 zeigt den Aktivitätsanstieg nach Apoptoseinduktion durch anti-CD95-Ak in CD40-stimulierten ALL-Blasten bzw. normalen B-Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Es zeigte sich für beide Caspasen eine deutlich höhere Aktivität in normalen CD40-stimulierten B-Zellen im Vergleich zu CD40-stimulierten ALL-Blasten. Die Spaltung der Caspasen-8 und –3 konnte im Westernblot weder für die normalen B-Zellen, noch für die ALL-Blasten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 4-11: Lumineszenzaktivität der Caspase-8 und –3 in unstimulierten und CD40-stimulierten normalen B-Zellen und Vorläufer-B-ALL-Blasten nach Apoptoseinduktion mit monoklonalem anti-CD95-Ak. Bei den ALL-Blasten zeigt sich ein deutlich stärkerer Anstieg der Lumineszenzaktivität nach Zugabe von anti-CD95-Antikörper in den CD40-stimulierten normalen B-Zellen, verglichen mit den CD40-stimulierten Vorläufer-B-ALL-Blasten.

Um die unterschiedlich starke Hochregulation der beiden kurzen c-FLIP Isoformen in den ALL-Blasten semiquantitativ zu bestimmen, wurden die Banden densitometrisch mit dem Programm "J Image©" ausgewertet. Die relative Stärke der *FLIP short* und –R-Westernblotbanden wurden in bezug zur FLIP long Expression in CD40-stimulierten gesunden B-Zellen und ALL-Blasten gesetzt. Die Ergebnisse von fünf unabhängig erstellten Westernblots sind dargestellt als die Mittelwerte +/- Stabw der FLIP short+-R/ FLIP long peak area Ratio. In ALL-Blasten liess sich nach CD40-Stimulation im Gegensatz zu gesunden B-Zellen eine deutliche Hochregulation der kurzen Isoformen von c-FLIP (short/-R), mit einer Ratio c-FLIP short +-R /c-FLIP long von >1 nachweisen (Abbildung 4-12).



Abbildung 4-12: Ratio zwischen der Expression von FLIP long und FLIP short/–R in gesunden B-Zellen und ALL-Blasten nach CD40-Stimulation. Gezeigt wird die densitometrisch gemessene "Peak area" der Banden von FLIP short und –R als Ratio bezogen auf die FLIP long Expression. Es zeigt sich eine deutliche Hochregulation der Kurzen Isoformen von c-FLIP mit einer Ratio >1 in den ALL-Blasten nach CD40-Stimulation. Dargestellt ist der Mittelwert aus insgesamt fünf verschiedenen ALL-Blasten <u>+</u>SD.

## 4.3 Untersuchung des antiapoptotischen Moleküls Survivin in Vorläufer-B-ALL-Blasten und gesunden reifen B-Zellen

Nach den Untersuchungen zur Expression von rezeptornahen, an der Apoptosekaskade beteiligten Molekülen wurde im Folgenden die Expression des an der Endstrecke des Todesrezeptor-vermittelten, sowie des mitochondrialen Apoptosepathway wirkenden antiapoptotischen Moleküls Survivin untersucht. Die Survivin-Proteinexpression wurde anhand ELISA-Technik und die Survivin mRNA-Expression quantitativ mittels einer "real-time-PCR"-Methode gemessen.

## 4.3.1 Untersuchung der Expression von Survivin-Gesamtprotein in Vorläufer-B-ALL-Blasten von Kindern

Zur Bestimmung der Survivin-Proteinexpression wurden immer 1x10<sup>6</sup> mononukleäre Zellen aus Blut oder Knochenmark lysiert (s. 3.4.9.1) und die Survivin-Gesamtproteinkonzentration in einem Survivin-ELISA (R&D) gemessen (s. 3.4.8.1). Hierzu wurden frische und kryokonservierte Vorläufer-B-ALL-Blasten untersucht. Eine Beeinflussung der Meßmethodik zur Bestimmung der Gesamtproteinexpression durch die Kryokonservierung wurde anhand mehrerer vergleichender Experimente in den gleichen Blasten ausgeschlossen. Es wurden frische Proben sowohl direkt in Lysepuffer aufgenommen als auch vorübergehend kryokonserviert und danach erst lysiert. Die anschliessende Proteinbestimmung beider Proben ergab nahezu identische Werte. Insgesamt wurden 66 Proben von Kindern mit einer Vorläufer-B-ALL untersucht, Eingang in die Untersuchungen erhielten nur Proben mit einem Anteil von mehr als 80% Blasten. Zur Kontrolle dienten mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (n=5) und Knochenmark (n=5) von gesunden Probanden, da diese Zellen keine bzw. nur eine marginale Survivin-Expression aufweisen. Das untersuchte Patientenkollektiv hatte ein mittleres Alter bei Erstdiagnose von 4,5 Jahren (range: 1-17 Jahre) und eine initiale Leukozytenzahl von 12.500/µl (range 1.000-273.000/µl). Gesunde periphere Blutzellen enthielten im Median 0 pg/ml (range: 0-77 pg/ml) und gesundes Knochenmark 71 pg/ml (range: 45-305 pg/ml) (Abbildung 4-13). In den untersuchten Vorläufer-B-ALL-Blasten (n=66) zeigte sich im Vergleich zu den Proben gesunder Probanden eine signifikant erhöhte Survivin-Proteinkonzentration mit einem Median von 407 pg/ml (range: 0-2765 pg/ml; p=0,0001). Die Patienten wurden aufgrund der Ausreifungstadien der Blasten anhand von immunphänotypischen Markern in die verschiedenen B-ALL-Subtypen: pro B-ALL (n=5; 7%), prä B-ALL (n=17; 26%) und c-ALL (n=44; 67%) eingeteilt. Dabei war die Survivin-Expression zwischen den verschiedenen Reifungstadien der Vorläufer-B-ALL vergleichbar

hoch und betrug bei den Patienten mit einer c-ALL 379 pg/ml (range: 0-2157 pg/ml), bei der prä-B-ALL 356 pg/ml (range: 47-2765 pg/ml) und bei der pro-B-ALL 511 pg/ml (range: 0-1472 pg/ml) (Abbildung 4-13).



pro B-ALL pre B-ALL c-ALL control

Abbildung 4-13: Die Survivin-Expression in Vorläufer-B-Zellleukämien und Normalgewebe. Darstellung der Survivin-Expression in den verschiedenen Subtypen der kindlichen B-ALL, im Vergleich zu gesunden peripheren Blut- und Knochenmarkproben, untersucht mit dem Duo-Set Survivin ELISA-Kit (R&D). Die Expressionslevel von Survivin zwischen den Subtypen sind vergleichbar hoch (p=<0.05) Als Kontrolle wurden PB und KM-Proben (n=5) von gesunden Spendern gemessen.

## 4.3.2 Untersuchung einer Korrelation zwischen den klassischen Risikofaktoren und der Survivin-Protein-Expression

Die Höhe der gemessenen Survivin-Proteinexpression der Patienten mit Vorläufer-B-ALL wurde im Folgenden auf eine Korrelation mit den klassischen Risikofaktoren (Alter, initiale Leukozytenzahl, PVA-Score und Translokationen) untersucht. Im Vergleich der Altersgruppen  $\leq$  und  $\geq$  zehn Jahren zeigte sich für die prognostisch ungünstigere Gruppe  $\geq$  zehn Jahre eine mediane Survivinkonzentration von 582 pg/ml (256-1589 pg/ml) und in der prognostisch günstigeren Gruppe  $\leq$  zehn Jahre ein Wert von 398 pg/ml (0-2765 pg/ml p=0,151). Bei den Patienten mit einer niedrigen initialen Leukozytenzahl lag das mediane Expressionsniveau bei 333 pg/ml (range: 0-1589 pg/ml) gegenüber 644 pg/ml (range 0-2765 pg/ml, p=0,079) bei den Patienten mit hoher initialer Leukozytenzahl. Bei 38 Patienten erfolgte protokollgemäß eine *in vitro* Chemoresistenztestung der Leukämieblasten (PVA-Score). Von diesen zeigten Patienten mit einem PVA-Score <7, welcher für eine gute Chemosensibilität spricht, (n=28; 42%) eine mediane Survivin-Konzentration von 328 pg/ml (range: 0-2765 pg/ml), bei den Patienten mit einem Score >7, der eine verstärkte *in vitro* Chemoresistenz anzeigt (n=10; 15%), zeigte sich eine mediane Survivin-Konzentration von 398 pg/ml (range: 216-630 pg/ml) (p=0,589). Bei 28 Patienten konnte kein PVA-Score

bestimmt werden. Bei insgesamt 41 Patienten wurde ein zytogenetische Untersuchung durchgeführt. Die Patienten mit *TEL-AML* Translokation (n=10; 15%) hatten eine mediane Survivin-Proteinkonzentration von 346 pg/ml (range: 0-630 pg/ml) verglichen mit 333 pg/ml (Range: 0-1602 pg/ml) (p=0,272) bei den Patienten ohne Aberration (n=29; 44%). Lediglich bei den Patienten mit einer *BCR-ABL* Translokation (n=2; 3%) wurden erhöhte Survivinlevel nachgewiesen. Bei 25 Patienten war keine genetische Untersuchung erfolgt. Gemäß den in der Einleitung beschriebenen Risikofaktoren erfolgte eine Einteilung der untersuchten Patienten in eine Hochrisiko- (n=32; 48%) und eine Niedrigrisikogruppe (n=34; 52%). Es wurde nun untersucht, ob eine Korrelation zwischen der klinischen Einteilung zur jeweiligen Risikogruppe und der Survivin-Proteinexpression besteht. Für die Hochrisikogruppe zeigte sich eine deutlich erhöhte Survivin-Expression mit einem mittleren Proteinlevel von 575 pg/ml (0-2765 pg/ml) verglichen mit der Niedrigrisikogruppe mit einer medianen Survivin-Konzentration von 345 pg/ml (0-1589 pg/ml) (p=0,08).

## 4.3.3 Untersuchung einer Korrelation zwischen dem klinischen Therapieansprechen und der Survivin-Protein-Expression

Als nächstes wurde überprüft ob eine Korrelation zwischen der gemessenen Höhe der Survivin-Proteinkonzentration und dem klinischen Therapieansprechen der Kinder besteht. Verglichen wurde hierzu die Kinder, die während der Beobachtungszeit eine anhaltende Remission erreichten (n=26), die ein Rezidiv erlitten (n=22) und die Kinder die nach einem Rezidiv verstarben. Es zeigte sich, dass Patienten, die eine Vollremission erreichten (n=26), mit einer medianen Survivin-Konzentration von 346 pg/ml (range 0-1515 pg/ml) signifikant niedrigere Proteinkonzentrationen aufwiesen als die Patienten (n=22), die ein Rezidiv ihrer Erkrankung erlitten (636 pg/ml, range: 0-2765 pg/ml, p=0.029) (Abbildung 4-14).



Abbildung 4-14: Die Überexpression von Survivin-Protein in B-ALL Blasten bezogen auf das rezidivfreie Überleben. Die Grafik zeigt eine signifikant höhere Survivin-Expression bei den Rezidivpatienten (n=22) verglichen mit Patienten, bei denen eine anhaltende Vollremission (n=26) erreicht werden konnte (p=0.029).

Deutlich erhöhte Survivinkonzentrationen zeigten sich mit einem Median von 777 pg/ml (range 71-2765 pg/ml) bei den Patienten, die während der Beobachtungszeit verstarben, im Vergleich zu einer medianen Survivin-Konzentration von 346 pg/ml (0-1573 pg/ml p= 0,012) bei den überlebenden Patienten (Daten nicht gezeigt).

## 4.3.4 Untersuchung einer Korrelation zwischen dem klinischen 3-Jahre EFS, RFS und OS und der Survivin-Protein-Expression

Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die Höhe der Expression des antiapoptotischen Moleküls Survivin mit den Überlebenskurven der Patienten korreliert. Hierzu wurde retrospektiv das 3-Jahre-ereignisfreie Überleben, das -rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben untersucht. Die Korrelation zwischen dem Survivin-Expressionslevel und dem Überleben der Patienten wurde mittels Kaplan-Meier-Analyse analysiert. Bei der Auswertung wurde eine "cut-off"-Linie bei 305pg/ml gesetzt, die der maximalen gemessenen Survivin-Konzentration in gesunden Patientenzellen entsprach. Von den 66 untersuchten ALL-Patienten hatten 43 Patienten (65%) eine Survivin-Konzentration oberhalb dieser "cut-off"-Linie und wurden definiert als Patienten bei denen eine Überexpression vorlag. Bei dieser Patientenkohorte lag die mediane Proteinkonzentration bei 600 pg/ml (range 311-2765pg/ml). Anhand dieser medianen Survivinkonzentration wurde die gesamte Patientenkohorte (n=66) in zwei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe mit Expressionsleveln, die über dem Median der überexprimierten Proben lagen (>600pg/ml; n=22) und einer zweiten Gruppe die unter dem Median lagen (<600pg/ml; n=44). Diese

beiden Gruppen wurden nun in Bezug auf das 3-Jahre-ereignisfreie-Überleben (*"eventfree survival"* EFS), das 3-Jahre-rezidivfreie Überleben (*"relapsefree survival"* RFS) und das 3-Jahre-Gesamtüberleben (*"*overall survival" OS) analysiert. Es zeigte sich ein signifikant besseres EFS (Abb. 14-15), RFS (Abb. 14-16) und OS (Abb.14-17) über einen Zeitraum von 36 Monaten für die Gruppe der Patienten mit niedrigeren Survivinkonzentrationen (<600pg/ml). Eine niedrige Expression von Survivin*p*rotein ist mit einer besseren EFS, RFS und OS korreliert (EFS 0.81 +0,07 vs 0.41+0.12; p=0,01; RFS 0.82+0.06 vs 0.46+0.13, p=0.02; OS 0.98+0.002 vs 0.70+0.11; p=0,005) (Abbildung 4-15:Abbildung 4-16; Abbildung 4-17)).



