Aus der
Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie des
Zentrums für Kinderheilkunde der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
(Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. U. Göbel)

Fas- und Bcl-2 Induktion in humanen B-Zelleukämien durch Tumornekrosefaktor-α und Interferon-γ

DISSERTATION

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

ANDREAS CHRISTARAS

2000

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

gez. Universitätsprofessor Dr. med. Dieter Häussinger (Dekan)

Referent: Universitätsprofessor Dr. med. Dieter Körholz
Korreferent: Universitätsprofessor Dr. med. Jean Krutmann

1 Inhaltsverzeichnis

1 INHALTSVERZEICHNIS **3**

2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **5**

3 EINLEITUNG **7**

4 MATERIAL UND METHODEN **14**

4.1 Zellinien **14**

4.1.1 Herkunft der Zellinien 14

4.1.2 Kultivierung der Zellinien 14

4.2 Zellkulturreagentien & -bestandteile **16**

4.2.1 Lösungen & Puffer 16

4.2.2 Antikörper 17

4.2.3 Zytokine 19

4.2.4 Weitere Reagentien 19

4.3 Experimentelle Methoden **20**

4.3.1 Kulturansätze 20

4.3.2 Durchflußzytometrische Messung (FACS-Analyse) 20

4.3.3 Quantitative Bestimmung der Apoptose und des Zelltodes 22

4.4 Analyse und Auswertung **23**

4.4.1 Statistische Verfahren und Methoden 23

4.4.2 Datenverarbeitung 24

4.5 Immunphänotypische Klassifikation der Zellinien **25**

5 ERGEBNISSE **26**

5.1 Immunphänotypisierung der Zellinien **26**

5.2 CD95-Expression **27**

5.2.1 CD95-Expression im nativen, unbehandelten Zustand 27

5.2.2 Induktion der CD95-Expression durch Zytokine 28

5.3 Analyse der CD95-Funktion **34**

5.4 Expression von bcl-2 **38**

5.4.1 pro-B-ALL Zellen 39

5.4.2 c-ALL Zellen 39

5.4.3 prä-B-ALL Zellen 40
5.4.4 B-ALL Zellen 41

5.5 Zusammenfassung aller experimentellen Ergebnisse 42

6 DISKUSSION 44

6.1 Spontane Expression von CD95 44

6.2 Korrelation der CD95Expression & Differenzierung 45

6.3 Induktion der CD95-Expression durch Zytokine 47

6.4 Funktion des CD95-Antigens 49

6.5 Expression von bcl-2 als Antagonist von CD95 51

6.6 Biologische Bedeutung der Untersuchungsergebnisse 53

7 ZUSAMMENFASSUNG 54

8 LITERATURVERZEICHNIS 55

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 64

10 TABELLENVERZEICHNIS 65

2 Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
α-TG	α-Monothioglycerol
APAF	apoptosis-associated factor; Mammalia-Homolog des CED-4 Proteins)
APO-1	Apoptose-Antigen 1
Ar	Argon
bak	bcl-2 Antagonist/Killer
bax	bcl-2 assoziiertes Protein x
bcl-2	B-Zellymphom/Leukämieprotein 2
bcl-x	B-Zellymphom/Leukämieprotein x
bcl-x_L	B-Zellymphom/Leukämieprotein x - groß (large)
bcl-x_S	B-Zellymphom/Leukämieprotein x - klein (short)
BCS	Bathocuproindisulfonsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
ced	Caenorhabitis elegans Todesprotein (caenorhabiditis elegans death protein)
CrmA	Zytokin-Antwort Modifikator (cytokine response modifier)
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (cytotoxic T-lymphocytes)
cy	cytoplasmatisch
DD	Todesdomäne (death domain)
DED	Todes-Effektor Domäne (death effector domain)
DISC	Todes-induzierender Signalkomplex (death-inducing signaling complex)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGIL	European Group for the Immunological classification of Leukemias
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer (fluorescence activated cell-sorter)
FADD	Fas assoziierte Todesdomäne (fas associated death domain; MORT-1)
Fas-Ag	Fas-Antigen (FasR, CD95, APO-1)
FasL	Fas-Ligand (CD95L, APO-1L)
FasR	Fas-Rezeptor (Fas-Ag, CD95, APO-1)
FCM	Durchflußzytometrie (flow cytometry)
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLICE	FADD-ähnliches Interleukin 1β-konvertierendes Enzym (Caspase 8/Machα1/Mch5)
g	Erdbeschleunigung
L-Gln	L-Glutamin
HCL	Haarzellenleukämie (hairy cell leukemia)
ICE	Interleukin-1 β konvertierendes Enzym (interleukin 1 β converting enzyme)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
mAk	monoklonaler Antikörper (monoclonal antibody)
MDR	Multimedikamentenresistenz-Gen (multi-drug resistance gene)
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity)
MNC	mononukleäre Zellen (mononuclear cells)
MPO	Myeloperoxidase
MTP	Mikrotiterplatte
NaPyr	Natriumpyruvat
NGF	Nervaler Wachstumsfaktor (nerve growth factor)

NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
n. u.	nicht untersucht
PARP	poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCM	Plasmozytom (plasmocytoma, multiple myeloma)
PCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein (siehe PerCP)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein (siehe PCP)
PI	Propidiumiodid
PS	Phosphatidylserin
Pyr	Pyruvat
R-PE	R-Phycoerythrin (siehe PE)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
slg	oberflächen-gebundenes Immunglobulinm (surface-bound immunoglobulin)
TCR	T-Zellrezeptor
TdT	Terminale Deoxynukleotidyltransferase
α-TG	α-Monothioglycerol
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-R1	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor Typ 1 (p55 TNF-R; CD120a)
TNF-R2	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor Typ 2 (p75 TNF-R; CD120b)
TRADD	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor assoziierter Todesdomäne
TRAF	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor assoziierter Faktor
TRAIL	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor assoziierter apoptose-induzierender Ligand

3 Einleitung

Akute lymphoblastische Leukämien (ALL) sind die häufigsten malignen Erkrankungen von Kindern und Jugendlichen bis zum vollendeten 14. Lebensjahr (1). 85% aller ALL entstehen aus unreifen Vorläufern von B-Zellen. Die Behandlung der ALL erfolgt mittels Polychemotherapie und Bestrahlung in multizentrischen Therapieoptimierungsstudien. Durch diese Behandlungsschemata (Therapieprotokolle der COALL- und BFM-Studiengruppen für Deutschland) werden Heilungsraten von 70% bis 80% (2,3,4,5) erzielt. Aber auch heute noch ist die Prognose für Patienten mit schlechtem Ansprechen auf die konventionelle Polychemotherapie schlecht. Bei einem Teil der Kinder und Jugendlichen mit schlechtem Ansprechen bzw. schlechter Prognose sind bestimmte chromosomale Aberrationen beschrieben worden wie z. B. ein Philadelphia-Chromosom oder ein chromosomale Translokation t(4;11), so daß für diese Patienten schon in erster Remission eine hämatopoietische Stammzellentransplantation als indiziert angesehen wird (6,7,8,9,10,11). Mit diesem Therapieverfahren können Heilungsraten zwischen 33 und 61% erzielt werden (12,13).

Bei der Transplantation wird neben dem zytotoxischen Effekt der hoch dosierten Chemotherapie der biologische Wirkungsmechanismus der Spenderzellen gegen die Leukämiezellen ausgenutzt. Durch diesen sogennanten Graft versus Leukemia-Effekt (GvL) können beispielsweise Patienten mit einer chronisch myeloischen Leukämie (CML), welche ein Rezidiv nach einer allogenen Stammzelltransplantation erleiden, in eine erneute Remission gelangen. Hierzu wird der GvL-Effekt durch Spender-Lymphozyten-Infusionen (DLI) verstärkt (14,15). Im Gegensatz zur CML ist die GvL Reaktion gegen ALL-Zellen schwach (16). Durch eine gleichzeitige Stimulation des Immunsystems mit Hilfe von systemischem IL-2 konnten SLAVIN et al. jedoch auch bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie eine GvL-Reaktion induzieren (17,18).

Von Patienten mit einer Graft versus Host (GvH)-Reaktion ist bekannt, daß diese vermehrt mit einer Th1-Reaktion und damit einer verstärkten Freisetzung von Interferon-γ einhergeht (19,20). Möglicherweise besitzt das Interferon-γ in diesem Zusammenhang nicht nur bei der Zerstörung von Empfängergewebe sondern auch bei der Vermittlung des GvL-Effektes eine wesentliche Rolle. So haben SYKES et al. und FERRARA et al. in verschiedenen tierexperimentellen Untersuchungen gezeigt, daß auch der GvL-Effekt durch Interferon-γ vermittelt wird (21,22). Diese Beobachtungen belegen, daß auch Zytokine an der Abtötung von Leukämiezellen beteiligt sein können. Um die Wirksamkeit des GvL-Effektes gegen Leukämiezellen zu erhöhen, ist die genaue Kenntnis des molekularen Wirkungsmechanismus, über den Leukämiezellen abgetötet werden, notwendig.

Von KRAMMER und DEBATIN sind grundlegende Untersuchungen über die Induktion des Zelltodes bei Tumorzellen und aktivierten Lymphozyten vorgelegt worden (23,24,25). So hat die Arbeitsgruppe gezeigt, daß auf der Oberfläche von Tumorzellen und aktivierten T-Lymphozyten das Fas-Antigen verstärkt exprimiert wird (26). Nach Reaktion des Fas-Antigen mit dem Fas-Liganden folgt zunächst eine Trimerisierung der intrazellulären Domäne des Fas-Antigens, welche als death domain (DD) bezeichnet wird (27,28,29). Nachfolgend lagert sich das Protein FADD/MORT-1, welches auch eine DD enthält, an das Trimer der zytosolischen Domäne des Fas-Antigens an (30,31,32). FADD fungiert dann als sog. Adapterprotein, welches neben der DD auch eine death effector domain (DED) enthält, an welche sich die ebenfalls DED-enthaltende Caspase 8 (FLICE/Mch5/Mach) anlagert und kumuliert (33). Dieser Gesamtkomplex aus der zytoplasmatischen Domäme des Fas-Antigens, FADD und Caspase 8 wird als death-inducing signaling complex (DISC) bezeichnet (34). Nach proteolytischer Spaltung innerhalb des DISC ist die Caspase 8 aktiviert und wird aus dem DISC freigesetzt (35). Die aktivierte Caspase 8 stimuliert ihrerseits die Caspase 3 (CPP32/Yama/Apopain), welche im Zytoplasma lokalisiert ist (36,37). Anschließend werden direkt das interleukin 1β-converting enzyme (ICE) und weitere Caspasen in Sinne einer kaskadierenden Proteolyse aktiviert (38,39). Schließlich kommt es zu einer Inhibition von DNA-Reparaturenzymen und nachfolgend zu Strangbrüchen der DNA bzw. zur Aktivierung nukleärer Proteine und Enyzme (40,41). Am Ende dieser Reaktions- und Interaktionskette steht der apoptotische Zelltod (42).

Alternativ zu diesem Mechanismus kann bei einer Reihe von Zellen die Apoptose über einen von SCAFFIDI und Mitarbeitern beschriebenen zweiten Weg vermittelt werden. Hierbei kommt es nicht zu einer direkten Aktivierung von FLICE, sondern zunächst zu einer Stimulation der Mitochondrien, die an einer Erniedrigung des Mitochondrienpotentials erkennbar ist (43,44). In der Folge wird Cytochrom c freigesetzt, welches dann sukzessive Caspase 3 und 8 aktiviert (45). Dieser alternative Weg der Apoptoseinduktion kann durch bcl-2 und bcl-x gehemmt werden (46,47,48). Entscheidend ist hierbei das Gleichgewicht dieser Proteine zu zwei weiteren zytoplasmatischen Eiweißen, bax und bak, die apoptosefördernd wirken (49,50).

Neuere Untersuchungen zeigen, daß außer dem Fas-vermittelten auch noch weitere Mechnismen existieren, über die Tumorzellen eliminiert werden können. So kann TNF-α über die Reaktion mit dem TNF-Rezeptor Typ 1 (TNF-R1) ebenfalls eine Apoptoseinduktion vermitteln (51). Kürzlich sind weitere Faktoren und Rezeptoren wie zum Beispiel TRAIL (APO-2L) beschrieben worden, welche die Apoptose aktivierter Zellen oder von Tumorzellen induzieren (52,53,54). Schließlich kann von T-Zellen und auch Natürlichen Killerzellen Perforin gebildet werden (55,56). Dieses Protein vermittelt die Bildung von Kanälen in den Zielzellen (57). Durch diese Kanäle gelangen Granzyme in die Zielzelle und führen dort durch die Aktivierung der ICE-ähnlichen Proteasen zur Apoptoseinduktion (58).

Abbildung 1: Molekulare Mechanismen der Apoptose-Induktion bzw. Inhibition (Abbildung modifiziert nach 59,60)

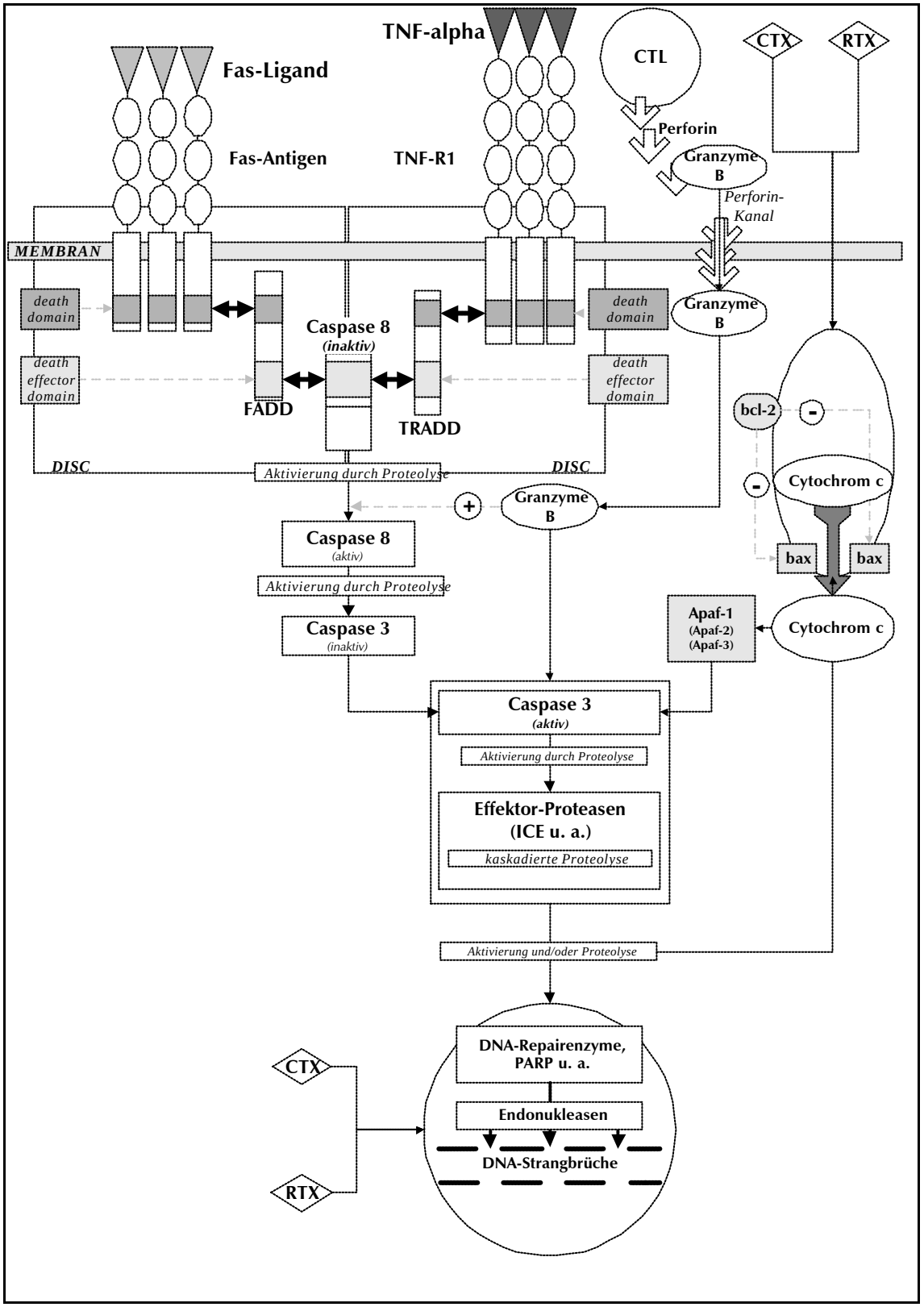


Abbildung 1: CTX: Zytostatika, CTL: zytotoxische T-Lymphozyten, RTX: radioaktive Bestrahlung. Der schwarze Doppelpfeil symbolisiert die Assoziation zweier Proteine.

Durch Untersuchungen der Arbeitsgruppe von DEBATIN zum Wirkungsmechanismus von Chemotherapeutika auf Tumorzellen ist gezeigt worden, daß bestimmte Zytostatika wie zum Beispiel Doxorubicin eine de novo Proteinsynthese durch die Tumorzellen benötigen, um den apoptotischen Zelltod zu vermitteln (61). Durch die Koinkubation von Neuroblastomzellen mit Doxorubicin kommt es zu einer erhöhten Freisetzung von FasL. Dieser bindet dann an den Fas-Rezeptor und induziert über die oben beschriebenen Signalwege die Apoptose in diesen Zellen. Bei Zellen mit Resistenz gegen Doxorubicin ist die Freisetzung von Fas-Ligand ausgeblieben (62). In weitergehenden Untersuchungen haben DEBATIN und Mitarbeiter darüber hinaus zeigen können, daß durch die Anwendung von Interferon-γ die Expression des Fas-Antigens auf den Neuroblastomzellen erhöht und die FasL-vermittelte Apoptoserate verstärkt werden kann (63). Somit liefern diese Arbeiten Hinweise darauf, daß die Fas-vermittelte Apoptose ein wichtiges Wirkprinzip für die chemotherapeutische Behandlung von Tumorzellen darstellt. Gleichzeitig wird eindrucksvoll demonstriert, daß biologische Faktoren wie zum Beispiel Interferon-γ in der Lage sind, eine zytotoxische Wirkung des FasL an den Tumorzellen durch die Heraufregulation des Fas-Rezeptors zu verstärken.

Bei T-Zell-Leukämien ist ebenfalls sehr eindrucksvoll gezeigt worden, daß hier die gleichen Wirkprinzipien gelten wie für das Neuroblastom. Durch Untersuchungen an einer T-Zell-Linie konnten DEBATIN et al. zeigen, daß Doxorubicin in diesen Zellen ebenfalls die Bildung von FasL vermittelt, welcher dann die Fas-induzierte Apoptose in Gang bringt. Bei resistenten Zellen ist wiederum die Freisetzung von FasL ausgeblieben (64). Dieses Phänomen hat sich nicht durch eine verminderte Aufnahme des Zytostatikums in die Zellen oder einen vermehrten Ausstrom der Medikamente aus den Tumorzellen erklären lassen, so daß dieser Resistenzmechanismus nicht über das multi-drug-resistance (MDR) Gen vermittelt wird (65).

Im Gegensatz zu Zellinien zeigen Untersuchungen bei frisch isolierten Leukämiezellen, daß ein hoher Prozentsatz eine Resistenz gegen FasL induzierte Apoptose aufweist. Allerdings war diese Resistenz nicht durch eine Überproduktion des bcl-2 bedingt (66).

Jedoch scheint ein aktiver Mechanismus die Ursache zu sein. So konnte die Resistenz in den meisten Fällen durch die Inkubation der Leukämiezellen mit Cycloheximid überwunden wurden (67). In einigen Fällen schient darüber hinaus auch noch ein weiterer Mechanismus von Bedeutung zu sein. So zeigen Mutationsanalysen, daß Mutationen im CD95-Protein zu einer Einschränkung der Funktion dieses Proteins führen und eine Resistenz gegenüber einer Apoptoseinduktion vermitteln. Allerdings scheint dieser Mechanismus nur selten von Bedeutung zu sein. So sind Mutationen des Fas-Rezeptors mit defekter Funktion des Proteins nur in 3 von 81 primären Zellkulturen frisch isolierter T-ALL-Zellen bei Kindern und 2 von 46 Fällen adulter T-Zell-Leukämien gefunden worden (68,69). Bei akuten Leukämien der B-Zellreihe haben sich keine CD95-Mutationen in den frisch isolierten Leukämiezellen von 32 Patienten nachweisen lassen (70).

