

Aus der  
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen  
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik  
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Gastroenterologie,  
Nephrologie, Rheumatologie)

**Immunmodulation von kindlichen akuten  
lymphoblastischen Leukämien durch spezifische  
Zytokin-Milieus**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Hilz, Johannes**

**2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Handgretinger  
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. C. Schneidawind

Tag der Disputation: 29.06.2022

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	i
Tabellenverzeichnis .....	iii
Abkürzungsverzeichnis .....	vi
1. Einleitung.....	1
1.1 Ausgewählte Zytokine und deren Bioaktivitätsmuster.....	3
1.1.1 Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ).....	3
1.1.2 Interferon gamma (IFN $\gamma$ ).....	5
1.1.3 Transforming Growth Factor beta (TGF $\beta$ ).....	6
1.1.4 Interleukin-10 (IL10).....	8
1.2 Zytokinrezeptoren und deren Signalkaskaden.....	10
1.2.1 TNF Rezeptoren .....	10
1.2.2 IFN $\gamma$ Rezeptor.....	12
1.3 Wissenschaftliche Zielsetzung der Arbeit .....	13
2. Material und Methoden .....	14
2.1 Allgemeine Zellkulturmethoden mit humanen B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien sowie mit primären B-Zell Vorläufer ALL-Patientenleukämiezellen.....	14
2.1.1 Einfrieren von Zellen.....	15
2.1.2 Auftauen von Zellen .....	15
2.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Viabilität .....	16
2.1.4 Split-Intervall und Split-Verhältnis der Zellkulturen .....	17
2.2 Analyse des Viabilitätsverlustes nach Inkubation in spezifischen Zytokin-Milieus .....	18
2.3 Analyse der Zellzyklusphasen und deren Veränderung in spezifischen Zytokin- Milieus .....	22
2.4 Bestimmung des Zelltodmechanismus nach Inkubation in spezifischen Zytokin- Milieus .....	28
2.4.1 Analyse mittels FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit mit 7-AAD im T <sub>H</sub> 1 spezifischen Zytokin-Milieu .....	28
2.4.2 Analyse der Caspasen-Aktivierung .....	31
2.5 Quantifizierung spezifischer Zytokinrezeptoren auf der Zelloberfläche.....	35

3. Ergebnisse.....	39
3.1 Analyse des Viabilitätsverlustes an B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien sowie Patientenleukämiezellen durch proinflammatorische Zytokine (TNF $\alpha$ und IFN $\gamma$ )....	39
3.1.1 Analyse an B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien.....	40
3.1.2 Analyse an Patientenblasten .....	42
3.2 Analyse des Viabilitätsverlustes an B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien sowie Patientenleukämiezellen durch immunregulatorische Zytokine (IL10 und TGF $\beta$ <sub>1</sub> ) ..	47
3.2.1 Analyse an B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien.....	47
3.2.2 Analyse an Patientenblasten .....	49
3.3 Einfluss der Zytokin-Milieus auf die Zellzyklusphasen der B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien.....	52
3.3.1 Analyse im T <sub>H1</sub> spezifischen Zytokin-Milieu .....	53
3.3.2 Analyse im immunregulatorischen Zytokin-Milieu .....	55
3.4 Analyse des Zelltodmechanismus an B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien sowie Patientenleukämiezellen .....	57
3.4.1 Analyse an B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien im T <sub>H1</sub> spezifischen Zytokin-Milieu.....	57
3.4.2 Analyse an Patientenblasten im proinflammatorischen und immunregulatorischen Zytokin-Milieu.....	63
3.5 Rezeptorstatus der behandelten Zelllinien sowie Patientenleukämiezellen .....	65
4. Diskussion .....	70
4.1 Effekte der proinflammatorischen Zytokine mit Bezug auf das Therapieansprechen, die Risikogruppierung und den Rezeptorstatus der ALL .....	70
4.2 Effekte der immunregulatorischen Zytokine mit Bezug auf das Therapieansprechen, die Risikogruppierung und Hypothesen zur Genese der ALL.....	73
4.3 Schlussfolgerung und Ausblick .....	76
5. Zusammenfassung .....	77
6. Literaturverzeichnis .....	80
7. Erklärungen zum Eigenanteil .....	87
Anhang.....	89

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dotplots einer FACS basierten Viabilitätsanalyse mittels FSC/SSC Messmethode mit der Zelllinie RS4;11 ohne Behandlung. ....	21
Abbildung 2: Dotplots einer FACS basierten Viabilitätsanalyse mittels Zombie Aqua Färbung mit der Zelllinie RS4;11 ohne Behandlung. ....	22
Abbildung 3: Dotplots einer FACS basierten Zellzyklusanalyse mittels BrdU/7-AAD Färbung mit der Zelllinie RS4;11 ohne Behandlung. ....	27
Abbildung 4: Dotplots einer FACS basierten Analyse des Zelltodmechanismus mittels FITC Annexin V/7-AAD Färbung mit der Zelllinie RS4;11 ohne Behandlung. ....	31
Abbildung 5: Dotplots einer FACS basierten Quantifizierung von mTNF $\alpha$ mit der Zelllinie RS4;11. ....	38
Abbildung 6: Spezifischer Zelltod der Zelllinien nach 72 h Inkubation mit T <sub>H</sub> 1 Zytokinen im Rahmen der Viabilitätsverlustanalysen mittels FSC/SSC Messmethode am FACS Gerät. ....	41
Abbildung 7: Spezifischer Zelltod der Zelllinien nach 72 h Inkubation mit T <sub>H</sub> 1 Zytokinen im Rahmen der Viabilitätsverlustanalysen mittels Zombie Aqua Messmethode am FACS Gerät. ....	42
Abbildung 8: Spezifischer Zelltod der Patientenblasten nach 48 h (links) und 72 h (rechts) Inkubation mit T <sub>H</sub> 1 Zytokinen im Rahmen der Viabilitätsverlustanalysen mittels FSC/SSC Messmethode am FACS Gerät. ....	43
Abbildung 9: Spezifischer Zelltod von vier Patientenblasten nach 48 h Inkubation mit T <sub>H</sub> 1 Zytokinen im Rahmen der Viabilitätsverlustanalysen mittels Zombie Aqua Messmethode am FACS Gerät. ....	45
Abbildung 10: Spezifischer Zelltod der Zelllinien nach 72 h Inkubation mit immunregulatorischen Zytokinen im Rahmen der Viabilitätsverlustanalysen mittels FSC/SSC Messmethode am FACS Gerät. ....	48
Abbildung 11: Spezifischer Zelltod der Zelllinien nach 72 h Inkubation mit immunregulatorischen Zytokinen im Rahmen der Viabilitätsverlustanalysen mittels Zombie Aqua Messmethode am FACS Gerät. ....	49
Abbildung 12: Spezifischer Zelltod der Patientenblasten nach 48 h Inkubation mit immunregulatorischen Zytokinen im Rahmen der Viabilitätsverlustanalysen mittels FSC/SSC Messmethode am FACS Gerät. ....	50
Abbildung 13: Spezifischer Zelltod von vier Patientenblasten nach 48 h Inkubation mit immunregulatorischen Zytokinen im Rahmen der Viabilitätsverlustanalysen mittels Zombie Aqua Messmethode am FACS Gerät. ....	51
Abbildung 14: Q4 der finalen Auswertungs-Dotplots der Zelllinien (lebende Zellen) nach 72 h Inkubation mit T <sub>H</sub> 1 Zytokinen im Rahmen der Zelltodanalysen mittels FITC Annexin V und 7-AAD Färbung. ....	58

Abbildung 15: Q1 der finalen Auswertungs-Dotplots der Zelllinien (früh-apoptotische Zellen) nach 72 h Inkubation mit T <sub>H</sub> 1 Zytokinen im Rahmen der Zelltodanalysen mittels FITC Annexin V und 7-AAD Färbung. ....	59
Abbildung 16: Q2 der finalen Auswertungs-Dotplots der Zelllinien (spät-apoptotische Zellen) nach 72 h Inkubation mit T <sub>H</sub> 1 Zytokinen im Rahmen der Zelltodanalysen mittels FITC Annexin V und 7-AAD Färbung. ....	60
Abbildung 17: Mittelwerte der relativen Fluoreszenzeinheit (RFU) +/- einfachem Standardfehler der Zelllinien (MHH-CALL-4 und NALM-6) nach 72 h Inkubation mit T <sub>H</sub> 1 Zytokinen im Rahmen der Zelltodanalysen mittels photometrischer Aktivitätsmessung der Effektorcaspasen 3 und 7. ....	62
Abbildung 18: Mittelwerte der relativen Fluoreszenzeinheit (RFU) +/- einfachem Standardfehler der Patientenblasten (PDX_2_6_7 und PDX_9) nach 48 h Inkubation mit T <sub>H</sub> 1 Zytokinen und immunregulatorischen Zytokinen im Rahmen der Zelltodanalysen mittels photometrischer Aktivitätsmessung der Effektorcaspasen 3 und 7. ....	64
Abbildung 19: Regression (mit Ausreißer) der Antikörperbindungskapazität (ABC) von TNFR-2 und dem spezifischen Zelltod der Patientenblasten nach 48 h Inkubation mit 10 ng/ml TNF $\alpha$ . ....	67
Abbildung 20: Regression (ohne Ausreißer) der Antikörperbindungskapazität (ABC) von TNFR-2 und dem spezifischen Zelltod der Patientenblasten nach 48 h Inkubation mit 10 ng/ml TNF $\alpha$ . ....	68
Abbildung 21: Gruppiertes Boxplot der Antikörperbindungskapazität (ABC) von TNFR-2 der Patientenblasten. Cut-off reagibel/nicht reagibel bei 5 % spezifischem Zelltod nach 48 h Inkubation mittels 10 ng/ml TNF $\alpha$ . ....	68
Abbildung 22: Gruppiertes Boxplot der Antikörperbindungskapazität (ABC) von TNFR-2 der Patientenblasten. Cut-off reagibel/nicht reagibel bei 10 % spezifischem Zelltod nach 48 h Inkubation mittels 10 ng/ml TNF $\alpha$ . ....	69

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Methoden zur Aufnahme aufgetauter Zelllinien in Zellkultur. ....	16
Tabelle 2: Split-Intervall und Split-Verhältnis der Zelllinien sowie Zellzahl nach einem Split. ....	17
Tabelle 3: Pipettierschema Viabilitätsassay in 96-Well-Platte. ....	18
Tabelle 4: Pipettierschema Zellzyklusassay in 24-Well-Platte. ....	23
Tabelle 5: Reagenzien im BrdU Flow Kit. ....	26
Tabelle 6: Pipettierschema Analyse des Zelltodmechanismus mittels FITC Annexin V/7-AAD Färbung in 24-Well-Platte. ....	28
Tabelle 7: Pipettierschema plattenbasierter Caspase 3/7-Assay in 96-Well-Platte. ....	32
Tabelle 8: Antikörper-Fluorochrom-Kombinationen zur Quantifizierung spezifischer Zytokinrezeptoren. ....	36
Tabelle 9: Viabilität der Mediumkontrollen der Zelllinien (in Prozent) in den dargestellten Versuchsergebnissen der Viabilitätsverlustanalysen zur Behandlung mit IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ . ....	40
Tabelle 10: Viabilität der Mediumkontrollen der Patientenblasten (in Prozent) in den dargestellten Versuchsergebnissen der Viabilitätsverlustanalysen zur Behandlung mit IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ . ....	43
Tabelle 11: Viabilität der Mediumkontrollen der Zelllinien (in Prozent) in den dargestellten Versuchsergebnissen der Viabilitätsverlustanalysen zur Behandlung mit IL10/TGF $\beta_1$ . ....	47
Tabelle 12: Viabilität der Mediumkontrollen der Patientenblasten (in Prozent) in den dargestellten Versuchsergebnissen der Viabilitätsverlustanalysen zur Behandlung mit IL10/TGF $\beta_1$ . ....	49
Tabelle 13: Prozentuale Anteile der einzelnen Zellzyklusphasen der Mediumkontrollen der Zelllinien in den dargestellten Versuchsergebnissen zur Behandlung mit IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ nach 96 h Inkubation. ....	53
Tabelle 14: Zellzyklusphasen und deren Änderung bei den Zelllinien nach 96 h Inkubation mit T $_H$ 1 Zytokinen. ....	54
Tabelle 15: Prozentuale Anteile der einzelnen Zellzyklusphasen der Mediumkontrollen der Zelllinien in den dargestellten Versuchsergebnissen zur Behandlung mit IL10/TGF $\beta_1$ nach 96 h Inkubation. ....	55
Tabelle 16: Zellzyklusphasen und deren Änderung bei den Zelllinien nach 96 h Inkubation mit immunregulatorischen Zytokinen. ....	56
Tabelle 17: Viabilität der Mediumkontrollen der Zelllinien (in Prozent) in den durchgeführten Versuchsreihen zur Zelltodanalyse mittels FITC Annexin V und 7-AAD Färbung unter Behandlung mit IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ . ....	57

Tabelle 18: Mittelwerte der relativen Fluoreszenzeinheit (RFU) der Negativkontrollen sowie RFU-Einzelwerte der Positivkontrollen der Zelllinien (MHH-CALL-4 und NALM-6) in der durchgeführten Versuchsreihe zur Zelltodanalyse mittels photometrischer Aktivitätsmessung der Effektorcaspasen 3 und 7 unter Behandlung mit IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ . .....	61
Tabelle 19: Mittelwerte der relativen Fluoreszenzeinheit (RFU) der Negativkontrollen und Positivkontrollen der Patientenblasten (PDX_2_6_7 und PDX_9) in der durchgeführten Versuchsreihe zur Zelltodanalyse mittels photometrischer Aktivitätsmessung der Effektorcaspasen 3 und 7 unter Behandlung mit IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ und IL10/TGF $\beta$ <sub>1</sub> . .....	63
Tabelle 20: Gegenüberstellung der Mittelwerte der Antikörperbindungskapazitäten (ABC) der Rezeptoren IFNGR1, TNFR-1 und TNFR-2 sowie von mTNF $\alpha$ und dem spezifischen Zelltod (in Prozent) der Zelllinien nach 72 h Inkubation mit 10 ng/ml TNF $\alpha$ respektive 10 ng/ml IFN $\gamma$ . .....	66
Tabelle 21: Gegenüberstellung der Antikörperbindungskapazität (ABC) der Rezeptoren IFNGR1, TNFR-1 und TNFR-2 sowie von mTNF $\alpha$ und dem spezifischen Zelltod (in Prozent) der Patientenblasten nach 48 h Inkubation mit 10 ng/ml TNF $\alpha$ respektive 10 ng/ml IFN $\gamma$ . .....	66
Tabelle 22: Auflistung der verwendeten Medien und Zytokine mit Katalognummer und Firma. ....	90
Tabelle 23: Auflistung der verwendeten Reagenzien und Chemikalien mit Katalognummer und Firma. ....	90
Tabelle 24: Merkmale der verwendeten B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien. ....	91
Tabelle 25: Immunphänotyp der verwendeten B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien. ....	92
Tabelle 26: Merkmale der verwendeten Patientenzellen (PDX). ....	93
Tabelle 27: Auswertung von Q1 zur Analyse des Zelltodmechanismus mittels FITC Annexin V und 7-AAD Färbung an den Zelllinien nach 72 h Inkubation mit 10 ng/ml IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ . ....	94
Tabelle 28: Auswertung von Q2 zur Analyse des Zelltodmechanismus mittels FITC Annexin V und 7-AAD Färbung an den Zelllinien nach 72 h Inkubation mit 10 ng/ml IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ . ....	95
Tabelle 29: Auswertung von Q3 zur Analyse des Zelltodmechanismus mittels FITC Annexin V und 7-AAD Färbung an den Zelllinien nach 72 h Inkubation mit 10 ng/ml IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ . ....	96
Tabelle 30: Auswertung von Q4 zur Analyse des Zelltodmechanismus mittels FITC Annexin V und 7-AAD Färbung an den Zelllinien nach 72 h Inkubation mit 10 ng/ml IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ . ....	97
Tabelle 31: Auswertung der photometrischen Aktivitätsmessung der Effektor-Caspasen 3 und 7 zur Analyse des Zelltodmechanismus an den Zelllinien MHH-CALL-4 und NALM-6 nach 72 h Inkubation mit 0,1/1 und 10 ng/ml IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ . ....	98



Tabelle 32: Auswertung der photometrischen Aktivitätsmessung der Effektor-Caspasen 3 und 7 zur Analyse des Zelltodmechanismus an den Patientenzellen PDX\_2\_6\_7 und PDX\_9 nach 48 h Inkubation mit 10 ng/ml IL10/TGF $\beta$ <sub>1</sub> respektive 10 ng/ml IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ . ..... 99

## Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ABC	Antibody Binding Capacity
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BrdU	Bromdesoxyuridin
BV421	Brilliant Violet 421
CAR	Chimeric Antigen Receptor
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Cyclin Dependent Kinase
DD	Death Domain
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
enTNF	endogen produziertes TNF
FACS	Flourescence-activated Cell Sorting
FADD	Fas-Associated Death Domain
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAS	IFN $\gamma$ -Activated Sequence
GDF	Growth and Differentiation Factor
I $\kappa$ B	Inhibitor of $\kappa$ B
IAP	Inhibitor of Apoptosis
IFNGR	Interferon Gamma Rezeptor
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IKK	Inhibitor of $\kappa$ B Kinase
IL10	Interleukin-10
IRF	Interferon Regulatory Factor

ISG	Interferon Signature Genes
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun-N-Terminal-Kinase
LAP	Latency Associated Protein
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LTBP	Latent Transforming Growth Factor beta Binding Protein
LT $\alpha$	Lymphotoxin alpha
MAPK	Mitogen-Associated Protein Kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRD	Minimale Residual Disease
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
mTNF	membrangebundenes TNF
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOD/SCID	Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immundeficiency <i>Mäuse</i>
PBS	Phosphat Buffered Saline
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
PDX	Patient Derived Xenograft
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
RFU	Relative Fluorescence Units
RIP	Receptor Interacting Protein
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute <i>Medium</i>
RT	Raumtemperatur
SE	Standard Error
SMAC	Second Mitochondria derived Activator of Caspase mimetics
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TACE	TNF alpha Converting Enzyme
TGF $\beta$ <sub>1</sub>	Transforming Growth Factor beta 1
TIM	TNFR-Associated Factor Interacting Motive

TLR	Toll-like-Rezeptor
TNFR	Tumornekrosefaktor Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRADD	TNFR-Associated Death Domain
TRAF	TNFR-Associated Factor
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. Die Fortschritte in der Diagnostik und Therapie der kindlichen ALL im Laufe der letzten 50 Jahre zählen zu den größten Erfolgen moderner Medizin. Hocheffektive konventionelle Chemotherapien wurden bereits durch neuartige zielgerichtete Therapien ergänzt. Nichtsdestotrotz bestehen weiterhin große Herausforderungen in der Behandlung insbesondere therapierefraktärer und rezidivierender ALL. Hierzu ist ein noch breiteres Verständnis der Pathophysiologie der ALL essentiell (Heikamp & Pui, 2018).

Durch die maligne Transformation einer Knochenmarkstammzelle mit konsekutivem Differenzierungsstopp und klonaler Expansion von Vorläuferzellen kommt es bei der ALL zur unkontrollierten Vermehrung unreifzelliger Blasten. Neben der generellen Einteilung nach der Zellart in B-Linien und T-Linien ALL und dem Reifegrad der Zellen in Vorläufer- und Reife ALL, ist auch die Differenzierung anhand prognostischer Indikatoren von großer Bedeutung und letztlich therapieentscheidend. Hierbei erfolgt eine Risikostratifizierung, welche in den vergangenen Jahrzehnten stetig weiterentwickelt und an neue wissenschaftliche Erkenntnisse angepasst wurde (Kato & Manabe, 2018). Die Risikostratifizierung anhand der Minimalen Resterkrankung (MRD), insbesondere der Nachweis von Tumorresten auf molekularer Ebene nach Induktionstherapie, zeigte sich dabei als ausgesprochen sensitiv. Diese Risikostratifizierung ergänzte und ersetzte auch zum Teil konventionelle Prognosefaktoren, wie das Erkrankungsalter, das Geschlecht, die ethnische Zugehörigkeit und die Leukozytenzahl zum Diagnosezeitpunkt (Conter et al., 2010; Pui et al., 2011). Mittels aktueller Polychemotherapie-Regime, welche durch große prospektive randomisierte Studien konzipiert und stetig verbessert wurden, kann heutzutage bei deutlich über 80 % der Patienten eine dauerhafte Remission erreicht werden (Inaba & Mullighan, 2020; Möricke et al., 2010). Rezidive hingegen sind weiterhin schwer zu behandeln und bergen eine weitaus ungünstigere Prognose für den Patienten. Sie treten bei etwa 10-15 % der Patienten mit kindlicher ALL auf und stellen die Haupttodesursache durch Krebs im Kindesalter dar (Goto, 2015; Heikamp & Pui, 2018). Neben zytogenetischen Untersuchungen und der Immunphänotypisierung spielen heute molekulargenetische Analysen von Genexpressionsprofilen und epigenetischen

Veränderungen sowie Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Arrays und das Whole Genome Sequencing eine große Rolle. Hierdurch konnten weitere Subgruppen der ALL beschrieben, neue prognostische Marker identifiziert und spezifische Therapiekonzepte erweitert sowie neuentwickelt werden (Goto, 2015; Pui et al., 2011).