Abbildung 4-15: Hohe Survivinexpressionslevel in B-ALL Blasten sind assoziiert mit einer schlechteren 3-Jahre-ereignisfreies Überleben (EFS). In der Grafik wird das 3-Jahre-ereignisfreie Überleben bei Patienten mit hohem Survivinexpressionslevel (>600 pg/ml), verglichen mit Patienten mit niedrigen oder negativen Survivinwerten (<600pg/ml) nach einer Kaplan-Meier-Analyse dargestellt. Es zeigte sich, dass die Patienten mit einem hohem Survivinlevel ein deutlich schlechteres 3-Jahre-ereignisfreies Überleben zeigen, als die Patienten mit niedrigen Spiegeln (p=0.01).



Abbildung 4-16: Hohe Survivinexpressionslevel in B-ALL Blasten sind assoziiert mit einem schlechten rezidivfreien 3-Jahresüberleben (RFS) bei Patienten mit initial sehr hoher Survivin-Expression. Dargestellt ist das rezidivfreie Überleben bei Patienten mit einem hohen Survivinexpressionslevel (>600 pg/ml), verglichen mit Patienten mit niedrigen oder negativen Survivinwerten (<600pg/ml) nach einer Kaplan-Meier-Analyse (p=0.02).



Abbildung 4-17: Die Überexpression von Survivin-Protein in B-ALL Blasten ist assoziiert mit einem schlechten Gesamtüberleben (OS) bei Patienten mit initial sehr hoher Survivin-Expression. Dargestellt ist das Gesamtüberleben (3 Jahre) bei Patienten mit sehr hohen Expressionsleveln von Survivin-Protein (>600 pg/ml), verglichen mit Patienten mit niedrigen oder negativen Survivinwerten (<600pg/ml), untersucht mit der Kaplan-Meier-Analyse (p=0.005).

Die Daten zeigen, dass die Höhe der Survivinexpression in den Vorläufer-B-ALL-Blasten unserer pädiatrischen Patientenkohorte einen unabhängigen Risikofaktor für das 3-Jahre-EFS (p=0.02), das 3-Jahre-RFS (p=0.04) und -OS (p=0.005) darstellt.

## 4.4 Untersuchung der mRNA-Expression von Survivin und seinen Splice-Varianten in Vorläufer-B-ALL-Blasten von Kindern

Nachdem die Survivinexpression im Gesamtprotein mittels ELISA untersucht worden war, sollten in den folgenden Experimenten die m-RNA-Expression in den Vorläufer-B-ALL-Blasten qualitativ in einer konventionellen PCR und quantitativ in einer "real-time PCR" untersucht werden. Dies erfolgte um die auf Proteinebene gezeigten Ergebnisse auch auf translationaler Ebene zu untersuchen. Die aus den Blasten von pädiatrischen Patienten mit Vorläufer-B-ALL gewonnene Gesamt-RNA (s. 3.4.1-3.4.4) wurde mit Survivin-spezifischen Primern anhand der Reversen Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben und durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert (s. 3.4.5 und 3.4.6). Die PCR-Produkte wurden in der Agarose-Gelelektrophorese augetrennt. In der konventionellen PCR Analyse zeigte sich in den untersuchten mononukleären Blutzellen gesunder Probanden keine Expression von (Daten die Survivin nicht gezeigt). In den Vorläufer-B-ALL-Blasten wurde Survivinexpression mit der erwarteten Bandenlänge von 426bp nachgewiesen. Auch die entsprechenden Banden der Splicevarianten Survivin-2B (495bp), Survivin3B (595bp) und Survivin-AExon3 (411bp) ließen sich in geringerer Intensität im Vergleich zur Hauptform (426bp) nachweisen (Abbildung 4-18).



Abbildung 4-18: Survivin mRNA Expression in pädiatrischen B-ALL Blasten. Dargestellt wird die Gelelektrophorese einer qualitativen RT-PCR von Survivin und dem "Housekeeping-Gen" GAPDH nach einer Färbung mit Etidium Bromid. Survivin (431bp) als stärkste Bande, aber auch die Splicavarianten Survivin3B (591bp), Survivin-2B (500bp) und Survivin∆Exon3 können teilweise als schwache Banden detektiert werden. Als Negativkontrolle wurde in jedem Lauf eine Wasserkontrolle mitgeführt (NTC = none template control, bp= Basenpaare, 1-12 Vorläufer-B-ALL-Patientenproben)

Um diese qualitativen Aussagen zu ergänzen, wurde zusätzlich eine spezifische quantitative Analyse mittels *"real-time"*-PCR für die funktionell bedeutsamen Splicevarianten Survivin-2B und Survivin- $\Delta$ Exon3 durchgeführt (s. 3.4.6). Die Expressionshöhe der jeweiligen Splicevariante wurde auf einen internen GAPDH-Standard normiert. Die Ergebnisse der ALL-Blasten (n=20) verglichen mit Kontrollblut von gesunden Personen (PB n=6, KM n=3) sind in Abbildung 4-19 dargestellt. Bei den B-ALL Blasten zeigte sich eine erhöhte Expression von Survivin und Survivin-2B verglichen mit den untersuchten gesunden Kontrollproben, bei denen nur minimale Expressionslevel von Survivin und Survivin-2B nachgewiesen wurden (p=0.02 und p=0.001). Die Expression von Survivin  $\Delta$ Exon3 in den Vorläufer-B-ALL-Blasten und den gesunden Kontrollproben unterschied sich hingegen nicht signifikant (p=0.64) (Abbildung 4-19c). Aufgrund einer grossen Schwankungsbreite zwischen den Patienten unterschieden sich die Expressionslevel zwischen den einzelnen Survivin-Splicevarianten (Survivin, Survivin-2B, Survivin- $\Delta$ Exon3) ebenfalls nicht signifikant.



Abbildung 4-19: mRNA-Expression der Survivin Splicevarianten in Vorläufer B-ALL Blasten. Dargestellt ist der in der Lightcycler Analyse ermittelte relative mRNA-Expressionslevel der jeweiligen Survivin-Isoformen normiert auf das "Housekeeping-Gen" GAPDH. Als Kontrolle wurde mRNA aus dem Blut gesunder Spender analysiert.

Wie bereits für die Survivin-Proteindaten beschrieben, wurden die untersuchten Patienten anhand der in 1.1 beschriebenen klinischen Risikoparametern in eine Hoch- und eine Niedrigrisikogruppe eingeteilt und untersucht ob eine Korrelation zwischen den beiden Risikogruppen und der Höhe der Survivin-mRNA-Expression besteht. Dabei zeigte sich eine signifikant höhere Expression der pro-apoptotischen Splicevariante Survivin-2B in den Niedrigrisikopatienten (p=0.02) (Abbildung 4-20b) im Vergleich zu den Hochrisikopatienten. Im Gegensatz dazu unterschied sich die Expression von Survivin und Survivin∆Exon3 zwischen Niedrig- und Hochrisikopatienten nicht signifikant (p=0.49 und p=0.97) (Abbildung

4-20 a+c). Betrachtet man die Risikofaktoren im Einzelnen, so gilt für die Patienten  $\geq 10$ Jahren mit einem prognostisch ungünstigeren Verlauf, daß sie eine höhere Expression aller 3 Isoformen aufweisen verglichen mit den Patienten  $\leq 10$  Jahre die einen klinisch günstigeren Verlauf haben, wobei auch hier die proapoptotische Splicevariante Survivin-2B dominierte (p=0,02). Hinsichtlich der Patienten mit niedrigen und hohen initialen Leukozytenzahlen ließen sich keinerlei signifikante Unterschiede in der Expressionshöhe der verschiedenen Isoformen feststellen. Auch zwischen den Patienten mit einer anhaltenden Remission und denen, die ein Rezidiv ihrer Erkrankung erlitten oder zwischen den Patienten die an der Grunderkrankung verstarben und denen Überlebenden zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Höhe der Survivin-Expressionslevel.



Abbildung 4-20: Vergleich der Expressionsmuster von Survivin Splicevarianten in Vorläufer B-ALL Blasten von Hoch- und Niedrigrisikopatienten. Dargestellt ist der in der Light Cycler Analyse ermittelte relative mRNA-Expressionslevel der jeweiligen Survivin-Isoform normiert auf das "Housekeeping-Gen" GAPDH.

Für die verschiedenen Survivin-Splicevarianten wurde ein unterschiedliches antiapoptotisches Potential an der intrinsischen Regulation beschrieben. Survivin und Survivin $\Delta$ Exon3 haben ein hohes anti-apoptotisches Potenzial, wohingegen Survivin-2B sein anti-apoptotisches Potential verloren zu haben scheint [100]. Aus diesem Grund wurde die attenuierende Splicevariante Survivin-2B im Sinne eines "apoptotischen Index" (PI) ins Verhältnis zur Summe der anti-apoptotischen Splice-Formen (Survivin und Survivin $\Delta$ Exon3) gesetzt: [PI = Survivin-2B / (Survivin + Survivin $\Delta$ Exon3)]. Zwischen den Hoch- und Niedrigrisikopatienten zeigte sich in der Auswertung des funktionell bedeutsamen "proapoptotischen Index" bei den Niedrigrisikopatienten ein deutlich erhöhter Index, der jedoch nicht statistisch signifikant war (p=0.06) (Abbildung 4-21).



Abbildung 4-21: Expressionsmuster der Survivin Splicevarianten in Vorläufer B-ALL Blasten von Hochund Niedrigrisikopatienten im Vergleich. Der in der Light Cycler Analyse ermittelte relative mRNA-Expressionslevel der verschiedenen Survivin-Isoform normiert auf das "Houskeeping-Gen" GAPDH wurden im Sinne des oben beschriebenen "pro-aoptotischen Index" gemäß ihrer Funktion ins Verhältnis zueinander gesetzt und anschließend in beiden Patientengruppen verglichen.

### **5** Diskussion

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, ist ein physiologischer Vorgang, der das kontrollierte Entfernen von Zellen im Organismus gewährleistet. Maligne transformierte Zellen haben Resistenzmechanismen entwickelt, um sich der physiologischen Apoptose und damit ihrer immunologischen Elimination zu entziehen. Auch in den unreifen B-Zell-Blasten der akuten lymphatischen Leukämie scheint eine Apoptoseresistenz entscheidend zur Entwicklung einer hochmalignen und aggressiv schnell wachsenden Erkrankung beizutragen [101-103].

Schwerpunkt dieser Arbeit war es, einzelne Moleküle zu untersuchen, die zur pathologischen Regulation der physiologischen Apoptose bei den akuten lymphatischen Leukämien im Kindesalter führen und dadurch zu einer ungehinderten Proliferation der Blasten beitragen. Da die Apoptose einen komplexen Mechanismus mit manigfaltigen Reaktionskaskaden darstellt, können Störungen der Abläufe auf verschiedenen Ebenen auftreten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in unreifen Lymphomzelllinien und Vorläufer-B-ALL-Blasten von Kindern die Expression und Regulation der Moleküle zu untersuchen, die an der Todesrezeptor-CD95-vermittelten Apoptoseinduktion beteiligt sind und die Unterschiede zu normalen B-Zellen zu beschreiben. Zu den untersuchten Molekülen gehören insbesondere die CD95-rezeptornahen Vertreter die an der Bildung des Todesrezeptorkomplex (DISC, "deathinducing-signaling-complex") beteiligt sind. Der sogenannte DISC wird nach Aktivierung des CD95-Rezeptor und seiner Trimerisierung, durch Anlagerung des Adaptormoleküls FADD/Mort-1 und der Procaspase-8 gebildet [104]. Das schwerpunktmässig untersuchte Molekül c-FLIP, verhindert die Aktivierung der Procaspase-8 am DISC und blockiert dadurch die Fortleitung der Apoptosekaskade in den frühen Schritten [61, 71]. C-FLIP wurde bereits in verschiedenen maligne entarteten, schnell proliferierenden Geweben hochexprimiert nachgewiesen [105, 106].

Ein zweiter Schwerpunkt wurde auf die Untersuchung des antiapoptotischen Moleküls Survivin gelegt. Survivin wirkt als Inhibitor der gemeinsamen Endstrecke der Todesrezeptorvermittelten und der über die Mitochondrien ablaufenden Apoptosekaskade [107]. Die Untersuchungen zur Expression und Regulation von Survivin in Vorläufer-B-ALL-Blasten waren von besonderem Interesse, da Survivin bereits von anderen Arbeitsgruppen in akuten und chronischen lymphatischen Leukämien bei Erwachsenen und akuten myeloischen Leukämien von Kindern und Erwachsenen als prognoserelevanter Tumormarker identifiziert wurde [92-95]. Für pädiatrische Vorläufer-B-Zellleukämien lagen zu Beginn der Arbeit kaum
Untersuchungen zu Survivin vor. Erstmals wurden in der vorliegenden Arbeit qualitative und quantitative Analysen zur Survivin-Expression auf Transkript- bzw. Proteinebene in kindlichen Vorläufer-B-ALL-Blasten durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse wurden abschliessend bezüglich einer möglichen Korrelation zu klinischen Risikomarkern und dem klinischen Verlauf der Patienten untersucht.