Ähnlich wie für T-Zell-Leukämien hat die Arbeitsgruppe um DEBATIN auch demonstrieret, daß Zytostatika wie Doxorubicin, Methotrexat und Cytarabin nicht nur die Apoptose von T-Zell-Leukämien vermitteln können, sondern auch auf B-Zell-Leukämien zu einer verstärkten Expression des CD95-Antigens führen (71). Darüber hinausgehend kommt es zu einer Störung der Mitochondrienfunktion und zu einem partiellen Verlust an Bcl-x, welches die Apoptose-vermittelnde Wirkung der Zytostatika unterstützt.

Während über die Wirkungsweise und die Effekte der Chemotherapie auf Leukämiezellen wie zuvor dargestellt sehr viel berichtet worden ist, sind über die Zusammenhänge zwischen der Wirkungsweise verschiedener Zytokine und der Expression sowie Funktion von CD95 bei verschiedenen Leukämien nur wenige Daten bekannt. Die modulierende Wirkung wird durch die Beobachtung erkennbar, daß durch Hyperthermie die endogene Bildung von TNF-α in myeloblastischen Leukämiezellen gesteigert wird und dies mit der Induktion von Apoptose in diesen Zellen korreliert (72).

Untersuchungen an gesunden, normalen B-Zellen zeigen, daß durch Interferon-γ die Expression und auch die Funktion von FasL und Fas gesteigert werden kann (73,74). Allerdings wirkt zum Beispiel das Th-2 Zytokin IL-4 anti-apoptotisch auf diese B-Zellen (75); in Anwesenheit von IL-4 wird der apoptotische Zelltod dieser B-Zellen sogar gehemmt (76). Hinsichtlich der Wirkungsweise verschiedener Zytokine auf die CD95-Expression auf humanen B-Zell-Leukämien sind jedoch nicht viele Daten bekannt. Dieses könnte aber gerade zum Verständnis des GvL-Effekts und damit zu einer Verbesserung der therapeutischen Ansatze beim GvL-Effekt wesentlich beitragen.

Aus diesen Beobachtungen ergeben sich für meine Arbeit, in der ich mich auf die Untersuchung des Fas-Systems konzentriere, die folgenden Fragestellungen:

1. Können bestimmte Zytokine auf B-Zellprogenitor-Leukämiezellen die Expression funktionell aktiven CD95 induzieren?

2. Bestehen Zusammenhänge zwischen einer CD95 Expression und dem Differenzierungsgrad der Progenitor-B-Zell-Leukämien?

3. Führt die Induktion von CD95 auch zu einer erhöhten Apoptoserate nach CD95 Stimulation?

4. Welche Rolle spielt bcl-2 bei der Zytokin-vermittelten Fas-Expression bzw. Fas-induzierten Apoptose?

4 Material und Methoden

4.1 Zellinien

4.1.1 Herkunft der Zellinien

Folgende humane Progenitor-B-Leukämiezellinien werden für die Untersuchungen verwendet:

- 207
  Deutsche Sammlung für Zellkulturen und Mikroorganismen (DSM), Braunschweig (77)
- 697
  Deutsche Sammlung für Zellkulturen und Mikroorganismen (DSM), Braunschweig (77)
- Nalm-6
  Deutsche Sammlung für Zellkulturen und Mikroorganismen (DSM), Braunschweig (77)
- 380
  Deutsche Sammlung für Zellkulturen und Mikroorganismen (DSM), Braunschweig (78)
- Reh
  American Type Culture Collection (ATCC), Bethesda, Maryland, U.S.A. (79,80,81)
- MHH-ALL 2 (syn. MHH-CALL 2)
  freundlicherweise von Dr. med. O. Thomeczkowski und Dr. med. O. Sykora, Zentrum für Kinderheilkunde IV, Medizinische Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt (82).

4.1.2 Kultivierung der Zellinien

4.1.2.1 R10-Medium

R10-Medium wird für die fortlaufende Kultivierung der Zellinien 207, 380, 697, Nalm-6 und Reh verwendet. Es setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

➢ RPMI 1640-Nährmedium (RPMI 1640; Biochrom, Berlin)	439 ml
➢ Penicillin-Streptomycin (Biochrom, Berlin)	100 mM

- FCS, hitzeinaktiviert (Gibco BRL, Wiesbaden) 10%
- L-Glutamin (Biochrom, Berlin) 2 mM

4.1.2.2 MHH-ALL-Medium

MHH-ALL-Medium wird für die fortlaufende Kultivierung der Zellinie MHH-ALL 2 verwendet. Das MHH-ALL-Medium setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- RPMI 1640-Nährmedium (RPMI 1640; Biochrom, Berlin) 439 ml
- Penicillin-Streptomycin (Biochrom, Berlin) 100 mM
- FCS, hitzeinaktiviert (Gibco BRL, Wiesbaden) 10%
- L-Glutamin (Biochrom, Berlin) 2 mM
- Natriumpyruvat (Gibco BRL, Wiesbaden) 1 mM
- Bathocuproindisulfonsäure (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) 20 nM
- α-Thioglycerol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) 50 µM
- HEPES-Puffer (Gibco BRL, Wiesbaden) 10 mM

4.1.2.3 Herstellung der Kulturmedien

Die unter R10- und MHH-ALL Medium genauer bezeichneten Bestandteile werden unter sterilen Kautelen vermischt und anschließend mit 0,2 µm Filter (Sartorius, Berlin) gefiltert. Die Kulturmedien werden bei 4°C in 500 ml Polyethylen-Kulturflaschen (Becton Dickinson, Heidelberg) aufbewahrt. Die Medien sind maximal für 7 d ab Herstellungsdatum verwendet worden.

4.1.2.4 Passagierung der Zellinien

Die Zellinien Reh, Nalm-6, 207, 380, 697, und MHH-ALL 2 werden in 50 ml Kulturflaschen aus Polyethylen (Becton Dickinson, Heidelberg) bei 37°C Temperatur und 5% Vol. CO_2 in Brutschränken für 72 h kultiviert. Die Zellkonzentration der einzelnen Zellinien beträgt jeweils 1,0 x 10^6 Zellen pro ml Suspension bei einem Gesamtvolumen von 15 ml Suspension. Nach 72 h Inkubationszeit werden die Kulturflaschen dem Brutschrank entnommen und passagiert. Hierbei wird die Hälfte des Suspensionsvolumens entnommen, durch die gleiche Menge frisch zubereiteten Zellkulturmediums ersetzt und hiernach erneut für 72 h kultiviert.

4.2 Zellkulturreagentien & -bestandteile

4.2.1 Lösungen & Puffer

4.2.1.1 Bovines Serumalbumin (BSA) & Fötales Kälberserum (FCS)

BSA (Cohn V Fraktion, 96-99% Reinheit) ist von der Firma Sigma-Aldrich, Deisenhofen erworben worden. Zum Erhalt einer wäßrigen Lösung wird BSA mit PBS rekonstituiert und durch Inkubation im Wasserbad bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviert.

FCS ist von Gibco BRL, Wiesbaden, bezogen worden. Vor Verwendung in den Experimenten ist FCS über 30 min bei 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert worden.

4.2.1.2 Modifizierte PBS zur Durchflußzytometrie (PBS-FCM)

PBS-FCM zur Verwendung bei Spülung und Zentrifugation im Rahmen der Vorbereitung durchflußzytometrischer Analysen wird wie folgt hergestellt: Zum Erhalt von 100 ml einer PBS-FCM Lösung wird 100 ml PBS mit 1,0 g NaN_3 supplementiert. Zu 99 ml 0,1% NaN_3-PBS-Lösung wird 1 ml hitzeinaktiviertes FCS hinzugegeben.

4.2.1.3 Modifizierte PBS zur Stimulantiendilution (PBS-BSA)

PBS-BSA zur Verwendung als Verdünnung der Stimulantien zum gebrauchsfertigen Einsatz wird wie folgt hergestellt: 100 ml PBS wird mit 1 g hitzeinaktiviertem BSA supplementiert.

4.2.1.4 Permeabilisierungs- und Fixierungslösungskit Fix & Perm

Die im Rahmen der durchflußzytometrischen Analyse notwendige Fixierung und Permeabilisierung der zu untersuchenden Zellen wird mittels des Fix & Perm Cell Permeabilization Kit (An der Grub Bio Research GmbH, Kaumberg, Österreich) vorgenommen.

4.2.2 Antikörper

4.2.2.1 Spezifische Antikörper

Tabelle 1: Monoklonale Antikörper zur Immunphänotypisierung

Klon	*Isotyp*	*Darreichung*	*Spezifität*	*Hersteller*
ALB2	IgG1	FITC	CD10	Immunotech, Hamburg
J4.119	IgG1	FITC, PE	CD19	Immunotech, Hamburg
L27	IgG1 κ	FITC, PE, PCP	CD20	Becton & Dickinson, Heidelberg
SJ10.1H11	IgG1	FITC, PE	CD22	Immunotech, Hamburg
ALB9	IgG1	PE	CD24	Immunotech, Hamburg
PD67.6	IgG1 κ	FITC, PE	CD33	Becton & Dickinson, Heidelberg
HPCA-2	IgG1 κ	FITC, PE	CD34	Becton & Dickinson, Heidelberg
BL14	IgG1 κ	FITC, PE	CD37	Immunotech, Hamburg
2D1	IgG1 κ	FITC, PE, PCP	CD45	Becton & Dickinson, Heidelberg
L243	IgG2a κ	FITC, PE, PCP	HLA-DR	Becton & Dickinson, Heidelberg
TB28-2	IgG1 κ	FITC, PE	κ-Ketten	Becton & Dickinson, Heidelberg
1-155-2	IgG1 κ	FITC, PE	λ-Ketten	Becton & Dickinson, Heidelberg
IgD26	$F(ab)_2$	PE	δ-Ketten (IgD)	Dako, Hamburg
R1/69	$F(ab)_2$	FITC, PE	μ-Ketten (IgM)	Dako, Hamburg

Alle in Tabelle 1 aufgelisteten Antikörper sind murine Antikörper spezifisch für humane Antigene.

Tabelle 2: Monoklonale Antikörper gegen humanes CD95 Antigen (CD95)

Klon	*Isotyp*	*Spezies*	*Darreichung*	*biologischer Effekt*	*Hersteller*
UB2	IgG1 κ	Maus	FITC, PE	kein Effekt	Immunotech, Hamburg
CH11	IgM	Maus	unkonjugiert	Apoptose-Induktion	Immunotech, Hamburg

Tabelle 3: Monoklonale Antikörper gegen humanes bcl-2 Antigen (bcl-2)

Klon	*Isotyp*	*Spezies*	*Darreichung*	*biologischer Effekt*	*Hersteller*
124	IgG1 κ	Maus	FITC, PE	kein Effekt	Dako, Hamburg

4.2.2.2 Isotypkontrollen

Folgende Antikörper werden im Rahmen der Untersuchungen als Isotypkontrollen zur Messung des Ausmaßes der unspezifischen Bindung bei der FACS-Analyse eingesetzt:

Tabelle 4: Isotypische murine Kontroll-Antikörper (monoklonal)

Klon	*Darreichung*	*Spezifität*	*Isotyp für*	*Hersteller*
11711.11	gereinigt	KLH	Maus IgG1	R&D Systems, Wiesbaden
20102.1	gereinigt	KLH	Maus IgG2a	R&D Systems, Wiesbaden
679.1Mc7	gereinigt, FITC, PE	nicht-biologisches Hapten	Maus IgG1	Immunotech, Hamburg
U7.27	FITC, PE	nicht-biologisches Hapten	Maus IgG2a	Immunotech, Hamburg
GC323	gereinigt, FITC	nicht-biologisches Hapten	Maus IgM	Immunotech, Hamburg

Die o. g. Immunogene kommen in menschlichen Zellen nicht vor.

4.2.3 Zytokine

Folgende human-rekombinanten Zytokine werden in Zellkulturen eingesetzt:

Tabelle 5: Zytokine

Zytokin	*Hersteller*	*Herkunftsorganismus*
TNF-α	R&D Systems, Wiesbaden	E. coli
IFN-γ	Dr. Rentschler, Laupheim	E. coli
IL-2	EuroCetus, Amsterdam, Niederlande	E. coli
IL-3	R&D Systems, Wiesbaden	E. coli
IL-4	Genzyme, Ratingen	E. coli
IL-6	Biosource, Giessen	E. coli
IL-7	Genzyme, Ratingen	E. coli
IL-10	Biosource, Giessen	E. coli
IL-12	ICN Biochemicals, Eschwege	E. coli
NGF-β	Genzyme, Ratingen	E. coli

4.2.4 Weitere Reagentien

Folgende Reagentien finden im Rahmen dieser Arbeit Anwendung:

Tabelle 6: Verschiedene Reagentien

Reagens	*Darreichungsform*	*Hersteller*
PBS pH 7,4	gebrauchsfertige Lösung	Serono-Wiessner AG, Berlin
Trypanblau	0,4% Lösung	Gibco BRL, Wiesbaden
Propidiumiodid	Trockensubstanz	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumpyruvat	100 mM in PBS	Gibco BRL, Wiesbaden
HEPES	1 M pH 7,4 Lösung	Gibco BRL, Wiesbaden
α-Monothioglycerol	100% Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bathocuproindisulfonsäure	10 mM in PBS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Penicillin-Streptomycin	gebrauchsfertige Lösung	Biochrom, Berlin
L-Glutamin	200 mM Lösung	Biochrom, Berlin
Natriumazid (NaN_3)	Trockensubstanz	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Annexin V-FITC	gebrauchsfertige Lösung	Pharmingen, Hamburg
Annexin V Bindungspuffer	gebrauchsfertige Lösung	Pharmingen, Hamburg

4.3 Experimentelle Methoden

4.3.1 Kulturansätze

Zur Durchführung der Experimente werden je experimenteller Bedingung 4 x 10^5 lebende Zellen der verschiedenen Zellinien in 48-Loch-Zellkulturplatten (Costar, Cambridge, Massachusetts, USA) in frischem Medium suspendiert. Nach Zugabe der den Experimentalbedingungen entsprechenden Reagentien bzw. Stimulantien werden die Zellen bei 37°C und 5 %Vol. CO_2 im Inkubator unter Standardbedingungen für die in den Experimenten definierten Zeiträume (72 bzw. 76 h) inkubiert.

4.3.2 Durchflußzytometrische Messung (FACS-Analyse)

4.3.2.1 Grundlagen des Meßverfahrens

Bei der durchflußzytometrischen Analyse werden Zellen in Suspension durch eine Mikrokapillare geleitet, in der lediglich die Passage einer einzelnen Zelle möglich ist. Auf diese Mikrokapillare wird ein Laserstrahl definierter Wellenlänge gerichtet, welcher sich beim Auftreffen auf eine sich im Suspensionsdurchfluß befindliche Zelle in zwei Teilstrahlen spaltet, ein Vorwärtstreulicht (forward scatter; FSC) und ein Seitwärtsstreulicht (side scatter; SSC). Diese werden von entsprechend angeordneten Detektoren aufgefangen. Die durch den FSC-Detektor generierten Signale entsprechen der Größe, die durch den SSC-Detektor generierten Signale der Granularität der den Laserstrahl getroffenen Einzelzelle.

Neben Informationen über Größe und Granularität der zu untersuchende Zelle können auch Informationen über die Expression von Antigenen auf der Oberfläche oder im Inneren der Zelle gewonnen werden. Hierzu werden Antikörper verwendet, welche entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie beispielsweise R-PE gekoppelt sind, oder es werden fluoreszenzgekoppelte, sekundäre Antikörper eingesetzt, welche für nicht-farbstoffgekoppelte Primärantikörper spezifisch sind. Der Fluoreszenzfarbstoff wird durch Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und emittiert dann seinerseits Licht einer definierten Wellenlänge, welches durch entsprechende Detektoren erfaßt und in elektrische Signale ungesetzt werden kann.

Fluoreszierende Substanzen, welche sich ad primam in der Zelle befindet oder ad secundam hinzugefügt werden (z. B. PI) werden auf die gleiche Weise vom Laserstrahl zur Emission eines Lichts spezifischer Wellenlänge angeregt und können bei Vorhandensein entsprechender Detektoren gemessen werden.

Bei Einsatz mehrerer Farbstoffe, die von einer definierten Wellenlänge (hier 488 nm Ar-Ne Laserlicht) angeregt werden, aber jeweils bei distinkten Wellenlängen die aufgenomme Energie emittieren, können unterschiedliche zelluläre Strukturen bzw. exprimierte Antigene simultan markiert und somit gemessen werden.

Tabelle 7: Fluoreszenzfarbstoffe in der Durchflußzytometrie

Farbstoff	*max. Exzitation bei*	*Emission bei*	*Farbe*	*Fluoreszenzkanal FACScan*
FITC	495 nm	519 nm	grün	FL-1
PE	480 nm	578 nm	orange	FL-2
PerCP (PCP)	490 nm	675 nm	dunkelrot	FL-3
PI	536 nm	617 nm	rot-orange	FL-2/FL-3

4.3.2.2 Verwendete Geräte und Software

Die durchlußzytometrischen Analysen werden auf einem Durchflußzytometer des Typs FACScan (Becton & Dickinson, Heidelberg) vorgenommen. Die Steuerung der Messung erfolgt mittels eines HP9000/340 Workstation Rechnersystems (Hewlett-Packard, Böblingen) und der Mess- und Analysesoftware LYSYS II Version 2.1 (Becton & Dickinson, Heidelberg). Die so gewonnenen Daten werden anschließend mittels der LIFUTIL Software (Hewlett-Packard, Böblingen) auf einen IBM PC-XT/AT kompatiblen Personal Computer transferiert und dort mit der Analysesoftware WinMDI Version 2.8 (Joseph Trotter, Flow Cytometry Core Unit, TSRI, La Jolla, Kalifornien, USA) ausgewertet.

4.3.2.3 Oberflächenfärbung mit konjugierten Antikörpern

4 x 10^5 suspendierte Zellen werden in FACS-Röhrchen (Falcon Tubes, Becton & Dickinson, Heidelberg) gefüllt und anschließend sedimentiert (666 x g, 6 min, RT), der Überstand dekantiert. Das resultierende Zellpellet wirde mit 1 μg direktfluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörper für 15 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der inkubierten Zellen mit je 200 μl PBS-FCM Lösung (666 x g, 6 min, RT) werden die Zellen erneut in 200 μl PBS-FCM Lösung aufgenommen und der durchflußzytometrischen Messung zugeführt. Zur Messung der Expression von maximal 3 Antigenen werden 3 antigenspezifische, fluoreszenzfarbstoffkonjugierte Antikörper in der Menge von je 1 μg im Inkubationsschritt dem Zellpellet zugesetzt. Die Antikörper müssen mit unterschiedlichen, sich in den Emissionsspektren nicht überlappenden Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sein (vgl. Tabelle 7).

4.3.2.4 Intrazelluläre (zytoplasmatische) Färbung

4 x 10^5 Zellen werden bei der Färbung bzw. Messung intrazellulärer Antigene wie unter 4.3.2.3 vorbeschrieben sedimentiert und der zellfreie Überstand dekantiert. Das verbliebene Zellpellet wird mit 100 μl der Fix & Perm Fixierungslösung suspendiert und inkubiert (RT, Dunkelheit, 15 min). Danach werden die Zellen erneut sedimentiert (666 x g, RT, 6 min). Es erfolgt hiernach die Zugabe von 100 μl Fix & Perm Permeablisierungslösung sowie die Zugabe von 1 μg des konjugierten Antikörpers mit anschließender Inkubation für 15 min (Dunkelheit, 4 °C). Anschließend werden die Zellen wie unter 4.3.2.3 beschrieben gewaschen und im FACScan gemessen (83,84,85).

4.3.3 Quantitative Bestimmung der Apoptose und des Zelltodes

Die Detektion von Annexin V kann zur Erkennung und Quantifizierung apoptotischer Zellen herangezogen werden. Annexin V ist ein Ca^{2+}-abhängiges, phospholipid-bindendes Protein, welches eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin (PS) besitzt.

Apoptotische Zellen verlieren im Rahmen des Apoptoseprozeßes die Eigenschaft, die Asymmetrie der Zellmembran aufrecht zu erhalten (86). In apoptotischen Zellen wird das Membranphospholipid PS von der inneren Lipidschicht der Plasmamembran zur äußeren Lipidschicht transloziert, so daß PS an der Zelloberfläche Kontakt mit dem Extrazellularraum hat. Im Gegensatz hierzu findet sich bei lebenden Zellen PS nicht an der Oberfläche der Zellmembran.

Da abgestorbene Zellen aufgrund der Disruption ihrer Plasmamembran ebenfalls PS dem extrazellulären Raum gegenüber exponieren können, muß eine Diskriminierung zwischen diesen Zellen und den viablen Zellen mit einer intakten Plasmamembran erfolgen (87,88). Hierzu wird Propidiumiodid (PI) als Farbstoff eingesetzt, der Zellen mit einer intakten Zellmembran (lebende Zellen) von Zellen mit einer nicht-intakten Zellmembran (nekrotische und apoptotische Zellen) unterscheiden kann (89,90,91). Somit sind Zellen, welche sich mit Annexin V anfärben lassen, aber kein PI in ihr Zytoplasma aufnehmen, apoptotisch, PI-aufnehmende und Annexin V positive Zellen nekrotisch.