Neue immuntherapeutische Ansätze zur zielgerichteten Therapie werden bereits bei therapierefraktärer und rezidivierter B-ALL mit vielversprechenden Ergebnissen angewendet. Hierzu gehört die Verwendung monoklonaler Antikörper gegen leukämische Oberflächenmerkmale, wie der bispezifische Antikörper Blinatumomab, welcher CD3<sup>+</sup> T-Zellen gegen CD19<sup>+</sup> Leukämiezellen richtet (Gore et al., 2018; Locatelli et al., 2020; von Stackelberg et al., 2016). Des Weiteren werden autologe T-Zellen *ex vivo* mit einem CD19 spezifischen Chimeric Antigen Receptor (CAR) modifiziert und dem Patienten rücktransfundiert (Maude et al., 2014, 2018). Die Expression immunogener Oberflächenmoleküle wird von Leukämiezellen, wie auch von vielen anderen Tumorzellen, reduziert, wodurch sie sich einer zellulären Immunantwort entziehen können. Durch die Herunterregulierung von Costimulatoren, wie CD80, resultiert beispielsweise eine Anergie von CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen mit ausbleibender Produktion T<sub>H</sub>1 spezifischer Zytokine (Yotnda et al., 1999). Abgesehen von der direkten zytotoxischen Aktivität von Immunzellen, können einzelne Zytokine selbst einen zytotoxischen Effekt auf B-Vorläufer ALL-Zellen haben, wie am Beispiel von IL4 Mitte der 1990er Jahre gezeigt wurde (Manabe et al., 1994). Braumüller und Kollegen (2013) konnten in unterschiedlichen Tumoren nachweisen, dass die T<sub>H</sub>1 Zytokine Tumornekrosefaktor (TNF) und Interferon gamma (IFN $\gamma$ ) einen permanenten Wachstumsarrest durch Seneszenz auslösen können. Zytokine haben neben anderen Botenstoffen zudem eine bedeutende Auswirkung auf die unmittelbare Umgebung von ALL-Zellen. Durch die Hochregulation von IL15 durch ALL-Blasten im ZNS, wird deren Überleben und Proliferation gefördert und das Risiko für ZNS Rezidive erhöht (Cario et al., 2007; Williams et al., 2014). Pallasch und Kollegen (2014) konnten in infiltrierter Knochenmark eine Reduzierung der makrophagenabhängigen Tumorbekämpfung im Rahmen einer Antikörpertherapie nachweisen, welche auf eine tumorbedingte Veränderung der Mikroumgebung zurückzuführen ist. Eine gesteigerte IL10 Produktion durch verschiedene hämatologische und solide Tumore wurde darüber hinaus als möglicher negativer Prognosefaktor beschrieben (Moore et al., 2001).

Die pro- und antitumorogene Wirkung einzelner Zytokine, ihre rezeptorvermittelten Signalkaskaden und deren Interaktionen sowie der Wert, einen therapeutischen Nutzen aus der Reaktion von ALL-Blasten auf unterschiedliche Zytokine ziehen oder diese als weiteren Prognosefaktor vor der Einleitung einer spezifischen Therapie nutzen zu können, macht es unabdingbar, die wissenschaftlichen Erkenntnisse zur Wirkungsweise einzelner Zytokine speziell für die akute lymphoblastische Leukämie im Kindesalter zu erweitern.

## 1.1 Ausgewählte Zytokine und deren Bioaktivitätsmuster

### 1.1.1 Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ )

Gegen Ende des 19. Jahrhunderts begann der New Yorker Chirurg William B. Coley Patienten mit fortgeschrittenen Sarkomen mit Filtraten aus bakteriellen Kulturen experimentell zu therapieren. Auslöser dieses Vorgehens war die in einigen Fällen zu beobachtende vollständige Spontanregression von fortgeschrittenen, inoperablen Sarkomen und anderen Tumoren unterschiedlichen Ursprungs nach akzidenteller Erysipel-Infektion sowie der im Anschluss zum Teil Jahre andauernden Rezidivfreiheit. Letztlich verfolgte Coley den Ansatz, mit einem Toxin-Gemisch aus der Kultur von *Streptococcus pyogenes* und *Bacillus prodigiosus* die antitumorale Wirkung zu erzielen. Die Keime selbst wurden durch Hitze inaktiviert. Es zeigte sich ein unterschiedliches Ansprechen der Sarkome auf die *in vivo* Therapie am Patienten. Neben einer vollständigen, über Jahre anhaltenden Regression gab es Fälle mit nur kurzzeitigem Effekt der Therapie über wenige Wochen trotz fortgesetzter Injektionen. In manchen Fällen, insbesondere bei sehr großen und stark vaskularisierten Tumoren, zeigte sich gar kein Effekt der Therapie (Coley, 1910). Heutzutage ist klar, dass dieser Effekt der antitumoralen Wirkung des Immunsystems zuzuordnen ist, welche unter anderem durch Zytokine wie TNF vermittelt wird (Balkwill, 2002; Wajant et al., 2003). In den 1970er Jahren wurde TNF, auch als TNF $\alpha$  bezeichnet, erstmalig isoliert und als mögliches Produkt von Makrophagen beschrieben (Carswell et al., 1975). Im Jahre 1984 konnte seine strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zu Lymphotoxin  $\alpha$  (LT $\alpha$ ) nachgewiesen sowie deren beiden cDNAs kloniert werden (Pennica et al., 1984). Mit dem Fortschritt in der Molekularbiologie und der Identifizierung weiterer verwandter Proteine wurde klar,

dass TNF als auch  $LT\alpha$  einer großen Proteinfamilie namentlich der TNF Superfamilie angehören, deren Liganden mit den zugehörigen Rezeptoren der TNFR Superfamilie interagieren (Locksley et al., 2001; Hehlhans & Pfeffer, 2005).

Tumornekrosefaktor (respektive  $TNF\alpha$ ) wird als Typ II Transmembran-Protein überwiegend von Makrophagen, aber auch durch eine Vielzahl anderer Gewebe, wie beispielsweise von lymphoiden Zellen und Mastzellen sowie, wenn auch geringer, von Endothelzellen und Fibroblasten produziert. Durch proteolytische Spaltung durch die Metalloprotease TNF alpha converting enzyme (TACE) kann es von seiner membranintegrierten Form gelöst werden. Große Mengen löslichen TNFs werden beispielsweise infolge der Erkennung von Endotoxinen, insbesondere von Lipopolysacchariden, durch Pattern recognizing receptors, wie den Toll-like-Rezeptoren, von Makrophagen freigesetzt. Durch seine lokale als auch systemische Wirkung, wie der gesteigerten Gefäßpermeabilität, der Aktivierung anderer Abwehrzellen und der Erzeugung von Fieber, wird TNF neben anderen Zytokinen als Schlüsselspieler in der Entstehung eines septischen Schocks gesehen. Im Allgemeinen kann TNF daher als Hauptakteur der proinflammatorischen Zytokine betrachtet werden. TNF nimmt eine bedeutende Rolle im Rahmen der angeborenen als auch erworbenen Immunantwort ein. Es ist maßgeblich bei der Koordination der Bekämpfung und Beseitigung intrazellulärer Keime, wie *Mycobacterium tuberculosis*, beteiligt. Mit der Fähigkeit, über seine zugehörigen Rezeptoren auf zellulärer Ebene sowohl eine Apoptose als auch ein Überlebens- und Differenzierungssignal auszulösen, zeigt TNF zwei in sich widersprüchliche funktionale Facetten, welche sich in Geweberegeneration und Gewebewachstum als auch Zerstörung desselbigen äußern können (Wajant et al., 2003). Mit Fokus auf seinen Einfluss auf die Entstehung und Bekämpfung von Krebszellen, wird TNF von Wang und Lin (2008) als „doppelschneidiges Schwert“ bezeichnet. Zum einen hat Tumornekrosefaktor die Eigenschaft Zelltod auszulösen und damit eine antitumorale Wirkung zu erzielen. Zum anderen besitzt es die Fähigkeit, in den meisten Krebszellen, welche gegen den TNF vermittelten Zelltod resistent sind, Zellproliferation und Zellüberleben sowie deren Migration zu induzieren. Die Regulation der pro- und antitumoralen Fähigkeit von TNF, das heißt, welche Mechanismen explizit zu tragen kommen, um zwischen den entgegengesetzten Wegen zu entscheiden, ist derzeit noch Stand aktueller Forschung. Evident hingegen ist, dass der Gewebetyp, der zelluläre



Kontext und die TNFR-Besetzung der Zielzellen sowie der Zeitpunkt und die Dauer der TNF-Wirkung für den Netto-Effekt von Tumornekrosefaktor von großer Bedeutung sind (Wajant et al., 2003; Wang & Lin, 2008). TNF erzielt *in vivo* nach bisherigem Kenntnisstand überwiegend ein Signal des Zellüberlebens und der Proliferation im Rahmen seiner herausragenden Rolle in der Regulation inflammatorischer Prozesse. Die direkt durch TNF induzierte Apoptose scheint *in vivo* hingegen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen (Wajant et al., 2003). Die in verschiedenen *in vivo* Modellen dennoch nachzuweisende, durch TNF vermittelte Tumorabwehr, ist nachweislich abhängig von einer funktionierenden angeborenen und erworbenen Immunabwehr (Wajant et al., 2003; Wang & Lin, 2008).

### 1.1.2 Interferon gamma (IFN $\gamma$ )

Interferone werden in drei verschiedene Typ-Gruppen eingeteilt. IFN $\gamma$ , als einziges Typ II Interferon, wurde vor knapp 60 Jahren von Frederick Wheelock als ein Virus-Hemmstoff, welcher von Leukozyten nach Stimulation mit Phytohämagglutinin produziert wird und sich in seinen biochemischen Eigenschaften von anderen bekannten Interferonen unterscheidet, erstmals beschrieben (Jorgovanovic et al., 2020; Wheelock, 1965). IFN $\gamma$  wird hauptsächlich von Natürlichen Killerzellen sowie von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen, insbesondere zu T<sub>H1</sub> T-Helferzellen differenzierte CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, produziert und daher sowohl von Zellen der angeborenen als auch erworbenen Immunabwehr (Jorgovanovic et al., 2020; Parker et al., 2016). Zur Synthese von IFN $\gamma$  werden die Zellen durch Interleukine wie IL12 und IL18, durch Tumor- oder pathogene Antigene sowie durch IFN $\gamma$  selbst, als positive Rückkopplung, stimuliert (Jorgovanovic et al., 2020). Selbst steuert es wiederum die Produktion einer Vielzahl von immunmodulatorischen und proinflammatorischen Zytokinen wie beispielsweise IL12 und TNF $\alpha$  (Bach et al., 1997). IFN $\gamma$  ist entscheidend bei der Koordination und Funktion des angeborenen und erworbenen Immunsystems beteiligt. Die Expression von Major Histocompatibility Complex Klasse I und Klasse II (MHC I und MHC II) wird durch IFN $\gamma$  gesteigert, wodurch zum einen die Erkennung pathologischer Antigene über MHC I auf IFN $\gamma$  exponierten Zellen erleichtert und diese gegenüber einem Angriff von zytotoxischen T-Zellen empfänglich gemacht werden. Zum anderen wird die Antigenpräsentation über

MHC II auf antigenpräsentierenden Zellen verstärkt und damit die humorale Immunantwort unterstützt (Bach et al., 1997; Jorgovanovic et al., 2020).  $\text{IFN}\gamma$  gilt auch als Schlüsselvermittler in der Aktivierung und Regulation von mononuklearen Phagozyten, wie Makrophagen (Bach et al., 1997). So wird es beispielsweise als ein bedeutender Faktor in der phänotypischen Programmierung von Makrophagen in eine antitumorogene Untergruppe gesehen, welche fähig ist, Krebszellen zu beseitigen (Jorgovanovic et al., 2020). Neben seinen proinflammatorischen Fähigkeiten, wie der Auslösung einer Immunantwort und der Stimulation zur Beseitigung von Pathogenen, beugt  $\text{IFN}\gamma$  auch einer übermäßigen Immunantwort und einem Gewebeschaden vor. Im Hinblick auf seine Beteiligung in der Tumorentstehung und -bekämpfung zeigt  $\text{IFN}\gamma$  für beide Richtungen dirigierende Funktionen. So agiert es, neben den bereits genannten Mechanismen, zum einen als zytotoxisches Zytokin mit der Initiierung eines Apoptosesignals, zum anderen stimuliert es Immunescape-Mechanismen in Krebszellen beispielsweise durch die Synthese von inhibitorischen Immuncheckpoint-Molekülen wie dem Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) (Jorgovanovic et al., 2020; Parker et al., 2016). Folglich stellt sich  $\text{IFN}\gamma$  als vielseitig agierendes Zytokin mit herausragenden Eigenschaften in Bezug auf die Regulation inflammatorischer Prozesse, als auch bedeutenden tumorprotektiven und tumorbegünstigenden Effekten dar.

### 1.1.3 Transforming Growth Factor beta ( $\text{TGF}\beta$ )

Transforming Growth Factor  $\beta$  ist ein Mitglied einer großen Protein-Superfamilie zu welcher, neben der  $\text{TGF}\beta$ -Isoformen ( $\text{TGF}\beta_1$ ,  $\text{TGF}\beta_2$  und  $\text{TGF}\beta_3$ ), unter anderem Aktivin und Inhibin, die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), die Growth and Differentiation Factors (GDFs) sowie das Anti-Müller-Hormon gehören (Nagaraj & Datta, 2010; Neel et al., 2012).  $\text{TGF}\beta_1$  ist unter den Isoformen der  $\text{TGF}\beta$  Subfamilie das meistuntersuchte Zytokin. Auch in dieser Arbeit wird es in den Fokus genommen. Humanes  $\text{TGF}\beta_1$ , respektive  $\text{TGF}\beta$ , wird von vielen verschiedenen Zelltypen in unterschiedlichen Geweben produziert (Massagué, 2008; Neel et al., 2012). Dabei wird  $\text{TGF}\beta$  in einer inaktiven Form im Komplex mit dem  $\text{TGF}\beta$ -Propeptid (Latency Associated Protein (LAP)) und dem daran gebundenen Latent  $\text{TGF}\beta$ -Binding Protein (LTBP) in den Extrazellularraum sezerniert. Hier kann es durch enzymatische Spaltung von dem großen Vorläufermolekül

getrennt und als Homodimer in seine aktive Form überführt werden (Nagaraj & Datta, 2010; Neel et al., 2012).

Durch die Regulation von Zellproliferation, -differenzierung und Zellüberleben sowie Zelladhäsion nimmt TGF $\beta$  eine bedeutende Rolle in der Gewebshomöostase mit Steuerung von Gewebewachstum und -regeneration ein und bewahrt in frühen Stadien ausgesprochen effektiv vor der weiteren malignen Transformation von Tumorzellen. In normalen Epithelzellen und hämatopoetischen Zellen sowie in frühen Tumorzellen wird durch den SMAD-abhängigen TGF $\beta$  Signalweg der Zellzyklus durch die Expression von Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen (CDK), wie p15<sup>INK4B</sup>, p16<sup>INK4A</sup>, p21<sup>CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> und/oder p57<sup>KIP2</sup> angehalten und dadurch das Zellwachstum unterdrückt. Das ermöglicht TGF $\beta$  den Übergang von der G1 Phase in die S Phase des Zellzyklus zu verhindern (Nagaraj & Datta, 2010; Yu & Feng, 2019). In fortgeschrittenen Tumorstadien hingegen kann TGF $\beta$  auch als ein stark protumorigenes Zytokin wirken, indem entartete Zellen die tumorunterdrückenden Effekte von TGF $\beta$  nicht nur umgehen, sondern auch dessen regulatorischen Funktionen beispielsweise zur Invasion und Metastasierung nutzen können (Massagué, 2008; Nagaraj & Datta, 2010; Neel et al., 2012). Einen Teil seiner oben genannten zellulären Effekte übt TGF $\beta$  auch auf unterschiedliche Immunzellen aus und gilt daher als herausragendes immunregulatorisches Zytokin. So unterdrückt es beispielsweise die zytotoxischen Fähigkeiten CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen sowie die Proliferation und Funktion von NK-Zellen (Yang et al., 2010). TGF $\beta$  ist damit ein Schlüsselspieler in der Vermittlung von Immunsuppression und Immuntoleranz, wodurch sich TGF $\beta$ -produzierende Tumore vor einer Immunantwort abschirmen können (Massagué, 2008). Wachsende und voranschreitende Tumore sezernieren gewöhnlich größere Mengen TGF $\beta$  in ihre unmittelbare Umgebung, wodurch nicht nur die Tumorzellen selbst, sondern auch die umliegenden Stroma- und Parenchymzellen sowie die Immunzellen von den soeben dargelegten Effekten betroffen sind und sich unter anderem dadurch die Mikroumgebung der Tumore ändert (Neel et al., 2012; Yu & Feng, 2019).

Die zugrundeliegenden Mechanismen der nachzuweisenden funktionalen Dualität von TGF $\beta$ , sowohl tumorprotektiv als auch tumorauslösend zu wirken, sind äußerst komplex und bisher nicht vollständig geklärt. Nach Yang und Kollegen (2010) ist die Tumorprogression hin zu einem metastasierten Stadium allgemein von einer reduzierten

oder veränderten TGF $\beta$  Signalempfänglichkeit und einer gesteigerten Expression oder Aktivität von TGF $\beta$  begleitet. Genetische und epigenetische Störungen in Tumorzellen in Kombination mit einer veränderten Mikroumgebung des Tumors führen zu Signalveränderungen von TGF $\beta$ . Frühere Studien konzentrierten sich in der Ursachenfindung der Dualität auf die tumoreigene Signaltransduktion und die Veränderungen in SMAD-abhängigen und SMAD-unabhängigen Signalwegen sowie deren Verknüpfungen. Der andauernde Erkenntnisfortschritt bezüglich des Effekts von TGF $\beta$  auf das Immunsystem und dessen Zellen in der Mikroumgebung von Tumoren, führt jedoch zu einer Erweiterung der Erklärungsansätze (Yang et al., 2010).

Die Entwicklung neuer Therapieformen, mit dem Ziel, den protumorigenen und prometastatischen TGF $\beta$ -Signalweg zu eliminieren, sind Teil aktueller präklinischer und klinischer Studien. Hierzu gehört beispielsweise die TGF $\beta$  Antagonisierung mit dem humanen anti-TGF $\beta$  Antikörper Fresolimumab in fortgeschrittenen Brustkrebsstadien (Formenti et al., 2018; Yang et al., 2020).

#### 1.1.4 Interleukin-10 (IL10)

IL10 kann als nichtkovalent gebundenes Homodimer von verschiedenen Zelltypen produziert werden, die Hauptquelle von IL10 stellen jedoch Makrophagen dar. Diese können durch exogene Faktoren, wie Endotoxine, über den Toll-like-Rezeptor TLR4 oder durch endogene Zytokine, wie TNF, über den TNFR-1 vermittelten NF- $\kappa$ B Signalweg sowie durch Katecholamine zur Synthese stimuliert werden. Generell spielt für die IL10 Expression *in vivo* die Stressachse eine bedeutende Rolle (Asadullah et al., 2003).

Über die Modulation der Expression von Zytokinen, löslichen Mediatoren und Zelloberflächenmolekülen von Zellen myeloiden Ursprungs, greift IL10 entscheidend in deren Fähigkeiten ein, eine Immunantwort auszulösen und aufrechtzuerhalten. So inhibiert IL10 die Produktion von Zytokinen wie IL1, IL6, IL12 und TNF durch aktivierte Makrophagen, wodurch deren proinflammatorische Wirkung blockiert wird. Des Weiteren unterdrückt IL10 durch kompetitive und interagierende intrazelluläre Mechanismen die Interferon-induzierte STAT1 Aktivierung, wodurch die IFN-abhängige Gen-Transkription gedrosselt werden kann (Moore et al., 2001). Hinzu kommt die Fähigkeit von IL10, die Bildung von Chemokinen der CC- und CXC- Familie zu

hemmen, wodurch die Chemotaxis von anderen Makrophagen, dendritischen Zellen, neutrophilen Granulozyten und T-Zellen inhibiert wird. IL10 unterdrückt nicht nur die Produktion und die Signalwege genannter Effektoren, sondern steigert auch die Produktion ihrer natürlichen Antagonisten, wie beispielsweise lösliche TNFR-1 und TNFR-2 Rezeptoren. Die Herunterregulierung von Toll-like-Rezeptoren wie TLR4 und die erhöhte Expression von Scavenger-Rezeptoren durch IL10 steigert darüber hinaus die Phagozytoseaktivität entsprechender Zellen (Moore et al., 2001). IL10 hat auch Auswirkungen auf Zellen der lymphoiden Reihe. So werden CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowohl direkt durch die Hemmung ihrer Proliferation und Zytokin-Produktion, als auch indirekt durch den gedrosselten Reifungsprozess von dendritischen Zellen und anderen antigenpräsentierenden Zellen, inhibiert. Neben den dargestellten überwiegend anti-inflammatorischen Funktionen, fördert IL10 bei B-Zellen, abhängig von deren Aktivierungsstatus, das Zellüberleben und die Differenzierung und steigert die Immunglobulin-Produktion. IL10 gilt auch als potenter Stimulator von NK-Zellen und zeigt bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen stimulierende Effekte, wodurch deren Rekrutierung, zytotoxische Aktivität und Proliferation induziert wird (Mocellin et al., 2003; Moore et al., 2001). Mocellin und Kollegen (2003) verstehen hierunter im Rahmen der frühen Immunantwort einen durch IL10 vermittelten Prozess, während dem es zu einer verlängerten Antigenaufnahme von antigenpräsentierenden Zellen kommt. Sollte durch die von IL10 mitinduzierte gesteigerte Phagozytoseaktivität und die lytischen Prozesse das auslösende Pathogen nicht beseitigt werden können, wird der inflammatorische Prozess durch hinzukommende Signale fortgesetzt, wodurch die Reifung der mit Antigenen beladenen antigenpräsentierenden Zellen voranschreitet und die adaptive Immunabwehr rekrutiert wird.

Durch die soeben dargestellten Eigenschaften mit der Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen gilt IL10 in experimentellen Krebsmodellen auch als antitumoral wirkend. Bei Krebspatienten mit hämatologischen und soliden Tumoren hingegen konnte eine negative Korrelation zwischen den IL10 Serumwerten und der Prognose festgestellt werden. Demzufolge wird IL10 auch als potentieller Biomarker zur Prognosevoraussage und zielgerichteten Krebstherapie vorgeschlagen (Moore et al., 2001; Zhao et al., 2015). Zusammenfassend ist IL10 mit seinen immunregulatorischen Fähigkeiten entscheidend bei der Koordination und Beschränkung inflammatorischer Prozesse beteiligt, indem das

auslösende Pathogen beseitigt und Kollateralschaden möglichst vermieden werden (Mocellin et al., 2003; Moore et al., 2001).