### 5.1 CD95-vermittelte Apoptose in CD40-stimulierten Lymphomzelllinien Daudi und Raji

Als Modell unreifer maligner B-Zellen wurden die prä-B-Lymphom-Zelllinien Daudi und Raji ausgewählt, die analog zu den ALL-Blasten einen unreifen Phänotyp aufweisen (Expression CD19/CD10). Beide Zelllinien exprimieren CD40 [108], welches Vorraussetzung für die Stimulationsversuche durch Interaktion mit CD40L war. Der CD40-Ligand wird auf aktivierten T-Zellen exprimiert und interagiert mit antigenpräsentierenden Zellen wie B-Zellen, dendritischen Zellen und Monozyten. Die CD40-CD40L-Interaktion führt in den reifen B-Zellen zunächst zur Proliferation, dann zur Ausreifung mit Immunglobulin-Subklassenswitch und Hochregulation costimulatorischer Moleküle [36, 37, 39]. Die CD40-Aktivierung stellt somit sowohl ein Überlebens-, als auch Ausreifungssignal für die reife B-Zelle dar [35, 109]. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde zunächst die CD95-Expression auf den beiden Lymphom-Zelllinien Daudi und Raji untersucht, da das Auslösen der CD95-vermittelten Apoptose Voraussetzung zur Untersuchung der intrazellulären Vorgänge der Apoptose war. In den Daudi Zellen wurde die initial niedrige CD95-Expression nach CD40-Stimulation deutlich hochreguliert, bei den Raji Zellen wurde die schon initial sehr hohe CD95-Expression durch die CD40-Stimulation nicht weiter moduliert. Nach CD40-Stimulation waren die Zelllinien also hinsichtlich ihrer CD95-Expression vergleichbar. Garrone et al. (1995) konnten den gleichen Effekt wie bei den Daudi Zellen, auch für ruhende reife B-Zellen aus Tonsillen zeigen. Durch die CD40-Stimulation wurde die CD95-Expression auf der Zelloberfläche hochreguliert und zusätzlich erfolgte eine Sensitivierung für CD95-vermittelte Apoptose [110]. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde die Sensitivität für CD95-vermittelte Apoptose in den Raji- und Daudi-Zellen durch die CD40-Stimulation nur geringfügig gesteigert. Es scheint also in den beiden Zellinien nach CD95-vermittelter Apoptoseinduktion eine Blockierung auf dem Weg zur Aktivierung der Procaspasen am Todesrezeptorkomplex (DISC) vorzuliegen. Diese Ergebnisse waren

Ausgangspunkt zur Untersuchung der Modulation von Molekülen die an der DISC-Bildung, nach CD95-vermittelter Apoptoseinduktion beteiligt sind.

Durch CD40-Stimulation erfolgte weder in den Daudi-Zellen noch in den Raji-Zellen eine Regulation der am normalen Ablauf der CD95-vermittelten Apoptosekaskade beteiligten untersuchten Moleküle FADD, Procaspase-8, Procaspase-3. Entsprechend war auch die nur mässige Sensitivität für CD95-induzierte Apoptose in den unstimulierten wie auch in den CD40-stimulierten Zellen annähernd gleich. Dieser Eindruck widerspricht den Ergebnissen von Wang et al. (2008) die zumindest in Raji-Zellen eine gesteigerte Apoptose nach Inhibition von NF-kappa-B durch CD40-CD40L-Interaktion zeigten [111]. Voorzwanger et al. (2006) zeigten für Daudi und Raji Zellen, dass Chemotherapie-induzierte Apoptose nach CD40-Stimulation durch Abnahme der Caspase-3/-7-Aktivität deutlich gehemmt wird [112]. Diese Ergebnisse konnten für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit den Daudi und Raji Zellen ebenfalls ausgeschlossen werden. Die basale Expression der Caspase-3 wurde sowohl in der Western-Blot-Analyse sowie in den Aktivitätsassays durch die CD40-Stimulation nicht reguliert. CD40 scheint also nach den hier durchgeführten Versuchen keinen relevanten regulativen Einfluß auf die Daudi- und Raji-Zellen zu haben. Im Gegensatz zu den Daudi-Zellen wurde in den Raji-Zellen, unabhängig von der CD40-Stimulation eine Spaltung der Proformen der Initiator-Caspase-8 und der Effektor-Caspase-3 in ihre aktiven Spaltprodukte nachgewiesen. Dies zeigt, dass der Ablauf und die Fortleitung der Aktivierung der Caspasen funktioniert, jedoch keine adäquate Apoptose ausgelöst wird. Um diese divergenten Verhaltensweisen und die trotz hoher CD95-Expression nur schwache Sensitivität für CD95-vermittelte Apoptose zu untersuchen, wurde das rezeptornah wirkende Molekül c-FLIP genauer betrachtet. Sowohl c-Flip long als auch c-Flip short können die Induktion der Apoptose durch die klassischen Todesrezeptor-Signalwege blockieren [56, 59]. Die Inhibition erfolgt durch die Blockierung der Spaltung von Procaspase-8 zum aktiven Enzym im DISC [72]. Während c-FLIP short als auch das in Raji-Zellen erstmalig beschriebene c-FLIP-R, bisher als rein anti-apoptotische Moleküle beschrieben wurden, kann c-FLIP long bei geringem Expressionsniveau auch eine pro-apoptotische Funktion ausüben. [74-76]. In den in dieser Arbeit untersuchten Daudi- und Raji-Zellen zeigte sich ein gänzlich unterschiedliches Expressionsmuster der c-FLIP-Isoformen nach CD40-Stimulation. In den unstimulierten Zellen Daudi-Zellen zeigte sich nur eine marginale Expression von FLIP long und -short, durch die CD40-Stimulation erfolgte jedoch eine massive Hochregulation der beiden exprimierten Flip-Isoformen (long und short) wobei die antiapoptotische FLIP short-Isoform überproportional stärker hochreguliert wurde. Entsprechend verblieben nach CD95vermittelter Apoptose in den CD40-stimulierten und unstimulierten Daudi-Zellen die Caspasen in ihrer ungespaltenen zymogenen Form und damit in einem inaktiven Zustand. Parallel durchgeführte Aktivitätstests der Caspasen bestätigten diesen Befund. Es scheint so, dass in den CD40-stimulierten Daudi-Zellen die gesteigerte CD95-Expression zwar zu einer moderaten Sensitivierung für CD95-vermittelte Apoptose führt, dabei verhindert aber die überproportional stärkere Hochregulation von FLIP short eine deutlichere Sensitivierung und damit auch die Fortleitung zur Aktivierung der Caspasen. In den Raji Zellen wurden c-Flip long und short unabhängig von der CD40-Stimulation stabil und und in einem ausgeglichenen Verhältnis exprimiert. Durch die Kombination von CD95 mit dem Proteinsynthesehemmer Cycloheximid (CHX) wurde eine deutliche Sensitivierung der Raji-Zellen gegenüber CD95vermittelter Apoptose erreicht. Es zeigte sich durch die Zugabe von CHX eine deutliche Abnahme der antiapoptotischen FLIP-R-Isoform. Die Sensitivierung scheint also durch eine Inhibition der FLIP-R-Neusynthese verursacht zu sein, wodurch das Verhältnis zugunsten der proapoptotisch wirksamen long-Form verschoben wird und die Zellen sensitiver für CD95vermittelte Apoptose wurden. In den Daudi-Zellen konnte durch die Hemmung der Proteinneusynthese durch CHX keine relevante Sensitivierung erreicht werden, da auch nach Abnahme der FLIP short-Expression nach Zugabe von CHX, dasVerhältnis zwischen FLIP long und short, zugunsten der antiapoptotischen short-Form dennoch weiterhin deutlich überwog. Jeon et al. (2005) konnten in EBV-positiven Lymphomen der NK/T-Zellreihe, trotz hoher CD95-Expression, eine Apoptoseresistenz gegenüber dem agonistischen CD95-Antikörper nachweisen, die sich nach Zugabe von CHX in eine Apoptosesensitivierung umkehren liess. In dieser Studie zeigte sich eine deutliche Herunterregulierung von FLIP long durch CHX bei gleichzeitig unbeeinflusster Expression anderer anti- und pro-apoptotisch wirkender Proteine [113]. Krueger et al. (2001) beschrieben in der B-lymphoblastischen Zelllinie BJAB, dass die Hochregulation von FLIP short eine komplette Blockierung der physiologischen Abläufe der CD95-vermittelten Apoptose durch Rekrutierung an den DISC und Blockade der Caspase-8 Aktivierung bewirkt [73]. Obwohl FLIP long als Aktivator der Caspase-8 beschrieben wird, scheint der Apoptose-auslösende Effekt durch eine überproportional stärkere Hochregulation von FLIP short unterdrückt zu werden, so dass letztlich die Apoptose-inhibierende Wirkung überwiegt [76]. Diese Befunde lassen vermuten, dass nicht die ausschliessliche Expression einer der beiden FLIP-Isoformen, long oder short und -R, entscheidend für das Auslösen oder die Resistenz der Apoptose ist, sondern vielmehr das Verhältnis der exprimierten Moleküle zueinander. Dies konnte auch durch Eeva et al. (2006) an der Lymphom-Zelllinie HF1A3 gezeigt werden, bei der nach CD40-Stimulation durch Hochregulation von FLIP long und short (short>long) eine Apotposeresistenz nachgewiesen wurde [114]. Diese Resistenz war nach Herrunterregulation von FLIP long und short durch selektive Inhibition von "nuclear factor (NF)- $\kappa$ B" reversibel. Dies zeigt übereinstimmend mit den hier erhobenen Daten, dass das Verhältnis der FLIP-Isoformen long < short zu einer Apoptoseresistenz und long > short zu einer Apoptosesensitivierung führt.

Zusammenfassend zeigte sich zwischen den immunphänotypisch sehr homogenen Zelllinien Daudi und Raji ein divergentes Reaktionsverhalten auf die CD40-Stimulation, so wie auf die CD95-vermittelte Apoptoseinduktion. Die überproportional stärkere Hochregulation des antiapoptotischen Protein FLIP short scheint in den Daudi-Zellen ursächlich für die Apoptoseresistenz zu sein. In den Raji-Zellen konnte durch die Zugabe von CHX ein Überwiegen der proapoptotischen FLIP long Form und dadurch eine relevante Sensitivierung für CD95-vermittelte Apoptose erreicht werden. Diese Unterschiede zwischen den Zelllinien bezüglich der Modulation von DISC-assoziierten Molekülen und Aktivierung der Caspasenkaskade nach CD95-vermittelter Apoptoseinduktion in CD40-stimulierten Zellen, war Anlass zur Untersuchung der entsprechenden Regulation in primären Vorläufer-B-ALL-Blasten von Kinder.

### 5.2 CD95-vermittelte Apoptose in Vorläufer-B-ALL-Blasten von Kindern

Nach der Etablierung eines Modellsystems mit den beiden Lymphomzelllinien Daudi und Raji zur Untersuchung CD95-vermittelter Apoptoseinduktion in CD40-stimulierten B-Zellen, wurde im nächsten Teil der vorliegenden Arbeit die Expression und Regulation der beschriebenen Moleküle in kindlichen Vorläufer-B-ALL-Blasten untersucht und mit normalen gesunden B-Zellen verglichen. Ruhende unstimulierte Vorläufer-B-ALL-Blasten zeigen nur eine sehr schwache bis fehlende Expression von CD95 auf ihrer Oberfläche und sind dadurch nicht sensitiv für CD95-vermittelte Apoptose. Dies scheint ein wichtiger Mechanismus der malignen Zelle zu sein, um sich der physiologischen Elimination zu entziehen. Vergleichbar mit den zuvor untersuchten Daudi-Zellen, führt die CD40-Stimulation zu einer signifikanten CD95-Hochregulation auf Vorläufer-B-ALL-Blasten und gesunden B-Zellen. Trotz deutlich gesteigerter CD95-Expression nach CD40-Stimulation, war die Sensitivität für CD95-vermittelte Apoptose in den ALL-Blasten signifikant niedriger als in den zum Vergleich herangezogenen normalen reifen B-Zellen [48]. Die Aktivitätsbestimmung der rezeptornahen Initiator-Caspase-8 und der distalen Effektor-Caspase-3/-7 zeigte eine gleichbleibend niedrige Aktivität der Caspasen nach CD95vermittelter Apoptoseinduktion in CD40-stimulierten Vorläufer-B-ALL-Blasten, wohingegen