Zur Durchführung dieser Untersuchungsmethode werden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen (666 x g, 6 min, RT) und danach in einer Konzentration von 1 x 10^6 Zellen/ml im Annexin-V-Bindungspuffer resuspendiert. 1 x 10^5 Zellen werden 5 μl Annexin V-FITC Lösung und 0,05 μg PI zugegeben und anschließend für inkubiert (15 min, Dunkelheit, RT). Anschließend werden 400 μl des Annexin-V-Bindungspuffers zugegeben und die Zellen binnen 1 h einer FACS-Analyse unterzogen (92).

4.4 Analyse und Auswertung

4.4.1 Statistische Verfahren und Methoden

Auf eine statistische Auswertung und weiterführende Analyse der mittels dieser Untersuchungen gewonnen Daten wird aufgrund der geringen Anzahl der durchgeführten Experimente verzichtet.

4.4.2 Datenverarbeitung

Die Errechnung deskriptiver statistischer Parameter erfolgt zum einen in Eigenleistung nach Angaben einschlägiger Fachliteratur (93), zur nachfolgenden Kontrolle mittels der Tabellenkalkulation Excel für Windows 95 Version 7.0 (Microsoft, München). Die Bildbearbeitung und Konvertierung erfolgt mit dem Bildbearbeitungsprogramm Photoshop 5.0 für Windows 95 (Adobe, München). Die Erstellung des dieser Arbeit zugrunde liegenden elektronischen Dokuments wird mittels der Textverarbeitung Microsoft Word für Windows 95 Version 7.0 (Microsoft, München) durchgeführt.

Alle elektronischen Datenverarbeitungsoperationen werden auf einem handelsüblichen IBM-PC XT/AT kompatiblen Rechnersystem unter dem Betriebssystem Windows 98 (Microsoft, München) durchgeführt.

4.5 Immunphänotypische Klassifikation der Zellinien

Die EGIL-Klassifikation teilt akute B-Zellvorläuferleukämien analog der regulären B-Lymphozytopoese und -differenzierung anhand von Antigenen, welche auf der Zellmembran oder im Zytoplasma nach Reifungsstadium spezifisch exprimiert werden, in 4 Typen (B I bis B IV) ein (94). Leukämien des Reifungsstadiums B I (pro-B-ALL) entsprechen der nach alter Nomenklatur als prä-prä-B-ALL bezeichneten Typen.

Tabelle 8: EGIL-Klassifikation akuter B-Zelleukämien

Marker	*B I (pro-B-ALL)*	*B II (c-ALL)*	*B III (prä-B-ALL)*	*B IV (B-ALL)*
cyTdT	+	+	+	+ / –
HLA-DR	+	+	+	+
CD19	+	+	+	+
cyCD22	+ / –	+	+	+
CD24	+ / –	+	+	+ / –
CD10	–	+	+	+ / –
CD20	–	+ / –	+ / –	+
cyIgM	–	–	+	–
sIgM	–	–	–	+

Tabelle 8: EGIL-Klassifikation akuter B-Zellvorläufer-Leukämien. +: obligatorische Expression des Markers, + /–: fakultative Expression des Markers, –: obligatorisch fehlende Expression des Markers

5 Ergebnisse

5.1 Immunphänotypisierung der Zellinien

Zur Determinierung des Immunophänotyps der verwendeten Zellinien werden Zellen nach Passagierung mittels FACS-Analyse untersucht (95). Nach erfolgter dreimaliger Immunphänotypisierung werden die Zellinien anhand der EGIL-Klassifikation klassifiziert (vgl. Tabelle 8).

Tabelle 9: Immunphänotypisierung der Zellinien nach der EGIL-Klassifikation

Antigene	***Zellinien***					
	207	***697***	***Nalm-6***	***Reh***	***380***	***MHH-ALL 2***
CD10	–	+	+	+	+	+
CD19	+	+	+	+	+	+
CD20	–	–	–	–	–	+
CD22	–	+	–	+	+	+
CD24	–	+	–	+	+	+
CD34	–	–	–	–	–	–
CD37	+	–	–	–	+	+
CD45	–	+	–	+	+	+
HLA-DR	+	+	+	+	+	+
κ-Kette	–	–	–	–	–	–
λ-Kette	–	–	–	–	–	+
sIgM	–	–	–	–	–	+
cyμ	–	+	+	–	–	+
cyCD22	–	+	–	+	–	+
cyTdT	+	+	+	+	+	+
EGIL Typ	**B I** ***pro-B-ALL***	**B II** ***c-ALL***	**B II** ***c-ALL***	**B III** ***prä-B-ALL***	**B III** ***prä-B-ALL***	**B IV** ***B-ALL***

Tabelle 9: +: Expression des Markers, –: fehlende Expression des Markers

Die Zellinie 207 entspricht nach der EGIL-Klassifikation einer pro-B-ALL (B I) und stellt somit die undifferenzierteste aller hier untersuchten Zellinien dar. Die Zellinien 380 und Reh entsprechen einer common-ALL (c-ALL bzw. B II), die Zellinien 697 und Nalm-6 einer prä-B-ALL (B III) und die Zellinien MHH-ALL 2 und 4 einer B-ALL (B IV). Somit stellen die Blasten der Zellinie MHH-ALL 2 die differenziertesten Leukämiezellen im Rahmen dieser Untersuchungen dar.

5.2 CD95-Expression

5.2.1 CD95-Expression im nativen, unbehandelten Zustand

Im Rahmen der Immunphänotypisierungen der Zellinien (vgl. 5.1) wird zunächst durchflußzytometrisch untersucht, ob die Zellinien CD95 spontan exprimieren und ob die Expression über einen Inkubationszeitraum von 72 h ohne Behandlung zunimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 dargestellt.

Abbildung 2: CD95$^+$ Expression ($\mu \pm$SEM) der Zellinien im nativen Zustand (n=3)

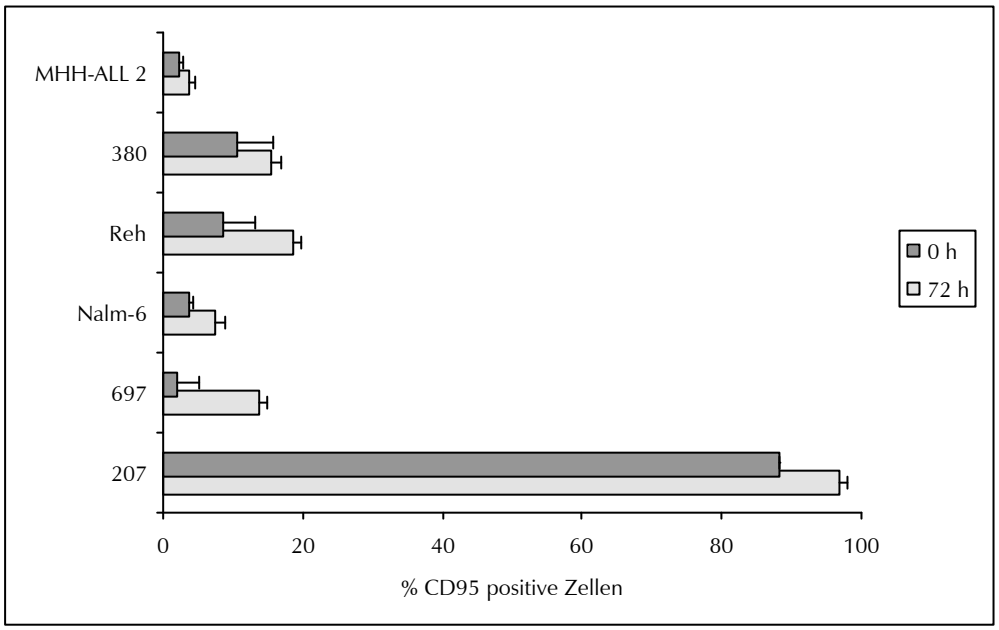


Abbildung 2: Zellen der 6 untersuchten Leukämie-Zellinien wurden durchflußzytometrisch hinsichtlich der CD95-Positivität (prozentualer Anteil CD95$^+$-Zellen) nach 0 und 72 h Stimulation unter Standardbedingungen untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte (n=3 Experimente) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

Die pro-B-ALL 207 zeigt die höchste spontane Expression von CD95. Diese steigert sich nach 72 h Inkubationszeit ohne Behandlung. Bei den prä-B-ALL Zellinien Nalm-6 und 697 ist die CD95-Expression im nativen Zustand nur sehr gering nachweisbar und wird durch die 72-stündige Kultivierungszeit deutlich erhöht, bleibt insgesamt aber dennoch schwach. Die c-ALL Zellinien 380 und Reh exprimieren CD95 stärker als die prä-B-Linien, aber deutlich schwächer als die pro-B-ALL 207. Die B-ALL MHH-ALL 2 exprimiert im unbehandelten Zustand nur sehr gering CD95 und zeigte nach 72 h keine wesentliche Steigerung. Ein Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad der Leukämiezellen und der CD95-Expression im unbehandelten Zustand ergibt sich nicht.

5.2.2 Induktion der CD95-Expression durch Zytokine

Zur Beantwortung der Frage, ob die CD95-Expression bei Zellinien, welche spontan kein oder nur sehr wenig CD95 exprimieren, induziert werden kann, werden die 6 Zellinien mit verschiedenen Zytokinen stimuliert und anschließend durchflußzytometrisch hinsichtlich ihrer CD95 Expression untersucht.

5.2.2.1 pro-B-ALL Zellen

Die nach der EGIL-Klassifikation als B I (pro-B-ALL) zu klassifizierende Zellinie 207, welche damit die undifferenzierteste der hier untersuchten Leukämiezellinien ist, exprimiert als einzige im unbehandelten Zustand CD95 sehr stark. Fast alle 207-Zellen exprimieren CD95 auf ihrer Zellmembran. Die Behandlung der 207-Zellen mit den in Tabelle 10 dargestellten Zytokinen veränderte die Zahl der CD95 positiven Zellen nicht.

Tabelle 10: 207 - CD95 Expression ($\mu \pm$SEM) nach Zytokin-Stimulation (n=3)

Bedingung	% $CD95^+$ Zellen	MFI $CD95^+$ Zellen
unbehandelt	96,76 ± 0,03	50,53 ± 1,02
TNF-α 25 ng/ml	96,11 ± 0,18	76,47 ± 1,33
IFN-γ 20 ng/ml	96,86 ± 0,33	49,30 ± 0,46
IL-2 100 IU/ml	93,61 ± 0,94	60,40 ± 0,80
IL-4 100 IU/ml	91,94 ± 1,78	63,97 ± 2,84
IL-6 10 ng/ml	93,40 ± 0,69	56,10 ± 3,20
IL-10 100 ng/ml	92,18 ± 1,47	56,51 ± 1,03

Tabelle 10: 207-Zellen wurden 72 h unter Standardbedingungen inkubiert und durchflußzytometrisch hinsichtlich der CD95-Positivität (prozentualer Anteil und mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) untersucht.

Unter Behandlung mit TNF-α nimmt allerdings die Dichte der Expression von CD95 auf der Zellmembran der 207-Zellen zu, wie der Anstieg der MFI um 50% bei konstanter Prozentzahl $CD95^+$ 207-Zellen zeigt.

5.2.2.2 c-ALL Zellen

Auf der nach der EGIL-Klassifikation als c-ALL (B II) eingestuften Zellinie 697 kann im unbehandelten Zustand eine schwache CD95-Expression gemessen werden (13,87 ± 3,20% $CD95^+$-Zellen; $\mu \pm$SEM). Die Stimulation mit TNF-α führt zu einer Verdopplung der $CD95^+$-Zellen, die Stimulation mit IFN-γ fast zu einer Verdreifachung des Anteils $CD95^+$-Zellen. Die anderen untersuchten Zytokine zeigen keinen induktiven Effekt auf die CD95-Expression von 697-Zellen.

Tabelle 11: 697 - CD95 Expression ($\mu \pm$SEM) nach Zytokin-Stimulation (n=3)

Bedingung	% $CD95^+$ Zellen	MFI $CD95^+$ Zellen
unbehandelt	13,87 ± 3,20	13,50 ± 0,70
TNF-α 25 ng/ml	24,48 ± 3,24	14,01 ± 0,73
IFN-γ 20 ng/ml	31,86 ± 7,61	14,10 ± 0,81
IL-2 100 IU/ml	20,95 ± 1,63	9,60 ± 4,81
IL-4 100 IU/ml	22,09 ± 0,65	9,27 ± 4,64
IL-6 10 ng/ml	20,36 ± 1,17	9,50 ± 4,75
IL-10 100 ng/ml	12,67 ± 0,43	12,83 ± 0,23
IL-12 10 ng/ml	10,80 ± 3,19	12,10 ± 1,12
NGF-β 50 ng/ml	12,24 ± 3,70	12,03 ± 1,09

Tabelle 11: 697-Zellen wurden 72 h unter Standardbedingungen inkubiert und durchflußzytometrisch hinsichtlich der CD95-Positivität (prozentualer Anteil und mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) untersucht.

Die c-ALL Zellinie Nalm-6 exprimiert im unbehandelten Zustand nur sehr wenig CD95. Die Zytokine TNF-α, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 und IFN-γ können die Expression von CD95 bei Nalm-6 Zellen nicht modulieren, weder hinsichtlich der Anzahl $CD95^+$ Zellen noch der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI).

Tabelle 12: Nalm-6 - CD95 Expression ($\mu \pm$SEM) nach Zytokin-Stimulation (n=3)

Bedingung	% CD95$^+$ Zellen	MFI CD95$^+$ Zellen
unbehandelt	7,46 ± 0,50	13,10 ± 0,07
TNF-α 25 ng/ml	6,16 ± 0,39	13,35 ± 0,05
IFN-γ 20 ng/ml	4,85 ± 0,69	13,00 ± 0,10
IL-2 100 IU/ml	5,01 ± 0,63	12,95 ± 0,15
IL-4 100 IU/ml	7,71 ± 0,86	13,20 ± 0,20
IL-6 10 ng/ml	5,72 ± 0,02	13,00 ± 0,10
IL-10 100 ng/ml	5,92 ± 0,58	13,05 ± 0,05

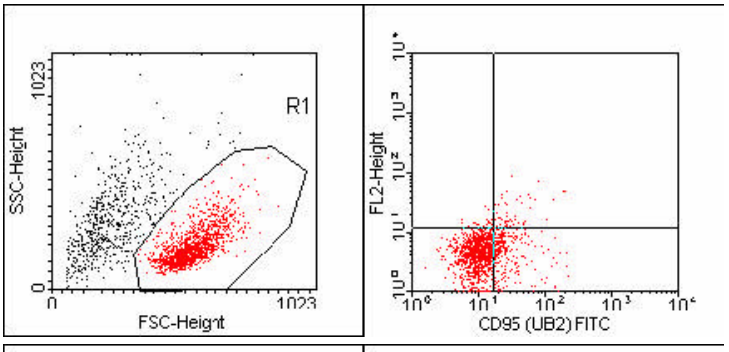
Tabelle 12: Nalm-6-Zellen wurden 72 h unter Standardbedingungen inkubiert und durchflußzytometrisch hinsichtlich der CD95-Positivität (prozentualer Anteil und mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) untersucht.

5.2.2.3 prä-B-ALL Zellen

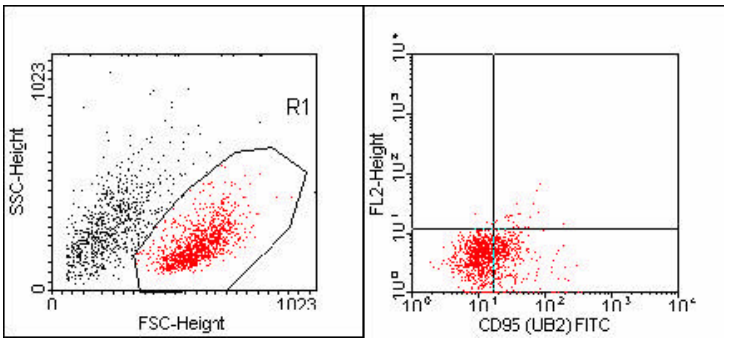
Bei der nach EGIL-Klassifikation als prä-B-ALL (B III) einzuordnenden Zellinie Reh zeigen 18,6 ± 4,58% ($\mu \pm$SEM) der Zellen schon in unbehandeltem Zustand eine CD95-Expression; die 72-stündige Stimulation mit IFN-γ bewirkt eine deutliche Induktion der CD95 Expression; der Anteil CD95$^+$-Zellen erhöht sich auf 53,95 ± 10,89% ($\mu \pm$SEM).

Abbildung 3: Reh - FACS-Analyse der CD95 Expression

unbehandelt



TNF-α



(Fortsetzung Abbildung 3)

IFN-γ

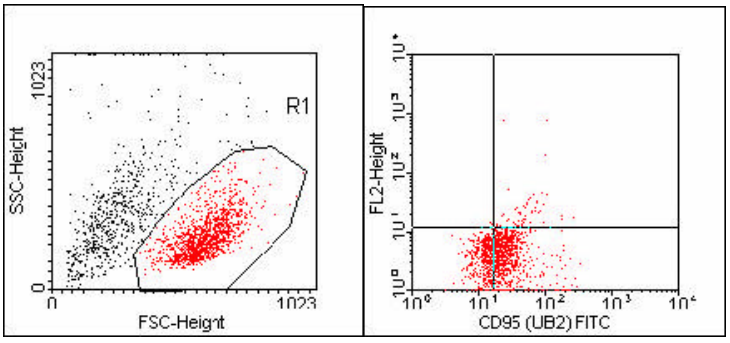


Abbildung 3: Durchflußzytometrische Analyse eines repräsentativen Experimentes zur CD95 Expression nach 72 h Zytokinstimulation der prä-B-ALL Zellinie Reh. Gate R1 (entspricht vitalen Zellen bzw. Lymphozytengate); nur die im R1 erfaßten Zellen werden berücksichtigt..

Tabelle 13: Reh - CD95 Expression (μ±SEM) nach Zytokin-Stimulation (n=3)

Bedingung	% CD95⁺ Zellen	MFI CD95⁺ Zellen
unbehandelt	18,60 ± 4,58	25,33 ± 3,61
TNF-α 25 ng/ml	26,23 ± 6,99	28,32 ± 5,94
IFN-γ 20 ng/ml	49,07 ± 8,92	29,27 ± 8,63
IL-2 100 IU/ml	20,95 ± 1,63	9,60 ± 4,81
IL-4 100 IU/ml	22,09 ± 0,65	9,27 ± 4,64
IL-6 10 ng/ml	20,36 ± 1,17	9,50 ± 4,75
IL-10 100 ng/ml	12,67 ± 0,43	12,83 ± 0,23
IL-12 10 ng/ml	10,80 ± 3,19	12,10 ± 1,12
NGF-β 50 ng/ml	12,24 ± 3,70	12,03 ± 1,09

Tabelle 13: Reh-Zellen wurden 72 h unter Standardbedingungen inkubiert und durchflußzytometrisch hinsichtlich der CD95-Positivität (prozentualer Anteil und mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) untersucht.

TNF-α allein induziert eine wesentlich schwächere CD95 Expression (26,23 ± 6,99% CD95⁺-Zellen; μ±SEM). Die anderen Zytokine üben keinen induktiven oder repressiven Effekt auf die Expression von CD95 auf Reh-Zellen aus.

Bei der prä-B-ALL (EGIL B III) Zellinie 380 führen die hier eingesetzten Zytokine zu keiner wesentlichen Beeinflussung der CD95 Expression.

Tabelle 14: 380 - CD95 Expression ($\mu \pm$SEM) nach Zytokin-Stimulation (n=3)

Bedingung	% CD95$^+$ Zellen	MFI CD95$^+$ Zellen
unbehandelt	10,51 ± 1,52	20,07 ± 1,22
TNF-α 25 ng/ml	10,25 ± 1,58	20,00 ± 1,20
IFN-γ 20 ng/ml	10,19 ± 1,77	19,80 ± 1,21
IL-2 100 IU/ml	7,30 ± 0,71	7,85 ± 0,05
IL-4 100 IU/ml	13,31 ± 2,39	8,10 ± 0,10
IL-6 10 ng/ml	7,97 ± 0,06	7,90 ± 0,02
IL-10 100 ng/ml	8,41 ± 0,38	7,85 ± 0,35

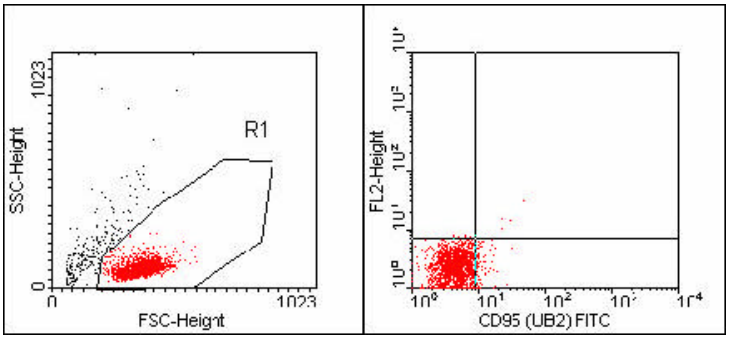
Tabelle 14: 380-Zellen wurden 72 h unter Standardbedingungen inkubiert und durchflußzytometrisch hinsichtlich der CD95-Positivität (prozentualer Anteil und mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) untersucht.