## 1.2 Zytokinrezeptoren und deren Signalkaskaden

### 1.2.1 TNF Rezeptoren

Für die Signaltransduktion von TNF sind zwei membranöse Rezeptoren von Bedeutung, TNF Rezeptor Typ 1 (TNFR-1, p55 Rezeptor) und TNF Rezeptor Typ 2 (TNFR-2, p75 Rezeptor). TNFR-1 wird ubiquitär in vielen verschiedenen Geweben exprimiert. TNFR-2 ist hingegen primär auf Zellen des Immunsystems zu finden. Analog zur Verteilung der Rezeptoren wird TNFR-1 in den meisten Zellen die Hauptrolle in der TNF-Signaltransduktion zugeschrieben, wobei TNFR-2 auf Leukozyten und Zellen des lymphatischen Systems dominiert. TNFR-1, welches im Gegensatz zu TNFR-2 eine sogenannte Death Domain (DD) als Protein-Protein Interaktionsdomäne besitzt, ist dadurch prinzipiell befähigt eine Apoptose-Signalkaskade auszulösen (Wajant et al., 2003; Wang & Lin, 2008).

#### TNFR-1

Nach der Bindung von TNF rekrutiert Tumornekrosefaktor Rezeptor Typ 1 primär TNFR-Associated Death Domain (TRADD) durch die Interaktion der Death Domains beider Proteine. TRADD wiederum stellt eine Plattform zur Rekrutierung weiterer Adapter-Proteine, wie Receptor Interacting Protein (RIP), TNFR-Associated Factor 2 (TRAF-2) und Fas-Associated Death Domain (FADD), dar. Diese Adapter-Proteine ermöglichen ihrerseits die Rekrutierung von Schlüsselmolekülen, welche für die weitere intrazelluläre Signalwirkung entscheidend sind. Prinzipiell können hierdurch sowohl ein Apoptosesignalweg als auch Signalwege zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B oder der Mitogen-Associated Protein Kinasen (MAPKs) initiiert werden (Hehlgans & Pfeffer, 2005; Wang & Lin, 2008).

Ausgehend von dem Signalkomplex aus TRADD und den Adapter-Proteinen TRAF-2 und RIP wird über die Aktivierung des Schlüsselmoleküls Inhibitor of  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) Kinase (IKK) die Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den Zellkern und infolgedessen die Transkription der NF- $\kappa$ B abhängigen Zielgene bewirkt (Wajant et al.,

2003; Wang & Lin, 2008). Die hieraus gebildeten Proteine wie beispielsweise die Inhibitors of Apoptosis (IAPs) vermitteln ein anti-apoptotisches Signal über die Blockierung von Effektorcaspasen (Hehlhans & Pfeffer, 2005). Über denselben Komplex aus TRADD, TRAF-2 und RIP ist auch die Aktivierung der c-Jun-N-Terminal-Kinasen (JNK) möglich. Die JNK Kinasen sind dabei die häufigsten von TNF induzierten MAP Kinasen. Ihre anti- und pro-apoptotische Wirkung nach Aktivierung über TNF wird bis heute kontrovers diskutiert, wobei neuere Studien einer andauernden JNK Aktivierung ein pro-apoptotisches Signal nachsagen (Wajant et al., 2003; Wang & Lin, 2008).

Ein anderer TNFR-1 Signalkomplex wird aus TRADD, FADD und Pro-Caspase-8 gebildet, welcher Zelltod durch Apoptose auslöst. Dabei kann die autoaktivierte Caspase-8 sowohl den extrinsischen als auch den intrinsischen, mitochondrialen Apoptosesignalweg aktivieren (Wajant et al., 2003; Wang & Lin, 2008). TNFR-1 besitzt daher die Fähigkeit ein starkes pro-apoptotisches Signal auszulösen, insbesondere dann, wenn die Proteinsynthese allgemein reduziert ist oder der NF- $\kappa$ B Signalweg kompromittiert wird (Hehlhans & Pfeffer, 2005; Wajant et al., 2003). Hierbei ist eine enge Verbundenheit beider Signalwege zu erkennen, wobei sie sich gegenseitig durch verschiedenste, zum Teil dargestellte Schaltkreise hemmen und der Netto-Effekt der TNFR-1 Aktivierung letztlich von der Signalstärke des jeweiligen Signalwegs abhängt. Im Vergleich zu anderen Death Domain Rezeptoren, wie dem Fas-Rezeptor, bei welchen trotz einer parallelen NF- $\kappa$ B Aktivierung das Apoptosesignal *in vivo* überwiegt, wird TNFR-1 hingegen *in vivo* primär als NF- $\kappa$ B induzierender Rezeptor spezifiziert (Wajant et al., 2003).

Neben der Fähigkeit des TNFR-1 Rezeptors Apoptose zu initiieren, besitzt er auch eine Nekrose auslösende Funktion, welche maßgebend von der Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) getragen wird. Dieser Nekrose-Signalweg ist von der RIP-Kinaseaktivität abhängig und läuft aufgrund der Spaltung von RIP durch aktivierte Caspase-8 nicht parallel zur Apoptose (Wajant et al., 2003; Wang & Lin, 2008). Der genaue Signalweg ist jedoch bis heute nicht endgültig geklärt.

### TNFR-2

TNFR-2 wird im Allgemeinen die Vermittlung eines Signals zum Zellüberleben und zur Zellproliferation zugeschrieben. TNFR-2 trägt an seiner zytoplasmatischen Domäne

TNFR-Associated Factor (TRAF)-Interacting Motive (TIMs) und gehört damit einer bestimmten Subgruppe der TNFR-Superfamilie an (Hehlhans & Pfeffer, 2005; Wajant et al., 2003). Nach Aktivierung von TNF Rezeptoren welche TIM enthalten, werden Proteine der TRAF-Familie rekrutiert, wodurch nachgeschaltete Signalwege, wie NF- $\kappa$ B, MAPK und auch Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), initiiert werden können (Hehlhans & Pfeffer, 2005). TNFR-2 bindet nach Aktivierung von TNF TRAF-2 und RIP, wonach, analog zu TNFR-1, der das Zellüberleben fördernde NF- $\kappa$ B Signalweg ausgelöst werden kann. Gu und Kollegen (2006) konnten spezifisch für TNFR-2 auch eine Aktivierung des PI3K/Proteinkinase B Signalwegs durch endogen produziertes TNF (enTNF) nachweisen. Dabei wurde ebenfalls eine gesteigerte Proliferation von enTNF produzierenden Zellen beschrieben, welche über den PI3K/Proteinkinase B Signalweg ausgelöst wird.

Wie eingangs erwähnt wurde, besitzt TNFR-2 im Gegensatz zu TNFR-1 keine Death Domain. Dennoch konnte durch Grell und Kollegen (1993) ein apoptotisches Signal ausgehend von der spezifischen Aktivierung des TNF Rezeptors Typ 2 nachgewiesen werden. Weiterführende Analysen zeigten, dass die Apoptoseinduktion hierbei nicht direkt durch TNFR-2 ausgelöst wird. Die Aktivierung von TNFR-2 führt zur gesteigerten Produktion von enTNF, welches in seiner membrangebundenen Form (mTNF) TNFR-1 autokrin oder parakrin aktiviert und dadurch Zelltod auslöst (Grell et al., 1999). Dieser Effekt konnte auch bei anderen Rezeptoren der TNFR-Superfamilie ohne Death Domain nachgewiesen werden. Die Wirkung von mTNF an TNFR-1 wird durch die zeitgleiche Stimulation von TNFR-2 deutlich verstärkt, indem ein Prozess angestoßen wird, welcher zum Verbrauch von TRAF2 und den TRAF2 assoziierten protektiven Faktoren führt (Wajant et al., 2003).

### 1.2.2 IFN $\gamma$ Rezeptor

Der Interferon Gamma Rezeptor (IFNGR) besteht aus zwei Untereinheiten, dem Interferon Gamma Rezeptor 1 (IFNGR1) und dem Interferon Gamma Rezeptor 2 (IFNGR2). Die beiden Untereinheiten des IFNGRs werden konstitutiv auf der Zelloberfläche unterschiedlicher Gewebe exprimiert, wobei die Expression von IFNGR2 stärker reguliert werden kann. Die Regulation von IFNGR2 auf der jeweiligen Zelle ist



ausschlaggebend für die Empfänglichkeit des IFN $\gamma$ -Signals und hängt unter anderem von der Exposition gegenüber IFN $\gamma$  selbst ab (Bach et al., 1997).

Beide Untereinheiten, IFNGR1 und IFNGR2, sind an ihrer intrazellulären Domäne jeweils mit einer Janus Kinase, JAK1 beziehungsweise JAK2, verbunden. IFN $\gamma$  bindet als Homodimer zwei IFNGR1 Untereinheiten, gefolgt von der Rekrutierung zweier IFNGR2 Untereinheiten und den jeweils assoziierten Janus Kinasen (Bach et al., 1997; Parker et al., 2016). Hierdurch werden die Janus Kinasen 1 und 2 autoaktiviert, welche infolge zwei Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) Moleküle phosphorylieren. Die beiden aktivierten STAT1 Moleküle homodimerisieren und translozieren in den Zellkern (Bach et al., 1997; Jorgovanovic et al., 2020). Es folgt die Bindung an die DNA-Sequenz IFN $\gamma$ -Activated Sequence (GAS), wodurch die Transkription zahlreicher Gene initiiert wird. Neben STAT1 kann auch STAT3 aktiviert werden und als Homodimer oder Heterodimer zusammen mit STAT1 in den Zellkern translozieren (Parker et al., 2016). Die durch IFN $\gamma$  induzierten Gene werden Interferon Signature Genes (ISG) genannt, welche selbst wiederum häufig Transkriptionsfaktoren sind und inflammatorische Signale sowohl unterstützen als auch hemmen. Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1) ist ein bedeutender Transkriptionsfaktor, welcher die Expression vielfältiger Gene auslöst, die in zellbiologischen Vorgängen, wie der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und der Zellwachstumshemmung sowie der Tumorunterdrückung, beteiligt sind. IRF-1 aktiviert die Synthese und steigert hierdurch die Expression von MHC I. Ein weiterer, über die Aktivierung von IRF-1 vermittelter Effekt, ist die Expression von einigen Immuncheckpoint Liganden auf Tumor- als auch T-Zellen. Neben dem JAK-STAT Signalweg sind weitere durch IFN $\gamma$  ausgelöste Signalkaskaden sowie deren möglichen Interaktionen Stand aktueller Forschung. Ein Signalweg der dabei hervorgehoben wird ist der PI3K/Proteinkinase B Signalweg (Jorgovanovic et al., 2020).

### 1.3 Wissenschaftliche Zielsetzung der Arbeit

Durch den enormen wissenschaftlichen Fortschritt der letzten Jahrzehnte konnten spezifische Prognosefaktoren, wie die MRD, in ihrer Genauigkeit verbessert werden und eine sensitive Vorhersage des Therapieerfolges ermöglichen. Wie anhand der Zahlen

großer prospektiver Studien zu erkennen ist, erleiden aber auch immer wieder jene Patienten ein Rezidiv, welche ursprünglich einer Standard-Risikogruppe zugeordnet wurden. Das selektive Ansprechen auf eine Therapie bleibt dabei häufig ungeklärt und führt zu Problemen in der Therapiefortsetzung. Wie zuvor beschrieben, haben Zytokine, welche entweder von den Tumorzellen selbst oder von Immunzellen im Rahmen einer antitumoralen Immunabwehr produziert werden, einen weitreichenden Einfluss auf das Voranschreiten oder das erfolgreiche Bekämpfen einer Krebserkrankung. In dieser Arbeit soll der Effekt ausgewählter Zytokine auf Leukämiezellen untersucht und deren Reaktionsmuster mit Bezug auf den Rezeptorstatus evaluiert werden. Übersetzt in die klinische Anwendung könnte das spezifische Reaktionsmuster einer Leukämie einen Erklärungsansatz beim selektiven Therapieansprechen liefern oder bereits vor Therapiebeginn als neuer Prognosemarker dienen.

## 2. Material und Methoden

Die benutzten Medien und Zytokine als auch die in den jeweiligen Versuchen verwendeten Reagenzien und Chemikalien sind in Tabelle 22 und 23 im Anhang aufgelistet. In den folgenden Unterkapiteln werden die angewendeten Methoden ausführlich dargestellt.

### 2.1 Allgemeine Zellkulturmethoden mit humanen B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien sowie mit primären B-Zell Vorläufer ALL-Patientenleukämiezellen

Zur Analyse der zellulären Effekte ausgewählter Zytokine auf Vorläufer B-ALL-Zellen werden Zelllinien und primäre Patientenleukämiezellen verwendet. Im Anhang sind aus Tabelle 24 und 25 die von der DSMZ verwendeten B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien und deren Merkmale zu entnehmen. Da primäre lymphoblastische Leukämiezellen nur sehr schwer *in vitro* zu kultivieren sind, wird hierfür ein in der Arbeitsgruppe bereits etabliertes Mäuse-Xenotransplantationsmodell verwendet (Aktenzeichen Ethikvotum: 448/2014BO1). Dabei werden neu diagnostizierte Leukämien frisch direkt intravenös in immuninkompetente NOD/SCID-Mäuse transplantiert. Nach dem Anwachsen der Leukämie in den Mäusen werden die Leukämiezellen aus der Milz und dem

Knochenmark gewonnen. Im Anschluss wird der Anteil der CD19<sup>+</sup> Leukämiezellen durchflusszytometrisch bestimmt und die Zellen nach dem unten genannten Schema entweder eingefroren oder direkt für die Versuche verwendet. Der Anteil CD19<sup>+</sup> Leukämiezellen an den aus der Maus gewonnenen primären Proben lag stets über 80 %. Durch die Verwendung von primären Patientenproben aus einem Xenotransplantationsmodell (PDX) wird die Heterogenität des Reaktionsverhalten von Vorläufer B-ALL-Zellen deutlich besser abgebildet als bei der alleinigen Analyse von Zelllinien. Die Merkmale der verwendeten Patientenzellen sind in Tabelle 26 im Anhang aufgelistet.

### 2.1.1 Einfrieren von Zellen

Bei der Kryokonservierung müssen die Zellen vor der Bildung von Eiskristallen geschützt werden. Deshalb wird das Einfriermedium zu 90 % mit dem Frostschutzmittel DMSO hergestellt. Zudem wird dem Einfriermedium zu 10 % FCS hinzugefügt. Die Zellsuspension mit bekannter Zellzahl der einzufrierenden Zellen wird zentrifugiert (300 g/RT/10 min). Der Medium-Überstand wird abgenommen und 1-5 x 10<sup>6</sup> Zellen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen. Je 1 ml Zellsuspension wird dann in beschriftete Cryo-Röhrchen gegeben und zügig in einem Mister Frosty (Gefrierbehälter mit Isopropylalkohol, ermöglicht eine Kühlrate von 1 °C/Minute) bei -80 °C über Nacht eingefroren. Bei Bedarf überführt man am nächsten Tag die Röhrchen in einen N<sub>2</sub>-Tank.

### 2.1.2 Auftauen von Zellen

Da das Frostschutzmittel DMSO toxisch auf aufgetaute Zellen wirkt, muss der Auftauprozess möglichst schnell durchgeführt werden. Zunächst wird das Cryo-Röhrchen mit den aufzutauenden Zellen aus dem N<sub>2</sub>-Tank geholt und auf Trockeneis ins Labor transportiert. Im 37 °C Wasserbad werden die Zellen schnell angetaut und an der Sterilbank in ein vorbereitetes Falcon (50 ml) mit mindestens 20 ml 37 °C warmen Medium (20 % FCS) gegeben und gut gemischt. Anschließend werden die Zellen gewaschen (400 g/RT/7 min), der Überstand abgenommen und das Zellpellet ein zweites Mal in 10 ml Medium (20 % FCS) resuspendiert und gewaschen (400 g/RT/7 min). Der Überstand wird erneut abgenommen und das Pellet zuletzt im Zellkulturmedium mit entsprechender FCS-Konzentration aufgenommen. Beim Auftauprozess der Zelllinien und der anschließenden Kultivierung ist auf Unterschiede bezüglich der Medium-

Zusammensetzung, der auszusäenden Zellzahl und der Kulturflasche respektive Wellplatte zu achten. Diese sind in Tabelle 1 beschrieben.

**Tabelle 1: Methoden zur Aufnahme aufgetauter Zelllinien in Zellkultur.**

Zelllinie	Medium	auszusäende Zellzahl (Zellen/ml)	Kulturflasche/Well-Platte
<b>KOPN-8</b>	- 90 % RPMI 1640 + 10 % FCS - Initial 20 % FCS	0,5-1 x 10 <sup>6</sup>	- Initial 12-Well-Platte - Anschließend T75 Zellkulturflasche
<b>MHH-CALL-4</b>	80 % RPMI 1640 + 20 % FCS	1 x 10 <sup>6</sup>	- Initial 24-Well-Platte - Anschließend T75 Zellkulturflasche
<b>NALM-6</b>	90 % RPMI 1640 + 10 % FCS	1 x 10 <sup>6</sup>	T75 Zellkulturflasche
<b>NALM-16</b>	90 % RPMI 1640 + 10 % FCS	1 x 10 <sup>6</sup>	T75 Zellkulturflasche
<b>REH</b>	80 % RPMI 1640 + 20 % FCS	2 x 10 <sup>6</sup>	- Initial 24-Well-Platte - Anschließend T75 Zellkulturflasche
<b>RS4;11</b>	90 % RPMI 1640 + 10 % FCS	0,5 x 10 <sup>6</sup>	T75 Zellkulturflasche

### 2.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Viabilität

In einer unsterilen 96-Well-Platte wird für die zu zählende Zellsuspension, je nach gewünschtem Verdünnungsverhältnis (Zellsuspension/Trypanblau), ein bestimmtes Volumen an Trypanblau in einem Well vorgelegt. Das Verhältnis richtet sich nach der erwarteten Zellkonzentration der Zellsuspension. Optimal sind Mischverhältnisse, welche zu einer Zellzahl von 20-100 Zellen pro großen Quadranten einer Neubauerzählkammer führen. Die Zellsuspension muss vorerst durch mehrmaliges Resuspendieren gut gemischt werden. Ein Aliquot von ca. 0,5 ml wird in ein Eppendorf-Cup gegeben. Nachdem in den Zellkulturen in dieser Arbeit Zellkonzentrationen von ca. 1-3 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml zu erwarten sind, ist für diese eine 1/5 Verdünnung (4 µl Zellsuspension/16 µl Trypanblau) optimal. Trypanblau diffundiert durch die perforierte Zellmembran toter Zellen und färbt diese blau an. Vitale Zellen hingegen schließen Trypanblau aus und erscheinen daher unter dem Lichtmikroskop weiß. Die Zellzahl toter, blauer und lebender, weißer Zellen errechnet sich dann mit folgender Gleichung:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Zählergebnis} \times \text{Verdünnungsfaktor}_{\text{(Trypanblau)}}}{\text{ausgezählte Quadranten}} \times 10^4/\text{ml} \quad (1)$$

Im Rahmen der Analysen zum Viabilitätsverlust nach Inkubation mit den Zytokinen wird der spezifische Zelltod wie folgt berechnet (Fulda et al., 1997; Peng et al., 2001; Podhorecka et al., 2016):

$$\text{Spez. Zelltod [\%]} = \frac{(\% \text{ tote Zellen Behand.} - \% \text{ tote Zellen Kontr.}) \times 100}{(100 - \% \text{ tote Zellen Kontr.})} \quad (2)$$

#### 2.1.4 Split-Intervall und Split-Verhältnis der Zellkulturen

Vom Leibniz-Institut DSMZ wird für jede Zelllinie ein Split-Intervall und Split-Verhältnis sowie die zu haltende Zellzahl nach einem Split zur Orientierung vorgegeben. Diese Vorgaben wurden in den Versorgungsablauf der Zellkulturen im Labor integriert. In Tabelle 2 sind die regelmäßig eingehaltenen Split-Intervalle und -Verhältnisse mit der gehaltenen Zellzahl nach einem Split für jede verwendete Zelllinie aufgetragen. Alle Zellkulturen wurden stets bei einem Gesamtvolumen von 20 ml in einer T75 Zellkulturflasche gehalten.

**Tabelle 2: Split-Intervall und Split-Verhältnis der Zelllinien sowie Zellzahl nach einem Split – d: days/Tage zwischen zwei Split-Vorgängen.**

Zelllinie	Split-Intervall (d)	Split-Verhältnis	Zu haltende Zellzahl nach einem Split (Zellen/ml)
<b>KOPN-8</b>	3 (Mo + Do)	1:2 bis 1:3	0,5-1,5 x 10 <sup>6</sup>
<b>MHH-CALL-4</b>	7 (Mo)	1:2 bis 1:4	> 0,6 x 10 <sup>6</sup>
<b>NALM-6</b>	2-3 (Mo + Mi + Fr)	1:2 bis 1:3	1-2 x 10 <sup>6</sup>
<b>NALM-16</b>	2-3 (Mo + Mi + Fr)	1:1,5 bis 1:2	1-1,5 x 10 <sup>6</sup>
<b>REH</b>	3-4 (Mo + Do)	1:1,5 bis 1:2	> 2 x 10 <sup>6</sup>
<b>RS4;11</b>	3-4 (Mo + Do)	1:2 bis 1:4	0,5-1,0 x 10 <sup>6</sup>

Mithilfe folgender Gleichung lässt sich die Zellverdopplungszeit nach jedem Splitten bestimmen:

$$\text{Zellverdopplungszeit [h]} = \frac{\text{Intervall [h]} \times \log 2}{\log \text{Konzentration}_{\text{End}} - \log \text{Konzentration}_{\text{Anf}}} \quad (3)$$

Um die Zellverdopplungszeit der Zelllinien bestimmen zu können, wurde von Beginn an für jede Zellkultur vor dem Splitten die Zellkonzentration bestimmt. Nach mehrmaligem Splitten wurde die mittlere Verdopplungszeit jeder Zelllinie ermittelt.

## 2.2 Analyse des Viabilitätsverlustes nach Inkubation in spezifischen Zytokin-Milieus

### Pipettierschema

Dieser Versuch wird in einer sterilen 96-Well-Platte an der Sterilbank angesetzt. Das Pipettierschema für die Inkubation einer Zellsuspension mit zwei Zytokinen in Einzel- und Kombinationstherapie wird in Tabelle 3 gezeigt. Es wird eine Zellsuspension mit einer Zellkonzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/100  $\mu$ l hergestellt. Für eine Platte (hier: 50 Wells) ergibt sich eine Gesamtzellzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen in einem Gesamtvolumen von 5 ml.