in den CD40-stimulierten normalen B-Zellen eine deutliche Aktivitätszunahme nach CD95-Ligation nachgewiesen werden konnte. Dieser Unterschied und die Tatsache, dass eine Behandlung der Zellen mit dem Proteinsynthesehemmer Cycloheximid (CHX) zu einer Steigerung der Sensitivität für CD95-vermittelte Apoptose führt zeigt, dass die Ursache der Resistenz wahrscheinlich durch eine de novo Synthese anti-apoptotischer oder die Inhibition proapoptotischer Moleküle verursacht wird. Da in den Vorläufer-B-ALL-Blasten eine Blockierung der Initiator-Caspase-8 besteht und somit ein früher proximaler Block der CD95vermittelten Apoptoseinduktion vorliegt, wurden die an der DISC-Bildung beteiligten Moleküle vorrangig untersucht. Diese Proteine FADD, Procaspase-8 und FLIP long wurden in den Vorläufer-B-ALL-Blasten und gesunden B-Zellen konstitutiv exprimiert und durch die CD40-Stimulation nicht reguliert. Im Gegensatz dazu, waren die kurzen Isoformen FLIP short und FLIP-R in den unstimulierten gesunden B-Zellen und B-ALL Blasten nur marginal nachweisbar. Nach CD40-Stimulation erfolgte in den Vorläufer-B-ALL-Blasten eine deutliche Hochregulation von FLIP short und -R. Der entscheidende Unterschied zeigte sich in der nur schwachen Expression von FLIP short und einer fehlenden Expression von FLIP-R in den normalen B-Zellen nach CD40-Stimulation. Um die Rolle der Expression der beiden kurzen FLIP-Isoformen weiter zu untersuchen, wurde die Proteinsynthese durch CHX gehemmt. In den CD40-stimulierten Vorläufer-B-ALL-Blasten zeigte sich nach Zugabe von CHX eine deutliche Abschwächung der Expression von FLIP short und die Expression von FLIP-R wurde in den Blasten fast vollständig unterdrückt. Gleichzeitig zeigte sich dementsprechend eine Sensitivierung der Blasten gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Dies zeigt die Abhängigkeit der Apoptoseresistenz der Vorläufer-B-ALL-Blasten von der Höhe der Expression der kurzen Isofromen von c-FLIP, insbesondere von FLIP-R. Diese Ergebnisse wurden in dieser Arbeit für die kindliche B-ALL erstmalig beobachtet. Die Vorläufer-B-ALL-Blasten haben somit zwei Wege entwickelt sich der CD95-vermittelten Elimination zu entziehen. 1. Die ruhenden B-Zellen sind durch die fehlende Oberflächenexpression von CD95 vor Todesrezeptor-vermittelter Apoptose geschützt. 2. Nach CD40-Stimulation halten sie diese Resistenz durch Hochregulation von FLIP short und -R aufrecht. c-FLIP wurde in seiner Rolle als Apoptoseinhibitor bereits vielfach in malignen Erkrankungen untersucht. Ein Schwerpunkt ist die Untersuchung von c-FLIP, als Überlebenspromotor in B-Zell-Lymphomen [115, 116]. Es zeigte sich, dass eine hohe Expression von c-FLIP durch Blockierung der Caspase-8 zu einer erhöhten Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose führt [106, 117]. Bei verschiedenen malignen Erkrankungen der B-Zellreihe (Hodgkin Lymphom, B-Non-Hodgkin-Lymphom) wurde gezeigt, dass die Hochregulation von c-FLIP mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika, dem Entzug zytotoxischer Eliminationsmechanismen und einem schlechteren klinischen "Outcome" einher geht [106, 117]. Irisarri et al. (2000) zeigten mit den in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen vergleichbare Daten in der Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinie BR97: Die Apoptoseresistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose, durch Inhibition der Caspase-8-Aktivierung, wird durch eine hohe Expression von c-FLIP verursacht. Nach Abnahme der c-FLIP-Expression durch Hemmung der Proteinneusynthese durch CHX, wurden die BR97-Zellen vergleichbar mit den VorläuferB-ALL-Blasten wieder für CD95-vermittelte Apoptose sensitiviert [118]. Henino et al. (1999) zeigten, dass die CD40-Stimulation auch in gesunden B-Zellen eine Hochregulation von CD95 bewirkt und die Zellen zur Apoptose sensitiviert wurden. Dabei wurde der mitochondriale Signalwege umgangen und es erfolgte eine Rekrutierung der Procaspase-8 an den DISC-Komplex. Bei konstitutiver Expression von Caspase-8 und FADD erfolgte eine Modulation der c-FLIP-Expression nach CD40-Stimulation [77]. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass eine transiente Expression von c-FLIP einen temporären Schutz CD40-aktivierter B-Zellen gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose darstellen kann. In den frühen Untersuchungen zu c-FLIP wurde keine Unterscheidung der Isoformen vorgenommen, seit bekannt werden der beiden kurzen Isoformen short und -R werden die unterschiedlichen Funktionen der einzelnen Isoformen und ihr Verhältnis zueinander untersucht. Der entscheidende Unterschied zu den bisher erhobenen Daten zu c-FLIP in malignen Erkrankungen der B-Zellreihe, ist die Untersuchung der kurzen Isoformen von c-FLIP (short und -R) im Verhältnis zur Expression von FLIP long. In EBV-transformierten B-Zellen wurde eine Abhängigkeit der Apoptosesensitivität vom Verhältnis der Expression zwischen Caspase-8 und FLIP long nachgewiesen [113]. In den in dieser Arbeit untersuchten normalen B-Zellen zeigte sich eine deutliche Hochregulation von FLIP long und short, mit Überwiegen der proapoptotischen long Form, vor und nach CD40-Stimulation. Dies könnte der Grund sein, weshalb die normalen B-Zellen durch die CD40-Stimulation keine relevante Veränderung in Bezug auf ihre Apoptosesensitivierung, verglichen mit den B-ALL-Zellen zeigen. Für die Vorläufer-B-ALL-Blasten konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass nach CD40-Stimulation FLIP long und short, im Speziellen aber auch die FLIP-R Form hochreguliert werden und das Verhältnis zwischen der proapoptotischen long und den antiapoptotisch wirksamen, kurzen Isoformen ausgeglichen bzw. sogar zugunsten der kurzen Formen vorliegt. Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Hochregulation von FLIP short und -R nach CD40-Stimulation stabil (mind. 6 Tage) erfolgt, welches einen Unterschied zur transienten Expression bei normalen B-Zellen und kurzzeitaktivierten normalen T-Zellen darstellt [77, 119].

Zusammenfassend können die B-ALL Blasten ihre Resistenz gegenüber der CD95vermittelten Apoptose nach CD40-Stimulation trotz einer Hochregulation von CD95 durch eine Überexpression der kurzen FLIP Isoformen erhalten. Entscheidend ist das Verhältnis zwischen der Isoform long und den Isoformen short und/oder –R von c-FLIP.

# 5.3 Survivin-Expression als Prognosemarker bei pädiatrischen Patienten mit Vorläufer-B-ALL

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Moleküle untersucht, die an der Endstrecke des Todesrezeptor-vermittelten Apotosepathways beteiligt sind. Insbesondere die Expression von Survivin, einem Mitglied der IAP-Familie (*,,inhibitor of apoptosis protein family*") war Gegenstand der Untersuchung. Survivin inhibiert die Apoptosekaskade, indem es sowohl die Aktivierung der Caspase-9 als auch der Caspase-3 blockiert [120]. Survivin wurde in malignen Geweben als tumorspezifisches Protein beschrieben und ist neben seiner Apoptose-inhibierenden Wirkung an der Zellzykluskontrolle beteiligt [121]. In der vorliegenden Arbeit wurde Survivin auf Proteinebene und auf mRNA-Ebene untersucht. Es wurde erstmalig anhand einer quantitativen Messung die Gesamtproteinexpression von Survivin auf Proteinebene, sowie auf mRNA-Ebene die Expression von Survivin und seinen Splicevarianten Survivin-2B und Survivin-ΔExon3 in pädiatrischen Patienten mit Vorläufer-B-ALL untersucht.

In einer Patientenkohorte von 66 pädiatrischen Patienten wurde die Gesamt-Survivinproteinkonzentration in Vorläufer B-ALL-Blasten untersucht und es konnte aufgrund der erhobenen Daten eine wichtige prognostische Aussagekraft der Survivin-Proteinexpression gezeigt werden. Bisher existieren kaum Daten zur klinischen Relevanz der Survivin-Expression in akuten lymphatischen Leukämien von Kindern. In der Zusammenschau der existierenden Daten, die fast ausschließlich bei Erwachsenen Patienten mit ALL erhoben wurden, zeigte sich in der Durchführung einer Meta-Analyse von sechs Studien, dass in den bisher veröffentlichten Studien insgesamt nur ca. 80 erwachsene Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie untersucht wurden [90, 122-126]. In verschiedenen Studien bei Erwachsenen ALL- und kleinen Kohorten mit pädiatrischen Patienten mit AML wurde gezeigt, dass es Hinweise auf eine negative prognostische Bedeutung einer erhöhten Survivinprotein-Expression gibt [91, 95, 127]. Bei einer Untersuchung von 45 Kindern mit akuter myeloischer Leukämie (AML) zeigte sich in der

Western Blotanalyse ein Zusammenhang zwischen einer hohen Expression von Survivin-Protein und einem schlechteren Gesamtüberleben [92]. Im Gegensatz dazu wurde von Tamm et al. (2004) Survivin mittels immunhistochemischer Analyse in AML-Blasten von Kindern untersucht, wobei sich in dieser Studie kein Zusammenhang zwischen der Survivin-Expression der AML-Zellen und einer schlechteren Prognose zeigte. Methodenbedingt allerdings eine isolierte Detektion der erfolgte nur zytosolischen Survivin-Proteinkonzentration [91, 95]. Der Anteil der zytosolisch lokalisierten Form von Survivin beeinflusst das relative Verhältnis zwischen Survivin, den nachgeschalteten Caspasen und den stabilisierenden Proteinen. Verschiedene Experimente zeigen, dass hohe Survivinkonzentrationen die Endstrecke der Apoptose durch eine indirekte Hemmung der Effektorcaspase-3 blockiert [107, 128]. Dadurch liegt die aktive Caspase-3 in der Zelle unterhalb des Schwellenwerts zur Initiierung der Apoptosekaskade vor [129]. Dieses Modell zeigt, dass die Apoptoseinduktion abhängig von der Konzentration und insbesondere von der Ratio zwischen Survivin und Caspase-3 zu sein scheint. Da Survivinprotein in den verschiedenen Zellkompartimenten in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegt [130], wurde in dieser Arbeit eine quantitative Messung des Gesamt-Survivinproteins in den Vorläufer-B-ALL-Blasten durchgeführt. Es sollte eine reproduzierbare, quantitative Untersuchungsmethode zur Bestimmung des anti-apoptotischen Proteins Survivin angewandt werden, um eine Aussage über die klinische Relevanz der Survivin-Expression machen zu können. Deshalb ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit. die war Survivin-Proteinnachweismethode mittels Survivin-ELISA als eine gut standardisierbare, kostengünstige, an großen Fallzahlen umsetzbare Methode zu belegen. Die Survivin-Gesamtproteinexpression wurde in dieser Arbeit nur für die Hauptform von Survivin gemessen, da zum Zeitpunkt der Untersuchungen keine ELISA-Antikörper zum Nachweis der funktionell bedeutenden Splicevarianten auf Proteinebene verfügbar waren. Eine Untersuchung der Survivinsplicevarianten auf Proteinebene könnte Inhalt weiterer zukünftiger Versuche sein. Auch wenn die Proteinbestimmung derzeit keine sichere Differenzierung der Splicevarianten von Survivin erlaubt, ist die Bestimmung der Gesamtproteinmenge dennoch aus funktionellen Gründen sinnvoll. Die bislang vorliegenden Veröffentlichungen zur Proteinexpression in verschiedenen Geweben bedienen sich in der Regel qualitativer oder semiquantitativer Nachweisverfahren wie der Westernblotanalyse oder immunhistochemischer Methoden, wohingegen kaum quantitative Daten zur Survivin-Expression in Leukämiezellen der Vorläufer-B-Zellreihe existieren. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass in den Vorläufer-B-Zellleukämien von Kindern, eine hohe Survivin-Expression in den Blasten mit einem schlechten 3-Jahres-ereignisfreien Überleben, einem schlechteren 3-Jahres rezidivfreien Überleben und einem schlechteren Gesamtüberleben einhergeht. Aufbauend auf diesen Ergebnissen ist es zukünftig möglich, die Untersuchung der Survivin-Proteinexpression in kindlichen Vorläufer-B-ALL-Blasten als neuen prognostischer Marker einzusetzen, um Patienten mit besonders aggressiven Erkrankungen zu identifizieren. Eine signifikante Korrelation mit den klassischen Risikomarkern wie Alter des Patienten, Leukozytenzahl bei Diagnosesicherung, PVA-Score oder zytogenetischen Aberrationen wurde nicht nachgewiesen. Die nach dem Phänotyp eingeteilten Reifestadien der Vorläufer-B-Zellleukämien (pro-B-ALL, prä- und c-ALL), die auch als Risikofaktor protokollgemäß berücksichtigt werden unterschieden sich, bezogen auf ihre Survivinprotein-Expression nicht. Adida et al. (2000) konnten übereinstimmend in diffusen großzelligen Lymphomen der B-Zellreihe ebenfalls keine Korrelation zwischen der Survivin-Expression und dem Reifegrad der untersuchten Zellen nachweisen [131]. Bei den hier untersuchten Vorläufer-B-ALL-Blasten zeigte sich ein Trend zu höheren Survivinkonzentrationen bei den Patienten die initial eine erhöhte Leukozytenzellzahl hatten, was für das hohes proliferative Potential und eine gute Fähigkeit zur Selbsterneuerung der Leukämieblasten ursächlich sein kann. Diese hohe Leukozytenzahl verbunden mit einer hohen Survivinprotein-Expression wurde auch von Paydas et al. (2003) bei 28 erwachsenen Patienten mit ALL gezeigt [125]. Survivin scheint ein sehr wichtiges Molekül mit Einfluss auf die schnelle klonale Proliferation und eine verlängerte Überlebensfähigkeit der Blasten zu sein. Man kann sicher sagen, dass die Überexpression von Survivin aufgrund seiner Beteiligung an der Zellzykluskontrolle eine pathogenetisch wichtige Rolle bei der Entstehung von Leukämien hat, und wie von mehreren Gruppen für andere maligne Erkrankungen beschrieben, mit einem schlechteren Therapieansprechen korreliert. [100, 132-134]. Die erhöhte Survivin-Expression bei den untersuchten B-ALL Patienten mit einem Rezidiv ihrer Erkrankung lässt vermuten, dass die hohen Survivinlevel einen Überlebensvorteil der Blasten durch Inhibition der Apoptose darstellen. Deshalb kann die Detektion von Survivin genutzt werden, Patienten mit einem schlechteren Outcome zu identifizieren. Bezogen auf das EFS, RFS und OS zeigten sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten der Hochrisiko- und Niedrigrisiko-Gruppen keine signifikanten Unterschiede der Survivin-Expression. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass die Patienten der Hochrisikogruppe eine protokollgemäß intensivere Chemotherapie erhalten und dadurch der negative Effekt einer erhöhten Survivin-Expression maskiert wird. Die verschiedenen zur kurativen Therapie eingesetzten Chemotherapeutika induzieren den Zelltod sowohl über Todesrezeptoren sowie mitochondrial