5.2.2.4 B-ALL Zellen

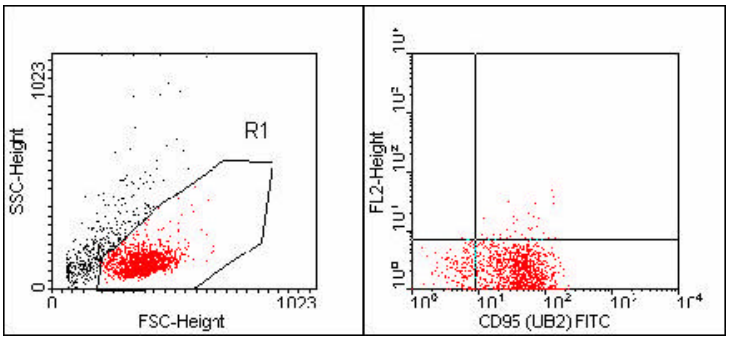
MHH-ALL 2 Zellen exprimieren im unbehandelten Zustand nur sehr wenig CD95.

Abbildung 4: MHH-ALL 2 - FACS-Analyse der CD95 Expression

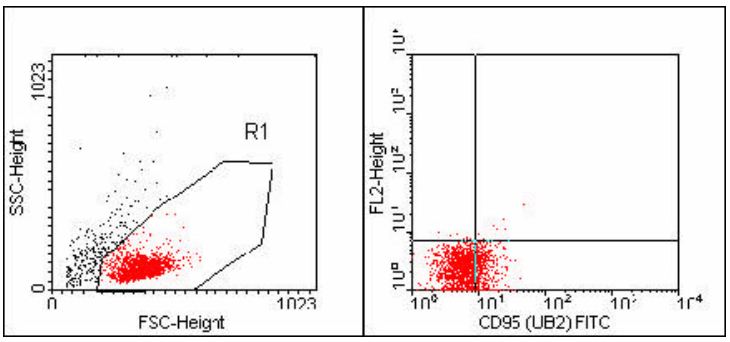
unbehandelt



TNF-α



(Fortsetzung Abbildung 4)



IFN-γ

<u>Abbildung 4:</u> Durchflußzytometrische Analyse eines repräsentativen Experimentes zur CD95 Expression nach 72 h Zytokinstimulation der B-ALL Zellinie MHH-ALL 2. Gate R1 (entspricht vitalen Zellen bzw. Lymphozytengate); nur die im R1 erfaßten Zellen werden berücksichtigt..

Abbildung 4 zeigt, daß die Inkubation von MHH-ALL 2 Zellen mit TNF-α zu einer starken Zunahme der CD95-positiven Zellen führt. Die Zunahme der Expression von CD95, welche nach IFN-γ gemessen wurde, war ebenfalls im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen erhöht, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß als bei TNF-α. Durch alle anderen Zytokine wurde die Expression von CD95 nicht wesentlich beeinflußt.

Tabelle 15: MHH-ALL 2 - CD95 Expression (μ±SEM) nach Zytokin-Stimulation (n=3)

Bedingung	% CD95⁺ Zellen	MFI CD95⁺ Zellen
unbehandelt	3,70 ± 0,67	15,21 ± 1,17
TNF-α 25 ng/ml	81,39 ± 3,71	47,79 ± 3,66
IFN-γ 20 ng/ml	19,52 ± 2,03	16,20 ± 1,12
IL-2 100 IU/ml	2,00 ± 0,57	18,81 ± 1,23
IL-3 50 ng/ml	1,78 ± 0,38	14,93 ± 0,52
IL-4 100 IU/ml	1,78 ± 1,13	19,16 ± 1,61
IL-6 10 ng/ml	1,39 ± 1,03	19,83 ± 1,49
IL-7 5 ng/ml	2,00 ± 0,52	14,33 ± 0,22
IL-10 100 ng/ml	2,05 ± 1,78	17,48 ± 0,03
IL-12 10 ng/ml	1,71 ± 0,62	12,86 ± 1,35
NGF-β 50 ng/ml	1,81 ± 0,73	12,76 ± 1,19

<u>Tabelle 15:</u> MHH-ALL 2 Zellen wurden 72 h unter Standardbedingungen inkubiert und durchflußzytometrisch hinsichtlich der CD95-Positivität (prozentualer Anteil CD95⁺-Zellen und mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) untersucht.

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, daß kein Zusammenhang zwischen der Induzierbarkeit der CD95-Expression und dem Reifungsgrad der Zellen besteht. Von allen untersuchten Zytokinen können nur TNF-α und IFN-γ bei einigen Zell-Linien die CD95 Expression heraufregulieren.

5.3 Analyse der CD95-Funktion

Um die Funktionalität des spontan oder nach Zytokinbehandlung exprimierten CD95 zu überprüfen, werden die Leukämiezellen der Zellinien 207, 697, Reh und MHH-ALL 2 zunächst mit TNF-α und IFN-γ über 72 h unter Standardbedingungen behandelt. Anschließend wird den zytokinbehandelten Zellen der Apoptose-induzierende, murin-monoklonale Antikörper CH11 oder ein unspezifischer IgM-Antikörper für weitere 4 Stunden zugesetzt (96,97). Der Anteil der apoptotischen Zellen wird durch die alleinige Anfärbung mit Annexin V charakterisiert. Wenn diese Zellen absterben und dabei ihre Membranintegrität verlieren, nehmen sie zusätzlich PI auf (88,92).

5.3.1.1 pro-B-ALL Zellen

Tabelle 16: 207 - Apoptotische und tote Zellen ($\mu \pm$SEM) mit Annexin V und PI (n=3)

Bedingung	**% nur Annexin V^+ Zellen** *(einfach positiv)*	**% PI^+/Annexin V^+ Zellen** *(doppelt positiv)*
unbehandelt (Medium)	61,77 ± 1,76	32,61 ± 0,67
+ CH11 1000 ng/ml	11,77 ± 2,31	78,90 ± 1,82
+ IgM 1000 ng/ml	62,23 ± 0,77	33,88 ± 1,72
TNF-α 25 ng/ml	45,99 ± 0,34	47,57 ± 1,03
+ CH11 1000 ng/ml	12,97 ± 0,71	75,82 ± 2,67
+ IgM 1000 ng/ml	45,94 ± 1,17	49,02 ± 1,12
IFN-γ 20 ng/ml	63,95 ± 1,21	31,27 ± 0,80
+ CH11 1000 ng/ml	16,25 ± 1,91	73,05 ± 3,00
+ IgM 1000 ng/ml	63,13 ± 2,77	32,58 ± 3,13

Tabelle 16: 207-Zellen wurden 72 h unter Standardbedingungen mit TNF-a und IFN-g inkubiert. Anschließend wurde den inkubierten Zellen für weitere 4 h Medium, CH11-Antikörper oder ein unspezifischer IgM-Antikörper zugesetzt. Nach insgesamt 76 h wurde der prozentuale Anteil PI^+ und PI^+/Annexin V^+ (entspricht toten Zellen) sowie nur Annexin V^+ Zellen (entspricht apoptotischen Zellen) bestimmt.

Aus der Tabelle 16 ist zu ersehen, daß die CD95-Expression auf 207-Zellen im Sinne einer Induktion von Apoptose funktional ist und zu einem Absterben binnen 4 Stunden von 73,05 bis 78,90% der 207-Zellen unter Behandlung mit CH11 führt, unbesehen der Vorbehandlung mit TNF-α oder IFN-γ. Ohne CH11 sind nach insgesamt 76 h nur 32,61% aller 207-Zellen im unbehandelten Zustand tot, 62% aber apoptotisch. Dieses Reaktionsmuster im Sinne einer effektiven Apoptose-Induktion durch CH11 ist auch bei den mit TNF-α und IFN-γ behandelten Zellen zu messen. Der CD95-Expression auf fast allen 207-Zellen (vgl. Tabelle 10) ist hierfür als Ursache anzunehmen. Der hohe Anteil toter Zellen nach CH11-Behandlung mit oder ohne Vorbehandlung durch die Zytokine TNF-α und IFN-γ zeigt, daß der über den Mechanismus der Apoptose vermittelte Zelltod bei 207-Zellen nach 4 h weitestgehend eingetreten ist. Allerdings führt TNF-α allein ebenfalls zu einer Zunahme der toten Zellen um ca. 15% verglichen mit den unbehandelten 207-Zellen.

5.3.1.2 c-ALL Zellen

Tabelle 17: 697 - Apoptotische und tote Zellen ($\mu \pm$SEM) mit Annexin V und PI (n=3)

Bedingung	**% nur Annexin V^+ Zellen** *(einfach positiv)*	**% PI^+/Annexin V^+ Zellen** *(doppelt positiv)*
unbehandelt (Medium)	72,00 ± 3,80	10,21 ± 1,46
+ CH11 1000 ng/ml	72,94 ± 1,43	9,36 ± 0,16
+ IgM 1000 ng/ml	71,45 ± 1,32	9,54 ± 0,84
TNF-α 25 ng/ml	38,23 ± 1,41	33,04 ± 2,47
+ CH11 1000 ng/ml	52,74 ± 1,85	35,13 ± 2,38
+ IgM 1000 ng/ml	35,14 ± 3,42	29,61 ± 0,36
IFN-γ 20 ng/ml	71,25 ± 4,29	12,65 ± 0,64
+ CH11 1000 ng/ml	65,16 ± 1,85	11,62 ± 0,66
+ IgM 1000 ng/ml	68,40 ± 2,40	11,84 ± 1,09

Tabelle 17: 697-Zellen wurden 72 h unter Standardbedingungen mit TNF-a und IFN-g inkubiert. Anschließend wurde den inkubierten Zellen für weitere 4 h Medium, CH11-Antikörper oder ein unspezifischer IgM-Antikörper zugesetzt. Nach insgesamt 76 h wurde der prozentuale Anteil PI^+ und PI^+/Annexin V^+ (entspricht toten Zellen) sowie nur Annexin V^+ Zellen (entspricht apoptotischen Zellen) bestimmt.

Trotz der niedrigen CD95-Expression auf 697-Zellen (vgl. Tabelle 11) im unbehandelten Zustand sind nach 76 h Inkubationszeit zu 72% der Zellen apoptotisch, le-

diglich 10,21% der 697-Zellen sind tot. Die Behandlung mit CH11 oder unspezifischem IgM-Antikörper führt hinsichtlich des Anteils apoptotischer oder toter Zellen zu keinem meßbaren Effekt. TNF-α, welches auf 697-Zellen eine Verdopplung der CD95-Expression zu induzieren vermag, führt allein zu einer Halbierung der apoptotischen Zellfraktion bei gleichzeitiger Zunahme der toten Zellen im Sinne einer stattgefundenen Apoptose. IFN-γ bewirkt im Vergleich zu den unbehandelten Zellen keine Veränderung, obwohl die CD95-Expression durch Behandlung mit IFN-γ verdreifacht wird (vgl. Tabelle 11). Die Behandlung von 697-Zellen mit CH11 im Anschluß an eine Vorbehandlung mit TNF-α führt allerdings nicht zu einer weiteren Zu- oder Abnahme der toten Zellen im Vergleich zu den nur mit TNF-α behandelten 697-Zellen, sondern zu einer isolierten Zunahme der apoptotischen Zellen. Somit bewirkt die Zugabe von CH11 zu TNF-α eine Apoptoseinduktion auf 697-Zellen. Die Zugabe von CH11 zu IFN-γ vorbehandelten Zellen induziert keine Apoptose, trotz Verdreifachung der CD95-Expression, was eine Non-Funktionalität des durch IFN-γ induzierten CD95-Moleküls nahe legt bzw. eine Inhibition der Fas-Funktion durch IFN-γ bedeuten könnte.

5.3.1.3 prä-B-ALL Zellen

Im unbehandelten Zustand exprimieren 18,6% der Reh-Zellen CD95, 48,63% der Zellen sind dabei apoptotisch, 6,72% tot. Die zusätzliche Behandlung mit CH11 oder unspezifischem IgM-Antikörper bewirkt bei unbehandelten Zellen keine Änderung. IFN-γ, welches die Anzahl der $CD95^+$ Reh-Zellen um mehr als das Doppelte auf bis zu 49,07% steigert, bewirkt hinsichtlich der apoptotischen Zellfraktion weder eine Steigerung noch eine Reduktion im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Auch die zusätzliche Behandlung mittels CH11 oder IgM zeigt keinen zusätzlichen Effekt. TNF-α allein, welches den Anteil CD95-exprimierender Reh-Zellen auf 26,23% steigert, bewirkt ebenfalls keine nennenswerte Zunahme der apoptotischen Zellfraktion und nur einen sehr geringen Anstieg der toten Zellfraktion nach insgesamt 76 h Behandlungszeit. Bei Reh-Zellen scheint somit eine über die spontane Apoptose- bzw. Absterberate CD95-vermittelte Rekrutierung von Zellen mit Determinierung zur Apoptose und nachfolgendem Zelltod nicht stattzufinden.

Tabelle 18: Reh - Apoptotische und tote Zellen ($\mu \pm$SEM) mit Annexin V und PI (n=3)

Bedingung	**% nur Annexin V$^+$ Zellen** *(einfach positiv)*	**% PI$^+$/Annexin V$^+$ Zellen** *(doppelt positiv)*
unbehandelt (Medium)	48,63 ± 3,88	6,72 ± 1,13
+ CH11 1000 ng/ml	46,06 ± 2,67	7,56 ± 1,14
+ IgM 1000 ng/ml	42,25 ± 2,05	7,12 ± 0,78
TNF-α 25 ng/ml	44,80 ± 4,89	13,05 ± 1,28
+ CH11 1000 ng/ml	48,19 ± 3,70	13,95 ± 1,24
+ IgM 1000 ng/ml	38,11 ± 4,94	13,12 ± 1,99
IFN-γ 20 ng/ml	45,99 ± 5,26	10,18 ± 3,71
+ CH11 1000 ng/ml	49,19 ± 3,18	9,64 ± 0,79
+ IgM 1000 ng/ml	50,96 ± 2,11	8,43 ± 0,68

Tabelle 18: Reh-Zellen wurden 72 h unter Standardbedingungen mit TNF-a und IFN-g inkubiert. Anschließend wurde den inkubierten Zellen für weitere 4 h Medium, CH11-Antikörper oder ein unspezifischer IgM-Antikörper zugesetzt. Nach insgesamt 76 h wurde der prozentuale Anteil PI$^+$ und PI$^+$/Annexin V$^+$ (entspricht toten Zellen) sowie nur Annexin V$^+$ Zellen (entspricht apoptotischen Zellen) bestimmt.

5.3.1.4 B-ALL Zellen

Obwohl nur 3,7% der MHH-ALL 2 Zellen in unbehandeltem Zustand CD95 exprimieren, sind 22,04% der Zellen apoptotisch und 12,1% tot. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit CH11 oder unspezifischem IgM-Anitkörper bewirkt dabei keine signifikante Änderung. Obwohl TNF-α die CD95-Expression auf 81,39% der MHH-ALL-2-Zellen zu induzieren vermag, unterscheiden sich die mit TNF-α vorbehandelten Zellen nicht im Anteil ihrer apoptotischen Zellen von den unbehandelten Zellen. Der Anteil der toten Zellen nach Vorbehandlung mit TNF-α steigt jedoch auf ca. 17,39 bis 19,17% an, ohne daß die zusätzliche Behandlung mit CH11 oder IgM eine weitere Zu- oder Abnahme der toten Zellen gegenüber den allein mit TNF-α behandelten Zellen zeigt. Dies bedeutet, daß das zusätzliche Absterben von MHH-ALL-2 Zellen unter TNF-α Behandlung nicht in einen ursächlichen Zusammenhang mit einer CD95-vermittelten Apoptose gebracht werden kann.

Tabelle 19: MHH-ALL 2 - Apoptotische und tote Zellen ($\mu \pm$SEM) mit Annexin V und PI (n=3)

Bedingung	**% nur Annexin V$^+$ Zellen** *(einfach positiv)*	**% PI$^+$/Annexin V$^+$ Zellen** *(doppelt positiv)*
unbehandelt (Medium)	22,04 ± 2,64	12,10 ± 0,58
+ CH11 1000 ng/ml	27,80 ± 2,31	12,20 ± 0,44
+ IgM 1000 ng/ml	24,60 ± 2,38	12,08 ± 0,97
TNF-α 25 ng/ml	22,61 ± 2,83	17,74 ± 1,56
+ CH11 1000 ng/ml	25,94 ± 0,51	19,17 ± 0,91
+ IgM 1000 ng/ml	24,41 ± 2,61	17,39 ± 1,05
IFN-γ 20 ng/ml	30,95 ± 1,99	14,58 ± 0,67
+ CH11 1000 ng/ml	34,74 ± 2,35	16,48 ± 0,42
+ IgM 1000 ng/ml	37,96 ± 4,86	17,02 ± 1,25

Tabelle 19: MHH-ALL-2-Zellen wurden 72 h unter Standardbedingungen mit TNF-a und IFN-g inkubiert. Anschließend wurde den inkubierten Zellen für weitere 4 h Medium, CH11-Antikörper oder ein unspezifischer IgM-Antikörper zugesetzt. Nach insgesamt 76 h wurde der prozentuale Anteil PI$^+$ und PI$^+$/Annexin V$^+$ (entspricht toten Zellen) sowie nur Annexin V$^+$ Zellen (entspricht apoptotischen Zellen) bestimmt.

IFN-γ, obwohl ein nur schwacher Induktor der CD95-Expression auf MHH-ALL 2-Zellen, bewirkt die stärkste Zunahme der apoptotischen Zellen auf 30,95%. Durch Zugabe von CH11 oder IgM-Antikörper wird nur eine geringradig weitere Zunahme der apoptotischen Zellen auf 34,74 bzw. 37,96% beobachtet, wobei sich zwischen dem CH11- und dem IgM-Antikörper keine nennenswerten Unterschiede ergeben. Der Anteil der toten Zellen nimmt jedoch bei mit IFN-γ vorbehandelten Zellen gegenüber den unbehandelten Zellen nur unwesentlich zu. Somit scheint die durch TNF-α induzierte CD95-Expression im Sinne einer Apoptoseinduktion nicht funktional zu sein. Die IFN-γ vermittelte, schwache Zunahme der Apoptose hingegen wird offenbar nicht über den CD95-Mechanismus verursacht.

5.4 Expression von bcl-2

Um die Ursache der mangelnden Funktionalität der CD95-Expression auf der prä-B-ALL Zellinie 697, der c-ALL Zellinie Reh und der B-ALL Zellinie MHH-ALL 2 zu untersuchen, wird die Expression des Apoptose-antagonistischen Proteins bcl-2 auf diesen Zellinien und der pro-B-ALL 207 durchflußzytometrisch gemessen.

5.4.1 pro-B-ALL Zellen

Die 207-Zellen exprimieren in unbehandeltem Zustand nur schwach bcl-2. Die Behandlung mit TNF-α und IFN-γ verändert diese schwache Expression nicht.

Tabelle 20: bcl-2 Expression (μ±SEM) von 207-Zellen nach TNF-a und IFN-g (n=3)

Bedingung	% bcl-2$^+$ Zellen	MFI bcl-2$^+$ Zellen
unbehandelt	13,63 ± 0,21	38,60 ± 0,15
TNF-α 25 ng/ml	14,02 ± 0,81	38,38 ± 0,09
IFN-γ 20 ng/ml	12,38 ± 0,58	38,37 ± 0,20

Tabelle 20: 207-Zellen wurden 72 h unter Standardbedingungen inkubiert und durchflußzytometrisch hinsichtlich der bcl-2-Positivität (prozentualer Anteil und mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) untersucht.

Auch die Expressionsdichte von bcl-2 wird durch die Zytokine TNF-α oder IFN-γ im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nicht alteriert.