**Tabelle 3: Pipettierschema Viabilitätsassay in 96-Well-Platte** – für Einzel- und Kombinationstherapie einer Zellsuspension mit zwei Zytokinen eines spezifischen Zytokin-Milieus ( $INF\gamma/TNF\alpha$  oder  $IL10/TGF\beta_1$ ) in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1/1/10/100 ng/ml) mit festgelegter Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen/100  $\mu$ l/Well. Gesamtvolumen pro Well bei 200  $\mu$ l.

Blank	100 $\mu$ l Medium + 100 $\mu$ l Zellsuspension
einfach Zytokin	50 $\mu$ l Medium + 50 $\mu$ l Zytokin (1 o. 2) + 100 $\mu$ l Zellsusp.
zweifach Zytokin	50 $\mu$ l Zytokin 1 + 50 $\mu$ l Zytokin 2 + 100 $\mu$ l Zellsuspension

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 Blank	2 Blank	3	4	5	6	7	8	9	10		
B	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	0,1 ng/ml Zytokin 2	
C	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	1 ng/ml Zytokin 2	
D	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	10 ng/ml Zytokin 2	
E	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	100 ng/ml Zytokin 2	
F			0,1 ng/ml Zytokin 1		1 ng/ml Zytokin 1		10 ng/ml Zytokin 1		100 ng/ml Zytokin 1			
G												
H												

Um die benötigte Zelllösung herzustellen, muss für die zu untersuchende Zellsuspension zunächst deren Zellkonzentration (lebende und tote Zellen) bestimmt werden. Das benötigte Volumen der Zellsuspension sowie des verwendeten Mediums für die korrekt eingestellte Zelllösung im Versuch, errechnet sich mit folgenden Formeln:

$$V_{\text{Zellsuspension}} = \frac{\text{Zellzahl}_{(\text{benötigt})}}{\text{Zellkonzentration}_{(\text{Zellsuspension})} \left[ \frac{1}{\text{ml}} \right]} \quad (4)$$

$$V_{\text{Medium}} = V_{(\text{benötigt})} - V_{(\text{Zellsuspension})} \quad (5)$$

In einem sterilen Falcon (15 ml oder 50 ml) wird das gewünschte Volumen mit der benötigten Zellkonzentration eingestellt.

Im nächsten Schritt werden die Zytokinverdünnungen für  $\text{INF}\gamma/\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL10}/\text{TGF}\beta_1$  mit dem benötigten Volumen vorbereitet. Für jede Zytokinverdünnung werden mindestens 500  $\mu\text{l}$  für insgesamt 10 Wells gebraucht. Da es jedoch zu Pipettierverlusten beim Ansetzen des Versuchs kommt, wird sowohl für die Zellsuspension als auch für die Zytokinverdünnung mehr als das nötige Mindestvolumen hergestellt. Des Weiteren muss beachtet werden, dass in jedem Well mit 50  $\mu\text{l}$  Zytokinzugabe die Zytokinkonzentration von Zytokin 1 und 2 durch das Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$  im Well geviertelt wird. Deshalb wird jede Arbeitskonzentration für das Ansetzen des Versuchs vervierfacht, um auf die gewünschte Endkonzentration, wie in Tabelle 3 beschrieben, zu kommen. Mithilfe einer Verdünnungsreihe können nach Herstellung einer 400 ng/ml Ausgangskonzentration die entsprechenden Konzentrationen mit 40/4/0,4 ng/ml im gewünschten Volumen durch drei aufeinanderfolgende 1/10 Verdünnungen vorbereitet werden.

In die 96-Well-Platte werden dann die Zytokine des Zytokin-Milieus  $\text{INF}\gamma/\text{TNF}\alpha$  oder  $\text{IL10}/\text{TGF}\beta_1$  in entsprechender Menge und Konzentration in die jeweiligen Wells vorgelegt. In den Wells mit Kombinationstherapie zweier Zytokine werden pro Zytokin 50  $\mu\text{l}$  pipettiert. In den Wells mit Einzeltherapie werden hingegen zu den 50  $\mu\text{l}$  Zytokin 1 oder 2 noch 50  $\mu\text{l}$  des passenden Zellkulturmediums hinzugegeben. Zwei Wells, in denen 100  $\mu\text{l}$  Medium vorgelegt werden, dienen als Negativkontrollen (Blank). Mithilfe eines Combipips lassen sich die jeweiligen Volumina einfach und präzise in die entsprechenden Wells pipettieren. Zuletzt werden in jedes Well 100  $\mu\text{l}$  der vorbereiteten Zellsuspension

hinzugegeben. Durch die Anordnung, wie sie im Pipettierschema veranschaulicht ist, produziert man für jede mögliche Zytokinkombination als auch für die Negativkontrolle Doppelwerte, da jeweils zwei Wells ausgelegt werden.

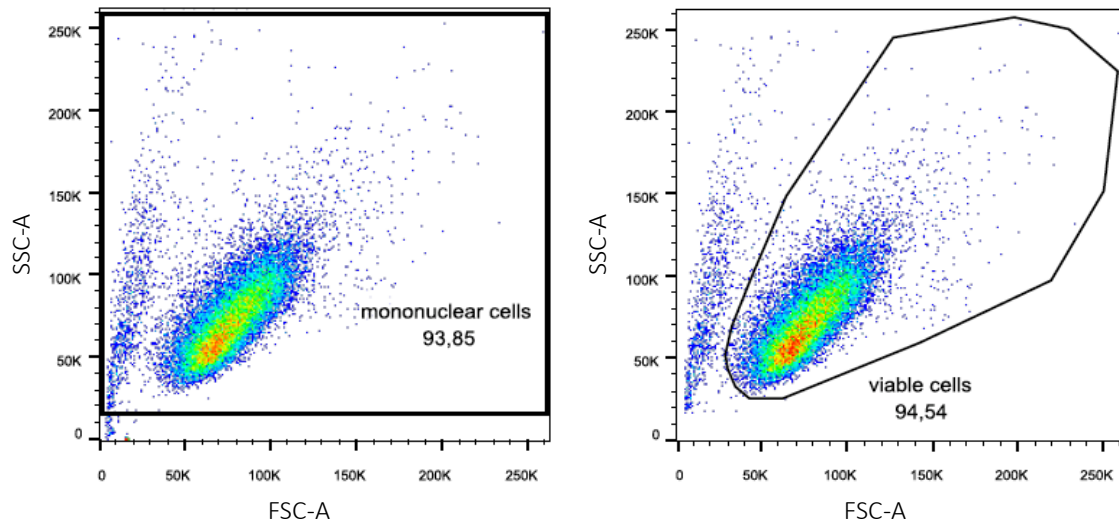
Die fertig pipettierte Platte inkubiert man anschließend bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Inkubationszeit richtet sich nach der zu untersuchenden Zellsuspension. Bei den Zelllinien ist eine 72-stündige Inkubationszeit vorgesehen. Bei den Patientenblasten werden für mehrere Messzeitpunkte auch entsprechend mehr Platten ausgelegt. Patientenblasten, welche man aus dem Stickstofftank auftaut, werden in zwei Platten für eine Inkubationszeit von 24 und 48 Stunden pipettiert. Wenn die Patientenblasten am selben Tag aus einer xenotransplantierten NOD/SCID-Maus gewonnen werden, ist zusätzlich eine Platte mit 72 Stunden Inkubationszeit anzusetzen.

Nach der Inkubationszeit werden die ausgelegten Doppelwerte in einem FACS-Röhrchen gepoolt. Im Anschluss daran erfolgt eine Färbung der Zellen mit Zombie Aqua und anschließender Messung am FACS Gerät, oder direkt die alleinige FSC/SSC-Messung ohne Färbung. Bei jeder Messung wird stets der Zellschrott (Debris) von der Auswertung ausgeschlossen, um ein klareres Verhältnis der Lebend- und Totzellpopulation zu erhalten. Außerdem werden pro Messung 20000 Events gemessen. Das Ergebnis wird folglich als repräsentativ für die gesamte Zellprobe gewertet.

### FSC/SSC

Durch die Bestimmung der Zellgröße im Forward Scatter (FSC) und der Zellgranularität im Side Scatter (SSC) lässt sich durchflusszytometrisch eine Lebendzell- und eine Totzellpopulation identifizieren. Sehr kleine Zellen oder Zellen, die eine hohe Granularität bei geringer Zellgröße aufweisen, sind in der Regel tote Leukämiezellen. Größere Zellen mit weniger oder stärker ausgeprägter Granularität sind hingegen lebende Zellen. Dies lässt sich in Abbildung 1 beispielhaft im Dotplot einer FACS-Analyse mit der Zelllinie RS4;11 unter Verwendung der FlowJo Software veranschaulichen. Durch das Gaten (Einschließen) der Lebendzellpopulation innerhalb der mononuklearen Zellen kann der Anteil lebender Zellen (viable cells) für jede zu messende Probe bestimmt werden.



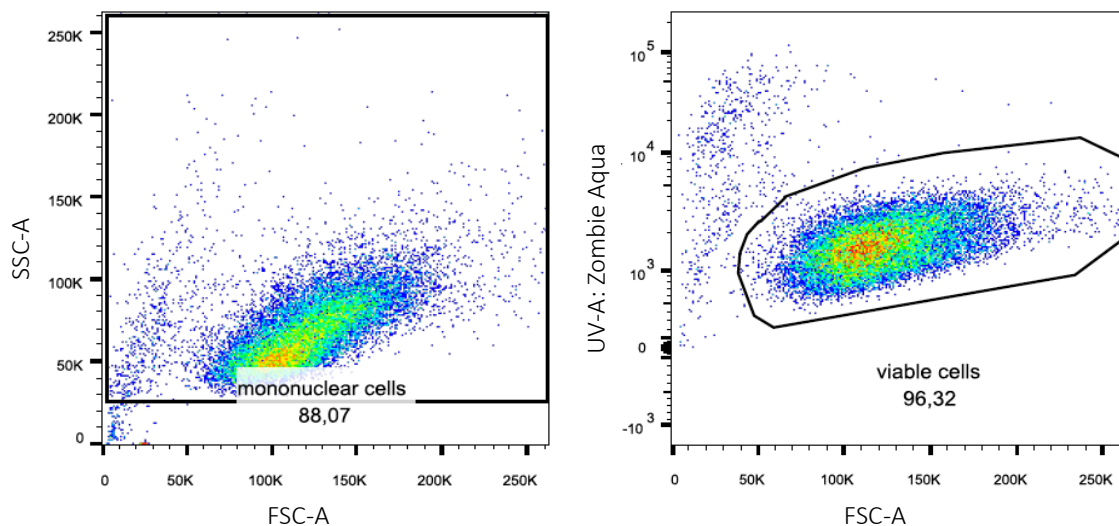


**Abbildung 1: Dotplots einer FACS basierten Viabilitätsanalyse mittels FSC/SSC Messmethode mit der Zelllinie RS4;11 ohne Behandlung** – Links: Ausschluss des Zellschrotts im linken unteren Eck des Dotplots durch das Gaten der Mononuklearen Zellen (93,85 %). Rechts: Gaten der Lebendzellpopulation mit einem Anteil von 94,54 % an den Mononuklearen Zellen. x-Achse: Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht) linear aufgetragen - proportional zur Zellgröße. y-Achse: Side Scatter (Seitwärtsstreulicht) linear aufgetragen - proportional zur Zellgranularität. Farblegende: Dichte der Messsignale von Rot über Grün nach Blau abnehmend.

### Zombie Aqua Färbung

Bei dieser Methode macht man sich die Eigenschaft des Zombie Aquas zunutze, welches tote Zellen anfärbt. Das lyophilisierte Zombie Aqua ist vor Gebrauch mit 100 µl DMSO zu mischen. Es ist sinnvoll 10 µl Aliquots vorzubereiten, um für die geringe Menge, die pro Versuch benötigt wird, nicht zu oft das Reagenz von -20 °C aufzutauen. Die Zellfärbung wird mit einer Zellzahl von 1-5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Röhrchen durchgeführt. Dies ist in dem vorliegenden Versuch durch das Poolen zweier Wells mit je mindestens 1x10<sup>5</sup> Zellen in ein FACS-Röhrchen nach einer Inkubationsdauer von 72 h bei den Zelllinien gegeben (48 h bei den aufgetauten Patientenleukämiezellen). Die Zytokinkonzentration für die Behandlungsgruppe einer Zelllinie liegt bei 10 ng/ml INF $\gamma$ /TNF $\alpha$  oder IL10/TGF $\beta$ <sub>1</sub> in Kombinationstherapie. Nach dem Poolen werden die Zellen im FACS-Röhrchen mit 500 µl 1x PBS gewaschen (450 g/RT/4 min). Der Überstand wird dekantiert und der Rücklauf weiterverwendet. Man gibt 0,5 µl Zombie Aqua pro Röhrchen hinzu und mischt die Lösung des Röhrchens gründlich. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten (RT/dunkel) wird erneut in 500 µl 1x PBS gewaschen (450 g/RT/4 min), der Überstand dekantiert und der Rücklauf weiterverwendet. Bis zur Messung am selben Tag ist die Probe bei 4 °C im Dunkeln zu lagern. Erfolgt die Messung am nächsten Tag, muss man die Zellen mit 1%igem Paraformaldehyd fixieren.

Unter Verwendung des UV-Lasers am FACS Gerät werden schließlich für jede Probe 20000 Events gemessen. Dafür muss darauf geachtet werden, dass im Detektor des UV-Strahlengangs der Filter 525/50 eingebaut ist. Im Dotplot zeigt sich das Bild einer Lebendzellpopulation und einer Population toter, Zombie Aqua-gefärbter Zellen. Dies wird in Abbildung 2 am Beispiel der Zelllinie RS4;11 veranschaulicht.



**Abbildung 2: Dotplots einer FACS basierten Viabilitätsanalyse mittels Zombie Aqua Färbung mit der Zelllinie RS4;11 ohne Behandlung** – Links: Ausschluss des Zellschrotts im linken unteren Eck des Dotplots durch das Gaten der Mononukleären Zellen (88,07 %). Rechts: Gaten der Lebendzellpopulation mit einem Anteil von 96,32 % an den Mononukleären Zellen. x-Achse: Forward Scatter (Vorwärtsstreuung) linear aufgetragen - proportional zur Zellgröße. y-Achse: (links) Side Scatter (Seitwärtsstreuung) linear aufgetragen - proportional zur Zellgranularität; (rechts) logarithmisch aufgetragenes Emissionssignal im Detektor des UV-Lasers; Zombie Aqua-gefärbte Zellen mit höherem Signal im Vergleich zur Lebendzellpopulation. Farblegende: Dichte der Messsignale von Rot über Grün nach Blau abnehmend.

Durch die Zombie Aqua Färbung lässt sich somit ebenfalls der Anteil lebender Zellen bestimmen. Damit stellt diese Färbung eine weitere Methode dar, die Zellviabilität nach Inkubation mit spezifischen Zytokinen in Einzel- und Kombinationstherapie am FACS Gerät zu messen.

### 2.3 Analyse der Zellzyklusphasen und deren Veränderung in spezifischen Zytokin-Milieus

#### Pipettierschema

Dieser Versuch wird in einer sterilen 24-Well-Platte an der Sterilbank angesetzt. Primäre Patientenblasten können für diesen Versuch nicht verwendet werden, da diese in Kultur nicht weiterwachsen. Damit ist kein aussagekräftiges Ergebnis zu den Zellzyklus-

veränderungen nach Zytokininkubtaion möglich. Zelllinien hingegen eignen sich für diesen Versuch, da sie in Kultur für lange Zeit überleben und wachsen können. In Tabelle 4 ist das Pipettierschema für die Inkubation einer Zellsuspension mit zwei Zytokinen in Einzel- und Kombinationstherapie gezeigt.

**Tabelle 4: Pipettierschema Zellzyklusassay in 24-Well-Platte** – für Einzel- und Kombinationstherapie einer Zellsuspension mit zwei Zytokinen eines spezifischen Zytokin-Milieus ( $INF\gamma/TNF\alpha$  oder  $IL10/TGF\beta_1$ ). Blank (-BrdU) als Kontrolle der unspezifischen Bindung des BrdU-Antikörpers. Blank (+BrdU) als Negativkontrolle ohne Behandlung, mit identischer Färbung wie bei Behandlungsproben. Bei der ersten Versuchsreihe in Kombinationstherapie: Spalte 3/4/5 mit 0,1/1/10 ng/ml Kombinationstherapie zweier Zytokine (1+2) eines Milieus. Bei der anschließenden Versuchsreihe in Einzel- und Kombinationstherapie: Spalte 3 mit Zytokin1, Spalte 4 mit Zytokin2, Spalte 5 mit Zytokin 1+2. 10 ng/ml als Standardkonzentration für alle Zelllinien bis auf MHH-CALL-4. Letztere wird mit 5 ng/ml behandelt. In Spalte 6 sind Proben zur Kompensation am FACS Gerät ausgelegt. Gesamtvolumen pro Well bei 1 ml.

	1	2	3	4	5	6
<b>A</b>	Blank (-BrdU)	Blank (+BrdU)	Konz. Zytokin 1 (+ 2)	Konz. Zytokin 2 (+ 1)	Konz. Zytokin 1+2	Blank (Komp.1)
<b>B</b>	Blank (-BrdU)	Blank (+BrdU)	Konz. Zytokin 1 (+ 2)	Konz. Zytokin 2 (+ 1)	Konz. Zytokin 1+2	Blank (Komp.2)
<b>C</b>						Postiv-kontrolle (Komp.3)
<b>D</b>						

Es wird eine Zellsuspension mit einer Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml hergestellt. Für eine Platte (hier: 13 Wells mit Kompensationsproben) ergibt sich eine Gesamtzellzahl von  $13 \times 10^6$  Zellen in einem Gesamtvolumen von 13 ml (1 ml/Well). Da jedoch ein Pipettierverlust beim Ansetzen des Versuchs beachtet werden muss, wird für die Zelllösung mehr als das nötige Mindestvolumen vorbereitet. Zur Herstellung der benötigten Zelllösung bestimmt man für die zu untersuchende Zellsuspension zunächst deren Zellkonzentration (lebende und tote Zellen). Das benötigte Volumen der Zellsuspension sowie des verwendeten Mediums für die korrekt eingestellte Zelllösung im Versuch errechnet sich mit den in Kapitel 2.2 beschriebenen Formeln. Die Zelllösung wird dann mit dem gewünschten Volumen und der oben genannten Zellkonzentration in einem sterilen Flacon (15 oder 50 ml) vorbereitet.

Für die zwei zu testenden Zytokin-Milieus  $INF\gamma/TNF\alpha$  und  $IL10/TGF\beta_1$  wird zu Beginn der Versuchsreihe für jede Zelllinie zunächst eine Kombinationstherapie der beiden Zytokine eines Milieus durchgeführt. Dabei kommen die Konzentrationen 0,1/1/10 ng/ml

zum Einsatz. Im Anschluss daran wird diejenige Konzentration für die folgenden Einzel- und Kombinationstherapieversuche verwendet, bei welcher bereits ein deutlicher Effekt gesehen wurde. Nach den ersten Versuchsreihen kristallisierte sich 10 ng/ml als Standardkonzentration für alle Zelllinien bis auf MHH-CALL-4 heraus. Für zuletzt genannte Zelllinie wird eine etwas niedrigere Konzentration von 5 ng/ml verwendet, da zwischen 1 und 10 ng/ml ein großer Effektsprung in den Vorversuchen zu verzeichnen war. Die minimale Konzentrationsänderung, welche durch die Zugabe eines geringen Zytokinvolumen (2-10 µl) zu einem vergleichbar großen Volumen (1 ml) im Well entsteht, wird vernachlässigt. Am Beispiel der Stockkonzentration von  $\text{INF}\gamma/\text{TNF}\alpha$  (200 ng/µl) wird dies für die Endkonzentration von 10 ng/ml veranschaulicht:

- 1 ng/µl ansetzen (1/200) → 5 µl Zytokin + 995 µl Medium
- 10 µl der Zytokinverdünnung werden in die entsprechenden Wells pipettiert.
- Volumenzunahme um 10 µl wird vernachlässigt ≈ 10 ng/ml Endkonzentration
- Für 0,1 und 1 ng/ml Endkonzentrationen wird eine 1/10 Verdünnungsreihe von 1 ng/µl Ausgangskonzentration hergestellt und ebenfalls 10 µl der Zytokinverdünnung in die entsprechenden Wells pipettiert.

Die in den Zellzyklusanalysen verwendete Stockkonzentration der Zytokine IL10/TGFβ<sub>1</sub> liegt bei 5 ng/µl. Letztlich werden für jede Probe bis auf die Kompensationsproben zwei Wells ausgelegt, um Doppelwerte zu produzieren. In die 24-Well-Platte wird die hergestellte Zellsuspension (1 ml/Well) vorgelegt. Nun pipettiert man die Zytokine in entsprechend vorbereiteter Konzentration (siehe oben) mit dem nötigen Volumen in die vorhergesehenen Wells.

Die fertig pipettierte Platte inkubiert man anschließend bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für insgesamt 96 Stunden. Zu beachten ist die zwischenzeitliche Inkubation mit BrdU die innerhalb der 96 h Gesamtinkubationszeit erfolgt.