lokalisierte Moleküle die in einer gemeinsamen Endstrecke münden. Die Tatsache, dass Survivin als Inhibitor der Effektorcaspasen wirkt und dadurch die gemeinsamen Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen "Apoptosepathways" blockiert lässt vermuten, dass Survivin auch eine Schlüsselfunktion bezogen auf die Wirkmechanismen von Chemotherapeutika besitzt [107]. Zhou et al. (2002) zeigte eine Modulation der Survivin-Expression durch verschiedene Chemotherapeutika, z.B. Daunorubicin. Daunorubicin führt durch Interaktion zwischen dem Tumorsuppressorgen p53 und Survivin zu einer "Downregulation" von Survivin und dadurch zur Sensitivierung für Apoptose in ALL-Zellen [135, 136]. Außerdem konnte von Ceballos-Cancino et al. (2007), gezeigt werden, dass Survivin das pro-apoptotische SMAC-Molekül inhibiert. SMAC wird aus den Mitochondrien freigesetzt und bindet direkt an Mitglieder der IAP Familie, wodurch diese neutralisiert werden und die Inhibition der Effektorcaspasen 3, -6 und -9 aufgehoben wird [137]. Survivin und Survivin-AEx3 können durch intramitochondriale Bindung die Freisetzung von SMAC verhindern und gleichzeitig auch das zytosolisch vorliegende SMAC blockieren [138]. Die verschiedenen Funktionen, die Survivin sowohl in der Zellzykluskontrolle als auch bei der Inhibition der physiologischen Apoptose ausübt, zeigen die komplexe Rolle die Survivin bei der Entstehung maligner hämatologischer Erkrankungen spielen zu scheint. Zusammenfassend konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit, die hohe Survivinprotein-Expression als neuer, von den klassischen klinischen Risikofaktoren unabhängiger Risikofaktor für das EFS, RFS und OS bei kindlichen Vorläufer B-Zellleukämien belegt werden.

Aufbauend auf den auf Proteinebene erhobenen Daten, wurde in einem zweiten Teil die Survivin-Expression auf mRNA-Ebene untersucht. Durch alternatives Splicing liegen vier mRNA-Splicevarianten von Survivin vor. Bisher beschrieben wurden Survivin-2B, Survivin- $\Delta$ Exon3, Survivin-2 $\alpha$  und Survivin-3B, welche ein unterschiedliches pro- oder antiapoptotisches Potential aufweisen [85, 139]. Survivin und seine pro-apoptotische Splicevariante Survivin-2B sind bevorzugt im Zytoplasma lokalisiert, die anti-apoptotische Splicevariante Survivin- $\Delta$ Ex3 vermehrt im Nukleolus [85, 140]. Für die beiden Splicevarianten Survivin-3D und Survivin-2 $\alpha$  lagen zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch keine Daten über die klinische Relevanz vor und es waren keine Primer-gekoppelten Sonden zur Detektion mittels "real-time-PCR" verfügbar. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen erstmalig eine quantitative Messung der mRNA-Expression der funktionell bedeutenden Survivinsplicevarianten Survivin, Survivin-2B und Survivin- $\Delta$ Exon3 bei 20 pädiatrischen Patienten mit Vorläufer-B-ALL. In der Literatur existieren derzeit nur sporadische Arbeiten zur quantitativen Untersuchung der Survivin-mRNA-Expression in Vorläufer-B-ALL-Blasten, insbesondere keine Untersuchungen bei Kindern. Anhand der hier erhobenen Daten wurde gezeigt, dass alle drei Isoformen Survivin, Survivin-2B und Survivin-AExon3 in den pädiatrischen ALL-Blasten exprimiert werden. Besonderes Interesse galt der Untersuchung, inwiefern die Höhe der gemessenen Survivinexpression der einzelnen Isoformen mit den klinischen Parametern der untersuchten Patienten korreliert. Die Patienten wurden anhand der oben genannten klinischen Risikoparameter in eine Hoch- und Niedrigrisiko-Gruppe aufgeteilt. Die Höhe der Expression von Survivin und Survivin-∆Exon3 zwischen den Patienten der Hoch- und Niedrigrisiko-Gruppe war vergleichbar. Es zeigte sich jedoch eine deutlich höhere Expression der pro-apoptotisch wirksamen Survivin-2B-Isoform bei den Patienten der Niedrigrisiko-Gruppe. Diese Patienten präsentieren sich häufig mit einer niedrigeren initialen Leukozytenzahl, was durch die hemmende Wirkung von Survivin-2B auf das anti-apoptotische und somit stark proliferative Potential der anderen Splicevarianten verursacht sein könnte. Survivin-AExon3 scheint ein hohes anti-apoptotisches Potential zu besitzen und eine Überexpression wurde in verschiedenen aggressiv wachsenden Tumoren beschrieben und scheint mit einer schlechten Prognose korreliert zu sein. Bei erwachsenen Patienten mit einer prognostisch ungünstigen und aggressiv verlaufenden akuten lymphatischen Leukämie zeigten sich im Vergleich zu Patienten mit einer chronisch lymphatischen Leukämie eine deutlich höhere Expression von Survivin-∆Exon3. Survivin-2B wurde kaum exprimiert [123]. Die Überexpression von Survivin-∆Exon3 konnte in den ebenfalls schnell proliferierenden Vorläufer-B-ALL-Blasten der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten pädiatrischen Patienten nicht bestätigt werden, die Expression von Survivin-ΔExon3 war erstaunlicherweise niedriger als in den gesunden Kontrollproben. Survivin und die Splicevariante-2B waren in den kindlichen Vorläufer-B-ALL-Blasten im Vergleich zu den gesunden reifen B-Zellen jedoch deutlich erhöht. Survivin-2B wurde als pro-apoptotisches Molekül beschrieben, welches als Antagonist der beiden anti-apoptotischen Formen Survivin und Survivin-AExon3 wirkt [139]. In Magenkarzinomen und Nierenkarzinomen wurde gezeigt, dass ein hhohes Tumorstadium und ein Tumorprogress mit einer Verschiebung des Splicevarianten-Verhältnisses zugunsten der anti-apoptotischen Formen und gleichzeitig mit der einer Abnahme Survivin-2B-Expression einhergeht [85, 100]. Das hohe Proliferationspotential im Sinne eines Tumorprogress könnte also durch die fehlende Hemmung der anti-apoptotischen Isoformen durch Survivin-2B verursacht sein. Übereinstimmend mit diesen Daten konnte auch in benignen ZNS-Tumoren eine deutlich höhere Expression der Survivin-2B-Isoform, im Gegensatz zu einer niedrigen Expression in

malignen schnell wachsenden Hirntumoren gezeigt werden [134]. Survivin-2B scheint durch seine hemmende Wirkung auf die beiden anti-apoptotisch wirksamen Survivin-Isoformen prognostisch günstig zu sein. Durch eine Heterodimerisierung von Survivin-2B mit Survivin erfolgt eine Verminderung der anti-apoptotischen Potenz von Survivin, so dass Survivin-2B als interner Regulationsschalter der anti-apoptotischen Wirkung fungiert. Aus diesem Grund lässt sich die apoptotische Potenz im Sinne eines "apoptotischen Indexes" (PI) bestimmen, indem man die attenuierende Splicevariante Survivin-2B ins Verhältnis zur Summe der antiapoptotischen Splice-Formen von Survivin setzt. In der Auswertung der erhobenen Daten bei den Vorläufer-B-ALL-Blasten zeigte sich keine signifikante Korrelation, aber ein scheinbar höherer proapoptotischer Index (Survivin-2B/Survivin+Survivin-AExon3) bei den Patienten der Niedrigrisiko-Gruppe. Bei den untersuchten Patienten in der prognostisch günstigeren Gruppe unter 10 Jahren zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Expression der Splicevariante Survivin-2B im Vergleich zu den prognostisch ungünstigeren Patienten mit einem Alter bei Erkrankungsbeginn von über 10 Jahren. Bei 13 Patienten wurde parallel sowohl auf mRNA-Ebene, wie auch auf Proteinebene die Surivin-Expression untersucht. Vermutlich aufgrund der sehr kleinen Fallzahl zeigten sich hier keine signifikanten Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden.

Der Verlauf und die Prognose der B-Zellleukämien des Kindesalters unterscheiden sich mit einem ereignisfreiem Überleben von 80-90% der Patienten nach Therapie mit den etablierten Studienprotokollen, deutlich von dem der Erwachsenenleukämien. Dies kann zum einen in der Anwendung unterschiedlicher Therapieprotokolle begründet liegen, zum anderen sind jedoch auch die Phäno- und Genotypen der Leukämieblasten in beiden Patientenkollektiven unterschiedlich. Die Erkenntnis, dass Survivin-2B als natürlicher Antagonist gegenüber den antiapoptotischen Isoformen wirkt und sich eine hohe Expression von Survivin-2B als prognostisch günstig darstellt, ließe sich in Zukunft zur Entwicklung alternativer Therapieansätze in der Leukämiebehandlung nutzen, indem man versucht das Expressionsverhältnis der verschiedenen Isoformen zu beeinflussen. Neben dem Einfluss der Chemosensitivität der Blasten auf das Therapieansprechen, spielen bei den Leukämiepatienten immunologische Kontrollmechanismen eine wichtige Rolle für die langfristige Erhaltung der Remission. Im Rahmen der immunologischen Kontrolle spielt die Erkennung der malignen Zellen und deren Unterscheidung von normalem gesunden Geweben eine entscheidende Rolle. Neben den klassischen leukämiespezifischen Antigenen, die physiologisch auch im Rahmen von Reifungsstadien exprimiert werden, gibt es verschiedene Antigene, die nur in spezifischen Tumorgeweben und nicht in gesunden reifen Geweben exprimiert werden [141]. Sie können als spezifische Zielobjekte für immuntherapeutische Therapieverfahren genutzt werden [142]. Survivin bietet sich durch seine fehlende Expression in reifen gesunden Geweben als tumorspezifisches Antigen in der immunologischen Tumortherapie an [87]. In einer Arbeit von Schaft *et al.(2005)* konnte gezeigt werden, dass zytotoxische T-Zellen durch Survivin-RNA transfizierte dendritischen Zellen stimuliert wurden und eine tumorspezifische Immunantwort auslösen können [143, 144]. Coughlin *et al (2004)*. transfizierte Neuroblastom-RNA in CD40 aktivierte B-Zellen, kultivierte sie mit Survivinantigen beladenen Zellen und konnte hierdurch eine tumorspezifische T-Zellantwort auslösen [145]. Aufgrund dieser Ergebnisse, die durch andere Gruppen auch für weitere Tumorentitäten bestätigt werden konnte, scheint Survivin ein ideales Target für die Tumorimmuntherapie darzustellen, da es insbesondere in den Blasten hochexprimiert wird. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse zu nutzen, um neue Therapieformen wie die Beeinflussung des Expressionverhältnis der verschiedenen Survivin-Isoformen oder Survivin als tumorspezifisches Antigen in der Immuntherapie zu entwickeln, könnten Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen sein.

### 6 Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die rezeptornahen Schritte nach CD95-vermittelter Apoptoseinduktion, in unstimulierten und CD40-stimulierten Lymphomzelllinien und Vorläufer-B-ALL-Blasten von Kinder untersucht und mit normalen B-Zellen verglichen. Die beiden unreifen Lymphomzelllinien Daudi und Raji, die zur Etablierung der Versuche in primären Leukämiezellen als Modellsystem dienten, zeigen ein divergentes basales Expressionsmuster von CD95 und eine unterschiedliche Sensitivität für CD95-vermittelte Apoptose. Die untersuchten Daudi-Zellen hatten eine initial niedrige Expression von CD95 auf ihrer Oberfläche, welche durch CD40-Stimulation deutlich hochreguliert wurde, jedoch trotzdem nicht zu einer signifikanten Sensitivierung für CD95-vermittelte Apoptose führte. Die Raji Zellen zeigten schon initial eine hohe Expression von CD95 die sich durch CD40-Stimulation nicht relevant steigern lies und auch die Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose nicht verstärkte. Ursächlich für dieses unterschiedliche Verhaltensmuster scheint eine Blockade in der Fortleitung der CD95-vermittelten Apoptose am "death-inducingsignaling-complex" (DISC) durch c-FLIP zu sein. Das Molekül c-FLIP blockiert nach CD95vermittelter Apoptoseinduktion die Rekrutierung der Procaspase-8 am DISC und verhindert somit die Aktivierung der proximalen Initiator- und distalen Effektorcaspasen die zum Ablauf der Apoptose führen. Der entscheidende Unterschied zeigte sich bei den CD40-stimulierten Daudi-Zellen in einer überproportional stärkeren Hochregulation der antiapoptotischen FLIP short-Form im Vergleich zur Expression des proapoptotischen FLIP long. Bei den Raji-Zellen wurden FLIP long und die kurze, der short-Form vergleichbare R-Form in einem ausgeglichenen Verhältnis, unabhängig von der CD40-Stimualtion, stabil exprimiert. Nach CD95-vermittelter Apoptoseinduktion in den Raji-Zellen, wurde durch Zugabe des Proteinsynthesehemmer Cycloheximid das Verhältnis zwischen FLIP long und –R zugunsten der proapoptotischen FLIP long Form verschoben und dadurch eine deutliche Sensitivierung für CD95-vermittelte Apoptose erreicht.