5.4.2 c-ALL Zellen

Tabelle 21: bcl-2 Expression (μ±SEM) von 697-Zellen nach TNF-a und IFN-g (n=9)

Bedingung	% bcl-2$^+$ Zellen	MFI bcl-2$^+$ Zellen
unbehandelt	99,56 ± 0,13	111,93 ± 11,40
TNF-α 25 ng/ml	99,00 ± 0,28	106,51 ± 10,17
IFN-γ 20 ng/ml	99,71 ± 0,07	118,61 ± 9,34

Tabelle 21: 697-Zellen wurden 72 h unter Standardbedingungen inkubiert und durchflußzytometrisch hinsichtlich der bcl-2-Positivität (prozentualer Anteil und mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) untersucht.

Die prä-B-ALL Zellen der Zellinie 697 sind alle bcl-2 positiv. Die Behandlung der 697-Zellen mit TNF-α und IFN-γ verändert jedoch die bcl-2 Expression weder hinsichtlich des Anteils bcl-2 positiver Zellen noch hinsichtlich der Dichte der bcl-2 Expression auf der einzelnen Zelle. Somit ist kein steigernder Effekt von TNF-α oder IFN-γ auf die bcl-2 Expression von 697-Zellen zu beobachten, der als Erklärung für die im Verhältnis zur zytokin-induzierten CD95-Expression (hier vor allem IFN-γ) nur schwachte Apoptoseinduktion dienen könnte.

5.4.3 prä-B-ALL Zellen

Tabelle 22: bcl-2 Expression ($\mu \pm$SEM) von Reh-Zellen nach TNF-a und IFN-g (n=9)

Bedingung	% bcl-2$^+$ Zellen	MFI bcl-2$^+$ Zellen
unbehandelt	99,66 ± 0,08	231,62 ± 18,77
TNF-α 25 ng/ml	99,40 ± 0,27	211,99 ± 10,92
IFN-γ 20 ng/ml	99,63 ± 0,14	237,97 ± 14,45

Tabelle 22: Reh-Zellen wurden 72 h unter Standardbedingungen inkubiert und durchflußzytometrisch hinsichtlich der bcl-2-Positivität (prozentualer Anteil und mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) untersucht.

Auch bei Reh-Zellen kommt es nach Stimulation mit IFN-γ und TNF-α zu einer Heraufregulation der CD95-Expression. Inbesondere durch IFN-γ wird die Zahl der CD95$^+$ Zellen gesteigert. Nach Stimulation des CD95 kommt es jedoch nur in einem verhältnismäßig geringen Ausmaß zur Apoptoseinduktion im Vergleich zum Anstieg der CD95-Expression. Diese Diskrepanz kann jedoch ähnlich wie für die Zellinie 697 nicht mit einer erhöhten bcl-2 Expression erklärt werden. Reh-Zellen zeigen im unbehandelten Zustand eine Expression von bcl-2 in allen Zellen, welche sich durch die Behandlung mit TNF-α oder IFN-γ nicht verändert.

5.4.4 B-ALL Zellen

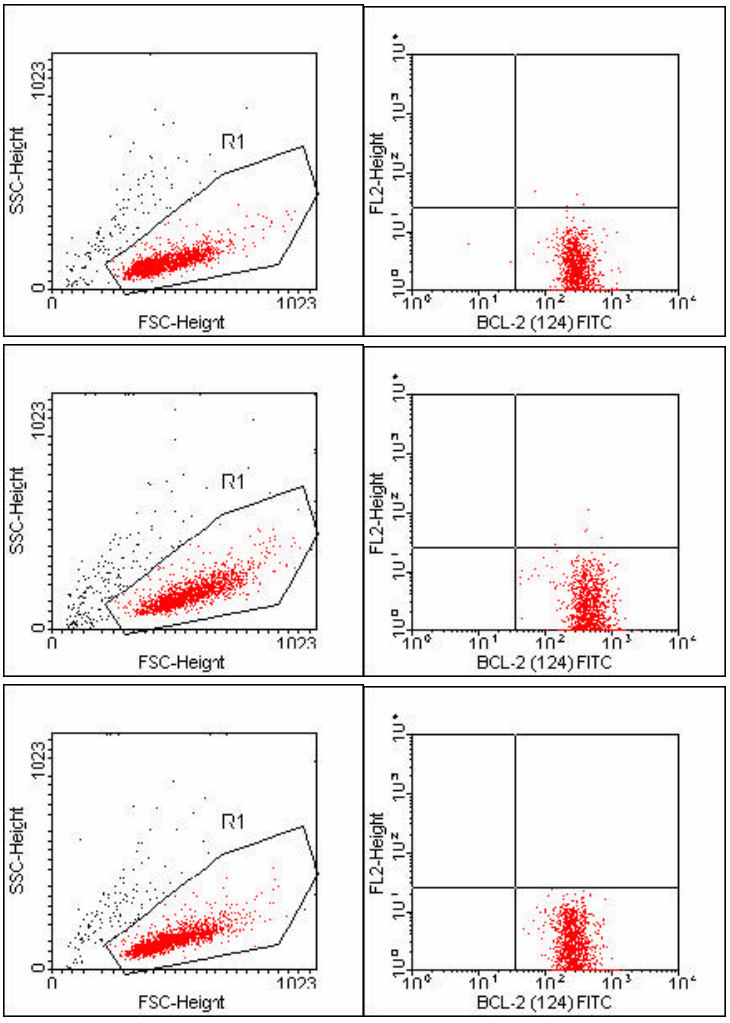
Die MHH-ALL-2 Zellen zeigen im unbehandelten Zustand eine Expression von bcl-2 in hoher Dichte auf allen Zellen. Unter Behandlung mit TNF-α wird die Expressionsdichte von bcl-2 verdoppelt, unter IFN-γ bleibt die Expressionsdichte von bcl-2 im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle unverändert. Somit wird die Expressionsdichte von bcl-2 gleichsinning mit der Expression von CD95 bei den MHH-ALL-2 Zellen durch TNF-α gesteigert, wobei im Gegensatz zu CD95 bcl-2 schon von allen Zellen im nativen Zustand exprimiert wird.

Abbildung 5: MHH-ALL 2 - FACS-Analyse der bcl-2 Expression

unbehandelte Zellen

TNF-α

IFN-γ



<u>Abbildung 5:</u> Durchflußzytometrische Analyse eines repräsentativen Experimentes zur CD95 Expression nach 72 h Zytokinstimulation der B-ALL Zellinie MHH-ALL 2. Gate R1 (entspricht vitalen Zellen bzw. Lymphozytengate); nur die im R1 erfaßten Zellen werden berücksichtigt.

IFN-γ, welches keinen induktiven Effekt auf die CD95-Expression der MHH-ALL 2-Zellen besitzt, zeigt auch keinerlei induktiven Effekt auf die bcl-2 Expression.

Tabelle 23: bcl-2 Expression ($\mu \pm$SEM) von MHH-ALL-2-Zellen nach TNF-a und IFN-g (n=3)

Bedingung	% bcl-2$^+$ Zellen	MFI bcl-2$^+$ Zellen
unbehandelt	98,35 ± 1,18	241,23 ± 26,25
TNF-α 25 ng/ml	99,47 ± 0,25	482,18 ± 56,03
IFN-γ 20 ng/ml	99,86 ± 0,03	258,47 ± 47,58

Tabelle 23: MHH-ALL-2-Zellen wurden 72 h unter Standardbedingungen inkubiert und durchflußzytometrisch hinsichtlich der bcl-2-Positivität (prozentualer Anteil und mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) untersucht.

5.5 Zusammenfassung aller experimentellen Ergebnisse

Werden alle Ergebnisse in Kürze zusammengefaßt, so zeigt sich folgendes Bild:

Tabelle 24: Zusammenfassende Darstellung der experimentellen Ergebnisse

Linie	*CD95 Expression*	*CD95 Funktion*	*bcl-2 Expression*
207	TNF-α ↑ / IFN-γ Ø	erhalten	keine Induktion
697	TNF-α ↑ / IFN-γ ↑	vermindert	kein Anstieg
Nalm-6	keine Induktion	nicht untersucht	nicht untersucht
Reh	TNF-α ↑ / **IFN-**g ↑↑	vermindert	kein Anstieg
380	keine Induktion	nicht untersucht	nicht untersucht
MHH-ALL 2	**TNF-**a ↑↑↑ / IFN-γ Ø-↑	vermindert	**TNF-**a ↑↑↑ / IFN-γ Ø

Aus der Tabelle 24 ist ersichtlich, daß sich im Rahmen dieser Untersuchungen folgende Reaktionsmuster bei den Zellinien fanden:

1. Auf der undifferenziersten Zellinie, der pro-B-ALL 207, konnte eine hohe spontane CD95-Expression mit erhaltener Funktion des CD95 gefunden werden.

2. CD95 konnte durch Zytokine auf den Linien 697, MHH-ALL 2 und Reh induziert werden. Hier war die Funktion des CD95 zum Teil wesentlich eingeschränkt.

3. Die eingeschränkte Funktion konnte zum Teil durch die Heraufregulation des die Apoptose antagonisierenden Proteins bcl-2 im Falle der MHH-ALL 2-Zellen erklärt werden. In anderen Fällen müssen differente Störungen, die zum Teil primär vorhanden sind, zum Teil auch erst durch die Zytokinstimulation entstehen (sie-

he IFN-γ induzierte CD95-Exprssion auf Reh-Zellen) angenommen werden.

Diese 3 Reaktionsmuster sind in der Abbildung 6 nochmals schematisch dargestellt.

Abbildung 6: Reaktionsmuster der Leukämiezellen nach Zytokinbehandlung

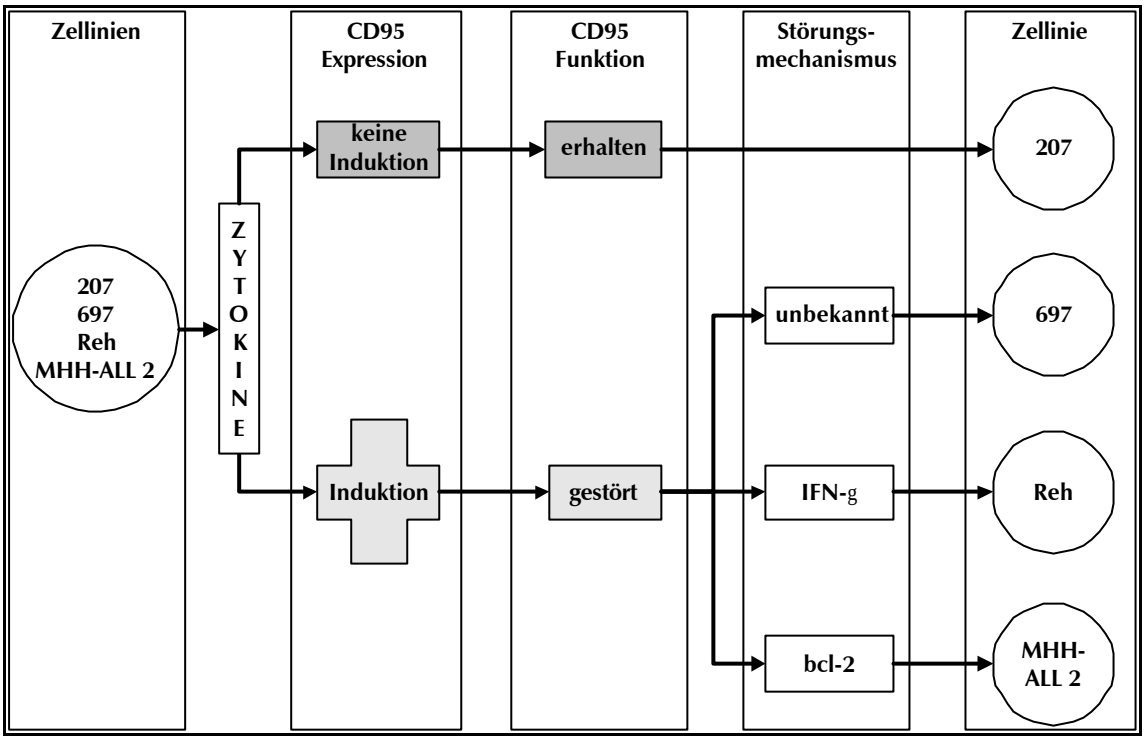


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Reaktionsmuster der untersuchten Leukämie-Zellinien nach Zytokinbehandlung hinsichtlich CD95-Expression, der CD95-Funktion, der bcl-2 Expression und des wahrscheinlichen Störungsmechanismus einer dysfunktionalen CD95-Expression.

Eine fehlende Induktion der CD95-Expression durch Zytokine zeigten die Zellinien 380 und Nalm-6. Daher wurden diese Zellinien nicht weiter untersucht, zumal mit 697 und Reh Zellinien der gleichen Reifungsstufe für weitere Untersuchungen verwendet wurden.

6 Diskussion

6.1 Spontane Expression von CD95

Die CD95-Expression im unbehandelten Zustand der in dieser Arbeit untersuchten humanen B-Zellprogenitorleukämien ist nur bei 1 von 6 sehr stark; 2 der 6 Zellinien zeigen eine schwache bis sehr schwache Expression, 3 von 6 Zellinien exprimieren CD95 nur in sehr geringer Anzahl.

Die Verwendung von Zelllinien im Rahmen dieser Untersuchungen liegt in der praktisch unbegrenzten Verfügbarkeit und damit Möglichkeit der Durchführung auch aufwendiger funktioneller Untersuchungen. Allerdings haben Untersuchungen an unmittelbar ex vivo gewonnen Zellen von ALL-Patienten den Vorteil einer besseren Korrelation mt der klinischen Situation in vivo. Es ist daher wichtig, ein geeignetes Modellsystem zu finden.

TSURUDA und Mitarbeiter haben in ihrer Arbeit zeigen können, daß auf den ALL-Zellen von 11 Patienten Fas gar nicht oder nur sehr schwach exprimiert wird (7 von 11 Fällen $CD95^+$-Zellen <30%), MUNKER et al. haben eine CD95-Expression auf adulten ALL-Zellen nur in 1 von 11 Fällen nachweisen können, und die Untersuchungen von DIGUISEPPE et al. haben bei 28 Präkursor-B-Zelleukämien keine oder eine nur sehr schwache CD95 Expression gezeigt (98,99,100). Die von LEVY et al. untersuchten 4 B-Zell-Progenitorleukämie-Zellinien der Differenzierungsstufen prä-B- und pro-B-ALL zeigen eine spontane CD95-Expression (101). Damit korreliert die spontane CD95-Expression der 6 hier untersuchten Zellinien der in der Literatur untersuchten ALL-Zellen bzw. Zellinien. Diese Linien wurden daher als für geeignet befunden, um modellhaft für Regulationsanalysen eingesetzt zu werden.

6.2 Korrelation der CD95-Expression & Differenzierung

Die Untersuchungen über die Fas-Expression bei normalen B-Zellen im Verlaufe ihrer Ontogenese liefern Argumente für die Hypothese, daß eine positiv-lineare Korrelation des Differenzierungsgrads mit der Expression von Fas in der B-Zellreifung vorzufinden ist. Normale B-Lymphozyten exprimieren mit zunehmenden Differenzierungsgrad CD95; bei ex vivo gewonnenen Plasmazellen und B-Zellen aus Follikelzentren ist eine hohe Expression von Fas nachgewiesen worden (102,103). Bei sehr frühen B-Zellen findet sich keine oder nur eine sehr schwache CD95-Expression (100,104). Aus diesen Befunden hinsichtlich der normalen B-Zellontogenese resultiert die Fragestellung, ob bei den hier untersuchten B-Zellprogenitorleukämien ebenfalls eine Korrelation zwischen der Expression von CD95 und dem Differenzierungsgrad der Zellinien vorzufinden ist.

Bei der Untersuchung an den hiesigen Leukämiezellinien hat sich jedoch eine solche Korrelation nicht vorfinden lassen. Auch in der Literatur sind die Untersuchungsergebnisse hinsichtlich der Korrelation zwischen Reifegrad der Leukämie und der Expression von Fas nicht einheitlich.

Die Arbeit von TSURUDA et al. zeigt im Gegensatz zur niedrigen CD95-Expression auf den ALL-Zellen hohe Fas-Expressionen auf differenzierteren B-Zellneoplasien wie B-Haarzelleukämien (B-HCL), B-Non-Hodgkin-Lymphomen (B-NHL) und Plasmozytomen (PCM). CD95 wird auf de facto jedem der untersuchten PCM, bei durchschnittlich 64% der B-NHL sowie ca. 68% der B-HCL exprimiert (98).

Insbesondere bei den hoch differenzierten Plasmozytom-Zellen ist eine starke CD95-Expression nachgewiesen worden (105). Auch die B-NHL, welche wesentlich differenzierter als die hier untersuchten Zellinien sind, zeigen eine starke Expression von Fas; 75% aller von KONDO und Mitarbeitern untersuchten follikulären Lymphome haben CD95 exprimiert, und in den sehr unfangreichen immunhistochemischen Untersuchungen von NGUYEN et al. exprimieren 29 von 67 B-NHL CD95; die niedrig-malignen B-NHL exprimieren dabei ca. in 87% der Fälle CD95, die hochmalignen B-NHL vom diffus-großzelligen oder Burkitt-Typ nur in 33% (106,107).

Demgegenüber zeigen Analysen an chronisch lymphatischen Leukämien der B-Zellreihe (B-CLL) eine geringe Fas Expression. TSURUDA et al. können in ca. 27% der Fälle von Patienten mit B-CLL eine Fas-Expression nachweisen, PANAYIOTIDIS et al. finden bei 10 von 21 Patienten eine Fas-Expression auf 15,6% der B-CLL-Zellen (98,108).

6.3 Induktion der CD95-Expression durch Zytokine

Da 5 der 6 hier untersuchten Zellinien spontan kein oder nur wenig CD95 exprimieren, werden Untersuchungen zur Beantwortung der Frage vorgenommen, in wie weit die CD95-Expression durch Behandlung mit verschiedenen Zytokinen induziert werden kann. Der B-Zellwachstumsfaktor IL-4 beispielsweise kann nach übereinstimmenden Berichten vieler Autoren eine Fas-Resistenz in B-Zellen induzieren, wobei FOOTE et al. diesen anti-apoptotischen Effekt insbesondere bei zuvor mittels CD40-Ligation aktivierten B-Zellen sehr eindrucksvoll beschrieben haben (75,76,109). Die Induktion einer CD95-Expression durch IL-4 wird jedoch auf keiner der 6 hier untersuchten B-Zellpräkursor-ALL-Zellinien beobachtet. Dieser Befund ist mit den Beobachtungen von OWEN-SCHAUB und Mitarbeiter analog, die bei nur 1 von 8 malignen Lymphomen die Effektivität der Heraufregulation von CD95 durch IL-4 zeigen können (110). LEVY et al. haben dieses Reaktionsmuster der fehlenden Induzierbarkeit einer CD95-Expression unter IL-4 Stimulation bei 4 B-Zell-Präkursorleukämiezellinien reproduzieren können (101). Die gleiche Arbeitsgruppe hat auch für die Zytokine IL-2 und IL-10 keine CD95-expressionsinduzierende Wirkung auf B-Vorläuferleukämien feststellen können (101). IL-2 und IL-10 zeigen bei den 6 hier untersuchten Zellinien ebenfalls keinen Effekt auf die Expression von CD95.

Die Wirkung von IL-12 auf die Fas-Expression maligner B-Zellen ist von WILLIAMS et al. untersucht worden. Das Th1-Zytokin IL-12 bewirkt bei CLL-Zellen eine Heraufregulation des Fas-Antigens (111). Diese Induktion der Expression von Fas ist bei den 3 hier mit IL-12 behandelten Zellinien nicht zu beobachten.

Für IFN-γ ist in den Untersuchungen von BERNASSOLA, DEBATIN et al. gezeigt worden, daß die Behandlung von Neuroblastom-Zellen zu einer Expression von CD95 führt (63). Auch bei Nierenzell- und Mammakarzinom- sowie bei Ewing-Sarkomzellen ist der induzierende Effekt von IFN-γ auf die CD95-Expression nachweisbar (112,113,114). Für Zellen des hämatopoietischen Systems ist beispielsweise bekannt, daß periphere T-Zellen durch IFN-γ zur Expression von CD95 stimuliert werden können (115). Bei Zellen von akuten myeloischen Leukämien vermag IFN-γ in den Untersuchungen von MUNKER und ANDREEFF die Expression von CD95 auf 9

von 12 AML-Zellinien zu induzieren, welche spontan nur wenig CD95 exprimieren (116).

Bei 3 der 6 hier untersuchten Zellinien kann zum ersten Male gezeigt werden, daß IFN-γ einen CD95-expressionsinduzierenden Effekt auf Präkursorzelleukämien der B-Zellreihe besitzt (117). Bei der c-ALL 697 wird die Zahl der CD95 exprimierenden Zellen im Vergleich zur schwachen Expression im unbehandelten Zustand fast verdoppelt, bei der prä-B-ALL Reh wird ein Anstieg der $CD95^+$ Zellen im ca. 35% auf 50% beobachtet. Im Gegensatz zu den anderen Zytokinen scheint IFN-γ somit einen gewissen induzierenden Effekt auf die CD95-Expression zu besitzen.