#### BrdU Inkubation

BrdU (Bromdesoxyuridin) ist ein anerkannter Proliferationsmarker und wird in phosphorylierter Form anstelle des Desoxythimidintriphosphats von proliferierenden Zellen im Rahmen der Synthesephase des Zellzyklus in die DNA eingebaut. Je nach der Zellverdopplungszeit einer Zellkultur variiert die Inkubationszeit mit BrdU. Durch

Vorversuche wurde für jede Zelllinie eine einstündige BrdU Inkubation ermittelt, außer für MHH-CALL-4, eine sich langsamteilende Zelllinie, welche für 18 Stunden mit BrdU inkubiert wird. Nach dem Protokoll des BrdU Flow Kit wird für BrdU eine 1 mM Arbeitskonzentration hergestellt und mit 10 µl ins entsprechende Well pipettiert:

- BrdU Stockkonzentration: 32,5 mM
- Arbeitskonzentration: 1 mM  $\rightarrow$  1/32,5 Verdünnung = 31 µl<sub>(Stock)</sub> + 976,5 µl<sub>(Medium)</sub>
- Endkonzentration: 10 µM durch 1/100 Verdünnung im Well (10 µl BrdU auf 1 ml Zellsuspension)

#### Zellen ernten, zählen und färben

Nach der Gesamtinkubationsdauer von 96 Stunden werden die Zellen geerntet und die beiden Wells der ausgelegten Doppelwerte in einem 2 ml Eppendorf-Cup gepoolt. Um die Zellkonzentration für die anschließende Färbung auf  $1 \times 10^6$  Zellen einzustellen, werden die Zellen (lebende und tote) gezählt und das errechnete Volumen mit der genannten Zellzahl in ein FACS-Röhrchen überführt. Es erfolgt eine Zellfärbung mit einem Anti-BrdU-FITC Antikörper, um den Proliferationsmarker BrdU im durchflusszytometrischen Verfahren sichtbar zu machen. Zudem untersucht man die Zellen auf ihren DNA-Gehalt mithilfe von 7AAD, eine Nukleinsäure-färbende Substanz. Wie im Protokoll des BrdU Flow Kit beschrieben, werden hierfür die in Tabelle 5 aufgelisteten Reagenzien benötigt und hergestellt.

#### Fixierung und Permeabilisierung der Zellen

Nachdem alle Proben mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen in einem FACS-Röhrchen eingestellt sind, werden die Zellen zunächst in 1 ml Staining Puffer gewaschen (300 g/RT/5 min), der Überstand wird verworfen und der letzte Tropfen mit einem Tuch aufgefangen (gilt auch für kommende Wasch-Schritte). Das Zellpellet resuspendiert man in 100 µl Cytofix/Cytoperm Puffer und inkubiert die Proben für 25 Minuten (RT/dunkel). Die Zellen werden mit 1 ml 1x BD Perm/Wash Puffer gewaschen (300 g/RT/5 min) und das Zellpellet anschließend in 100 µl Cytoperm Plus Puffer resuspendiert. Inkubiert werden die Proben dann für 10 Minuten im Dunkeln auf Eis. Es folgt ein erneuter Waschschritt in 1 ml 1x BD Perm/Wash Puffer (300 g/RT/5 min) und die Aufnahme des Zellpellet in 100 µl Cytofix/Cytoperm Puffer. Nach einer Inkubation für 5 Minuten

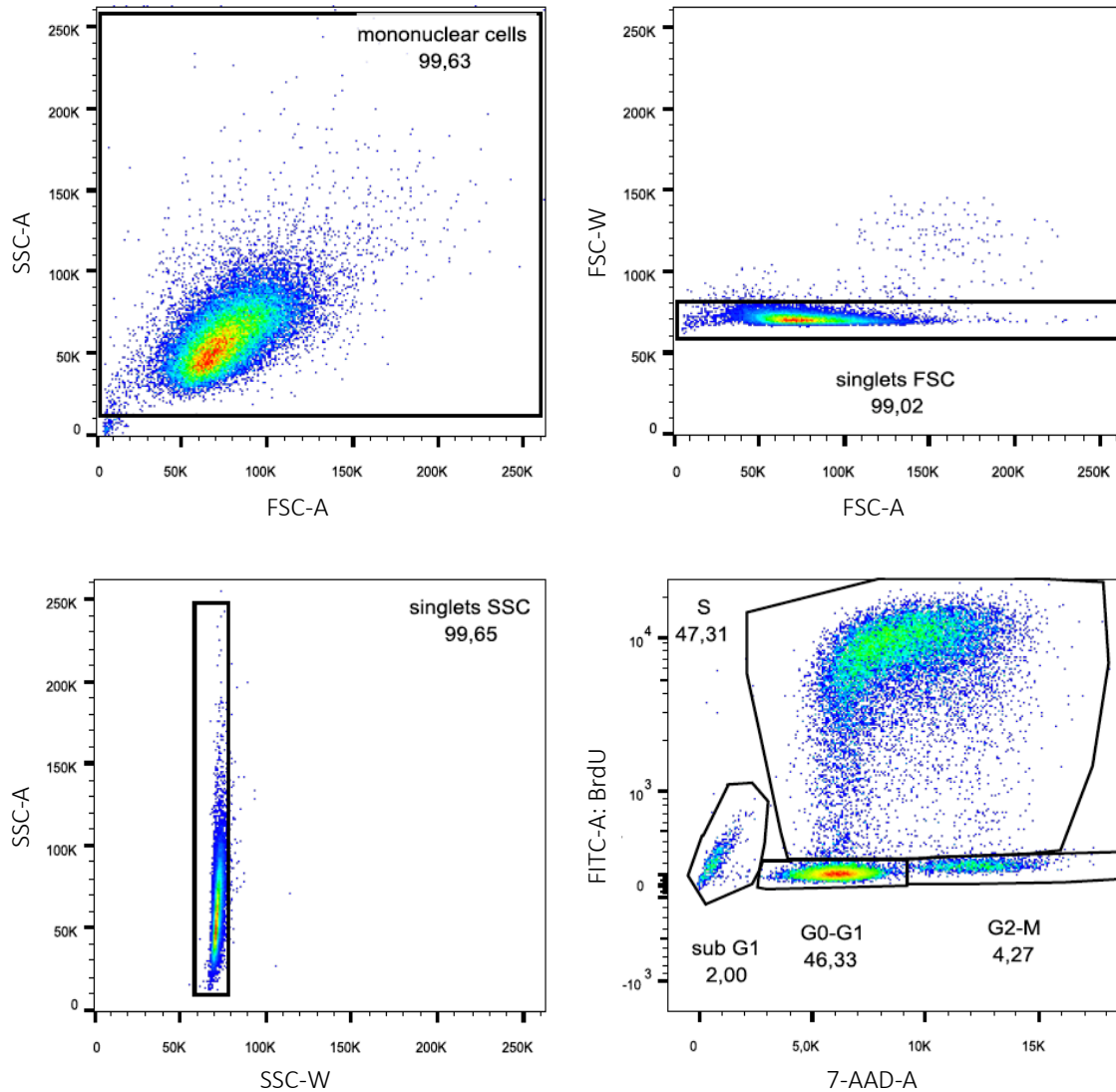
(RT/dunkel) müssen die Proben wieder in 1 ml 1x BD Perm/Wash Puffer (300 g/RT/5 min) gewaschen werden.

### Zellfärbung mit anti-BrdU-FITC Antikörper und 7AAD

Das Zellpellet wird in 100 µl verdünnter Desoxyribonuklease (DNase: 300 µg/ml) resuspendiert und für eine Stunde im Brutschrank (37 °C/5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert, wodurch die DNA der Zellen in kürzere Molekülketten oder einzelne Nukleotide hydrolysiert wird. Nach einem Waschschrift in 1 ml 1x BD Perm/Wash Puffer (300 g/RT/5 min) werden die Zellpellets in 50 µl anti-BrdU-FITC Antikörper (1:50) resuspendiert und für 20 Minuten inkubiert (RT/dunkel). Es folgen zwei Waschschriffe mit je 1 ml 7AAD-Perm/Wash Puffer (300 g/RT/5 min). Die Zellen werden letztlich in 100 µl 7AAD-Staining Puffer resuspendiert, um anschließend am FACS Gerät analysiert zu werden. Erfolgt die Messung erst am nächsten Tag, können die Proben mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei 4 °C im Dunkeln gelagert werden.

*Tabelle 5: Reagenzien im BrdU Flow Kit – Cytofix/Cytoperm Puffer und Cytoperm Plus Puffer sind gebrauchsfertig. 10x BD Perm/Wash Puffer, 7AAD, DNase 1 mg/ml, Anti-BrdU-FITC Antikörper und Staining Puffer müssen verdünnt werden. ddH<sub>2</sub>O: Millipore-Wasser*

Reagenzien	Herstellung
<b>Staining Puffer</b>	48,5 ml 1x PBS + 1,5 ml FCS => 1x PBS + 3 % FCS
<b>Cytofix/Cytoperm Puffer</b>	Gebrauchsfertig
<b>Cytoperm Plus Puffer</b>	Gebrauchsfertig
<b>1x BD Perm/Wash Puffer</b>	1:10 Verdünnung 45 ml ddH <sub>2</sub> O + 5 ml 10x BD Perm/Wash Puffer
<b>7AAD-Perm/Wash Puffer</b>	2 ml je Ansatz 40 µl 7AAD + 2 ml 1x BD Perm/Wash Puffer
<b>7AAD-Staining Puffer</b>	100 µl je Ansatz = 2 µl 7AAD + 98 µl Staining Puffer Stock 1 mg/ml; 300 µl Alliquots
<b>DNase Verdünnung</b>	1:3,33 Verdünnung entspricht 300 µg/ml 100 µl je Ansatz = 30 µl DNase (Stock) + 70 µl 1x PBS
<b>Anti-BrdU-FITC Antikörper</b>	50 µl je Ansatz (1:50 Verdünnung) 1 µl AK + 49 µl 1x BD Perm/Wash Puffer



**Abbildung 3: Dotplots einer FACS basierten Zellzyklusanalyse mittels BrdU/7-AAD Färbung mit der Zelllinie RS4;11 ohne Behandlung** – O.l.: Ausschluss des Zellschrotts im linken unteren Eck des Dotplots durch das Gaten der Mononuklearen Zellen (99,63%). O.r. und u.l.: Ausschluss der Zeldubletten in FSC-A/FSC-W und SSC-W/SSC-A Dotplots. U.r.: Zellzyklusphasen gegatet nach Populationen mit unterschiedlicher Signalstärke von 7-AAD (x-Achse) und FITC: BrdU (y-Achse): (sub G1) 2,00 % tote Zellen, (G0-G1) 46,33 % in G0- oder G1-Phase, (S) 47,31 % in Synthesephase, (G2-M) 4,27 % in G2- oder M-Phase. Farblegende: Dichte der Messsignale von Rot über Grün nach Blau abnehmend.

### Messung und Auswertung

Für jede Probe werden 30000 Events gemessen. Das Ergebnis gilt damit als repräsentativ für die gesamte Zellprobe. Wie in Abbildung 3 beispielhaft an vier Dotplots der Zelllinie RS4;11 zur Bestimmung der Zellzyklusphasen gezeigt, wird bei jeder Messung stets der Zellschrott (Debris) von der Auswertung isoliert. Des Weiteren kann es bei der oben genannten Färbeprozedur dazu kommen, dass Zellen aneinanderhaften. Falschhohe

Signale, die dann einer Zelle zugeordnet würden, können durch das Ausschließen von Zelldoubletten mithilfe spezifischer Gates in FSC-A/FSC-W und SSC-W/SSC-A Dotplots von der Auswertung ausgenommen werden. Letztlich wird mit der durchflusszytometrischen Untersuchung am FACS Gerät der DNA-Gehalt als auch die Menge des in die DNA eingebauten BrdU bestimmt, welche proportional zur gemessenen Signalstärke von 7-AAD respektive FITC sind. Durch diese beiden Parameter ist festzuhalten, in welcher Zellzyklusphase sich eine gemessene Zelle befindet.

## 2.4 Bestimmung des Zelltodmechanismus nach Inkubation in spezifischen Zytokin-Milieus

### 2.4.1 Analyse mittels FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit mit 7-AAD im T<sub>H</sub>1 spezifischen Zytokin-Milieu

#### Pipettierschema

Für diesen Versuch wird eine 24-Well-Platte benötigt, welche an der Sterilbank zu pipettieren ist. Das Pipettierschema für die Therapie der Zelllinien mit T<sub>H</sub>1 Zytokinen in Einzel- und Kombinationstherapie ist Tabelle 6 zu entnehmen.

**Tabelle 6: Pipettierschema Analyse des Zelltodmechanismus mittels FITC Annexin V/7-AAD Färbung in 24-Well-Platte** – für Einzel- und Kombinationstherapie von sechs Zelllinien mit T<sub>H</sub>1 Zytokinen (IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ ). Zytokin-konzentrationen bei 10 ng/ml. Gesamtvolumen pro Well bei 1 ml.

Blank	500 $\mu$ l Medium + 500 $\mu$ l Zellsuspension
Einfach Zytokin	250 $\mu$ l Medium + 250 $\mu$ l Zytokin (1 o. 2) + 500 $\mu$ l Zellsusp.
Zweifach Zytokin	250 $\mu$ l Zytokin 1 + 250 $\mu$ l Zytokin 2 + 500 $\mu$ l Zellsusp.

	1	2	3	4	5	6
	Zelllinie 1	Zelllinie 2	Zelllinie 3	Zelllinie 4	Zelllinie 5	Zelllinie 6
A	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
B	10 ng/ml TNF $\alpha$	10 ng/ml TNF $\alpha$	10 ng/ml TNF $\alpha$	10 ng/ml TNF $\alpha$	10 ng/ml TNF $\alpha$	10 ng/ml TNF $\alpha$
C	10 ng/ml IFN $\gamma$	10 ng/ml IFN $\gamma$	10 ng/ml IFN $\gamma$	10 ng/ml IFN $\gamma$	10 ng/ml IFN $\gamma$	10 ng/ml IFN $\gamma$
D	10 ng/ml TNF $\alpha$ + 10 ng/ml IFN $\gamma$	10 ng/ml TNF $\alpha$ + 10 ng/ml IFN $\gamma$	10 ng/ml TNF $\alpha$ + 10 ng/ml IFN $\gamma$	10 ng/ml TNF $\alpha$ + 10 ng/ml IFN $\gamma$	10 ng/ml TNF $\alpha$ + 10 ng/ml IFN $\gamma$	10 ng/ml TNF $\alpha$ + 10 ng/ml IFN $\gamma$



Die Zytokinkonzentration liegt in dieser Versuchsreihe bei 10 ng/ml. Für jede Zelllinie wird eine Zellsuspension mit einer Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml und einem Mindestvolumen von 2 ml für vier Wells vorbereitet. Durch die Zugabe von 500  $\mu$ l Medium und/oder Zytokinen halbiert sich die Zellkonzentration in jedem Well auf  $5 \times 10^5$  Zellen/ml. Damit ist die Zellkonzentration im Well identisch mit jener in den Viabilitätsassays ( $5 \times 10^4$  Zellen/100  $\mu$ l). Dies ist für die Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse von Bedeutung. Um die benötigte Zelllösung herzustellen, bestimmt man für die zu untersuchende Zellsuspension zunächst deren Zellkonzentration (lebende und tote Zellen). Das benötigte Volumen der Zellsuspension sowie des verwendeten Mediums errechnet sich mit den in Kapitel 2.2 beschriebenen Formeln. Für die Herstellung der Zytokinverdünnungen für INF $\gamma$  und TNF $\alpha$  (Stockkonzentration 200 ng/ $\mu$ l) muss darauf geachtet werden, dass die Zytokinkonzentration bei dem Eigenvolumen von 250  $\mu$ l im Gesamtvolumen von 1 ml geviertelt wird. Es wird daher eine Arbeitskonzentration von 40 ng/ml vorbereitet, um im Well eine Endkonzentration von 10 ng/ml zu erreichen. Für sechs Zelllinien wird pro Zytokin ein Mindestvolumen von 3 ml benötigt. Sowohl für die Zelllösung als auch für die Zytokinverdünnungen wird jedoch mehr als das nötige Mindestvolumen vorbereitet, um den Pipettierverlust beim Auslegen zu berücksichtigen. Für die Zytokinverdünnung ergibt sich demnach folgendes Schema:

- Vorverdünnung 400 ng/ml: 1  $\mu$ l Zytokin (Stock) + 499  $\mu$ l Medium (1:500)
- 40 ng/ml: z.B. 400  $\mu$ l Vorverdünnung + 3600  $\mu$ l Medium (1:10)

Die Volumina werden schließlich, wie in Tabelle 6 gezeigt, in die vorgesehenen Wells pipettiert. Dabei wird je nach Well das Volumen des Mediums und/oder der Zytokinverdünnung vorgelegt und die Zellsuspension mit 500  $\mu$ l zum Schluss hinzugegeben.

Die Platte ist schließlich für 72 Stunden bei 37 °C und 5 % CO $_2$  zu inkubieren.

In dieser Versuchsreihe wurden die Zelllinien MHH-CALL-4 und NALM-16 zusätzlich zur Inkubationsdauer von 72 h über 24 h und 48 h inkubiert, um eine Reaktionskinetik über drei Zeitpunkte darstellen zu können.

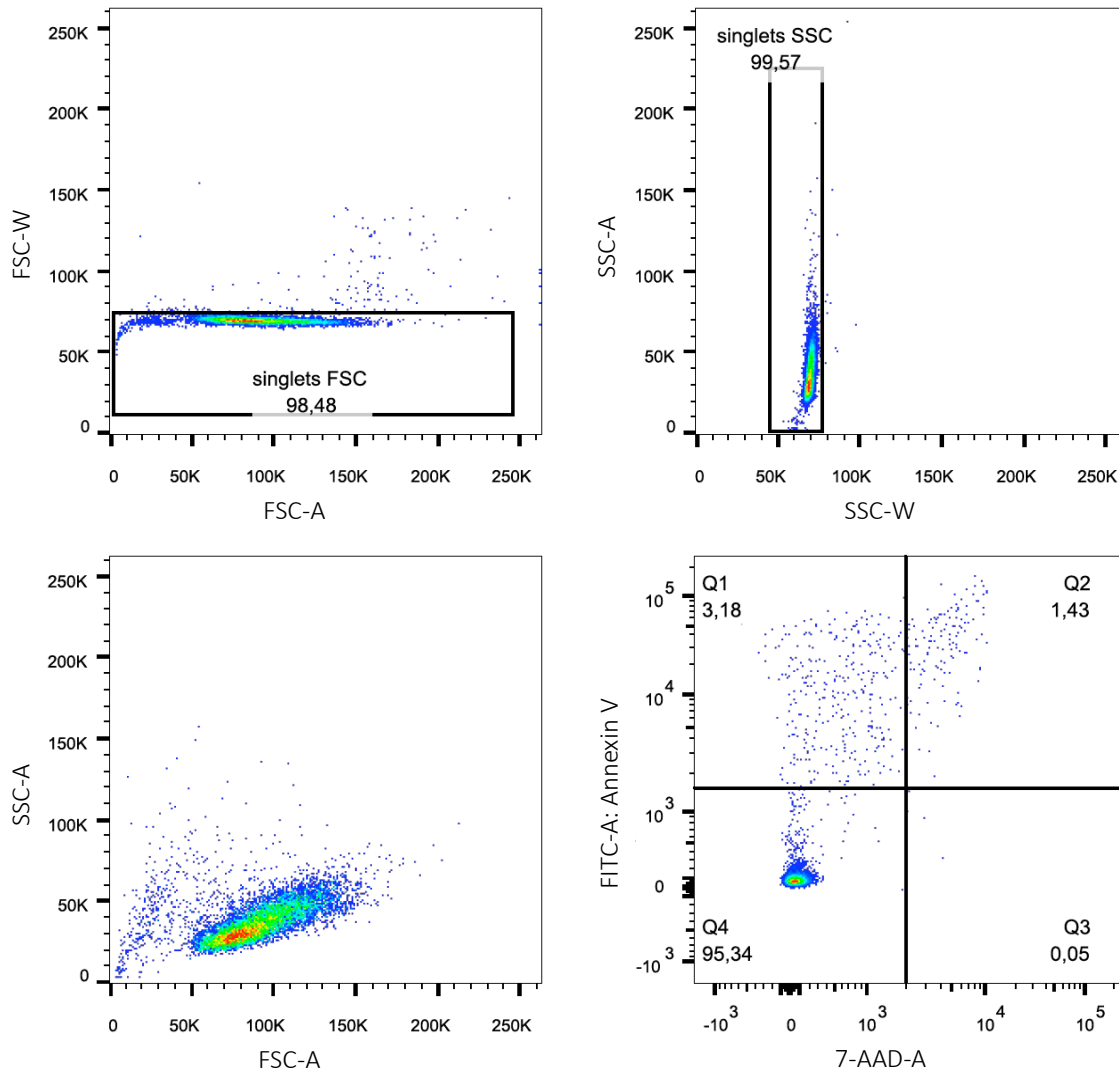
### Zellen ernten und färben

Nach der Inkubationsdauer von 72 h werden die Zellen eines jeden Wells von der Platte in einzelne FACS-Röhrchen überführt. Dem Protokoll des FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit mit 7-AAD entsprechend, werden die Zellen in den Röhrchen zweimal mit je 2 ml 1x Annexin V Binding Puffer (450 g/RT/4 min) gewaschen. Das Zellpellet wird nach dem zweiten Waschschrift in 100 µl 1x Annexin V Binding Puffer resuspendiert und zur Färbung der Zellen werden 1 µl FITC Annexin V und 5 µl 7-AAD Viability Staining Solution hinzugegeben. Jedes Röhrchen wird anschließend vorsichtig gevortext.

Es folgt eine Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur und im Dunkeln. Es werden dann 200 µl Annexin V Binding Puffer in jedes Röhrchen gegeben, um im Anschluss direkt am FACS Gerät zu messen.

### Messung und Auswertung

Für jede Probe werden 10000 Events gemessen. Bei der Auswertung der Ergebnisse mittels der FlowJo Software ist es notwendig, analog zur Zellzyklusanalyse, mögliche Zelldoubletten durch das Setzen spezifischer Gates in FSC-A/FSC-W und SSC-W/SSC-A Dotplots auszuschließen (Abbildung 4). Mit dieser Vorauswahl ist es im nächsten Schritt möglich, anhand der FITC Annexin V und 7-AAD Färbung zwischen lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen zu unterscheiden. Früh-apoptotische Zellen werden durch den flip-flop des Phosphatidylserins vom FITC Annexin V markiert und erscheinen im Quadranten Q1. Nekrotische Zellen werden vom Nukleinsäure-färbenden Lebend-/Totfarbstoff 7-AAD gefärbt und dadurch im Quadranten Q3 detektiert. Im Quadranten Q2 sind schließlich doppelt gefärbte (FITC Annexin V und 7-AAD positiv), spät-apoptotische Zellen auszumachen. Lebende Zellen sind ungefärbt und daher im Quadranten Q4 zu finden.