Vergleichbar mit den Daudi-Zellen zeigte sich auch in den primären Vorläufer-B-Zellleukämieblasten nach CD40-Stimulation eine Hochregulation der beiden kurzen Isoformen FLIP short und –R. Die Expression von FLIP-R konnte erstmalig in kindlichen Vorläufer-B-ALL-Blasten nachgewiesen werden. In den gesunden reifen B-Zellen wurde nur die antiapoptotische FLIP short-Isoform exprimiert, die im Verhältnis zur proapoptotischen long-Form jedoch deutlich schwächer exprimiert wurde. In dieser Arbeit konnte erstmalig ein Überwiegen der Expression der kurzen FLIP-Isoformen (short und –R) im Verhältnis zu FLIP long, als eine Ursache für die gesteigerte Apoptoseresistenz der Vorläufer-B-ALL-Blasten von Kindern gegenüber CD95-vermittelter Apoptose, im Vergleich zu gesunden B-Zellen, belegt werden. Insbesondere die Ratio zwischen der proapoptotischen long-Isoform zu den antiapoptotischen kurzen Isoformen short und –R scheint entscheidend für die Ausprägung der Apoptoseresistenz zu sein.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde Survivin, ein Mitglied der "Inhibitor of apoptosis family" (IAP) mittels ELISA und PCR, auf Protein- sowie mRNA-Ebene in Vorläufer-B-ALL-Blasten von Kindern untersucht. Das tumorspezifische Molekül Survivin hemmt die gemeinsame Endstrecke des todesrezeptor-vermittelten und des über die Mitochondrien fortgeleiteten Apoptosepathways, durch Inhibition der Effektorcaspasen-3 und -9. Die Messung der Survivin Gesamt-Proteinkonzentration erfolgte mittels ELISA-Technik in Vorläufer-B-ALL-Blasten von 66 Kindern. In retrospektiven multivariaten Analyse stellt sich Survivin als ein neuer unabhängiger Risikoparameter von den klassischen klinischen Risikofaktoren (Alter, Leukozytenzahl, Immunphänotyp, PVA-Score, Translokationen) dar. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass die Höhe der Survivinexpression in den Vorläufer-B-ALL-Blasten der untersuchten pädiatrischen Patientenkohorte einen unabhängigen Risikofaktor für das 3-Jahre-ereignisfreie-Überleben, das 3-Jahre-rezidivfreie-Überleben und das Gesamtüberleben darstellt.

Darüberhinaus wurde die prognostische Bedeutung des IAP Survivin in Vorläufer-B-ALL-Blasten von 20 Kindern auf mRNA-Ebene untersucht. Dabei erfolgte die Analyse der Expression von Survivin und seinen funktionell bedeutsamen Splicevarianten Survivin-2B und Survivin- $\Delta$ Exon3 in einer qualitativen und quantitativen PCR. Survivin wurde in den Vorläufer-B-ALL-Blasten der untersuchten Kinder deutlich überexprimiert und wurde in peripheren Blutzellen und Knochenmark von gesunden Probanden nicht nachgewiesen. Nach Etablierung einer quantitativen "real-time"-PCR wurde die Survivin-Expression der einzelnen Splicevarianten Survivin, Survivin-2B und Survivin  $\Delta$ -Exon3 in den Vorläufer-B-ALL-Blastenquantitativ bestimmt. Die Höhe der relativen mRNA-Expression von Survivin und seinen Splicevarianten wurde anschliessend mit den klassischen klinischen Risikofaktoren korreliert. Es konnte eine signifikant höhere Expression der pro-apoptotischen Splicevariante Survivin-2B bei den Niedrigrisikopatienten im Vergleich zu den Hochrisikopatienten nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte in den Vorläufer-B-Zell-Blasten der untersuchten pädiatrischen Patienten erstmalig die Überexpression der kurzen antiapoptotischen Isoformen von c-FLIP als eine Ursache für die erhöhte Apoptoseresistenz der Leukämieblasten bestätigt werden, sowie eine prognostische Relevanz der Survivinexpression neu belegt werden.

### 7 Literatur

- 1. Pui, C.H., Childhood leukemias. N Engl J Med, 1995. 332(24): p. 1618-30.
- 2. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group.* Br J Haematol, 1976. **33**(4): p. 451-8.
- 3. Zola, H. and B.W. Swart, *Human leucocyte differentiation antigens*. Trends Immunol, 2003. **24**(7): p. 353-4.
- 4. Yusuf, R.Z., et al., *Flow cytometric analysis of childhood leukemias*. J Pak Med Assoc, 2001. **51**(3): p. 133-6.
- 5. Wiemels, J.L., et al., *Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children*. Lancet, 1999. **354**(9189): p. 1499-503.
- 6. Greaves, M.F., et al., *Leukemia in twins: lessons in natural history*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2321-33.
- Saunders, E.F., B.C. Lampkin, and A.M. Mauer, Variation of Proliferative Activity in Leukemic Cell Populations of Patients with Acute Leukemia. J Clin Invest, 1967. 46(8): p. 1356-1363.
- 8. Mirro, J., Jr., et al., *Effects of recombinant human hematopoietic growth factors on leukemic blasts from children with acute myeloblastic or lymphoblastic leukemia.* Leukemia, 1993. **7**(7): p. 1026-33.
- 9. Touw, I., et al., *Recombinant hematopoietic growth factors fail to induce a proliferative response in precursor B acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 1989.
  3(5): p. 356-62.
- 10. Grimaldi, J.C. and T.C. Meeker, *The t(5;14) chromosomal translocation in a case of acute lymphocytic leukemia joins the interleukin-3 gene to the immunoglobulin heavy chain gene.* Blood, 1989. **73**(8): p. 2081-5.
- 11. Meeker, T.C., et al., *Activation of the interleukin-3 gene by chromosome translocation in acute lymphocytic leukemia with eosinophilia*. Blood, 1990. **76**(2): p. 285-9.
- 12. Harbott, J., et al., *Clinical significance of cytogenetic studies in childhood acute lymphoblastic leukemia: experience of the BFM trials.* Recent Results Cancer Res, 1993. **131**: p. 123-32.
- 13. Rubnitz, J.E., J.R. Downing, and C.H. Pui, *Significance of the TEL-AML fusion gene in childhood AML*. Leukemia, 1999. **13**(9): p. 1470-1.
- 14. Ludwig, W.D., et al., *Phenotypic and genotypic heterogeneity in infant acute leukemia. I. Acute lymphoblastic leukemia.* Leukemia, 1989. **3**(6): p. 431-9.
- 15. Pui, C.H., *Recent advances in the biology and treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia.* Curr Opin Hematol, 1998. **5**(4): p. 292-301.
- 16. Borkhardt, A., et al., *Infant acute lymphoblastic leukemia combined cytogenetic, immunophenotypical and molecular analysis of 77 cases.* Leukemia, 2002. **16**(9): p. 1685-90.
- 17. Campana, D., *Molecular determinants of treatment response in acute lymphoblastic leukemia.* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2008. **2008**: p. 366-73.
- 18. Fulda, S., *Targeting inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) for cancer therapy*. Anticancer Agents Med Chem, 2008. **8**(5): p. 533-9.
- 19. Wyllie, A.H., J.F. Kerr, and A.R. Currie, *Cell death: the significance of apoptosis.* Int Rev Cytol, 1980. **68**: p. 251-306.
- 20. Carson, D.A. and J.M. Ribeiro, *Apoptosis and disease*. Lancet, 1993. **341**(8855): p. 1251-4.
- 21. Mattson, M.P., *Apoptosis in neurodegenerative disorders*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(2): p. 120-9.

- 22. Krammer, P.H., *CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die*. Adv Immunol, 1999. **71**: p. 163-210.
- 23. Budihardjo, I., et al., *Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999. **15**: p. 269-90.
- 24. Eldadah, B.A. and A.I. Faden, *Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury*. J Neurotrauma, 2000. **17**(10): p. 811-29.
- 25. Ware, C.F., *The TNF superfamily*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(3-4): p. 181-4.
- 26. Ware, C.F., *The TNF Superfamily-2008*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(3-4): p. 183-6.
- 27. Younes, A. and B.B. Aggarwall, *Clinical implications of the tumor necrosis factor family in benign and malignant hematologic disorders*. Cancer, 2003. **98**(3): p. 458-67.
- 28. Willmroth, F., H.H. Peter, and W. Conca, *A matrix metalloproteinase gene expressed in human T lymphocytes is identical with collagenase 3 from breast carcinomas.* Immunobiology, 1998. **198**(4): p. 375-84.
- 29. Clark, E.A., *CD40: a cytokine receptor in search of a ligand*. Tissue Antigens, 1990. **36**(1): p. 33-6.
- 30. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 2-17.
- 31. Banchereau, J., et al., *The CD40 antigen and its ligand*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 881-922.
- 32. van Kooten, C. and J. Banchereau, *Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(3): p. 330-7.
- 33. Banchereau, J., et al., *Functional CD40 antigen on B cells, dendritic cells and fibroblasts.* Adv Exp Med Biol, 1995. **378**: p. 79-83.
- 34. Schonbeck, U., F. Mach, and P. Libby, *CD154 (CD40 ligand)*. Int J Biochem Cell Biol, 2000. **32**(7): p. 687-93.
- 35. Faassen, A.E., et al., *CD40-CD40 ligand interactions stimulate B cell antigen processing*. Eur J Immunol, 1995. **25**(12): p. 3249-55.
- 36. Gordon, J., *CD40 and its ligand: central players in B lymphocyte survival, growth, and differentiation.* Blood Rev, 1995. **9**(1): p. 53-6.
- 37. Splawski, J.B., S.M. Fu, and P.E. Lipsky, *Immunoregulatory role of CD40 in human B cell differentiation*. J Immunol, 1993. **150**(4): p. 1276-85.
- Ranheim, E.A. and T.J. Kipps, Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. J Exp Med, 1993. 177(4): p. 925-35.
- 39. Kennedy, M.K., et al., *Induction of B cell costimulatory function by recombinant murine CD40 ligand*. Eur J Immunol, 1994. **24**(1): p. 116-23.
- 40. Schultze, J.L., et al., *CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy.* J Clin Invest, 1997. **100**(11): p. 2757-65.
- 41. Evans, D.E., et al., *Resting B lymphocytes as APC for naive T lymphocytes: dependence on CD40 ligand/CD40.* J Immunol, 2000. **164**(2): p. 688-97.
- 42. Trauth, B.C., et al., *Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis*. Science, 1989. **245**(4915): p. 301-5.
- 43. Kayagaki, N., et al., *Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand*. J Exp Med, 1995. **182**(6): p. 1777-83.
- 44. Chinnaiyan, A.M., et al., *FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1)* and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. J Biol Chem, 1996. **271**(9): p. 4961-5.

- 45. Medema, J.P., et al., *FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC).* Embo J, 1997. **16**(10): p. 2794-804.
- 46. Cory, S., D.C. Huang, and J.M. Adams, *The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis.* Oncogene, 2003. **22**(53): p. 8590-607.
- 47. Scaffidi, C., et al., *Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22532-8.
- 48. Troeger, A., et al., *High expression of CD40 on B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia blasts is an independent risk factor associated with improved survival and enhanced capacity to up-regulate the death receptor CD95.* Blood, 2008. **112**(4): p. 1028-34.
- 49. Fuentes-Prior, P. and G.S. Salvesen, *The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition*. Biochem J, 2004. **384**(Pt 2): p. 201-32.
- 50. Nicholson, D.W., *Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death.* Cell Death Differ, 1999. **6**(11): p. 1028-42.
- 51. Fesik, S.W., *Insights into programmed cell death through structural biology*. Cell, 2000. **103**(2): p. 273-82.
- 52. Shi, Y., *Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view.* Protein Sci, 2004. **13**(8): p. 1979-87.
- 53. Thornberry, N.A., *The caspase family of cysteine proteases*. Br Med Bull, 1997. **53**(3): p. 478-90.
- 54. Thornberry, N.A., A. Rosen, and D.W. Nicholson, *Control of apoptosis by proteases*. Adv Pharmacol, 1997. **41**: p. 155-77.
- 55. Fischer, U., R.U. Janicke, and K. Schulze-Osthoff, *Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates.* Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 76-100.
- 56. Thome, M., et al., *Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors.* Nature, 1997. **386**(6624): p. 517-21.
- 57. Kischkel, F.C., et al., *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor.* Embo J, 1995. **14**(22): p. 5579-88.
- 58. Scaffidi, C., et al., *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways*. Embo J, 1998. **17**(6): p. 1675-87.
- 59. Krueger, A., et al., *FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(24): p. 8247-54.
- 60. Bertin, J., et al., *Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(4): p. 1172-6.
- 61. Hu, S., et al., *I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-*95-induced apoptosis. J Biol Chem, 1997. **272**(28): p. 17255-7.
- 62. Irmler, M., et al., *Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP*. Nature, 1997. **388**(6638): p. 190-5.
- 63. Hu, S., et al., *A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis.* J Biol Chem, 1997. **272**(15): p. 9621-4.
- 64. Srinivasula, S.M., et al., *FLAME-1*, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 18542-5.
- 65. Goltsev, Y.V., et al., *CASH, a novel caspase homologue with death effector domains*. J Biol Chem, 1997. **272**(32): p. 19641-4.
- 66. Inohara, N., et al., *CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10717-22.