Da das CD95-Antigen zur Superfamilie der TNF-Rezeptor-Proteine gehört, ist der Effekt von TNF-α auf die CD95-Expression besonders interessant (118,119). BOUSSIOTIS et al. haben TNF-α als autokrinen Wachstumsfaktor für normale, aktivierte B-Zellen beschrieben (120). In den Untersuchungen von KAWAKAMI et al. steigert TNF-α auf Lymphozyten des peripheren Blutes die Fas-Expression (121).

CORDINGLEY und Mitarbeiter zeigen, daß TNF-α als autokriner Wachstumsfaktor von B-HCL und B-CLL fungiert (122). Nach LENS et al. vermag TNF-α sogar die B-Zellrezeptor-induzierte Apoptose von Ramos-Burkitt-Lymphom-Zellen zu unterbinden (123). Bei Plasmozytomen ist TNF-α ein potenter Proliferations- und Überlebensfaktor der Plasmozytom-Zellen (124, 125). MUNKER und ANDREEFF zeigen im Gegensatz dazu, daß auf Zellen akute myeloischer Leukämien Fas durch TNF-α induziert werden kann (116). Über die TNF-α gesteuerte Induktion von CD95 auf Zellen Präkursor-B-ALL sind keine detaillierten Daten bekannt.

TNF-α führt bei 4 von 6 der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zellinien von B-Zellvorläuferleukämien zu einer Induktion der Expression von Fas-Antigen. Die spontan nicht CD95 exprimierenden MHH-ALL 2-Zellen sind nach Behandlung mit TNF-α zu 80% positiv. Durch die Arbeit von ZHOU et al. ist bekannt, daß TNF-α auf die meisten unmittelbar ex vivo gewonnenen B-Zellpräkursorleukämien als potenter Inhibitor des Wachstums fungiert; die ALL-Zellen von 11 der 13 Patienten sind durch TNF-α in ihrem Wachstum inhibiert worden, ohne daß jedoch eine Korrelation mit der Fas-Expression hergestellt worden ist (126).

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, daß einige wenige Zytokine tatsächlich in der Lage sind, die CD95-Expression auf B-Progenitorleukämien heraufzuregulieren. Allerdings ist damit nicht die Frage beantwortet, ob die erhöhte Expression von Fas auch mit einer erhöhten Funktionalität korreliert ist. Die Arbeiten von DEBATIN et al. zeigen diesbezüglich, daß die Fas-Expression gerade auf Leukämiezellen nicht mit der Fas-Funktion korreliert sein muß (65,66).

6.4 Funktion des CD95-Antigens

Von den 6 untersuchten Zellinien weist nur die spontan Fas exprimierende pro-B-ALL-Zellinie 207 eine vollständig funktionale Expression von CD95 auf. Dies kann durch die Apoptose-Induktion mittels des anti-CD95-Antikörpers CH11 nachgewiesen werden. Durch CH11-Stimulation kommt es zu einer Beschleunigung des Absterbeprozesses.

Von SCAFFIDI et al sind zwei prinzipielle Reaktionswege beschrieben worden. Zum einen ein sehr rascher Weg, bei dem die Caspase 8 direkt aktiviert wird, zum anderen eine indirekte Aktivierung der Caspasen über die Stimulation der Mitochondrien und die Freisetzung von Cytochrom c (43). Der nach CH11-Stimulation beschleunigte Zelltod innerhalb von 4 Stunden spricht stark dafür, daß diese Zellen zum Typ I gehören und damit eine bcl-2 unabhängigen Weg die Apoptose vermittelt wird.

Im Gegensatz zu der vollen CD95-Funktionalität der Zellinie 207 zeigen die Linien 697 und Reh eine praktisch fehlende CD95-Funktionalität. Bei 697-Zellen, welche unter Stimulation mit TNF-α und IFN-γ ihre CD95-Expression um den Faktor 1,9-2,3 auf ca. 30% zu steigern vermögen, bewirkt die Stimulation mit CH11 keinen Anstieg der Apoptoserate.

Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung könnte darin liegen, daß die Zytokinstimulation zwar zu einer Fas-Expression führt, es gleichzeitig aber auch zu einer Inhibition der intrazellulären Signaltransduktion kommt. Über etwaig inhibierende Effekte von IFN-γ auf die CD95-vermittelte Apoptose sind nicht viele Daten bekannt. HORIE et al. haben bei der myeloblastischen Zellinie EoL-1 eine Inhibition der TNF-α-induzierten Apoptose durch IFN-γ mittels Heraufregulation des TNF-R2 beobachten; allerdings induziert die alleinige Behandlung der EoL-1 Zellen mit IFN-γ eine

funktionelle CD95-Expression (127). FLUCKIGER et al. berichten über die Inhibition von IL-10 vermittelter Apoptose in B-CLL durch IFN-γ (128).

Die B-ALL MHH-ALL 2 zeigt keine spontane CD95-Expression. IFN-γ bewirkt nur eine schwache, TNF-α allerdings eine sehr starke Induktion der Expression von Fas-Antigen auf den MHH-ALL-2 Zellen. Trotzdem läßt sich auch in dieser Linie keine Zunahme der Apotose nach CH11-Stimulation erkennen.

Mögliche Ursache einer solchen Dysfunktionalität des exprimierten CD95 können Mutationen des Fas-Antigens sein. Bei von Patienten isolierten Zellen von T- und B-Linien-ALL sind diesbezüglich umfangreiche Untersuchungen durchgeführt worden, welche Fas-Mutationen als Ursache defekter Apoptose-Induktion über den Fas-/Fas-Ligand-Mechanismus beschrieben haben (68,69,70). Insgesamt sind diese Mutationen aber selten und daher eher von geringerer Relevanz. Weiterhin können auch Mutationen aller an der Signaltransduktion und der Effektorkaskade beteiligten Proteine die Induktion einer Apoptose vermindern oder gar aufheben. MANDRUZATTO et al. haben beispielsweise eine defekte apoptotische Signaltransduktion bei Karzinomen durch eine Mutation im Gen der Caspase-8 beschrieben (129).

6.5 Expression von bcl-2 als Antagonist von CD95

Eine ganz andere Möglichkeit, die Dysfunktionalität des CD95 auf den Leukämielinien zu erklären, könnte die Induktion anti-apoptotischer Faktoren sein. Aus diesem Grunde ist die Expression von bcl-2 nach Stimulation mit IFN-γ und TNF-α untersucht worden.

Bcl-2 ist eines der hinsichtlich der apoptose-inhibierenden Funktion am besten untersuchten Proteine. Initial ist das Protein aus follikulären B-NHL isoliert und in verstärkter Expression bei Vorliegen einer t(14;18) Translokation vorgefunden worden, wobei es intrazellulär in der Mitochondrienmembran lokalisiert ist (130). Bcl-2 ist das erste detailiert beschriebene und funktionell untersuchte Protein der bcl-2 Familie von Proteinen, welche alle an der Membran von Mitochondrien lokalisiert sind. Bcl-2 bildet Dimere, welche in der mitochondrialen Membran Kanäle konstituieren. Die Funktion des bcl-2 ist die Verhinderung des Austritts proapoptotischer Susbstanzen wie beispielsweise Cytochrom c aus dem Inneren der Mitochondrien (131). Zu der bcl-2 Proteinfamilie gehört noch das wie bcl-2 zytoprotektive und apoptose-inhibierende Protein Bcl-X_L. Neben bcl-2 und bcl-X_L finden sich in der bcl-2 Proteinfamilie apoptose-fördernde und damit zytozidale Proteine mit strukureller Homologie zum bcl-2. Hier ist neben dem bak insbesondere das bax-Protein von Wichtigkeit (132). Bax bewirkt an der mitochondrialen Membran den Ausstrom apoptose-induzierender Substanzen wie Cytochrom c aus dem mitochondrialen Inneren und antagonisiert somit die apoptose-inhibierende Wirkung von bcl-2 (133). Im Rahmen apoptose-favorisierender Stimuli transloziert es aus dem Zytosol der Zelle in die mitochondriale Membran zwecks Formung von Kanälen (134). Bax kann mit anderern Bax-Molekülen Homodimere bilden, was dann der Formation eines Kanals zur Deliberation von pro-apoptotischen Substanzen durch die mitochondriale Membran in Zytoplasma gleichkommt. Alternativ können bax-Moluküle aufgrund ihrer strukturellen Homologie mit bcl-2 Heterodimere bilden bzw. zwei bcl-2 Moleküle Homodimere, welche einen Austritt pro-apoptotischer Substanzen aus dem Inneren des Mitochondrions verhindern und somit anti-apoptotisch wirken (135). Aufgrund der dynamischen Dimerisierungen und somit Kanalöffnungen oder -schließungen an der mitochondrialen Membran gibt das Expressionsverhältnis von bcl-2 zu bax Auskunft darüber, ob am Mitochondrion die pro- oder contra-

apoptotischen Einflüße dominieren (136).

Bcl-2 kann als anti-apoptotisch wirkendes Protein zur Inhibition pro-apoptotischer Signale und Effektoren beitragen, darunter auch die Inhibition der CD95-induzierten Apoptose. Die Bedeutung der bcl-2 vermittelten CD95-Inhibition wird durch Untersuchungen von MOLICA et al. unterstrichen, in denen sich Zellen einer B-CLL durch eine niedrige Fas- und hohe bcl-2 Expression haben charakterisieren lassen (137). Untersuchungen von MAPARA et al. haben übereinstimmend eine negative Korrelation zwischen der Expression von CD95 und bcl-2 bei B-CLL feststellen können (138).

Allerdings kann nur bei der MHH-ALL 2 Zellinie nach TNF-α-Stimulation eine Verdopplung der bcl-2 Expression beobachtet werden. Der Verdopplung der Expression von bcl-2 steht aber eine ca. 8-fach stärkere CD95-Expression entgegen. Trotzdem kommt es nicht zu einem stimulierenden Einfluß des CH11 auf die Apoptose. Somit kann die verstärkte bcl-2-Expression zwar die CD95-Dysfunktion partiell erklären, reicht aber bei weitem nicht aus, daß volle Ausmaß der fehlenden Funktion von CD95 zu verstehen.

Jedoch scheint bcl-2 tatsächlich zu der fehlenden Apoptoseinduzierbarkeit von B-Zell-Leukämien beizutragen. Durch die Untersuchungen von CAMPANA et al. ist gezeigt worden, daß die Überexpression von bcl-2 ALL-Zellen der B-Zellreihe zu einem prolongierten Überleben verhelfen können (139). In dieser Studie haben ALL-Zellen aller 16 Patienten eine wesentlich höhere bcl-2 Expression aufgewiesen als die analog differenzierten normalen B-Zellen.

6.6 Biologische Bedeutung der Untersuchungsergebnisse

ALL-Patienten mit sehr ungünstiger Prognose werden nach den aktuell gültigen Therapieempfehlungen einer allogenen Knochenmark- oder Stammzelltransplantationen zugeführt (6,7,8). Neben dem zytotoxischen und antileukämischen Effekt der hoch-dosierten Konditionierungschemotherapie vor der allogenen Transplantation kommt dem GvL-Effekt in zunehmendem Maße therapeutische Bedeutung zu (15,16,140). Nachdem bei CML-Patienten die hohe Effektivität des GvL-Effekts durch allogene Stammzelltransplantationen oder Donor-Lymphozyteninfusionen hinsichtlich des Langzeitüberlebens als gesichert anzusehen ist, gilt dies für diese Behandlungsoptionen bei der ALL zur Zeit trotz der sehr umfangreichen Studie der multizentrischen Gruppe um PASSWEG et al. nicht (16,141).

Wichtige Bausteine des GvL-Effektes können die Aktivierung apoptotisch wirkender Signalwege wie die des Fas-Systems und auch die Freisetzung stimulierender Zytokine sein. In dieser Arbeit ist gezeigt worden, daß durch TNF-α und IFN-γ, d. h. zwei potentiellen Mediatoren des GvL-Effektes, die Expression des Fas-Rezeptors auf einigen Leukämiezellen erhöht werden kann. Allerdings führt dieses nicht zu einer erhöhten Funktionalität des Fas-R. Die fehlende Funktionalität des Fas-Systems auf den B-Progenitor-Leukämiezellen trotz Induzierbarkeit durch Zytokine könnte einen potentiellen Ansatz zum Verständnis des bei ALL gering ausgeprägten GvL-Effektes darstellen.

7 Zusammenfassung

Durch die allogene Stammzelltransplantation können Patienten mit rezidivierten Leukämien geheilt werden. Hierbei scheint der Graft versus Leukemia Effekt eine große Bedeutung zu besitzen. Dabei bilden Spenderlymphozyten Faktoren, die in der Lage sind, Leukämiezellen zu eliminieren. Um die molekularen Mechanismen zu charakterisieren, die bei einer zytokin-vermittelten Elimination von Leukämiezellen involviert sind, wird der Einfluß bestimmter Zytokine auf die Expression und Funktion des Fas-Antigens untersucht, da die Stimulation des Fas-Rezeptors den apoptotischen Zelltod induzieren kann.

Es sind sechs verschiedene B-Zell-Progenitor-Leukämie-Zellinien mit den Zytokinen IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, NGF-β, IFN-γ und TNF-α stimuliert worden. In 3 Linien induzieren TNF-α und/oder IFN-γ eine erhöhte CD95-Expression, während alle anderen Zytokine keinen wesentlichen Einfluß auf die CD95-Expression haben. Allerdings kann die Induzierbarkeit des Fas-Antigens nicht mit einem bestimmten Reifungsgrad der Leukämie korreliert werden. Die erhöhte Fas-Expression ist in diesen Zellen aber nicht mit einer erhöhten Funktionalität des Fas-Rezeptors hinsichtlich der Induktion von Apoptose verbunden. Die fehlende Funktion des Fas-Rezeptors kann in einer Linie mit einer durch TNF-α vermittelten erhöhten bcl-2 Expression erklärt werden.

Die insgesamt fehlende Wirkung hinsichtlich einer durch Zytokine vermittelbaren Steigerung der Apoptoserate von Progenitorleukämiezellen mag ein Erklärungsansatz für den bei diesen Leukämieformen auch im klinischen Alltag nur schwach imponierenden GvL-Effekt sein.

8 Literaturverzeichnis

1 KALETSCH U, KAATSCH P, MICHEALIS J: *Jahresbericht 1996 des Deutschen Kinderkrebsregisters Mainz*. In: GUTJAHR P: *Krebs bei Kindern und Jugendlichen*. 4. Auflage. Deutscher Ärzte-Verlag (DÄV). Köln, 1998.

2 JANKA GE, HARMS D, GÖBEL U, GRAUBNER U, HAAS RJ, JÜRGENS H, SPAAR HJ, WINKLER K FÜR DIE COALL-STUDIENGRUPPE: *Die COALL-Studien 1985-1992*. Monatsschr Kinderheilk 143: 495, 1995.

3 STILLER CA, EATOCK EM: *Patterns of care and survival for children with acute lymphoblastic leukaemia diagnosed between 1980 and 1994*. Arch Dis Child 81: 202-208, 1999.

4 REITER A, SCHRAPPE M, LUDWIG WD, HIDDEMANN W, SAUTER S, HENZE G, ZIMMERMANN M, LAMPERT F, HAVERS W, NIETHAMMER D: *Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86.* Blood 84 (9): 3122-3133, 1994.

5 REITER A, SCHRAPPE M, LUDWIG WD, LAMPERT F, HARBOTT J, HENZE G, NIEMEYER CM, GADNER H, MULLER-WEIHRICH S, RITTER J: *Favorable outcome of B-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood: a report of three consecutive studies of the BFM group.* Blood 80 (10): 2471-2478, 1992.

6 SCHLIEBEN S, BORKHARDT A, REINISCH I, RITTERBACH J, JANSSEN JWG, RATEI R, SCHRAPPE M, REPP R, ZIMMERMANN M, KABISCH H, JANKA-SCHAUB G, BARTRAM CR, LUDWIG WD, RIEHM H, LAMPERT F, HARBOTT J: *Incidence and clinical outcome of children with BCR/ABL-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL). A prospective RT-PCR study based on 673 patients enrolled in the German pediatric multicenter therapy trials ALL-BFM-90 and CoALL-05–92*. Leukemia 10 (4): 957–963, 1996.

7 REAMAN GH, SPOSTO R, SENSEL MG, LANGE BJ, FEUSNER JH, HEEREMA NA,LEONARD M, HOLMES EJ, SATHER HN, PENDERGRASS TW, JOHNSTONE HS,O'BRIEN RT, STEINHERZ PG, ZELTZER PM, GAYNON PS, TRIGG ME, UCKUN FM: *Treatment Outcome and Prognostic Factors for Infants With Acute Lymphoblastic Leukemia Treated on Two Consecutive Trials of the Children's Cancer Group.* J Clin Oncol 17 (2): 445, 1999.

8 PUI C, KANE JR, CRIST WM: *Biology and treatment of infant leukemias*. Leukemia 9 (5): 762-769, 1995.

9 PUI C: *Acute leukemia in children*. Curr Opin Hematol 3 (4): 249-258, 1996.

10 BEHM FG, RAIMONDI SC, FRESTEDT JL, LIU Q, CRIST WM, DOWNING JR, RIVERA GK, KERSEY JH, PUI CH: *Rearrangement of the MLL gene confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, regardless of presenting age.* Blood 87 (7): 2870-2877, 1996.

11 JANKA-SCHAUB GE, STUEHRK H, KORTUEM B, GRAUBNER U, HAAS RJ, GÖBEL U, JÜRGENS H, SPAAR HJ, WINKLER K FOR THE COALL STUDY GROUP: *Bone marrow blast count at day 28 as the single most important prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL).* Haematol Blood Transf 34: 233-237, 1992.

12 SANDERS JE, THOMAS ED, BRUCKNER CD, DONEY K: *Marrow transplantation for children with acute lymphoblastic leukemia in second remission*. Blood 70 (1): 324-326, 1987.

13 BORDIGIONI P, VERNANT JP, SOUILLET G, GLUCKMAN E, MARININCHI D, MILPIED N, FISCHER A, BENZ LEMOINE E, JOUET JP, REIFFERS J: *Allogeneic bone marrow transplantation for children with acute lymphblastic leukemia in first remission: a cooperative group study of the Groupe d'Etude de la Greffe de Moelle osseuse.* J Clin Oncol 7 (6): 747, 1989.

14 KOLB HJ, MITTERMULLER J, CLEMM C, HOLLER E, LEDDEROSE G, BREHM G, HEIM M, WILMANNS W: *Donor leukocyte transfusions for treatment of recur-rent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients*. Blood 76 (12): 2462–2465, 1990.

15 KOLB HJ, SCHATTENBERG A, GOLDMAN JM, HERTENSTEIN B, JACOBSEN N, ARCESE W, LJUNGMAN P, FERRANT A, VERDONCK L, NIEDERWIESER D: *Graft-versus-leukemia effect of donor lympho-cyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia*. Blood 86 (5): 2041–2050, 1995.

16 PORTER DL, ANTIN JH: *The graft-versus-leukemia effects of allogeneic cell therapy*. Ann Rev Med 50: 369-386, 1999.

17 OR R, ACKERSTEIN A, NAGLER A, AMAR A, NAPARSTEK E, VARADI G, KAPELUSHNIK J, SAMUEL S, PUGATSCH T, BRAUTBAR C, SLAVIN S: *Allogeneic cell-mediated and cytokine-activated immunotherapy for malignant lymphoma at the stage of minimal residual disease after autologous stem cell transplantation*. J Immunother 21 (6): 447-453, 1998.

18 APPELBAUM FR: *Graft versus leukemia (GVL) in the therapy of acute lymphoblastic leukemia (ALL)*. Leukemia 11 Suppl 4: S15-17, 1997.

19 KORHOLZ D, KUNST D, HEMPEL L, SOHNGEN D, HEYLL A, BONIG H, GOBEL U, ZINTL F, BURDACH S: *Decreased interleukin 10 and increased interferon-g production in patients with chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant 19 (7): 691-695, 1997.

20 SCHWAIGHOFER H, KERNAN NA, O'REILLY RJ, BRANKOVA J, NACHBAUR D, HEROLD M, EIBL B, NIEDERWIESER D: *Serum levels of cytokines and secondary messages after T-cell-depleted and non-T-cell-depleted bone marrow transplantation: influence of conditioning and hematopoietic reconstitution*. Transplantation 62 (7): 947-953, 1996.