**Abbildung 4: Dotplots einer FACS basierten Analyse des Zelltodmechanismus mittels FITC Annexin V/7-AAD Färbung mit der Zelllinie RS4;11 ohne Behandlung** – O.l. und o.r.: Ausschluss der Zelldubletten in FSC-A/FSC-W und SSC-W/SSC-A Dotplots. U.l.: FSC-A/SSC-A Dotplot der eingeschlossenen einzelnen Zellen. U.r.: Einteilung der Zellen nach deren Signalstärke von 7-AAD (x-Achse) und FITC: Annexin V (y-Achse) in vier Quadranten: (Q1) 3,18 % Annexin V (+)/7-AAD (-) früh-apoptotische Zellen, (Q2) 1,43 % Annexin V (+)/7-AAD (+) spät-apoptotische Zellen, (Q3) 0,05 % Annexin V (-)/7-AAD (+) nekrotische Zellen, (Q4) 95,34 % Annexin V (-)/7-AAD (-) lebende Zellen. Farblegende: Dichte der Messsignale von Rot über Grün nach Blau abnehmend.

#### 2.4.2 Analyse der Caspasen-Aktivierung

Caspasen sind proteolytische Enzyme der Apoptosesignalkaskade, welche durch intrinsische (DNA-Schaden) oder extrinsische (Aktivierung von Death Rezeptoren) Signale ausgelöst werden kann. Die Effektor-Caspasen 3 und 7 sind nach deren Aktivierung im Rahmen des programmierten Zelltods für die geordnete morphologische Veränderung der Zelle verantwortlich. Die Detektion ihrer enzymatischen Aktivität beweist demzufolge eine ablaufende Apoptose der untersuchten Zellen.

## Pipettierschema

Dieser Versuch wird in einer sterilen, schwarzen 96-Well-Platte an der Sterilbank angesetzt. Wie in Tabelle 7 für vier verschiedene Zellsuspensionen gezeigt, gibt es neben den Zytokinbehandlungen der zu untersuchenden Zellsuspension auch Negativ- und Positivkontrollen sowie reine Mediumkontrollen (hier als Blanks bezeichnet).

**Tabelle 7: Pipettierschema plattenbasierter Caspase 3/7-Assay in 96-Well-Platte** – für vier verschiedene Zellsuspensionen (Zs1-Zs4). Schwarz ctrl\_1: Positivkontrolle mit 1  $\mu$ M Staurosporin. Hell-Grau ctrl: Negativkontrollen. Dunkel-Grau 1: Kombinationstherapie des Zytokin-Milieus IL10/TGF $\beta$ <sub>1</sub> mit einer Konzentration von 10 ng/ml. Dunkel-Grau 2: Kombinationstherapie des Zytokin-Milieus IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  mit einer Konzentration von 10 ng/ml. Weiß Blank: reine Mediumkontrollen. Schwarz ctrl\_2: Positivkontrolle mit 100 nM Staurosporin. Alle Proben sind dreifach ausgelegt.

Blank	100 $\mu$ l Medium (10 % oder 20 % FCS) + 100 $\mu$ l Apo-ONE <sup>®</sup> Caspase-3/7 Reagenz (nach Inkubation)
Negativkontrolle	50 $\mu$ l Zellsuspension + 50 $\mu$ l Medium + 100 $\mu$ l Apo-ONE <sup>®</sup> Caspase-3/7 Reagenz (nach Inkubation)
Positivkontrolle (1 o. 2)	50 $\mu$ l Zellsuspension + 50 $\mu$ l Medium + Staurosporin in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (3 Stunden vor Inkubationsende) + 100 $\mu$ l Apo-ONE <sup>®</sup> Caspase-3/7 Reagenz (nach Inkubation)
Behandlung (1 o. 2)	50 $\mu$ l Zellsuspension + 50 $\mu$ l Zytokinkombination 1 oder 2 (10 ng/ml) + 100 $\mu$ l Apo-ONE <sup>®</sup> Caspase-3/7 Reagenz (nach Inkubation)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Zs1</b>	ctrl_1	ctrl_1	ctrl_1	ctrl	ctrl	ctrl	1	1	1	2	2	2
<b>B</b>	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
<b>Zs2</b>	ctrl_1	ctrl_1	ctrl_1	ctrl	ctrl	ctrl	1	1	1	2	2	2
<b>C</b>	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
<b>Zs3</b>	ctrl_1	ctrl_1	ctrl_1	ctrl	ctrl	ctrl	1	1	1	2	2	2
<b>D</b>	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
<b>Zs4</b>	ctrl_1	ctrl_1	ctrl_1	ctrl	ctrl	ctrl	1	1	1	2	2	2
<b>E</b>	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
	Blank	Blank	Blank		<b>Zs1</b>	ctrl_2	ctrl_2	ctrl_2				
<b>F</b>	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
					<b>Zs2</b>	ctrl_2	ctrl_2	ctrl_2				
<b>G</b>	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
					<b>Zs3</b>	ctrl_2	ctrl_2	ctrl_2				
<b>H</b>	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
					<b>Zs4</b>	ctrl_2	ctrl_2	ctrl_2				

Bei diesem Assay werden pro Behandlungsprobe sowie Negativ- und Positivkontrolle in ein Well 50  $\mu$ l der zu untersuchenden, vorbereiteten Zelllösung pipettiert. Das

Gesamtvolumen liegt nach Zugabe von 50 µl einer Zytokinkombination respektive 50 µl Medium bei 100 µl. Analog zu Kapitel 2.4.1 ist es von Bedeutung sehr ähnliche Versuchsbedingungen wie bei den Viabilitätsassays herzustellen, um vergleichbare Ergebnisse bezüglich eines Viabilitätsverlustes und der möglichen Aktivierung der Effektor-Caspasen 3 und 7 durch Apoptose zu bekommen. Demnach wird für diesen Versuch jede Zelllösung mit einer Zellkonzentration von  $5 \times 10^4$  Zellen/50 µl und einem Mindestvolumen von 750 µl für 15 Wells vorbereitet, um im Gesamtvolumen von 100 µl/Well dieselbe Zellkonzentration wie in den Viabilitätsassays zu erhalten. Hierzu muss für die zu untersuchende Zellsuspension zunächst deren Zellkonzentration (lebende und tote Zellen) bestimmt werden. Das benötigte Volumen der zu untersuchenden Zellsuspension sowie des verwendeten Mediums errechnet sich mit den in Kapitel 2.2 beschriebenen Formeln.

Die Zytokinkombinationen der Zytokin-Milieus  $\text{INF}\gamma/\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL}10/\text{TGF}\beta_1$  werden jeweils mit einer Konzentration von 10 ng/ml gemischt hergestellt (analog zu Kapitel 2.4.1 und Zombie Aqua Assay). Um die Halbierung der Zytokinkonzentration nach Zugabe von 50 µl der Zytokinkombination zu 50 µl Zelllösung auszugleichen, muss die Arbeitskonzentration auf 20 ng/ml verdoppelt werden. Sowohl für die Zelllösung als auch für die Zytokinverdünnungen wird mehr als das nötige Mindestvolumen vorbereitet, um den Pipettierverlust beim Auslegen zu berücksichtigen.

Für die Positiv- und Negativkontrollen verwendet man 50 µl der vorbereiteten Zelllösung und 50 µl des entsprechenden Mediums. Die reinen Mediumkontrollen (Blanks) aller verwendeten Medien werden mit 100 µl ausgelegt. Für beide Positivkontrollen sowie für beide Behandlungsgruppen der Zytokin-Milieus werden alle Proben des Versuchs dreifach angesetzt. Dies gilt auch für die Negativ- und Mediumkontrollen.

Nach dem Auslegen der Platte wird diese für eine Inkubationszeit von 72 Stunden bei den Zelllinien und 48 Stunden bei den aufgetauten Patientenleukämiezellen in den Brutschrank bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  gegeben.

#### Zugabe von Staurosporin

Die Zugabe zweier unterschiedlicher Konzentrationen von Staurosporin, ein Apoptose-auslösendes Agens, zu den Positivkontrollen erfolgt 3 Stunden vor Inkubationsende. 5 µl einer Staurosporinverdünnung werden dem jeweiligen Well mit 50 µl Zelllösung und

50 µl Medium zugegeben. Dadurch ergibt sich eine Verdünnung von 1:21, die bei der Herstellung der Arbeitskonzentration von Staurosporin beachtet werden muss. Die zu erreichende Endkonzentration von Staurosporin für die Positivkontrolle 1 ist 1 µM beziehungsweise 100 nM für die Positivkontrolle 2. Die Arbeitskonzentrationen werden aus einer Stock-Konzentration von 1 mM und dem entsprechenden Zellkulturmedium hergestellt.

Die Positivkontrollen werden als interne Kontrolle des Ansatzes mitgeführt, um das Messsignal möglicher Caspasen-Aktivierungen bei den Behandlungsgruppen mit einer Caspasen-Aktivierung durch ein Apoptose-auslösendes Agens in den Positivkontrollen zu bestätigen.

#### Herstellung, Zugabe und Wirkprinzip des Apo-ONE® Caspase-3/7 Reagenz

Das Apo-ONE® Caspase-3/7 Reagenz wird protokollgerecht aus dem Substrat und dem Puffer des Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay hergestellt. Beide sind bei -20 °C gelagert und werden für den Versuch auf Zimmertemperatur aufgetaut und gut geschüttelt. Für jedes zu messende Well wird ein Volumen von 100 µl Apo-ONE® Caspase-3/7 Reagenz benötigt. Je nach Höhe des daraus resultierenden Gesamtvolumens an Apo-ONE® Caspase-3/7 Reagenz, wird ein entsprechendes Volumen an Substrat mit dem Puffer 1:100 verdünnt und gut gevortext (z.B. 100 µl von 100x Substrat zu 9900 µl Puffer für insgesamt 100 Proben-Wells). Das hergestellte Apo-ONE® Caspase-3/7 Reagenz ist lichtgeschützt bei 4 °C bis zu 24 Stunden haltbar und darf nicht erneut eingefroren oder gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Substrat und Puffer muss vermieden werden.

Nach der Gesamtinkubationszeit von 72 Stunden bei den Zelllinien und 48 Stunden bei den aufgetauten Patientenleukämiezellen werden nun 100 µl des bereitgestellten Apo-ONE® Caspase-3/7 Reagenz jedem Well der Versuchsplatte zugegeben, sodass sich ein Gesamtmessvolumen von 200 µl ergibt. Folglich wird die Platte für eine weitere Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zur anschließenden Messung im Brutschrank inkubiert.

Durch den Puffer des hergestellten Reagenz, welcher die Zellen in jedem Well lysiert, wird dem Substrat (Rhodamine 110, bis-(N-CBZ-l-aspartyl-l-glutamyl-l-valyl-aspartic acid amide) (Z-DEVD-R110)) ermöglicht, mit den Effektor-Caspasen 3 und 7 in Kontakt zu treten. Die Caspasen spalten durch ihre enzymatische Aktivität das Z-DEVD-R110 am

C-terminalen Ende des Aspartats der DEVD Aminosäuresequenz, wodurch das Rhodamine 110 nun ungebunden und bei einer Exzitations-Wellenlänge von 499 nm fluoreszierend vorliegt. Die Menge an fluoreszierendem Produkt ist damit proportional zu der Menge an aktiven Effektor-Caspasen 3 und 7 in der jeweiligen zu messenden Probe.

### Messung und Auswertung

Nach der Inkubationszeit von einer Stunde mit dem Apo-ONE® Caspase-3/7 Reagenz erfolgt die Messung am Mikroplatten Photometer. Die Exzitations-Wellenlänge liegt bei  $485 \pm 20$  nm (optimal 499 nm), die Emissions-Wellenlänge bei  $530 \pm 25$  nm (optimal 521 nm). Es werden vier aufeinanderfolgende Messungen mit einem Zwischenintervall von 20 Minuten durchgeführt. In Kapitel 3 sind die Auswertungen der dritten Messung und damit insgesamt 100 Minuten nach Zugabe des Apo-ONE® Caspase-3/7 Reagenz dargestellt. Das Verhältnis der Messwerte zwischen den einzelnen Messungen blieb für jede Probe konstant.

Bei der Messung wird für jedes Well die Fluoreszenzintensität in der relativen Fluoreszenzeinheit (RFU) angegeben. Aus den drei Werten, der dreifach ausgelegten Proben des Versuchs, werden Mittelwerte gebildet. Anschließend wird von jedem Mittelwert der Proben (Assay RFU) die Mediumkontrolle (Blank RFU) abgezogen. Dadurch subtrahiert man die gemessene Hintergrundfluoreszenz, welche durch das Apo-ONE® Caspase-3/7 Reagenz und das Zellkulturmedium entstehen kann, von der gemessenen Fluoreszenzintensität.

## 2.5 Quantifizierung spezifischer Zytokinrezeptoren auf der Zelloberfläche

Es werden die Zytokinrezeptoren Interferon Gamma Rezeptor 1 (IFNGR1), TNF Rezeptor Typ 1 (TNFR-1), TNF Rezeptor Typ 2 (TNFR-2) als auch membrangebundenes TNF $\alpha$  bei den Zelllinien und Patientenleukämiezellen quantifiziert. Um im durchflusszytometrischen Verfahren die einzelnen Rezeptoren sowie das membrangebundene TNF $\alpha$  der zu messenden Zellen sichtbar zu machen, werden diese mit monoklonalen direkt konjugierten IgG FACS-Antikörpern markiert. Neben der Rezeptor- und mTNF $\alpha$ -Markierung wird auch das humane B-Lymphozytenantigen CD19

der Zellen angefärbt, um explizit die CD19<sup>+</sup> Leukämiezellen der zu untersuchenden Zelllösung zu detektieren und differenziert analysieren zu können. In Tabelle 8 sind die verwendeten Antikörper-Fluorochrom-Kombinationen für die Quantifizierung aufgetragen.

**Tabelle 8: Antikörper-Fluorochrom-Kombinationen zur Quantifizierung spezifischer Zytokinrezeptoren** – aufgelistet ist das Epitop, das direkt konjugierte Fluorochrom, der Isotyp, die Firma sowie Katalognummer (Kat.-Nr.) und das verwendete Probenvolumen des jeweiligen Antikörpers.

<b>Epitop</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Firma</b>	<b>Kat.-Nr.</b>	<b>Probenvolumen</b>
<b>TNFR-1 (CD120a)</b>	APC	Mouse IgG1	R&D Systems	FAB225A	10µl
<b>TNFR-2 (CD120b)</b>	APC	Mouse IgG2a	R&D Systems	FAB226A	10µl
<b>IFNGR1 (CD119)</b>	PE	Mouse IgG2b	BioLegend	308704	5µl
<b>TNFα</b>	BV421	Mouse IgG1	BioLegend	502932	5µl
<b>CD19</b>	APC	Mouse IgG1	BioLegend	302212	0,5µl (5µl einer 1:10 Verdünn.)
<b>CD19</b>	PE	Mouse IgG1	BioLegend	302208	0,5µl (5µl einer 1:10 Verdünn.)

In einem FACS-Röhrchen werden 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/100 µl für jede zu färbende Probe und für jede ungefärbte Kontrolle der zu untersuchenden Zellsuspension vorbereitet. Die Röhrchen werden zentrifugiert (300 g/RT/5 min) und das Zellpellet in 100 µl FACS-Puffer (1x PBS + 2 % FCS) aufgenommen.

Um im Anschluss an die Messung die detektierte Fluoreszenzintensität der Proben quantifizieren zu können, ist es notwendig, Microbeads mitzuführen. Mithilfe der Beads wird eine Standardkurve generiert, mit welcher die gemessene Fluoreszenzintensität jeder Zelle als Antikörperbindungskapazität (ABC) dargestellt werden kann. Verwendet werden hierfür Quantum Simply Cellular<sup>®</sup> Beads gegen Immunglobulin G der Maus. Je ein Tropfen der QSC Beads (Blank und B1 bis B4) wird nach dem Schütteln der Fläschchen in entsprechend beschriftete FACS-Röhrchen gegeben. Den Beads-Röhrchen werden jeweils noch 50 µl FACS-Puffer hinzugefügt, um ein Gesamtvolumen von ca. 100 µl zu erreichen. Zu den Beads B1 bis B4 und zu den vorbereiteten zu färbenden Zellen gibt man den zu testenden direkt konjugierten monoklonalen IgG FACS-Antikörper mit einem bestimmten Volumen, welches durch eine Antikörpertitration in

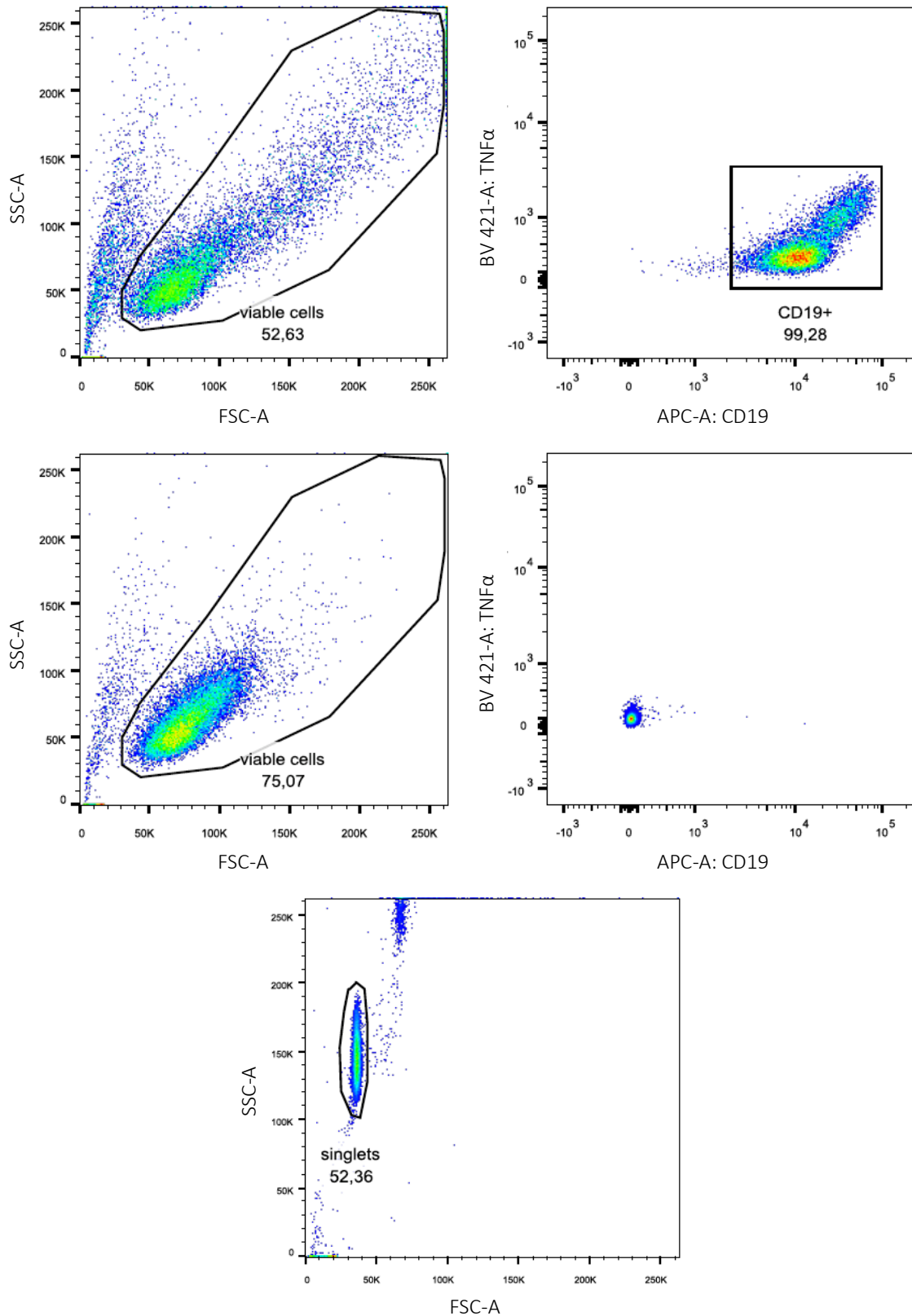


Vorversuchen ermittelt wurde, hinzu. Die angewandten Volumina sind in Tabelle 8 beschrieben. Nur zu den zu färbenden Zellen wird auch der CD19 Antikörper pipettiert. Die Röhrchen, zu denen Antikörper gegeben wurden, werden anschließend vorsichtig gevortext. Die Beads-Röhrchen sind lediglich durch leichtes Schütteln zu mischen. Um ein Überlappen der Emissionsspektren möglichst zu verhindern, wird der CD19/PE Antikörper nur mit APC konjugierten Antikörpern kombiniert, der CD19/APC Antikörper hingegen nur mit PE und BV421 konjugierten Antikörpern.

Es folgt eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur, im Dunkeln. Anschließend werden alle Röhrchen zweimal in 500 µl FACS-Puffer gewaschen (2500 g/RT/5 min). Beim ersten Waschschrift wird der Überstand abgekippt und der letzte Tropfen mit einem Tuch aufgefangen, um möglichst wenig Rücklauf zum Zellpellet zu haben. Beim zweiten Waschschrift wird der Rücklauf weiterverwendet. Die Beads-Röhrchen werden nach dem Waschen mit 200 µl FACS-Puffer aufgefüllt.

#### Messung und Auswertung

Für jede Probe werden 20000 Events am Durchflusszytometer gemessen. Das Ergebnis gilt damit als repräsentativ für die gesamte Zellprobe und die jeweiligen Beads. Wie in Abbildung 5 beispielhaft mit der Zelllinie RS4;11 gezeigt wird, ist bei der Auswertung der Zellproben zu beachten, dass zunächst auf die Lebendzellpopulation (viable cells) gegatet wird. Anschließend wählt man die CD19<sup>+</sup> gefärbten Leukämiezellen als Population aus. Das Fluoreszenzsignal des gebundenen konjugierten Antikörpers wird für die CD19<sup>+</sup> Zellen im geometrischen Mittel und im Median-Wert angegeben. Um falschhohe Signale von Dubletten bei den Beads auszuschließen, wird bei diesen diejenige Population bestimmt, welche aus alleinstehenden Beads besteht. Analog zu den Zellproben wird auch für die Beads (Blank und B1 bis B4) das geometrische Mittel und der Median-Wert der Fluoreszenzintensität der gebundenen konjugierten Antikörper bestimmt. Mithilfe der Excel-Datei von Bangs Laboratories (QuickCal V. 2.3) ordnet man die geometrischen Mittel und die Median-Werte der Fluoreszenzintensitäten der Beads deren Lotnummer-spezifischen Antikörperbindungskapazitäten zu, die vom Hersteller angegeben sind.