- 67. Han, D.K., et al., *MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(21): p. 11333-8.
- 68. Rasper, D.M., et al., *Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex.* Cell Death Differ, 1998. **5**(4): p. 271-88.
- 69. Shu, H.B., D.R. Halpin, and D.V. Goeddel, *Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis*. Immunity, 1997. **6**(6): p. 751-63.
- 70. Kataoka, T., et al., *FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation.* J Immunol, 1998. **161**(8): p. 3936-42.
- 71. Golks, A., et al., *c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis.* J Biol Chem, 2005. **280**(15): p. 14507-13.
- 72. Scaffidi, C., P.H. Krammer, and M.E. Peter, *Isolation and analysis of components of CD95 (APO-1/Fas) death-inducing signaling complex*. Methods, 1999. **17**(4): p. 287-91.
- 73. Krueger, A., et al., *Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex.* J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20633-40.
- 74. Chang, D.W., et al., *c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis.* Embo J, 2002. **21**(14): p. 3704-14.
- 75. Dohrman, A., et al., *Cellular FLIP Long Form Augments Caspase Activity and Death of T Cells through Heterodimerization with and Activation of Caspase-8.* J Immunol, 2005. **175**(1): p. 311-8.
- 76. Micheau, O., et al., *The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex.* J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 45162-71.
- 77. Hennino, A., et al., *Regulation of the Fas death pathway by FLICE-inhibitory protein in primary human B cells.* J Immunol, 2000. **165**(6): p. 3023-30.
- Nachmias, B., Y. Ashhab, and D. Ben-Yehuda, *The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer*. Semin Cancer Biol, 2004. 14(4): p. 231-43.
- 79. Richter, B.W., et al., *Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(13): p. 4292-301.
- 80. Li, F., et al., *Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin*. Nature, 1998. **396**(6711): p. 580-4.
- 81. Li, F. and D.C. Altieri, *Transcriptional analysis of human survivin gene expression*. Biochem J, 1999. **344 Pt 2**: p. 305-11.
- 82. Altieri, D.C., *Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer.* Oncogene, 2003. **22**(53): p. 8581-9.
- 83. Chen, J., et al., Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. Neoplasia, 2000.
  2(3): p. 235-41.
- 84. Kallio, M.J., M. Nieminen, and J.E. Eriksson, *Human inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin participates in regulation of chromosome segregation and mitotic exit.* Faseb J, 2001. **15**(14): p. 2721-3.
- 85. Mahotka, C., et al., *Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties.* Cancer Res, 1999. **59**(24): p. 6097-102.
- 86. Badran, A., et al., *Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptopsis gene survivin.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **314**(3): p. 902-7.

- 87. Ambrosini, G., C. Adida, and D.C. Altieri, *A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma.* Nat Med, 1997. **3**(8): p. 917-21.
- 88. Adida, C., et al., *Developmentally regulated expression of the novel cancer antiapoptosis gene survivin in human and mouse differentiation*. Am J Pathol, 1998. **152**(1): p. 43-9.
- 89. Velculescu, V.E., et al., *Analysis of human transcriptomes*. Nat Genet, 1999. **23**(4): p. 387-8.
- 90. Nakagawa, Y., et al., *Expression of IAP-family proteins in adult acute mixed lineage leukemia (AMLL)*. Am J Hematol, 2005. **78**(3): p. 173-80.
- 91. Adida, C., et al., *Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia.* Br J Haematol, 2000. **111**(1): p. 196-203.
- 92. Tamm, I., et al., *High expression levels of x-linked inhibitor of apoptosis protein and survivin correlate with poor overall survival in childhood de novo acute myeloid leukemia.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(11): p. 3737-44.
- 93. Wagner, M., et al., *In vivo expression of survivin and its splice variant survivin-2B: Impact on clinical outcome in acute myeloid leukemia.* Int J Cancer, 2006.
- 94. Wuchter, C., et al., *Differences in the expression pattern of apoptosis-related molecules between childhood and adult de novo acute myeloid leukemia.* Haematologica, 2004. **89**(3): p. 363-4.
- 95. Carter, B.Z., et al., *Caspase-independent cell death in AML: caspase inhibition in vitro with pan-caspase inhibitors or in vivo by XIAP or Survivin does not affect cell survival or prognosis.* Blood, 2003. **102**(12): p. 4179-86.
- 96. Bhojwani, D., et al., *Biological pathways associated with relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: A children's oncology group study.* Blood, 2006.
- 97. Hockenbery, D.M., et al., *BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(16): p. 6961-5.
- 98. Tsujimoto, Y., et al., *Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma*. Science, 1985. **228**(4706): p. 1440-3.
- 99. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points*. Cell, 2004. **116**(2): p. 205-19.
- 100. Krieg, A., et al., *Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression*. Br J Cancer, 2002. 86(5): p. 737-43.
- 101. Inukai, T., et al., *Resistance of infant leukemia with MLL rearrangement to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: a possible mechanism for poor sensitivity to antitumor immunity.* Leukemia, 2006. **20**(12): p. 2119-29.
- 102. Kerr, J.F., C.M. Winterford, and B.V. Harmon, *Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy.* Cancer, 1994. **73**(8): p. 2013-26.
- 103. Haarman, E.G., et al., *BCL-2 expression in childhood leukemia versus spontaneous apoptosis, drug induced apoptosis, and in vitro drug resistance.* Adv Exp Med Biol, 1999. **457**: p. 325-33.
- 104. Lavrik, I., et al., *The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 144-5.
- 105. Scaffidi, C., et al., *The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis*. J Biol Chem, 1999. **274**(3): p. 1541-8.
- 106. Uherova, P., et al., *Expression of c-FLIP in classic and nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2004. 12(2): p. 105-10.

- Tamm, I., et al., *IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs.* Cancer Res, 1998. 58(23): p. 5315-20.
- 108. Voorzanger-Rousselot, N. and J.Y. Blay, *Coexpression of CD40 and CD40L on B lymphoma and carcinoma cells: an autocrine anti-apoptotic role.* Leuk Lymphoma, 2004. **45**(6): p. 1239-45.
- 109. Banchereau, J., *Molecules controlling B-lymphocyte growth and differentiation*. Contrib Nephrol, 1995. **111**: p. 55-9.
- 110. Garrone, P., et al., *Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes*. J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1265-73.
- 111. Wang, Z., et al., *Induction of bcl-x by CD40 engagement rescues sIg-induced apoptosis in murine B cells.* J Immunol, 1995. **155**(8): p. 3722-5.
- 112. Voorzanger-Rousselot, N., L. Alberti, and J.Y. Blay, *CD40L induces multidrug* resistance to apoptosis in breast carcinoma and lymphoma cells through caspase independent and dependent pathways. BMC Cancer, 2006. **6**: p. 75.
- 113. Jeon, Y.K., et al., *Resistance to Fas-mediated apoptosis is restored by cycloheximide through the downregulation of cellular FLIP(L) in NK/T-cell lymphoma*. Lab Invest, 2005. **85**(7): p. 874-84.
- 114. Eeva, J., et al., *The CD40-induced protection against CD95-mediated apoptosis is associated with a rapid upregulation of anti-apoptotic c-FLIP*. Mol Immunol, 2007. 44(6): p. 1230-7.
- 115. Kanetaka, Y., et al., *Interferon-alpha induces transient upregulation of c-FLIP through NF-kappaB activation*. Exp Cell Res, 2008. **314**(2): p. 246-54.
- 116. van Houdt, I.S., et al., *Expression of c-FLIP is primarily detected in diffuse large B-cell lymphoma and Hodgkin's lymphoma and correlates with lack of caspase 8 activation*. Histopathology, 2007. **51**(6): p. 778-84.
- 117. Mathas, S., et al., *c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis.* J Exp Med, 2004. **199**(8): p. 1041-52.
- 118. Irisarri, M., et al., *Resistance to CD95-mediated apoptosis through constitutive c-FLIP expression in a non-Hodgkin's lymphoma B cell line*. Leukemia, 2000. **14**(12): p. 2149-58.
- 119. Schmitz, I., et al., *Resistance of short term activated T cells to CD95-mediated apoptosis correlates with de novo protein synthesis of c-FLIPshort.* J Immunol, 2004. **172**(4): p. 2194-200.
- 120. Marusawa, H., et al., *HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression*. Embo J, 2003. **22**(11): p. 2729-40.
- 121. Ambrosini, G., et al., *Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting*. J Biol Chem, 1998. **273**(18): p. 11177-82.
- 122. Mori, A., et al., *Expression of the antiapoptosis gene survivin in human leukemia*. Int J Hematol, 2002. **75**(2): p. 161-5.
- 123. Nakagawa, Y., et al., *Differential expression of survivin in bone marrow cells from patients with acute lymphocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Res, 2004. **28**(5): p. 487-94.
- 124. Moriai, R., et al., *Quantitative analysis of the anti-apoptotic gene survivin expression in malignant haematopoietic cells*. Anticancer Res, 2001. **21**(1B): p. 595-600.
- 125. Paydas, S., et al., *Survivin and aven: two distinct antiapoptotic signals in acute leukemias.* Ann Oncol, 2003. **14**(7): p. 1045-50.
- 126. Sugahara, K., et al., *Clinical relevance of survivin as a biomarker in neoplasms, especially in adult T-cell leukemias and acute leukemias.* Int J Hematol, 2004. **80**(1): p. 52-8.

- 127. Tamm, I., et al., *Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 1796-803.
- 128. Vogler, M., et al., *Inhibition of clonogenic tumor growth: a novel function of Smac contributing to its antitumor activity*. Oncogene, 2005. **24**(48): p. 7190-202.
- 129. Stucki, J.W. and H.U. Simon, *Mathematical modeling of the regulation of caspase-3 activation and degradation*. J Theor Biol, 2005. **234**(1): p. 123-31.
- 130. Schimmer, A.D., et al., *Identification of small molecules that sensitize resistant tumor cells to tumor necrosis factor-family death receptors*. Cancer Res, 2006. **66**(4): p. 2367-75.
- 131. Adida, C., et al., *Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas.* Blood, 2000. **96**(5): p. 1921-5.
- 132. Invernizzi, R., et al., *Survivin expression, apoptosis and proliferation in chronic myelomonocytic leukemia.* Eur J Haematol, 2006.
- 133. Invernizzi, R., et al., *Survivin expression in acute leukemias and myelodysplastic syndromes*. Leuk Lymphoma, 2004. **45**(11): p. 2229-37.
- 134. Yamada, Y., et al., *Transcriptional expression of survivin and its splice variants in brain tumors in humans.* J Neurosurg, 2003. **99**(4): p. 738-45.
- 135. Zhou, M., et al., *DNA damage induces a novel p53-survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells.* J Pharmacol Exp Ther, 2002. **303**(1): p. 124-31.
- 136. Holleman, A., et al., *The expression of 70 apoptosis genes in relation to lineage, genetic subtype, cellular drug resistance, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia.* Blood, 2006. **107**(2): p. 769-76.
- 137. Verhagen, A.M. and D.L. Vaux, *Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac.* Apoptosis, 2002. 7(2): p. 163-6.
- 138. Ceballos-Cancino, G., et al., *Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin.* Oncogene, 2007. **26**(54): p. 7569-75.
- 139. Mahotka, C., et al., *Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants*. Cell Death Differ, 2002. **9**(12): p. 1334-42.
- 140. Rodriguez, J.A., et al., *CRM1-mediated nuclear export determines the cytoplasmic localization of the antiapoptotic protein Survivin.* Exp Cell Res, 2002. **275**(1): p. 44-53.
- 141. Miwa, H., M. Beran, and G.F. Saunders, *Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemias*. Leukemia, 1992. **6**(5): p. 405-9.
- 142. Glouchkova, L., B. Ackermann, and D. Dilloo, *Leukemia vaccines*. Acta Haematol, 2003. **110**(2-3): p. 160-70.
- 143. Schaft, N., et al., *Generation of an optimized polyvalent monocyte-derived dendritic cell vaccine by transfecting defined RNAs after rather than before maturation.* J Immunol, 2005. **174**(5): p. 3087-97.
- 144. Zeis, M., et al., *Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells.* J Immunol, 2003. **170**(11): p. 5391-7.
- 145. Coughlin, C.M., et al., *RNA-transfected CD40-activated B cells induce functional T-cell responses against viral and tumor antigen targets: implications for pediatric immunotherapy.* Blood, 2004. **103**(6): p. 2046-54.