21 SYKES M, PEARSON DA, TAYLOR PA, SZOT GL, GOLDMAN SJ, BLAZAR BR: *Dose and timing of interleukin (IL)-12 and timing and type of total-body irradiation: effects on graft-vs.-host disease inhibition and toxicity of exogenous IL-12 in murine bone marrow transplant recipients*. Biol Blood Marrow Transplant 5 (5): 277-284, 1999.

22 HILL GR, TESHIMA T, GERBITZ A, PAN L, COOKE KR, BRINSON YS, CRAWFORD JM, FERRARA JLM: *Differential roles of IL-1 and TNF-a on graft-versus-host disease and graft versus leukemia*. J Clin Invest 104 (4): 459-466, 1999.

23 TRAUTH BC, KLAS C, PETERS AM, MATZKU S, MOLLER P, FALK W, DEBATIN KM, KRAMMER PH: *Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis*. Science 245 (4915): 301-305, 1989.

24 DHEIN J, WALCZAK H, BAUMLER C, DEBATIN KM, KRAMMER PH: *Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/Fas-antigen*. Nature 373 (6513): 438-441, 1995.

25 DEBATIN KM, GOLDMANN CK, WALDMANN TA, KRAMMER PH: *APO-1-induced apoptosis of leukemia cells from patients with adult T-cell leukemia*. Blood 81 (11): 2972-2977, 1993.

26 LEITHAUSER F, DHEIN J, MECHTERSHEIMER G, KORETZ K, BRUDERLEIN S, HENNE C, SCHMIDT A, DEBATIN KM, KRAMMER PH, MOLLER P: *Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells*. Lab Invest 69 (4): 415-429, 1993

27 BAJORATH J: *Identification of the ligand binding site in Fas (CD95) and analysis of Fas-ligand interactions*. Proteins 35 (4): 475-482, 1999.

28 BRUNNER T, MOGIL RJ, LAFACE D, YOO NJ, MAHBOUBI A, ECHEVERRI F, MARTIN SJ, FORCE WR, LYNCH DH, WARE CF, GREEN DR: *Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas*. Nature 373 (6513): 441-444, 1995.

29 ALDERSON MR, TOUGH TW, DAVIS-SMITH T, BRADDY S, FALK B, SCHOOLEY KA, GOODWIN RG, SMITH CA, RAMSDELL F, LYNCH DH: *Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes*. J Exp Med 181 (1): 71-77, 1995.

30 CHINNAIYAN AM, O'ROURKE K, TEWARI M, DIXIT VM: *FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis*. Cell 81 (4): 505-512, 1995.

31 BOLDIN MP, VARFOLOMEEV EE, PANCER Z, METT IL, CARMONIS JH, WALLACH D: *A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO-1 contains a sequence motif related to the death domain*. J Biol Chem 270 (14): 7795-7798, 1995.

32 CHINNAIYAN AM, TEPPER CG, SELDIN MF, O'ROURKE K, KISCHKEL FC, HELLBARDT S, KRAMMER PH, PETER ME, DIXIT VM: *FADD/MORT1 Is a Common Mediator of CD95 (Fas/APO-1) and Tumor Necrosis Factor Receptor-induced Apoptosis*. J Biol Chem 271 (9): 4961-4965, 1996.

33 MUZIO M, CHINNAIYAN AM, KISCHKEL FC, O'ROURKE K, SHEVCHENKO A, NI J, SCAFFIDI C, BRETZ JD, ZHANG M, GENTZ R, MANN M, KRAMMER PH, PETER ME, DIXIT VM: *FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex*. Cell 85 (6): 817-827, 1996.

34 KISCHKEL FC, HELLBARDT S, BEHRMANN I, GERMER M, PAWLITA M, KRAMMER PH, PETER ME: *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*. EMBO J 14 (22): 5579-5588, 1995.

35 MEDEMA JP, SCAFFIDI C, KISCHKEL FC, SHEVCHENKO A, MANN M, KRAMMER PH, PETER ME: *FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC)*. EMBO J 16 (10): 2794-2804, 1997.

36 LONGTHORNE VL, WILLIAMS GT: *Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis*. EMBO J 16 (13): 3805-3812, 1997.

37 SRINIVASULA SM, AHMAD M, FERNANDES-ALNEMRI T, LITWACK G, ALNEMRI ES: *Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: The Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases*. Proc Natl Acad Sci USA 93 (25): 14486-14491, 1996.

38 ENARI M, TALANIAN RV, WONG WW, NAGATA S: *Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis*. Nature 380 (6576): 723–726, 1996.

39 LOS M, VAN DE CRAEN M, PENNING LC, SCHENK H, WESTENDORP M, BAEUERLE PA, DROGE W, KRAMMER PH, FIERS W, SCHULZE-OSTHOFF K: *Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis*. Nature 375 (6526): 81–83, 1995.

40 LAZEBNIK YA, KAUFMANN SH, DESNOYERS S, POIRIER GG, EARNSHAW WC: *Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE*. Nature 371 (6495): 346–347, 1994.

41 CASIANO CA, MARTIN SJ, GREEN DR, TAN EM: *Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis*. J Exp Med 184 (2): 765–770, 1996.

42 WYLLIE AH: *Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation*. Nature 284 (5756): 555–556, 1980.

43 SCAFFIDI C, FULDA S, SRINIVASAN A, FRIESEN C, LI F, TOMASELLI KJ, DEBATIN KM, KRAMMER PH, PETER ME: *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways*. EMBO J 17 (6): 1675–1687, 1998.

44 ZAMZAMI N, SUSIN SA, MARCHETTI P, HIRSCH T, GOMEZ-MONTERREY I, CASTEDO M, KROEMER G: *Mitochondrial control of nuclear apoptosis*. J Exp Med 183 (4), 1533–1544, 1996.

45 YANG J, LIU X, BHALLA K, KIM CN, IBRADO AM, CAI J, PENG TI, JONES DP, WANG X: *Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked*. Science 275 (5303): 1129–1132, 1997.

46 ZAMZAMI N, BRENNER C, MARZO I, SUSIN SA, KROEMER G: *Subcellular and submitochondrial*

mode of action of bcl-2-like oncoproteins. Oncogene 16 (17): 2265–2282, 1998.

47 VANDERHEIDEN MG, CHANDEL NS, WILLIAMSON EK, SCHUMACKER PT, THOMPSON CB: *Bcl-X(L) regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria*. Cell 91 (5): 627–637, 1997.

48 MUCHMORE SW, SATTLER M, LIANG H, MEADOWS RP, HARLAN JE, YOON HS, NETTESHEIM D, CHANG BS, THOMPSON CB, WONG SL, NG SC, FESIK SW: *X-ray and NMR structure of human BCL-X_L, an inhibitor of programmed cell death*. Nature 381 (6580): 335–341, 1996.

49 CHITTENDEN T, FLEMINGTON C, HOUGHTON AB, EBB GE, GALLO GJ, ELANGOVAN B, CHINNADURAI G, LUTZ RJ: *A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions*. EMBO J 14 (22): 5589–5596, 1995.

50 OLTVAI ZN, MILLIMAN SJ, KORSMEYER SJ: *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death*. Cell 74 (4): 609–619, 1993.

51 HIGUCHI M, AGGARWAL BB: *Differential roles of two forms of TNF receptor in TNF-induced cytotoxicity, DNA fragmentation and differentiation*. J Immunol 152 (8): 4017-4025, 1994.

52 JEREMIAS I, HERR I, BOEHLER T, DEBATIN KM*: TRAIL/Apo-2-ligand-induced apoptosis in human T cells*. Eur J Immunol 28 (1): 143-152, 1998.

53 PITTI RL, MARSTERS SA, RUPPERT S, DONAHUE CJ, MOORE A, ASHKENAZI A: *Induction of apoptosis by APO-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family*. J Biol Chem 271 (22): 12687-12690, 1996.

54 MARIANI SM, MATIBA B, ARMANDOLA EA, KRAMMER PH: *Interleukin 1b-converting enzyme related proteases/caspases are involved in TRAIL-induced apoptosis of myeloma and leukemia cells*. J Cell Biol 137 (1): 221-229, 1997.

55 LOWIN B, HAHNE M, MATTMANN C, TSCHOPP J: *Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways*. Nature 370 (6491): 650-652, 1994.

56 PETERS PJ, BORST J, OORSCHOT V, FUKUDA M, KRAHENBUHL O, TSCHOPP J, SLOT JW, GEUZE HJ*: Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes*. J Exp Med 173 (5): 1099-1109, 1991.

57 ATKINSON EA, BLEACKLEY RC: *Mechanisms of lysis by cytotoxic T cells*. Crit Rev Immunol 15 (3-4): 359–384, 1995.

58 IRMLER M, HERTIG S, MACDONALD HR, SADOUL R, BECHERER JD, PROUDFOOT A, SOLARI R, TSCHOPP J: *Granzyme A is an interleukin 1 b-converting enzyme*. J Exp Med 181 (5): 1917-1922, 1995.

59 SELLERS WR, FISCHER DE: *Apoptosis and cancer drug targeting*. J Clin Invest 104 (12): 1655-1661, 1999.

60 O'REILLY LA, STRASSER A: *Apoptosis and autoimmune disease*. Inflamm Res 48 (1): 5-21, 1999.

61 FULDA S, LOS M, FRIESEN C, DEBATIN KM: *Chemosensitivity of solid tumor cells in vitro is related to activation of the CD95 system*. Int J Cancer 76 (1): 105-114, 1998.

62 FULDA S, SIEVERTS H, FRIESEN C, HERR I, DEBATIN KM: *The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells*. Cancer Res 57 (17): 3823-3829, 1997.

63 BERNASSOLA F, SCHEUERPFLUG C, HERR I, KRAMMER PH, DEBATIN KM, MELINO G: *Induction of apoptosis by IFNg in human neuroblastoma cell lines through the CD95/CD95L autocrine circuit*. Cell Death Differ 6 (7): 652-660, 1999.

64 FRIESEN C, HERR U, KRAMMER PH, DEBATIN KM: *Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells*. Nature Med 2 (5): 574-577, 1996.

65 FRIESEN C, FULDA S, DEBATIN KM: *Deficient activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in drug-resistant cells*. Leukemia 11 (11): 1833-1841, 1997.

66 DEBATIN KM, KRAMMER PH: *Resistance to APO-1 (CD95) induced apoptosis in T-ALL is determined by a BCL-2 independent anti-apoptotic program.* Leukemia 9 (5): 815-820, 1995.

67 LEMAIRE C, ANDREAU K, SOUVANNAVONG V, ADAM A: Specific dual effect of cycloheximide on B lymphocyte apoptosis: involvement of CPP32/caspase-3. Biochem Pharmacol 58 (1): 85-93, 1999.

68 BELTINGER C, KURZ E, BOHLER T, SCHRAPPE M, LUDWIG WD, DEBATIN KM: *CD95 (APO-1/Fas) Mutations in Childhood T-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia*. Blood 91 (10): 3943-3951, 1998.

69 TAMIYA S, ETOH K, SUZUSHIMA H, TAKATSUKI K, MATSUOKA M: *Mutation of CD95 (Fas/Apo-1) gene in adult T-cell leukemia cells*. Blood 91 (10): 3935-3942, 1998.

70 BELTINGER C, BOHLER T, KARAWAJEW L, LUDWIG WD, SCHRAPPE M, DEBATIN KM: *Mutation analysis of CD95 (APO-1/Fas) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukaemia*. Br J Haematol 102 (3): 722-728, 1998.

71 POSOVSZKY C, FRIESEN C, HERR I, DEBATIN KM: *Chemotherapeutic drugs sensitize pre-B ALL cells for CD95- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis*. Leukemia 13 (3): 400-409, 1999.

72 KATSCHINSKI DM, ROBINS HI, SCHAD M, FREDE S, FANDREY J: *Role of tumor necrosis factor α in hyperthermia-induced apoptosis of human leukemia cells*. Cancer Res 59 (14): 3404-3410, 1999.

73 KIM, YONG-MI: *Bedeutung des Fas-Antigens für die zytokingesteuerte Regulation der humanen B-Zellaktivierung*. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 1998.

74 GALIBERT L, BURDIN N, DE SAINT-VIS B, GARRONE P, VAN KOOTEN C, BANCHEREAU J, ROUSSET F: *CD40 and B cell antigen receptor dual triggering of resting B lymphocytes turns on a partial germinal center phenotype*. J Exp Med 183 (1): 77-85, 1996.

75 NAKANISHI K, MATSUI K, KASHIWAMURA S, NISHIOKA Y, NOMURA J, NISHIMURA Y, SAKAGUCHI N, YONEHARA S, HIGASHINO K, SHINKA S: *IL-4 and anti-CD40 protect against Fas-mediated B cell apoptosis and induce B cell growth and differentiation*. Int Immunol 8 (5): 791-798, 1996.

76 LEMAIRE C, ANDR AU K, FRAISSE CS, ADAM A, SOUVANNAVONG V: *IL-4 inhibits apoptosis and prevents mitochondrial damage without inducing the switch to necrosis observed with caspase inhibitors*. Cell Death Differ 6 (8): 813-820, 1999.

77 FINDLEY JR HW, COOPER MD, KIM TH, ALVARADO C, RAGAB AH: *Two new acute lymphoblastic leukemia cell lines with early B-cell phenotype*. Blood 60 (6): 1305-1309, 1982.

78 PEGORARO L, PALUMBO A, ERIKSON J, FALDA M, GIOVANAZZO B, EMANUEL BS, ROVERA G, NOWELL PC, CROCE CM: *A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia.* Proc Natl Acad Sci USA 81 (22): 7166-7170, 1984.

79 ROSENFELD C, GOUTNER A, CHOQUER C, VENUAT AM, KAYIBANDA B, PICO JL: *Phenotypic characterization of a unique non-T, non-B acute lymphoblastic leukaemia cell line*. Nature 267 (5614): 841-843, 1977.

80 ROSENFELD C, GOUTNER A, VENUAT AM, CHOQUET C, PICO JL, DORE JF, LIABEUF A, DURANDY A, DESGRANGE C, DE THE G: *An effect human leukaemic cell line: Reh*. Eur J Cancer 13 (4-5): 377-379, 1977.

81 KAYIBANDA B, ROSENFELD C, GOUTNER A, BORNKAMM GW: *A new lymphoid cell line, Reh 6, with characteristics of non-T and non-B cells, lacking the Epstein-Barr virus genome and derived from human acute lymphoblastic leukemia.* Intervirology 9 (5):316-320, 1978.

82 TOMECZKOWSKI J, YAKISAN E, WIELAND B, REITER A, WELTE K, SYKORA KW: *Absence of G-CSF receptors and absent response to G-CSF in childhood Burkitt's lymphoma and B-ALL cells*. Brit J Haematol 89 (4): 771-779, 1995.

83 LANZA F, LATORRACA A, MORETTI S, CASTAGNARI B, FERRARI L, CASTOLDI G: *Comparative Analysis of Different Permeabilization Methods for the Flow Cytometry Measurement of Cytoplasmic Myeloperoxidase and Lysozyme in Normal and Leukemic Cells*. Cytometry (Comm Clin Cytometry) 30 (3): 134-144, 1997.

84 GROENEVELD K, TE MARVELDE JG, VAN DEN BEEMD MWM, HOOIJKAAS H, VAN DONGEN JJM: *Flow cytometric determination of intracellular antigens for immunophenotyping*. Leukemia 10 (8): 1383-1389, 1996.

85 KNAPP W, STROBL H, MAJDIC O: *Flow Cytometric Analysis of Cell Surface and Intracellular Antigens in Leukemia Diagnosis*. Cytometry (Comm Clin Cytometry) 18 (4): 187-198, 1994.

86 NAITO M, NAGASHIMA K, MASHIMA T, TSURUO T: *Phosphatidylserine externalization is a downstream event of interleukin-1b-converting enzyme family protease activation during apoptosis*. Blood 89 (6), 2060-2066, 1997.

87 MARTIN SJ, REUTELINSPERGER CPM, MCGAHON AJ, RADER JA, VAN SCHIE RCAA, LAFACE DM, GREEN DR: *Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl*. J Exp Med 182 (5): 1545-1556, 1995.

88 KOOPMAN G, REUTELINSPERGER CPM, KUITJEN GAM, KEEHNEN RMJ, PALS ST, VAN OERS MHJ: *Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis*. Blood 84 (5): 1415-1420, 1994.

89 SASAKI DT, DUMAS SE, ENGLEMAN EG: *Discrimination of viable and non-viable cells using propidium iodide in two color immunofluorescence*. Cytometry 8 (4): 413-420, 1987.

90 GIVAN AL: *Flow Cytometry. First Principles*. 64, 104. Wiley-Liss, New York, 1992.

91 CRISSMAN HA, STEINKAMP JA: *Rapid, one-step staining procedures for analysis of cellular DNA and protein by single and dual laser flow cytometry*. Cytometry 3 (2): 84-90, 1982.

92 VERMES I, HAANEN C, STEFFENS-NAKKEN H, REUTELINSPERGER CPM: *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. J Immunol Meth 184 (1): 39-51, 1995.

93 FREEDMAN D, PISANI R, PURVES R: *Statistics*. W.W. Norton & Co. New York, London, 1978.

94 BENE MC, CASTOLDI G, KNAPP W, LUDWIG WD, MATUTES E, ORFAO A, VAN'T VEER MB: *Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)*. Leukemia 9 (10): 1783-1786, 1995.

95 ROTHE G, SCHMITZ G: *Consenus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Working group on flow cytometry and image analysis*. Leukemia 10 (5): 877-895, 1996.

96 YONEHARA S, ISHII A, YONEHARA M: *A cell-killing monoclonal antibody (Anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor*. J Exp Med 169 (5): 1747-1756, 1989.

97 KOBAYASHI N, HAMAMOTO Y, YAMAMOTO N, ISHII A, YONEHARA M, YONEHARA S: *Anti-Fas monoclonal antibody is cytocidal to human immunodeficiency virus-infected cells without augmenting viral replication*. Proc Natl Acad Sci 87 (24): 9620-9624, 1990.

98 TSURUDA K, YAMADA Y, HIRAKATA Y, SUGAHARA K, MAEDA T, ATOGAMI S, TOMONAGA M, KAMIHIRA S: *Qualitative and quantitative characterization of Fas (APO-1/CD95) on leukemic cells derived from patients with B-cell neoplasms*. Leuk Res 23 (2): 159-166, 1999.

99 MUNKER R, LUBBERT M, YONEHARA S, TUCHNITZ A, MERTELSMANN R, WILMANNS W: *Expression of the Fas antigen on primary human leukemia cells*. Ann Hematol 70 (1): 15-17, 1995.

100 DIGUISEPPE JA, LEBEAU P, AUGENBRAUN J, BOROWITZ MJ: *Multiparameter flow-cytometric analysis of bcl-2 and Fas expression in normal and neoplastic hematopoiesis*. Am J Clin Pathol 106 (3): 345-351, 1996.

101 LEVY Y, BENLAGHA K, BUZYN A, COLOMBEL M, BROUET JC, LASSOUED K: *IL-7 sensitizes human pre-B cells but not pro-B cells to Fas/APO-1 (CD95)-mediated apoptosis*. Clin Exp Immunol 110 (2):329-335, 1997.

102 YOSHINO T, KONDO E, CAO L, TAKAHASHI K, HAYASHI K, NOMURA S, AKAGI T: *Inverse expression of bcl-2 protein and Fas antigen in lymphoblasts in peripheral lymph nodes and activated peripheral blood T and B lymphocytes*. Blood 83 (7): 1856-1861, 1994.

103 MARTINEZ-VALDEZ H, GURET C, DE BOUTEILLER O, FUGIER I, BANCHEREAU J, LIU YJ: *Human germinal center B cells express the apoptosis-inducing genes Fas, c-myc, P53, and Bax but not the survival gene bcl-2*. J Exp Med 183 (3):971-977, 1996

104 MIYAWAKI T, UEHARA T, NIBU R, TSUJI T, YACHIE A, YONEHARA S, TANIGUCHI N: *Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood*. J Immunol 149 (11): 3753-3758, 1992

105 HATA H, MATSUZAKI H, TAKEYA M, TAKATSUKI K: *Fas/Apo-1 (CD95)-mediated and CD95-independent apoptosis of malignant plasma cells*. Leuk Lymphoma 24 (1-2): 35-42, 1996.

106 KONDO E, YOSHINO T, YAMADORI I, MATSUO Y, KAWASAKI N, MINOWADA J, AKAGI T: *Expression of Bcl-2 protein and Fas antigen in non-Hodgkin's lymphomas*. Am J Pathol 145 (2): 330-337, 1994.

107 NGUYEN PL, HARRIS NL, RITZ J, ROBERTSON MJ: *Expression of CD95 antigen and Bcl-2 protein in non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease*. Am J Pathol 148 (3):847-853, 1996.

108 PANAYIOTIDIS O, GANESHAGURU K, FORONI L, HOFFBRAND AV: *Expression and function of the FAS antigen in B chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia*. Leukemia 9 (7): 1227-1232, 1995.