**Abbildung 5: Dotplots einer FACS basierten Quantifizierung von mTNF $\alpha$  mit der Zelllinie RS4;11 – O.l.: Gaten der Lebendzellpopulation der gefärbten Zellen (52,63 %). O.r.: Gefärbte Lebendzellpopulation gated auf CD19 positive Zellen (99,28 %) - darin Zellen mit unterschiedlich hoher Signalstärke von BV421: TNF $\alpha$ . M.l.: Gaten der Lebendzellpopulation der ungefärbten Zellen (75,07 %). M.r.: Ungefärbte Lebendzellpopulation als Kontrolle mit sehr geringer Hintergrundfluoreszenz von BV421: TNF $\alpha$  und APC:CD19. U.m.: Single-Beads-Population (52,36 %) der B1-Beads.**

Anhand der Eichgerade, die dann durch die Excel-Datei erstellt wird, lässt sich jedem geometrischen Mittel und Median-Wert der gemessenen Zellproben eine ABC aus der entsprechenden Standardkurve zuordnen. Für die ungefärbten Kontrollen wird dieselbe Prozedur durchgeführt, jedoch mit einer CD19<sup>-</sup> Population, da keine Färbung vorliegt. Hierbei wird die Hintergrundfluoreszenz detektiert, welche durch Eigenfluoreszenz der Zelle entstehen kann. Für die weitere Auswertung der Daten im Ergebnisteil wird die ABC des geometrischen Mittels der Fluoreszenzintensität verwendet.

### 3. Ergebnisse

Im ersten Schritt der Versuchsreihen war es von Interesse, mögliche Viabilitätsveränderungen durch die Zytokine bei den B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien sowie primären Patientenblasten zu analysieren, um einen ersten Überblick über das Reaktionsverhalten dieser Leukämiezellen zu erhalten. Bei den Zelllinien erfolgte im Anschluss die Analyse der Zellzyklusveränderungen nach Inkubation mit den Zytokinen. Sowohl bei den Patientenzellen als auch bei den Zelllinien wurde dann der Zelltodmechanismus durch die Zytokine untersucht. Um einen ersten Zusammenhang zwischen dem Reaktionsmuster der Zelllinien sowie der Patientenzellen und deren molekularbiologischen Beschaffenheit darzulegen, wurde zuletzt die Zytokinrezeptorverteilung der behandelten Zellen analysiert und in Bezug auf die zuvor beschriebenen Zellreaktionen evaluiert.

#### 3.1 Analyse des Viabilitätsverlustes an B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien sowie Patientenleukämiezellen durch proinflammatorische Zytokine (TNF $\alpha$ und IFN $\gamma$ )

Um das Verhältnis von Lebend- und Totzellpopulationen an B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien und primären ALL-Patientenblasten nach Inkubation mit T<sub>H</sub>1 Zytokinen bestimmen zu können, wurden die Viabilitätsverlustanalysen, wie in Kapitel 2 beschrieben, mithilfe von FSC/SSC FACS Analysen sowie durch die Färbung mit dem Lebend-/Totfarbstoff Zombie Aqua durchgeführt.

### 3.1.1 Analyse an B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien

Für die FACS basierte FSC/SSC Viabilitätsverlustanalyse der Zelllinien durch proinflammatorische T<sub>H1</sub> Zytokine wurden zwei unabhängige Versuchsreihen durchgeführt. In der folglich dargestellten FSC/SSC Analyse lag die gemessene Zellviabilität der Mediumkontrollen nach 72 h Inkubation im Median bei 91,21 %. In Tabelle 9 ist die Viabilität der Mediumkontrolle für jede Zelllinie einzeln aufgelistet.

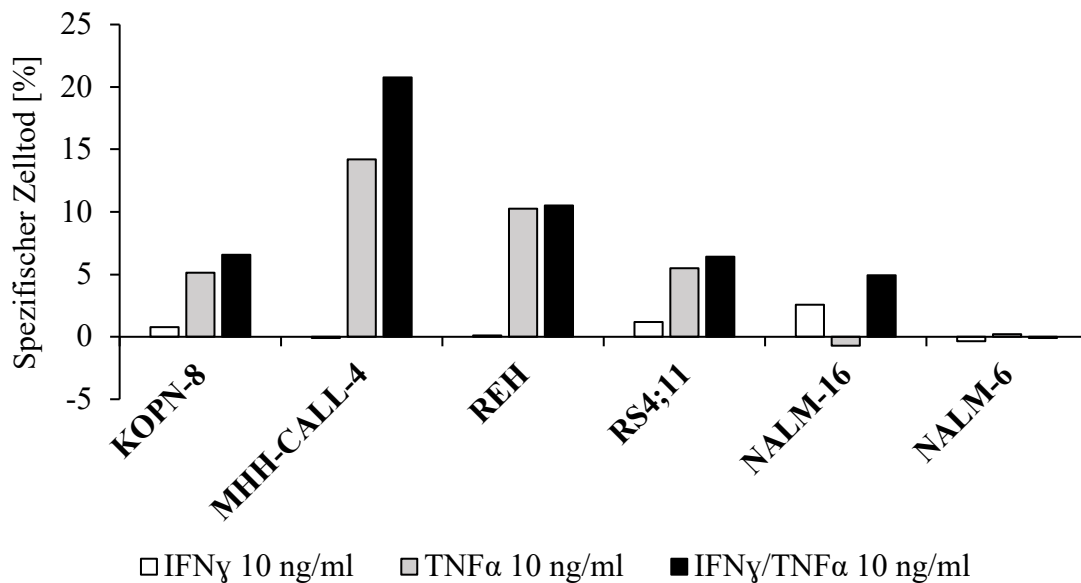
**Tabelle 9: Viabilität der Mediumkontrollen der Zelllinien (in Prozent) in den dargestellten Versuchsergebnissen der Viabilitätsverlustanalysen zur Behandlung mit IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  – FSC/SSC: FSC/SSC Messmethode; Z.A.: Zombie Aqua Messmethode**

Viabilität	KOPN-8	MHH-CALL-4	REH	RS4;11	NALM-16	NALM-6
FSC/SSC	88,14	85,04	93,40	94,16	89,02	95,22
Z.A.	90,33	88,29	90,59	96,32	88,60	93,59

Wie in Abbildung 6 repräsentativ für beide Versuchsreihen zu sehen ist, zeigt Tumornekrosefaktor alpha mit einer Konzentration von 10 ng/ml bei vier von sechs Zelllinien den größten Einzeleffekt im Sinne einer Viabilitätsreduktion > 5 %. Interferon gamma hingegen weist in Einzeltherapie mit gleicher Konzentration nur geringe, bis keine Viabilitätsveränderungen (< 3 %) bei den untersuchten Zelllinien auf, gilt jedoch bei NALM-16 als Hauptakteur der proinflammatorischen Zytokine. In Kombinationstherapie beider proinflammatorischen Zytokine kommt es bei MHH-CALL-4 zu einer stärkeren Viabilitätsreduktion als durch TNF $\alpha$  allein, obwohl IFN $\gamma$  hier in Einzeltherapie keinen Effekt zeigt. Bei NALM-16 ist dieses Phänomen in milderer Ausprägung ebenfalls zu erkennen. Hier bewirkt TNF $\alpha$  in Einzeltherapie keine Viabilitätsreduktion. Eine Kombination beider T<sub>H1</sub> Zytokine zeigt jedoch einen stärkeren Effekt als IFN $\gamma$  allein. Bei RS4;11 und REH addieren sich die Einzelwirkungen der Zytokine in Kombinationstherapie, ohne eine zusätzliche Effektsteigerung zu zeigen. NALM-6 weist als einzige Zelllinie weder in Einzel- noch in Kombinationstherapie eine nennenswerte Viabilitätsveränderung auf und ist daher nicht reagibel auf T<sub>H1</sub> Zytokine.

Die Inkubation der Zelllinien mit einer Konzentration von 100 ng/ml in Einzel- und Kombinationstherapie verdeutlichte den soeben beschriebenen Effekt der T<sub>H1</sub> Zytokine. So verstärkte sich die Viabilitätsreduktion der reagiblen Zelllinien in Kombinationstherapie in beiden Versuchsreihen im Median um 5,23 % (Min. 0,51 %, Max. 9,64 %).

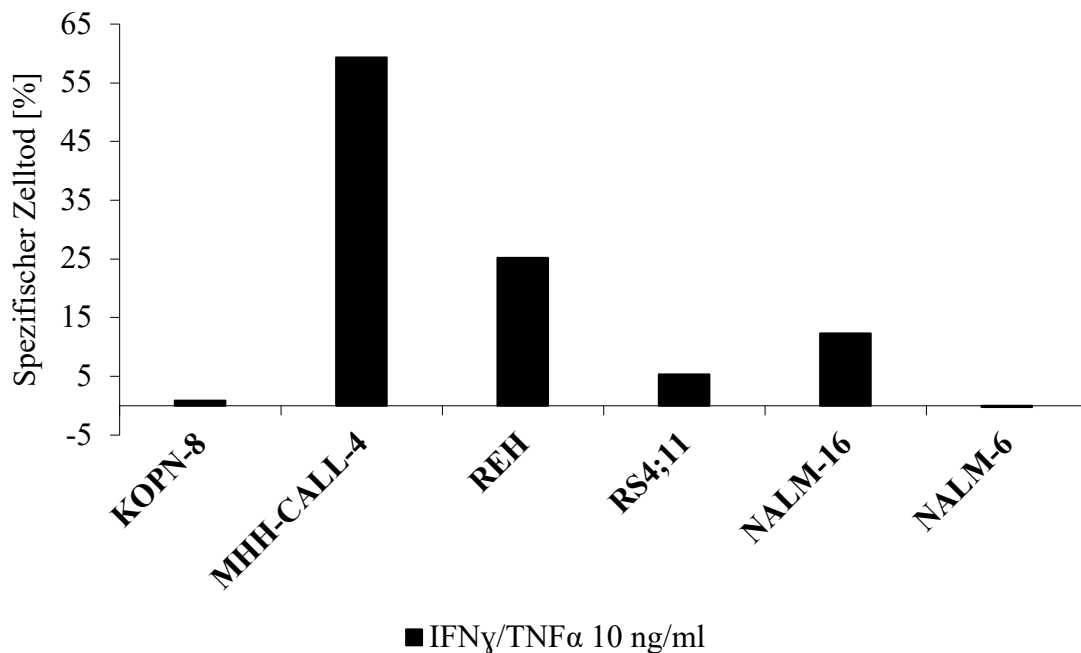
Auf die Darstellung dieser Ergebnisse wird verzichtet, da der Fokus bewusst auf *in vivo* erreichbare Konzentrationen gelegt werden soll.



**Abbildung 6:** Spezifischer Zelltod der Zelllinien nach 72 h Inkubation mit  $T_H1$  Zytokinen im Rahmen der Viabilitätsverlustanalysen mittels FSC/SSC Messmethode am FACS Gerät – 10 ng/ml IFN $\gamma$  (weiß), TNF $\alpha$  (grau) und IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  (schwarz).

Die Analyse des Lebendzellanteils durch eine Färbung mit Zombie Aqua zeigt bei den Zelllinien ein sehr ähnliches Wirkungsmuster der  $T_H1$  Zytokine in Kombinationstherapie mit 10 ng/ml und 72 h Inkubation (Abbildung 7). Neben einem noch deutlicheren Effekt der Zytokine bei MHH-CALL-4, REH und NALM-16 zeigt KOPN-8 jedoch kaum eine Reaktion. Die Viabilität bei NALM-6 bleibt auch hier unbeeinflusst. Der Lebendzellanteil der Mediumkontrollen lag im Median bei 90,46 % (Tabelle 9).

Folglich ist bei der Reaktion der einzelnen Zelllinien auf die Inkubation mit 10 ng/ml TNF $\alpha$  und/oder IFN $\gamma$  über 72 h eine große Heterogenität festzustellen. Unterschiede bestehen in der Reagibilität sowohl auf die Einzel- als auch Kombinationstherapie mit TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ , wobei es sich bei der Reaktion reagibler Zelllinien einheitlich um eine Viabilitätsreduktion handelt. Als effektstärkstes Zytokin im  $T_H1$  Milieu gilt Tumornekrosefaktor alpha. Die Kombination beider Zytokine führt bei den reagiblen Zelllinien stets zu einer stärkeren Viabilitätsreduktion als bei den Einzeltherapien. Dabei scheinen TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  sich entweder in ihren Einzeleffekten zu addieren oder einen synergistischen Effekt zu haben, wie bei MHH-CALL-4 und NALM-16.



**Abbildung 7:** Spezifischer Zelltod der Zelllinien nach 72 h Inkubation mit T<sub>H</sub>1 Zytokinen im Rahmen der Viabilitätsverlustanalysen mittels Zombie Aqua Messmethode am FACS Gerät – 10 ng/ml IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  (schwarz).

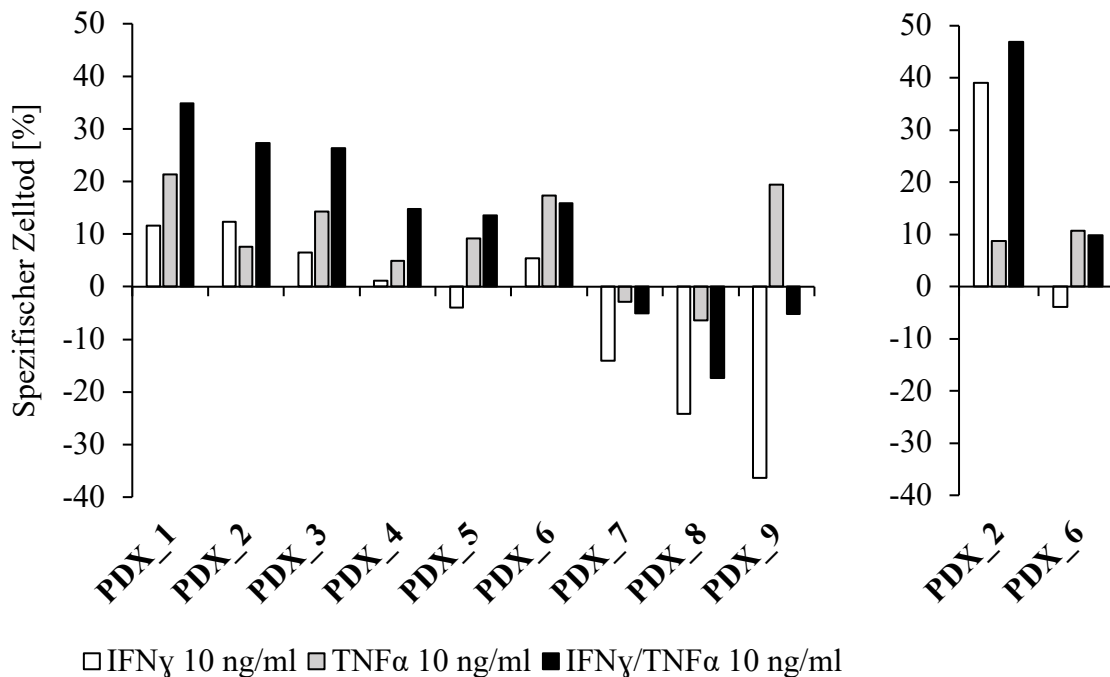
### 3.1.2 Analyse an Patientenblasten

Nachdem die Auswirkung der T<sub>H</sub>1 Zytokine auf die Viabilität der B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien untersucht worden ist, wurde auch der Effekt auf primäre B-Zell ALL-Patientenblasten analysiert. Mithilfe von FSC/SSC Viabilitätsanalysen am Durchflusszytometer ließ sich auch hier der Anteil lebender und toter Zellen bestimmen. Wie in Material und Methoden beschrieben, wurde die Viabilität der Zellen durch das Ansetzen entsprechend vieler Zellkulturplatten nach 24 und 48 Stunden gemessen. Eine Messung nach 72 Stunden erfolgte bei zwei Patientenblasten (PDX\_2 und PDX\_6), welche frisch aus einer xenotransplantierten Maus gewonnen wurden. Der Anteil lebender Zellen der Mediumkontrollen (Tabelle 10) war bereits nach 24 h (Median 65,80 %) deutlich niedriger als bei den Zelllinien nach 72 h und nahm auch fortschreitend nach 48 h (Median 54,16 %) ab. Für die Patientenblasten PDX\_2 und PDX\_6 war die Viabilität nach 72 h im Mittel bei 56,99 %.

**Tabelle 10: Viabilität der Mediumkontrollen der Patientenblasten (in Prozent) in den dargestellten Versuchsergebnissen der Viabilitätsverlustanalysen zur Behandlung mit IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  – FSC/SSC: FSC/SSC Messmethode; Z.A.: Zombie Aqua Messmethode; h: Inkubationszeit in Stunden**

Viabilität	FSC/SSC			Z.A.
	24 h	48 h	72 h	48 h
PDX_1	72,33	64,00	-	-
PDX_2	64,11	49,41	41,02	46,64
PDX_3	75,39	66,01	-	-
PDX_4	55,26	58,19	-	-
PDX_5	65,80	54,16	-	-
PDX_6	78,86	77,24	72,95	47,45
PDX_7	65,88	52,30	-	15,60
PDX_8	64,20	44,78	-	-
PDX_9	53,08	43,55	-	52,14

Aus Abbildung 8 geht hervor, dass durch die Einzeltherapie mit 10 ng/ml Tumornekrosefaktor alpha bei fünf der neun Patienten nach 48 h eine Viabilitätsreduktion > 9 % ausgelöst wird. Interferon gamma bewirkt in Einzeltherapie eine Reduktion des Lebendzellanteils > 5 % bei vier Patienten. Eine Viabilitätszunahme > 14 % wird in drei Fällen lediglich durch IFN $\gamma$  ausgelöst.



**Abbildung 8: Spezifischer Zelltod der Patientenblasten nach 48 h (links) und 72 h (rechts) Inkubation mit T<sub>H</sub>1 Zytokinen im Rahmen der Viabilitätsverlustanalysen mittels FSC/SSC Messmethode am FACS Gerät – 10 ng/ml IFN $\gamma$  (weiß), TNF $\alpha$  (grau) und IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  (schwarz).**

Im Falle einer Viabilitätsreduktion hat TNF $\alpha$  nach 48 h im Durchschnitt den stärksten Einzeleffekt. IFN $\gamma$  hingegen zeigt mit 39,10 % Viabilitätsabnahme die größte gemessene Einzelwirkung nach 72 h an PDX\_2. In Kombinationsbehandlung beider T<sub>H</sub>1 Zytokine sind Veränderungen im Wirkungsverhalten festzustellen, wozu folgende Gruppen gebildet werden können:

#### Synergistische Wirkung/Addition der Wirkung

Wie schon unter 3.1.1 bei zwei der sechs Zelllinien gezeigt werden konnte, scheinen TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  in Kombination eine synergistische Wirkung zu haben. Auch bei den Patientenzellen PDX\_2\_3\_4 und PDX\_5 erfolgt in Kombinationstherapie nach 48 h Inkubation eine stärkere Viabilitätsreduktion als sich durch Addition der Effekte bei Einzeltherapie ergeben würde.

Beispielhaft ist bei PDX\_4 durch IFN $\gamma$  in Einzeltherapie annähernd kein Effekt zu sehen (Viabilitätsreduktion um 1,19 %). In Kombination mit TNF $\alpha$ , welches selbst die Viabilität der Zellen nur um 4,93 % reduziert, wird der Lebendzellanteil allerdings um 14,76 % vermindert. Für PDX\_2 zeigt sich nach 48 h Inkubation mit den T<sub>H</sub>1 Zytokinen in Kombinationstherapie eine ähnliche Beobachtung einer synergistischen Wirkung. Nach 72 h jedoch addieren sich die hier vorliegenden Einzeleffekte dann lediglich zu einer Viabilitätsreduktion von 46,90 %.

So zeigt sich auch bei PDX\_1 bereits nach 48 h Inkubation kein synergistischer, sondern ein additiver Effekt der T<sub>H</sub>1 Zytokine.

#### Abgeschwächte Wirkung

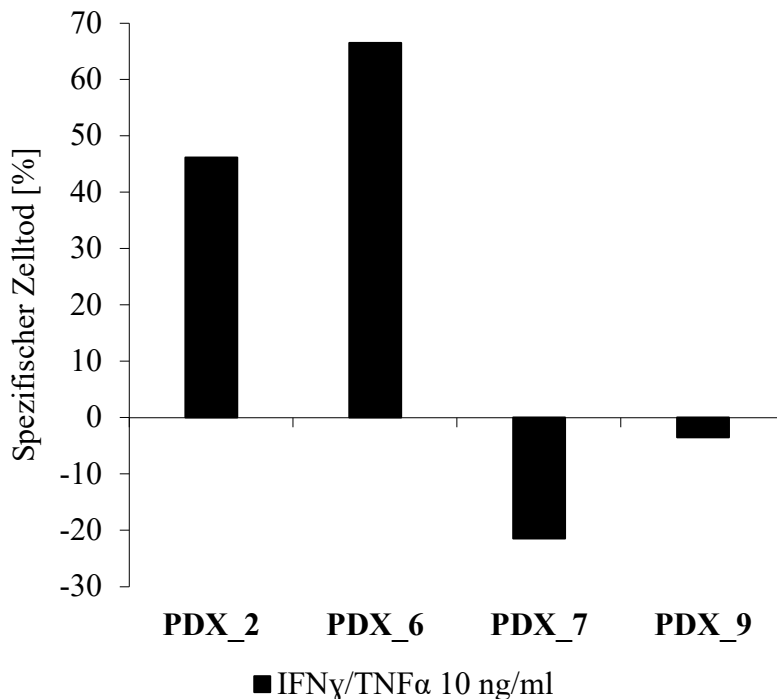
Bei PDX\_7\_8 und PDX\_9 führt die Kombination beider Zytokine in jedem der drei Fälle zu einem geringeren Anstieg des Lebendzellanteils als bei IFN $\gamma$ -Einzeltherapie. Bei PDX\_9 wird die starke Viabilitätszunahme von IFN $\gamma$  durch die Kombination mit TNF $\alpha$  nahezu vollständig aufgehoben, obwohl TNF $\alpha$  allein nur eine im Vergleich etwa halb so große Viabilitätsreduktion zeigt. Bei PDX\_7 und PDX\_8 tritt ein ähnlicher Effekt auf, obwohl TNF $\alpha$  hier in Einzeltherapie keine konträre Wirkung zu IFN $\gamma$  zeigt.