### 8 Veröffentlichungen

**Siepermann M**, Ewa Koscielniak, Tobias Dantonello, Dirk Klee, Joachim Boos, Barbara Krefeld, , Thomas Hoehn, Arndt Borkhardt, and Rüdiger Wessalowski

Oral maintenance chemotherapy in an 18-year-old woman during the 27<sup>th</sup> week of gestation with an alveolar rhabdomysarcoma (RMS) of the lower jaw, Manuscript submitted

Siepermann M, Gudowius S, Beltz K, Strier U, Feyen O, Troeger A, Göbel U, Laws HJ, Kögler G, Meisel R, Dilloo D, Niehues T

MHC class II deficiency cured by unrelated mismatched umbilical cord blood transplantation: Case report and review of 68 cases in the literature In Revision

S. Weinspach , **M. Siepermann**, J. Schaper, S. Sarikaya-Seiwert, H. Rieder, M. Gerigk, T. H ö hn, H.-J. Laws

Intracranial Hemorrhage in a Female Leading to the Diagnosis of Severe Hemophilia A and Turner Syndrome

Klin Padiatr. 2009 May-Jun;221(3):167-71

Glouchkova L., Ackermann B., Zibert A., Meisel R., **Siepermann M.**, Janka-Schaub G.E., Goebel U., Troeger A., Dilloo D.

**The CD70/CD27 pathway is critical for stimulation of an effective cytotoxic T cell response against B cell precursor acute lymphoblastic leukemia** *J Immunol.* 2009;182:718-725

Troeger A., Glouchkova L., Ackermann B., Zibert A., Meisel R., **Siepermann M.**, Hanenberg, H., Janka-Schaub G.E., Escherich, G., Goebel U., Dilloo D.

Reduced Expression and Defective Modulation of TNF Receptor/Ligand Family Molecules on proB-ALL Blasts

Klin Padiatr. 2008 Nov-Dec;220(6):353-7. Epub 2008 Oct 23

Troeger, A., Siepermann, M., Escherich, G., Meisel, R., Willers, R., Gudowius, S., Laws, HJ., Hanenberg, H., Göbel, U., Janka-Schaub, G., Mahotka, C., Dilloo, D., Survivin and its prognostic significance in acute B cell precursor lymphoblastic leukemia, Haematologica 2007 Aug;92(8):1043-50

Troeger, A., **Siepermann, M.**, Mahotka, C., Wethkamp, N., Bülle, H., Laws, HJ., Escherich, G., Janka-Schaub, G., Göbel, U., Dilloo, D., **Role of Survivin splice variants in pediatric acute precursor B lymphoblastic leukemia,** Klin Padiatr. 2007 May-Jun;219(3):127-33

Troeger, A., Schmitz, I., Siepermann, M., Glouchkova, L., Gerdemann, U., Janka-Schaub, G. E., Schulze-Osthoff, K., Dilloo, D., Upregulation of c-FLIPS+R upon CD40-Stimulation is associated with inhibition of CD95-induced apoptosis in primary precursor B-ALL, Blood. 2007 Jul 1;110(1):384-7

### Abstracts

### 1. Resistance to CD95-mediated apoptosis in ALL

Glouchkova L., **Siepermann M.,** Tröger A., Janka-SchaubG., Dilloo D., In: Klin. Pädiatr. 2003, 215: 191

#### 2. Survivin modulates CD95-induced apoptosis in B-cell leukemia

Tröger A., **M.Siepermann**, L. Glouchkova, G. Janka-Schaub and D. Dilloo Erasmus workshop on Molecular Therapeutics in Acute Leukemia; September 2003, Congress Center De Doelen, Rotterdam

## 3. Upregulation of FLIPs upon CD40-stimulation - a possible inhibition mechanisms of CD95-induced apoptosis in precursor B-ALL blasts in children

Tröger A., Schmitz I, **M.Siepermann**, L. Glouchkova, G. Janka-Schaub, U. Göbel, Schulze-Osthoff and D. Dilloo

Second Erasmus workshop on Molecular Therapeutics in Acute Leukemia; October 2005, Congress Center De Doelen, Rotterdam

# 4. Upregulation of FLIPs upon CD40 stimulation as a novel mechanism of resistance to CD95-induced apoptosis in precursor B-ALL blasts in children

Troeger A, Schmitz I, Glouchkova L, Siepermann M, Janka-Schaub G, Schulze-Osthoff K, Dilloo D

November 2005, GPOH Meeting, Frankfurt/Main, Germany

## **5.** Upregulation of FLIPs upon CD40 stimulation- a novel inhibition mechanism of CD95-induced apoptosis in precursor B-ALL blasts in children

Troeger A, Schmitz I, Glouchkova L, Siepermann M, Janka-Schaub G, Schulze-Osthoff K, Dilloo D

December 2005, ASH meeting, Atlanta, USA

# 6. Upregulation of FLIPs upon CD40 stimulation- a possible inhibition mechanism of CD95-induced apoptosis in precursor B-ALL-blasts in children

Troeger A, Schmitz I, Glouchkova L, **Siepermann M,** Janka-Schaub G, Goebel U, Schultze-Osthoff K, Dilloo D

March 2006, EBMT Meeting, Hamburg, Germany

### 9 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Professor Dr. Dagmar Dilloo, die mir ein sehr interessantes Thema zur Bearbeitung gab, mich sowohl förderte als auch forderte und mich wissenschaftlich, aber auch klinisch sehr unterstützte.

Herrn Professor Dr. Gattermann danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Danken möchte ich auch Frau Dr. Anja Tröger, für die Betreuung der Arbeit und ihren Einsatz bei der Veröffentlichung der Daten.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Ludmilla Glouchkova und Herrn Dr. Oliver Feyen, die mir so viel beigebracht haben, die mir zu jeder Tages- und Nachtzeit immer mit Pannenhilfe und Diskussionsfreude zur Seite standen und mir den Spaß an der Forschung vermittelten. Vielen Dank!

Bedanken möchte ich mich auch bei den restlichen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dilloo, insbesondere bei Frau Dr. Birgit Ackermann, die mir immer hilfsbereit und unterstützend zur Seite stand und immer noch steht und entscheidend an der Korrektur dieser Arbeit mitgewirkt hat.

Ein grosser Dank geht an Herrn Privatdozent Dr. Ingo Schmitz und das gesamte Institut für Molekulare Medizin unter Leitung von Herrn Professor Dr. Klaus Schulze-Osthoff, für eine außergewöhnliche Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Western-Blot-Analysen.

Danken möchte ich auch Herrn Professor Dr. Göbel, der sehr viel Interesse an dieser Arbeit gezeigt hat und mich als Assistenzarzt in seiner Klinik eingestellt hat.

Der größte Dank geht an meine Familie, die mich zu jeder Zeit unterstützt haben, an mich geglaubt haben und ohne die das alles gar nicht möglich gewesen wäre. Danke.

Und zuletzt natürlich meiner Frau Kathrin, die mich glücklich macht und mich immer wieder motiviert und unterstützt. Vielen, vielen Dank!

## **10 Curriculum Vitae**

Meinolf Siepermann

### Angaben zur Person:

Geburtsdatum und –ort 16.08.1976, Haan Staatsangehörigkeit deutsch

#### **Schulausbildung:**

1983-1987	Gemeinschaftsgrundschule Elfenhang, Wuppertal
1987-1996	Gymnasium, August-Dicke-Schule, Solingen, Allgemeine Hochschulreife
1996-1997	Aufnahmeleitungsassistenz Filmpool GmbH, Köln
1997-1998	Zivildienst Deutsches Rotes Kreuz Solingen.
	Ausbildung zum Rettungssanitäter
1998-1999	Rettungssanitäter Rettungsdienst Stadt Leverkusen

#### Universitätsstudium:

1999 - 2005	Studium der Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
2001	ärztliche Vorprüfung
2002	1. Abschnitt ärztliche Prüfung
2004	2. Abschnitt ärztliche Prüfung
2005	3. Abschnitt ärztliche Prüfung

#### **Praktische Ausbildung :**

08/2001	Famulatur Anästhesie, Städt. Klinikum Solingen
03/2004	Famulatur Allgemeinmedizin, Praxis Dr.Maier, Bruneck, Italien
03/2003	Famulatur KMT-Ambulanz
	Klinik für Kinder Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie
08/2003	Famulatur KK04
	Klinik für Kinder Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie

### 10/2004 - 10/2005

praktisches Jahr, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Wahlfach Pädiatrie

- 29.11.2005 Approbation als Arzt
- seit 12/2005 Facharztausbildung im Fach Kinderheilkunde Klinik für Kinder Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie Direktor: Universitätsprofessor Dr. med A.Borkhardt Zentrum für Kinder und Jugendmedizin Universitätsklinikum Düsseldorf

Mitgliedschaften:

-Deutsche Gesellschaft für Kinder und Jugendmedizin (DGKJ)

-Deutsche Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH)

-Marburger Bund

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen verwendet. Alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien und erbrachten Leistungen sind als solche gekennzeichnet.

Düsseldorf, 12.August 2009 H - Hypothese Meinolf Siepermann

### Untersuchungen verschiedener Stufen der CD95-vermittelten Apoptose und

### des IAP Survivin in Vorläufer-B-Zell-Leukämieblasten von Kindern

Maligne transformierte Zellen haben Resistenzmechanismen entwickelt, um sich der physiologischen Apoptose und damit ihrer immunologischen Elimination zu entziehen. Auch in den unreifen B-Zell-Blasten der akuten lymphatischen Leukämie von Kindern scheint eine Apoptoseresistenz entscheidend zur Entwicklung einer hochmalignen und aggressiv schnell proliferierenden Erkrankung beizutragen.

Schwerpunkt dieser Arbeit war es, einzelne rezeptornahe und an der Endstrecke der Apoptosekaskade beteiligte Moleküle, die zur pathologischen Regulation der Todesrezeptor-CD95-vermittelten Apoptose führen zu untersuchen und die Unterschiede zu normalen B-Zellen zu beschreiben. Zu den im Western Blot untersuchten Molekülen gehörten insbesondere die an der Bildung des Todesrezeptorkomplex (DISC, "death-inducingsignaling-complex") beteiligten Vertreter. Das Molekül c-FLIP, welches die Aktivierung der Procaspase-8 am DISC blockiert und dadurch die Fortleitung der durch CD95 eingeleiteten Apoptosekaskade in den frühen Schritten verhindert, war Schwerpunkt der Untersuchung. In den beiden unreifen Lymphomzelllinien Daudi und Raji zeigte sich nach CD40-Stimulation eine hohe CD95-Expression, dennoch lag in beiden Zelllinien eine Resistenz für CD95vermittelte Apoptose vor. Ursächlich scheint bei CD40-stimulierten Daudi-Zellen eine überproportional stärkere Hochregulation des antiapoptotischen Proteins c-FLIP short zu sein. In den Raji-Zellen wurde durch Zugabe des Proteinsynthesehemmer Cycloheximid, das zuvor ausgeglichene Verhältnis zwischen FLIP long und -R, zugunsten der proapoptotischen FLIP long Form verschoben, und eine deutliche Sensitivierung für CD95-vermittelte Apoptose erreicht. In den primären Vorläufer-B-ALL-Blasten zeigte sich nach CD40-Stimulation eine Hochregulation der beiden antiapoptotischen kurzen Isoformen FLIP short und -R, wobei die Expression von FLIP-R erstmalig in kindlichen Vorläufer-B-ALL-Blasten nachgewiesen wurde. In den gesunden reifen B-Zellen die eine signifikant höhere Sensitivität für CD95vermittelte Apoptose zeigten, wurde die proapoptotisch wirksame long-Form deutlich stärker als die antiapoptotische FLIP short-Isoform exprimiert. Die kurze Isoform FLIP-R war in den normalen B-Zellen, nicht nachweisbar. Es konnte erstmalig eine Überexpression der kurzen FLIP-Isoformen (short und -R) als eine Ursache für die gesteigerte Apoptoseresistenz der Vorläufer-B-ALL-Blasten von Kindern, gegenüber CD95-vermittelter Apoptose, im Vergleich zu gesunden B-Zellen belegt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das antiapoptotische Molekül Survivin, ein Mitglied der "Inhibitor of apoptosis family" (IAP) auf Protein- sowie mRNA-Ebene in Vorläufer-B-ALL-Blasten von Kindern quantifiziert und seine prognostische Bedeutung geprüft. Das tumorspezifische Molekül Survivin hemmt die gemeinsame Endstrecke des todesrezeptorvermittelten und des über die Mitochondrien fortgeleiteten Apoptosepathways, durch Inhibition der Effektorcaspasen-3 und –9. Die Messung der Survivin Gesamt-Proteinkonzentration erfolgte mittels ELISA-Technik in Vorläufer-B-ALL-Blasten von 66 Kindern. In einer retrospektiven multivariaten Analyse stellt sich Survivin als ein neuer unabhängiger Risikoparameter von den klassischen klinischen Risikofaktoren (Alter, Leukozytenzahl, Immunphänotyp, PVA-Score, Translokationen) dar. Die erhöhte Survivin-Expression konnte als unabhängiger Risikofaktor für das 3-Jahre-ereignisfreie-Überleben, das 3-Jahre-rezidivfreie-Überleben und das Gesamtüberleben identifiziert werden. Auf mRNA-Ebene erfolgte die Analyse der Expression von Survivin und seinen funktionell bedeutsamen Splicevarianten Survivin-2B und Survivin- $\Delta$ Exon3 in einer qualitativen und quantitativen PCR. Survivin wurde in den Vorläufer-B-ALL-Blasten der untersuchten Kinder deutlich überexprimiert und die Höhe der relativen mRNA-Expression von Survivin und seinen Splicevarianten anschließend mit den klassischen klinischen Risikofaktoren korreliert. Es konnte eine signifikant höhere Expression der pro-apoptotischen Splicevariante Survivin-2B bei den Niedrigrisikopatienten im Vergleich zu den Hochrisikopatienten nachgewiesen werden und somit die prognostisch und eventuell therapeutische Relevanz gezeigt werden.

gez. Univ.-Prof. Dr. D.Dilloo