109 FOOTE LC, HOWARD RG, MARSHAK-ROTHSTEIN A, ROTHSTEIN TL: *IL-4 induces Fas resistance in B cells*. J Immunol 157 (7):2749-2753, 1996.

110 OWEN-SCHAUB LB, METERISSIAN S, FORD RJ: *Fas/APO-1 expression and function on malignant cells of hematologic and nonhematologic origin*. J Immunother 14 (3):234-241, 1993.

111 WILLIAMS JF, PETRUS MJ, WRIGHT JA, HUSEBEKK A, FELLOWES V, READ EJ, GRESS RE, FOWLER DH: *fas-mediated lysis of chronic lymphocytic leukaemia cells: role of type I versus type II cytokines and autologous fasL-expressing T cells*. Br J Haematol 107 (1):99-105, 1999.

112 GERHARZ CD, RAMP U, DEJOSEZ M, MAHOTKA C, CZARNOTTA B, BRETSCHNEIDER U, LORENZ I, MULLER M, KRAMMER PH, GABBERT HE: *Resistance to CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in human renal cell carcinomas: an important factor for evasion from negative growth control.* Lab Invest 79 (12):1521-1534, 1999.

113 NAUJOKAT C, SEZER O, POSSINGER K: *Tumor necrosis factor-α and interferon-γ induced expression of functional Fas ligand on HT29 and MCF7 adenocarcinoma cells*. Biochem Biophys Res Commun 264 (3):813-819, 1999.

114 KONTNY HU, LEHRNBECHER TM, CHANOCK SJ, MACKALL CL: *Simultaneous expression of Fas and nonfunctional Fas ligand in Ewing's sarcoma*. Cancer Res 58 (24):5842-5849, 1998.

115 SUDA T, HASHIMOTO H, TANAKA M, OCHI T, NAGATA S: *Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing*. J Exp Med 186 (12):2045-2050, 1997.

116 MUNKER R, ANDREEFF M: *Induction of death (CD95/FAS), activation and adhesion (CD54) molecules on blast cells of acute myelogenous leukemias by TNF-α and IFN-γ*. Cytokines Mol Ther 2 (3):147-159, 1996.

117 DORRIE J, SCHUH W, KEIL A, BONGARDS E, GREIL J, FEY GH, ZUNINO SJ: *Regulation of CD95 expression and CD95-mediated cell death by interferon-g in acute lymphoblastic leukemia with chromosomal translocation t(4;11).* Leukemia 13 (10):1539-1547, 1999.

118 ITOH N, YONEHARA S, ISHII A, YONEHARA M, MIZUSHIMA S, SAMESHIMA M, HASE A, SETO Y, NAGATA S: *The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis*. Cell 66 (2): 233-243, 1991.

119 OEHM A, BEHRMANN I, FALK W, MAIER G, KLAS C, LI-WEBER M et al.: *Purification and molecular cloning of the APO-1 antigen,a new member of the TNF/NGF receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen*. J Biol Chem 267 (15): 10709-10715, 1992.

120 BOUSSIOTIS VA, NADLER LM, STROMINGER JL, GOLDFELD AE: *Tumor necrosis factor a is an autocrine growth factor for normal human B cells*. Proc Natl Acad Sci USA 91 (15): 7007-7011, 1994.

121 KAWAKAMI A, EGUCHI K, MATSUOKA N, TSUBOI M, KOJI T, URAYAMA S, NAKASHIMA T, KAWABE Y, NAGATAKI S: *Expression and function of Fas and Fas ligand on peripheral blood lymphocytes in normal subjects*. J Lab Clin Med 132 (5):404-413, 1998.

122 CORDINGLEY FT, BIANCHI A, HOFFBRAND AV, REITTIE JE, HESLOP HE, VYAKARNAM A, TURNER M, MEAGER A, BRENNER MK: *Tumour necrosis factor as an autocrine tumour growth factor for chronic B-cell malignancies*. Lancet 1 (8592):969-971, 1988.

123 LENS SM, TESSELAAR K, DEN DRIJVER BF, VA OERS MH, VAN LIER RA: *A dual role for both CD40-ligand and TNF-a in controlling human B cell death*. J Immunol 156 (2): 507-514, 1996.

124 BORSET M, HJORTH-HANSEN H, JOHNSEN AC, SEIDEL C, WAAGE A, ESPEVIK T, SUNDAN A: *Apoptosis, proliferation and NF-kappaB activation induced by agonistic Fas antibodies in the human myeloma cell line OH-2: amplification of Fas-mediated apoptosis by tumor necrosis factor*. Eur J Haematol 63 (5):345-353, 1999.

125 JOURDAN M, TARTE K, LEGOUFFE E, BROCHIER J, ROSSI JF, KLEIN B: *Tumor necrosis factor is a survival and proliferation factor for human myeloma cells*. Eur Cytokine Netw 10 (1):65-70, 1999.

126 ZHOU M, FINDLEY HW, MA L, ZAKI SR, HILL T, HAMID M, HOOPER WG, RAGAB AH: *Effect of tumor necrosis factor-a on the proliferation of leukemic cells from children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL): studies of primary leukemic cells and BCP-ALL cell lines*. Blood 77 (9): 2002-2007, 1991.

127 HORIE T, DOBASHI K, IIZUKA K, YOSHII A, SHIMIZU Y, NAKAZAWA T, MORI M: *Interferon-g rescues TNF-a-induced apoptosis mediated by up-regulation of TNFR2 on EoL-1 cells*. Exp Hematol 27 (3):512-519, 1999.

128 FLUCKIGER AC, DURAND I, BANCHEREAU J: *Interleukin 10 induces apoptotic cell death of B-chronic lymphocytic leukemia cells*. J Exp Med 179 (1): 91-99, 1994.

129 MANDRUZZATO S, BRASSEUR F, ANDRY G, BOON T, VAN DER BRUGGEN P: *A CASP-8 Mutation Recognized by Cytolytic T Lymphocytes on a Human Head and Neck Carcinoma*. J Exp Med 186 (5): 785-793, 1997.

130 HOCKENBERY D, NUNEZ G, MILLIMAN C, SCHREIBER RD, KORSMEYER SJ: *Bcl-2 is a inner mitochondrial protein that block programmed cell death*. Nature 348 (6299): 334-336, 1990.

131 BOSSY-WETZEL E, NEWMAYER DD, GREEN DR: *Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization*. EMBO J 17 (1): 37-49, 1998.

132 JURGENSMEIER JM, XIE Z, DEVERAUX Q, ELLERBY L, BREDESEN D, REED JC: *Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria*. Proc Natl Acad Sci USA 95 (9): 4997-5002, 1998.

133 ANTONSSON B, CONTI F, CIAVATTA A, MONTESSAIT S, LEWIS S, MARTINOU I, BERNASCONI L,

BERNARD A, MERMOD JJ, MAZZEI G, MAUNDRELL K, GAMBALE F, SADOUL R, MARTINOU JC: *Inhibition of bax channel-forming activity by bcl-2*. Science 277 (5324): 370-372, 1997.

134 WOLTER KG, HSU YT, SMITH CL, NECHUSHTAN A, XI XG, YOULE RJ: *Movement of bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis*. J Cell Biol 139 (5): 1281-1292, 1997.

135 OLTVAI Z. MILLIMAN C, KORSMEYER SJ: *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog Bax, that accelerates programmed cell death*. Cell 74 (4): 609-619, 1993.

136 BRADY HJM, GIL-GOMEZ G: *Molecules in Focus: Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax.* Intl J Biochem Cell Biol 30 (6): 647-650, 1998.

137 MOLICA S, MANNELLA A, DATTILO A, LEVATO D, IULIANO F, PETA A, CONSARINO C, MAGRO S: *Differential expression of BCL-2 oncoprotein and Fas antigen on normal peripheral blood and leukemic bone marrow cells. A flow cytometric analysis*. Haematologica 81 (4): 302-309, 1996.

138 MAPARA M, BARGOU R, ZUGCK C, DOHNER H, USTAOGLOU F, JONKER RR, KRAMMER PH, DORKEN B: *APO-1 mediated apoptosis or proliferation in human chronic B-lymphocytic leukemia: correlation with bcl-2 oncogene expression*. Eur J Immunol 23 (3): 702-708, 1993.

139 CAMPANA D, COUSTAN-SMITH E, MANABE A, BUSCHLE M, RAIMONDI SC, BEHM FG, ASHMUN R, ARICO M, BIONDI A, PUI CH: *Prolonged survival of B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells is accompanied by overexpression of bcl-2 protein.* Blood 81 (4): 1025-1031, 1993.

140 CHAMPLIN R, KHOURI I, KORNBLAU S, MARINI F, ANDERLINI P, UENO NT, MOLLDREM J, GIRALT S: *Allogeneic hematopoietic transplantation as adoptive immunotherapy. Induction of graft-versus-malignancy as primary therapy*. Hematol Oncol Clin North Am 13 (5): 1041-57, VII-VIII, 1999.

141 PASSWEG JR, TIBERGHIEN P, CAHN JY, VOWELS MR, CAMITTA BM, GALE RP, HERZIG RH, HOELZER D, HOROWITZ MM, IFRAH N, KLEIN JP, MARKS DI, RAMSAY NK, ROWLINGS PA, WEISDORF DJ, ZHANG MJ, BARRETT AJ: *Graft-versus-leukemia effects in T lineage and B lineage acute lymphoblastic leukemia.* Bone Marrow Transplant 21 (2): 153-158, 1998.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekulare Mechanismen der Apoptose-Induktion bzw. Inhibition (Abbildung modifiziert nach 59,60) 10

Abbildung 2: $CD95^+$ Expression ($\mu \pm SEM$) der Zellinien im nativen Zustand (n=3) 27

Abbildung 3: Reh - FACS-Analyse der CD95 Expression 30

Abbildung 4: MHH-ALL 2 - FACS-Analyse der CD95 Expression 32

Abbildung 5: MHH-ALL 2 - FACS-Analyse der bcl-2 Expression 41

Abbildung 6: Reaktionsmuster der Leukämiezellen nach Zytokinbehandlung 43

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Monoklonale Antikörper zur Immunphänotypisierung	17
Tabelle 2:	Monoklonale Antikörper gegen humanes CD95 Antigen (CD95)	18
Tabelle 3:	Monoklonale Antikörper gegen humanes bcl-2 Antigen (bcl-2)	18
Tabelle 4:	Isotypische murine Kontroll-Antikörper (monoklonal)	18
Tabelle 5:	Zytokine	19
Tabelle 6:	Verschiedene Reagentien	19
Tabelle 7:	Fluoreszenzfarbstoffe in der Durchflußzytometrie	21
Tabelle 8:	EGIL-Klassifikation akuter B-Zelleukämien	25
Tabelle 9:	Immunphänotypisierung der Zellinien nach der EGIL-Klassifikation	26
Tabelle 10:	207 - CD95 Expression ($\mu \pm$SEM) nach Zytokin-Stimulation (n=3)	28
Tabelle 11:	697 - CD95 Expression ($\mu \pm$SEM) nach Zytokin-Stimulation (n=3)	29
Tabelle 12:	Nalm-6 - CD95 Expression ($\mu \pm$SEM) nach Zytokin-Stimulation (n=3)	30
Tabelle 13:	Reh - CD95 Expression ($\mu \pm$SEM) nach Zytokin-Stimulation (n=3)	31
Tabelle 14:	380 - CD95 Expression ($\mu \pm$SEM) nach Zytokin-Stimulation (n=3)	32
Tabelle 15:	MHH-ALL 2 - CD95 Expression ($\mu \pm$SEM) nach Zytokin-Stimulation (n=3)	33
Tabelle 16:	207 - Apoptotische und tote Zellen ($\mu \pm$SEM) mit Annexin V und PI (n=3)	34
Tabelle 17:	697 - Apoptotische und tote Zellen ($\mu \pm$SEM) mit Annexin V und PI (n=3)	35
Tabelle 18:	Reh - Apoptotische und tote Zellen ($\mu \pm$SEM) mit Annexin V und PI (n=3)	37
Tabelle 19:	MHH-ALL 2 - Apoptotische und tote Zellen ($\mu \pm$SEM) mit Annexin V und PI (n=3)	38
Tabelle 20:	bcl-2 Expression ($\mu \pm$SEM) von 207-Zellen nach TNF-α und IFN-γ (n=3)	39
Tabelle 21:	bcl-2 Expression ($\mu \pm$SEM) von 697-Zellen nach TNF-α und IFN-γ (n=9)	39
Tabelle 22:	bcl-2 Expression ($\mu \pm$SEM) von Reh-Zellen nach TNF-α und IFN-γ (n=9)	40
Tabelle 23:	bcl-2 Expression ($\mu \pm$SEM) von MHH-ALL-2-Zellen nach TNF-α und IFN-γ (n=3)	42
Tabelle 24:	Zusammenfassende Darstellung der experimentellen Ergebnisse	42

11 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich,

Andreas Christaras

geboren am 27.02.1971

in Solingen,

wohnhaft Bozener Straße 35 in 42659 Solingen,

daß ich die hier vorliegende Dissertation eigenständig und ohne fremde Hilfe erstellt und alle in dieser Dissertation aufgeführten Experimente und daraus resultierenden Ergebnisse ohne Hilfe fremder Personen durchgeführt und ermittelt habe.

Solingen, den 03.08.2000

_____

(Andreas Christaras)

12 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name:	Andreas Christaras
Wohnort:	Bozener Straße 35 42659 Solingen 0212 - 2473452 christar@uni-duesseldorf.de
Geburtstag und -ort:	27.02.1971, Solingen
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	Griechenland
Vater:	Konstantinos Christaras, Hilfsarbeiter
Mutter:	Ekaterini Christara, Hilfsarbeiterin

Schulbildung

01.09.1977-17.07.1981	Besuch der Städtischen Grundschule Böckerhof zu Solingen. Gleichzeitiger Besuch der Griechischen Nachmittagsschule in Solingen.
07.09.1981-22.05.1990	Besuch des Städtischen Gymnasiums Schwertstraße in Solingen mit abschließendem Erwerb der allgemeinen Hochschulreife. Durchschnittsnote: - gut - (2,0)

Hochschulbildung

15.10.1991	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Mediznischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
29.03.1994	Absolvierung der Ärztlichen Vorprüfung in Düsseldorf. Note: - gut - (2,00).
29.03.1995	Absolvierung des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung in Düsseldorf. Note: - befriedigend - (2,66).
23.03.1998	Absolvierung des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung in Düsseldorf. Note: - gut - (2,33).

01.06.1999	Absolvierung des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung in Düsseldorf. Prüfungsfächer (Prüfer): • *Innere Medizin* *(Univ.-Prof. Dr. med. B. E. Strauer)* • *Chirurgie* *(Univ.-Prof. Dr. med. P. Goretzki)* • *Kinderheilkunde* *(Univ.-Prof. Dr. med. H. G. Lenard)* • *Allgemeinmedizin* *(Univ.-Prof. Dr. med. H. H. Abholz)* Note: - gut - (2,00).
01.06.1999	Abschluß des Studiums der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit Absolvierung der Ärztlichen Prüfung Note: - gut - (2,33)

Berufsausübung

seit dem 01.07.1999	Tätigkeit als Arzt im Praktikum (AiP) im Zentrum für Kinderheilkunde der Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Hilfskrafttätigkeiten

15.02.1991-15.09.1991	Tätigkeit als Pflegehelfer ohne Examen auf der Station KC11 (jetzt KK04) der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie der Universitätskinderklinik Düsseldorf (Direktor: Universitätsprofessor Dr. U. Göbel).
15.09.1991-15.08.1996	Tätigkeit als Pflegehelfer ohne Examen bzw. studentische Aushilfspflegekraft auf der Station KC11/KK04 (während Semesterferien, an Wochenenden und ggf. wochentags).
15.08.1996-30.06.1999	Tätigkeit als studentische Hilfskraft im Labor für Experimentelle Hämatologie und Onkologie der Universitätskinderklinik Düsseldorf (Leiter: Universitätsprofessor Dr. U. Göbel).

Praktika

12.11.1990-15.01.1991	Absolvierung eines Pflegepraktikums auf der Station KC11 (jetzt KK04) der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie an der Universitätskinderklinik Düsseldorf (Direktor: Universitätsprofessor Dr. U. Göbel).
30.09.1996-11.10.1996	Praktikum der Gynäkologie und Geburtshilfe in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Klinikum Solingen (Direktorin: Dr. med. V. Jovanovic).

Famulaturen

01.07.1995-31.08.1995	Famulatur in der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie der Universitätskinderklinik Düsseldorf (Direktor: Universitätsprofessor Dr. U. Göbel).
29.07.1996-30.08.1996	Famulatur in der Praxis für Innere Medizin, Internistische Praxis Dr. med. K. Kim, Düsseldorf.
03.03.1997-04.04.1997	Famulatur in Abteilung für Innere Medizin des St. Martinus Krankenhauses (Leitender Arzt: Dr. med. R. Tönissen), Langenfeld (Rheinland).
15.09.1997-03.10.1997	Famulatur in der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie der Universitätskinderklinik Düsseldorf (Direktor: Universitätsprofessor Dr. U. Göbel).

Praktisches Jahr

22.04.1998-19.03.1999	Absolvierung des 3. Klinischen Studienabschnitts (Praktisches Jahr) in folgenden Kliniken der Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
22.04.1998-07.08.1998	C h i r u r g i e *Station CA09, Klinik für Allgemeine und Unfallchirurgie (Direktor: Universitätsprofessor Dr. H.-D. Röher)*
10.08.1998-27.11.1998	K i n d e r h e i l k u n d e *Station KK05, Klinik für Allgemeine Pädiatrie I, Neuropädiatrie und Neonatologie (Direktor: Universitätsprofessor Dr. H. G. Lenard)* *Station KK02, Klinik für Allgemeine Pädiatrie II, Stoffwechsel und Ernährung (Kommissarischer Direktor: Universitätsprofessor Dr. H. G. Lenard)*
30.11.1998-19.03.1999	I n n e r e M e d i z i n *Station ME06, Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie (Kommissarischer Direktor: Universitätsprofessor Dr. C. Aul)*

Sonstige medizinische Kenntnisse

Wintersemester 1996/1997: Folgende Kurse im Rahmen des Pilotprojekts „Anatomie in den bildgebenden Verfahren“ an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurden erfolgreich absolviert:

- *Grundkurs der Sonographie*
- *Kurs der Computertomographie (CT-Bildanalysekurs)*

Publikationen

20.06.1996 CHRISTARAS A, KÖRHOLZ D, KIM YM, BURDACH S: *Induc-*

tion of Fas on B-cell leukemia cells by Tumor Necrosis Factor-α and Interferon-γ. Mündlicher Vortrag auf IX. Kind-Philipp-Tagung für pädiatrisch-onkologische Forschung. Wilsede, 20.-22. Juni 1996.

05.10.1996 KÖRHOLZ D, CHRISTARAS A, KIM YM, BURDACH S, GÖBEL U: *Induction of Fas on B-cell leukemia cells by Tumor Necrosis Factor-α and Interferon-γ*. SIOP XXVII. Meeting. Mündlicher Vortrag bei der Nycomed-Nöllenberg Preis Session, 3. Preis. Wien, 01.-05. Oktober 1996. Erschienen in: Medical and Pediatric Oncology: 1996 Oktober; 27 (4): 209-390.

Promotion

Fas- und Bcl-2 Induktion in humanen B-Zelleukämien durch Tumornekrosefaktor-α und Interferon-γ.
Fertiggestellt und unmittelbar vor Abgabe beim akademischen Prüfungsamt.

Fremdsprachliche Kenntnisse

Englisch, Latein, Griechisch

Sonstige Kenntnisse

Folgende Kenntnisse von Computersystemen:

- *Sehr gute Kenntnisse der Hard- und Softwarekonfiguration vom IBM-PC XT/AT kompatiblen Computersystemen (Betriebssysteme Microsoft Windows 3.XX, Windows 95/98, Windows NT).*
- *Gute Kenntnisse der Softwarekonfiguration von Apple Macintosh Systemen (MacOS 7.XX, MacOS 8.XX).*
- *Gute bis sehr gute Kenntnisse von Anwendungssoftware für IBM-kompatible PC-Systeme (Microsoft Word, Access, Excel, Powerpoint).*
- *Gute Kenntnisse der Anwendungssoftware für Apple Macintosh Systeme (Microsoft Word, Excel, Powerpoint).*
- *Sehr gute Kenntnisse über die Konfiguration von Internetanschlüssen bzw. -software von IBM-kompatiblen PC-*

Systemen sowie von Apple Macintosh Systemen (Eudora, Netscape, Internet Explorer, PPP-Zugänge, TCP/IP-Netzwerke, WWW, FTP, E-Mail).

Solingen, den 03.08.2000

_____

(Andreas Christaras)