Neben der abgeschwächten Viabilitätszunahme durch eine Kombinationsbehandlung mit den genannten Zytokinen, zeigt sich bei PDX\_6 ein vergleichbares Bild bezüglich einer Reduktion des Lebendzellanteils. Beide T<sub>H</sub>1 Zytokine bewirken hier in Einzelbehandlung



nach 48 h eine Viabilitätsabnahme. In Kombination wird der Effekt aber weder addiert noch kommt es zu einer synergistischen Wirkung. Die Viabilitätsreduktion ist hier etwas schwächer ausgeprägt als bei TNF $\alpha$  allein. Nach 72 h Inkubation lässt sich dieser Effekt in Kombinationsbehandlung beider Zytokine in ähnlicher Weise beobachten.

Die soeben beschriebenen Wirkungstendenzen der Zytokine auf die Patientenzellen sind bei einem Großteil auch schon nach 24 h Inkubation zu sehen. PDX\_4 und PDX\_5 scheinen sogar zu diesem Zeitpunkt bereits die maximale Reaktion zu zeigen, welche sich nach 48 h kaum noch verändert. Nur bei PDX\_2 und PDX\_7 bildet sich nach einem Tag Inkubation noch keine deutlich erkennbare Tendenz ab.



**Abbildung 9: Spezifischer Zelltod von vier Patientenblasten nach 48 h Inkubation mit T<sub>H</sub>1 Zytokinen im Rahmen der Viabilitätsverlustanalysen mittels Zombie Aqua Messmethode am FACS Gerät – 10 ng/ml IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  (schwarz).**

Durch eine Konzentration der T<sub>H</sub>1 Zytokine von 100 ng/ml wird der dargelegte Effekt bei jenen sechs Patientenzellen, die durch eine Kombinationstherapie nach 48 h mit einer Viabilitätsreduktion reagieren, nur in geringem Maße beeinflusst. Im Median nimmt der spezifische Zelltod hierbei um 2,17 % (Min. -5,28 %, Max. 4,95 %) zu. Die Viabilitätszunahme der drei Patientenblasten, welche durch die 10 ng/ml Kombinationstherapie nach 48 h einen erhöhten Lebendzellanteil vorweisen, wird bei einer Konzentration von

100 ng/ml deutlich reduziert (Median 6,68 %, Min. 4,72 %, Max. 19,93 %), respektive in eine Viabilitätsabnahme invertiert (PDX\_9).

Für die Patientenzellen PDX\_2\_6\_7 und PDX\_9 wurde auch eine Analyse des Lebendzellanteils mit Zombie Aqua durchgeführt. Dabei zeigt sich, im Vergleich zur FSC/SSC Viabilitätsanalyse, die gleiche Wirkungstendenz der Kombinationstherapie der T<sub>H</sub>1 Zytokine nach 48 h Inkubation mit einer Konzentration von 10 ng/ml. Neben einem noch deutlicheren Effekt der Zytokine bei PDX\_2 und PDX\_6, stellt sich für PDX\_9 und PDX\_7 ein nahezu identisches Reaktionsverhalten dar (Abbildung 9). Der Lebendzellanteil der Mediumkontrollen lag im Median bei 47,05 % (Tabelle 10).

Zusammengefasst zeigt sich bei den Patientenzellen nach 48 h Inkubation mit TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  eine noch größere Variabilität in der Reaktion, als bei den Zelllinien nach 72 h. Dennoch lassen sich die Reaktionsmuster, wie oben beschrieben, gruppieren, wodurch ein besserer Überblick über die Wirkung der T<sub>H</sub>1 Zytokine entsteht. Neben der Tatsache, dass IFN $\gamma$  bei primären B-Zell ALL-Patientenblasten sowohl eine Viabilitätszunahme als auch Viabilitätsabnahme bewirken kann, ist auch zu erkennen, dass die Kombination beider Zytokine die in IFN $\gamma$ -Einzeltherapie aufgetretene Viabilitätszunahme wiederum verringert. Zudem führt die Kombinationsbehandlung bei fünf von sechs Patientenblasten, die mit einer Viabilitätsreduktion reagieren, zu einem stärker ausgeprägten Zelltod als bei den Einzeltherapien zu beobachten ist. Dabei kommt es wiederum bei vier der fünf Fälle nach 48 h zu einer stärkeren Reaktion als sich durch Addition der Einzeleffekte ergeben würde - es resultiert eine synergistische Wirkung. Alle beobachteten Effekte nach 48 h Inkubation sind überwiegend nach 24 h bereits angedeutet und werden nach 72 h in einem der beiden genannten Fälle noch verdeutlicht. Eine 100 ng/ml Zytokinkonzentration bewirkt im Falle einer Viabilitätsabnahme durch Kombinationstherapie der T<sub>H</sub>1 Zytokine im Median nur eine geringe Effektsteigerung im Vergleich zu 10 ng/ml. Eine Viabilitätszunahme fällt bei dieser Konzentration hingegen deutlich schwächer aus. Alle untersuchten Patientenblasten zeigen sich in Einzel- und/oder Kombinationstherapie gegenüber den T<sub>H</sub>1 Zytokinen reagibel.

### 3.2 Analyse des Viabilitätsverlustes an B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien sowie Patientenleukämiezellen durch immunregulatorische Zytokine (IL10 und TGFβ<sub>1</sub>)

Analog zu Kapitel 3.1 wurde das Verhältnis von Lebend- und Totzellpopulationen an B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien und primären ALL-Patientenblasten nach Inkubation mit den immunregulatorischen Zytokinen IL10 und TGFβ<sub>1</sub> mithilfe von FSC/SSC FACS Analysen bestimmt. Anschließend erfolgte die Färbung mit dem Lebend-/Totfarbstoff Zombie Aqua.

#### 3.2.1 Analyse an B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien

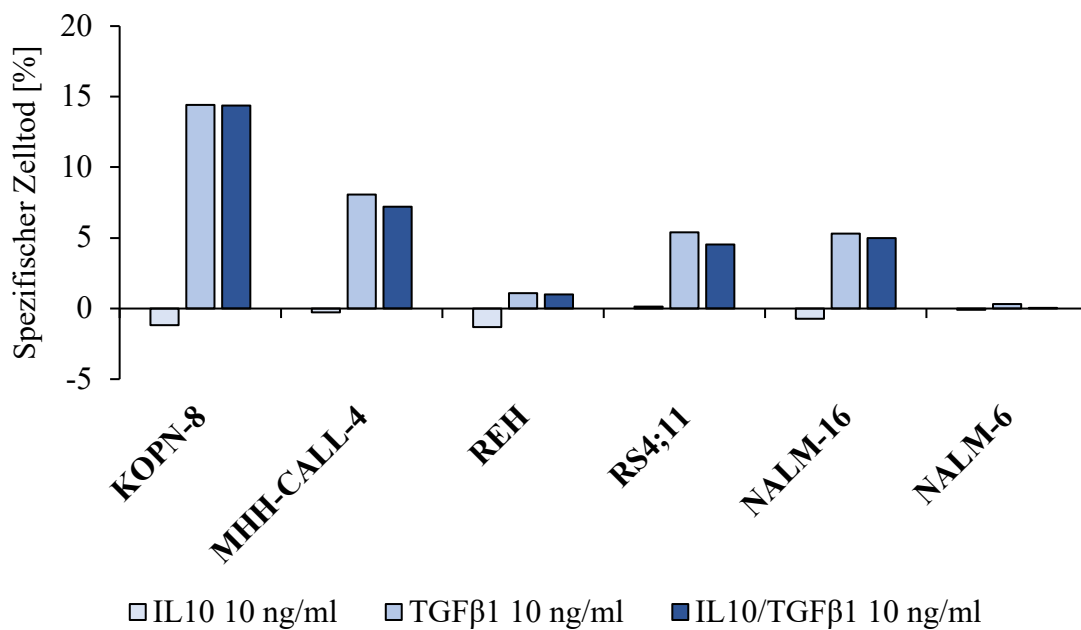
Bei den in Abbildung 10 dargestellten Versuchen mit den Zelllinien in FSC/SSC Messmethode war die gemessene Zellviabilität der Mediumkontrollen nach 72 h Inkubationszeit mit einem Median von 87,35 % leicht erniedrigt (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Viabilität der Mediumkontrollen der Zelllinien (in Prozent) in den dargestellten Versuchsergebnissen der Viabilitätsverlustanalysen zur Behandlung mit IL10/TGFβ<sub>1</sub> – FSC/SSC: FSC/SSC Messmethode; Z.A.: Zombie Aqua Messmethode**

Viabilität	KOPN-8	MHH-CALL-4	REH	RS4;11	NALM-16	NALM-6
FSC/SSC	82,47	86,54	83,70	93,94	88,15	94,74
Z.A.	90,33	88,29	90,59	96,32	88,60	93,59

Aus den abgebildeten Viabilitätsverlustanalysen, welche repräsentativ sind für die unten beschriebenen Versuchswiederholungen, geht hervor, dass IL10 in einer Konzentration von 10 ng/ml bei keiner der Zelllinien eine nennenswerte Veränderung des Anteils toter Zellen bewirkt. TGFβ<sub>1</sub> hingegen reduziert in derselben Konzentration bei vier der sechs Zelllinien den Lebendzellanteil um > 5 %. Zwei Zelllinien zeigen kaum eine Reaktion. Die Kombination beider immunregulatorischen Zytokine vermag den von TGFβ<sub>1</sub> gezeigten Effekt nicht nennenswert zu verändern.

Bei einer Konzentration von 100 ng/ml IL10 respektive TGFβ<sub>1</sub> in Einzel- und Kombinationstherapie konnte keine größere Effektveränderung beobachtet werden. Diese lag für die Zelllinien in allen Versuchswiederholungen bei ≤ ±2,20 %.

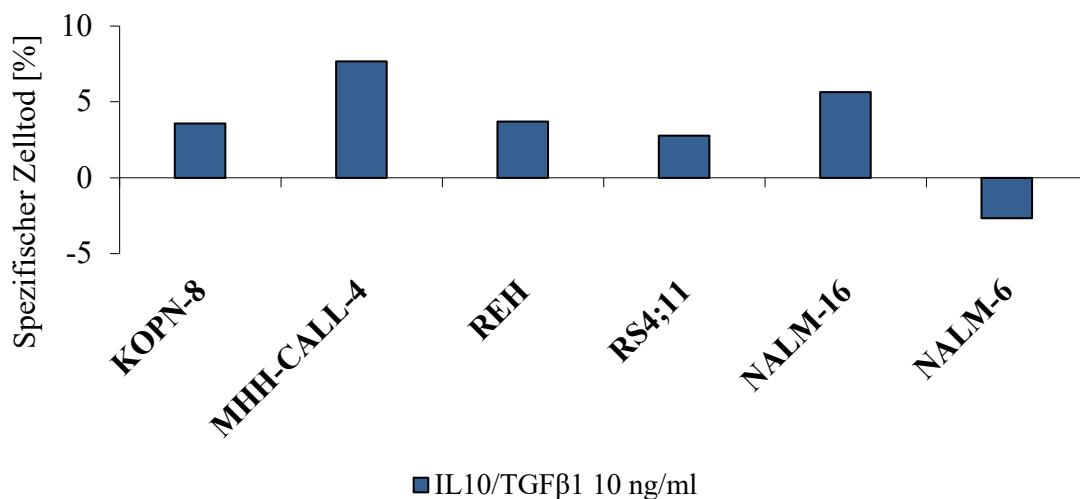


**Abbildung 10:** Spezifischer Zelltod der Zelllinien nach 72 h Inkubation mit immunregulatorischen Zytokinen im Rahmen der Viabilitätsverlustanalysen mittels FSC/SSC Messmethode am FACS Gerät – 10 ng/ml IL10 (blau-hell), TGFβ<sub>1</sub> (blau-mittel) und IL10/TGFβ<sub>1</sub> (blau-dunkel).

Die Erkenntnisse zu den beschriebenen Einzeleffekten der Zytokine ließen sich in mindestens drei unabhängigen Versuchen mit FSC/SSC FACS Viabilitätsanalysen reproduzieren. Die Kombinationstherapie wurde für die reagiblen Zelllinien zweimal und für die nicht reagiblen Zelllinien REH und NALM-6 einmal durchgeführt.

Das oben gezeigte Ergebnis einer Kombinationstherapie mit 10 ng/ml IL10/TGFβ<sub>1</sub> spiegelt sich auch in der Analyse mittels Zombie Aqua Färbung wider (Abbildung 11). Lediglich bei KOPN-8 zeigt sich eine geringere Reaktion. Der Lebendzellanteil der Mediumkontrollen lag im Median bei 90,46 % und ist für die Zelllinien im Einzelnen der Tabelle 11 zu entnehmen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Transforming Growth Factor beta 1, als Hauptakteur des immunregulatorischen Zytokin-Milieus IL10/TGFβ<sub>1</sub>, nach 72 h Inkubation mit 10 ng/ml zu einer Viabilitätsreduktion bei reagiblen Zelllinien führt, wobei auch hier eine Variabilität in der Effektstärke zwischen den Zelllinien zu erkennen ist. Eine gegenseitige Beeinflussung der Zytokinwirkung in Kombinationstherapie zeigt sich, wie oben dargestellt, nicht.



**Abbildung 11:** Spezifischer Zelltod der Zelllinien nach 72 h Inkubation mit immunregulatorischen Zytokinen im Rahmen der Viabilitätsverlustanalysen mittels Zombie Aqua Messmethode am FACS Gerät – 10 ng/ml IL10/TGFβ<sub>1</sub> (blau-dunkel).

### 3.2.2 Analyse an Patientenblasten

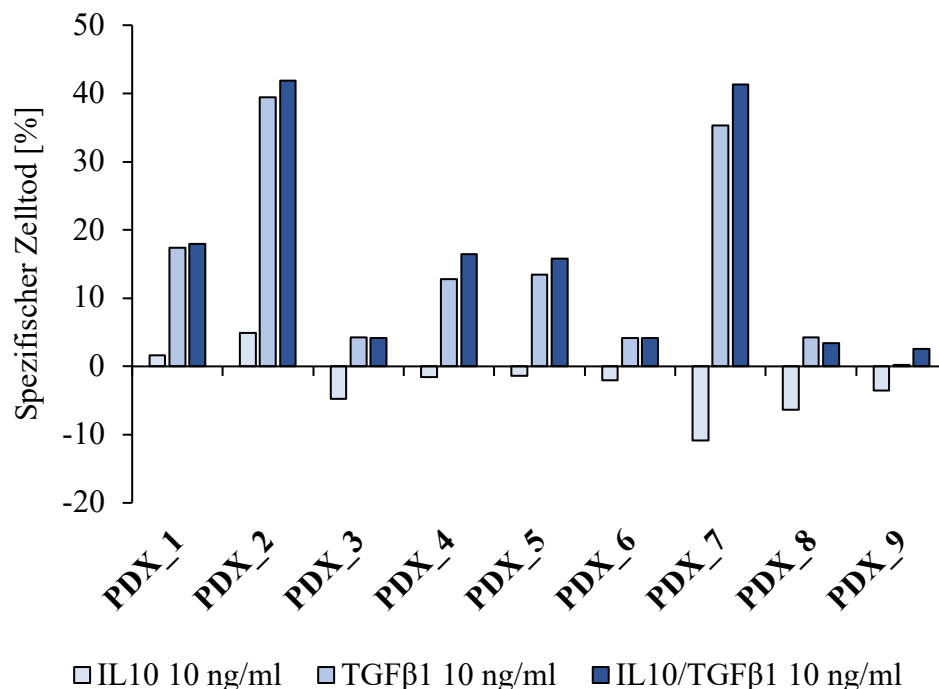
Neben den Untersuchungen an Zelllinien, wurden die Analysen bezüglich einer Viabilitätsveränderung durch immunregulatorische Zytokine auch bei den primären ALL-Patientenblasten durchgeführt. Analog zu den beschriebenen Versuchen mit proinflammatorischen T<sub>H</sub>1 Zytokinen unter 3.1.2 wurde die Viabilität der Zellen durch das Ansetzen entsprechend vieler Zellkulturplatten nach 24 und 48 Stunden in FSC/SSC Messmethode am FACS Gerät gemessen.

**Tabelle 12:** Viabilität der Mediumkontrollen der Patientenblasten (in Prozent) in den dargestellten Versuchsergebnissen der Viabilitätsverlustanalysen zur Behandlung mit IL10/TGFβ<sub>1</sub> – FSC/SSC: FSC/SSC Messmethode; Z.A.: Zombie Aqua Messmethode; h: Inkubationszeit in Stunden

Viabilität	FSC/SSC			Z.A.
	24 h	48 h	72 h	48 h
PDX_1	72,68	65,57	-	-
PDX_2	60,59	54,66	31,02	46,64
PDX_3	72,76	67,23	-	-
PDX_4	59,48	60,54	-	-
PDX_5	64,99	56,34	-	-
PDX_6	73,35	74,86	65,64	47,45
PDX_7	43,10	36,65	-	15,60
PDX_8	68,99	46,37	-	-
PDX_9	56,35	45,92	-	52,14

Bei zwei Patientenblasten (PDX\_2 und PDX\_6), welche frisch aus einer xenotransplantierten Maus gewonnen wurden, erfolgte auch eine Messung nach 72 Stunden. Der Anteil lebender Zellen der Mediumkontrollen (Tabelle 12) war auch hier bereits nach 24 h (Median 64,99 %) deutlich niedriger als bei den Zelllinien nach 72 h und nahm fortschreitend nach 48 h (Median 56,34 %) ab. Für die Patientenblasten PDX\_2 und PDX\_6 war die Viabilität nach 72 h im Mittel bei 48,33 %.

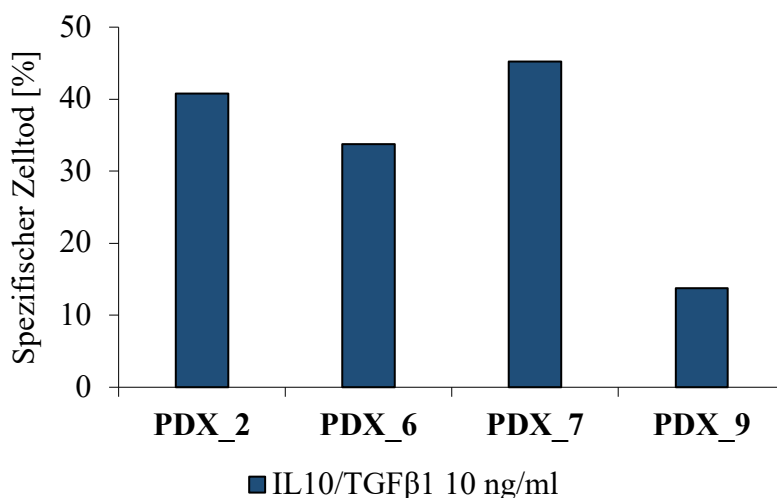
Aus Abbildung 12 geht hervor, dass die Inkubation mit 10 ng/ml Interleukin-10, wie auch schon bei den Zelllinien zu beobachten war, zu keiner Viabilitätsreduktion > 5 % führt. Lediglich für PDX\_7 und PDX\_8 ergibt sich eine Viabilitätszunahme durch IL10 > 6 %. Transforming Growth Factor beta 1 hingegen bewirkt bei fünf der neun Patientenblasten eine Viabilitätsreduktion > 12,5 %. Für PDX\_2 liegt diese sogar bei 39,39 % und ist damit die stärkste nachgewiesene Abnahme des Lebendzellanteils, welche durch Zytokin-Einzeltherapie innerhalb der Versuchsreihen an allen untersuchten Zellen mittels FSC/SSC Messmethode festgestellt wurde. Vier Patientenblasten sind hingegen auf TGFβ<sub>1</sub> nicht reagibel. Sie zeigen in Einzel- als auch Kombinationstherapie keine Viabilitätsreduktion ≥ 4,5 %.



**Abbildung 12:** Spezifischer Zelltod der Patientenblasten nach 48 h Inkubation mit immunregulatorischen Zytokinen im Rahmen der Viabilitätsverlustanalysen mittels FSC/SSC Messmethode am FACS Gerät – 10 ng/ml IL10 (blau-hell), TGFβ<sub>1</sub> (blau-mittel) und IL10/TGFβ<sub>1</sub> (blau-dunkel).

In Kombination beider immunregulatorischen Zytokine ist im Vergleich zur TGF $\beta$ <sub>1</sub>-Einzeltherapie für alle Zellen annähernd kein Unterschied im Reaktionsverhalten festzustellen.

Das soeben dargelegte Reaktionsmuster der Patientenzellen wird auch nach 24-stündiger Inkubation schon deutlich. Bei PDX\_4 als auch PDX\_5 wird bereits zu diesem Zeitpunkt, analog zu der Inkubation mit den T<sub>H1</sub> Zytokinen, annähernd die maximale Viabilitätsreduktion durch die immunregulatorischen Zytokine erreicht. Nach 72 h Inkubation ist bei den Patientenzellen PDX\_2 und PDX\_6 keine nennenswerte Effektänderung zu erkennen. Durch eine Zytokinkonzentration von 100 ng/ml wurde bei der Kombinationsbehandlung mit den immunregulatorischen Zytokinen die Viabilität der reagibel als auch nicht reagibel erscheinenden Patientenzellen nach 48 Stunden Inkubation im Vergleich zur 10 ng/ml Konzentration nicht bedeutend verändert. Im Median nimmt der spezifische Zelltod bei 100 ng/ml Kombinationstherapie um 0,99 % (Min. -5,02 %, Max. 5,81 %) zu.



**Abbildung 13:** Spezifischer Zelltod von vier Patientenblasten nach 48 h Inkubation mit immunregulatorischen Zytokinen im Rahmen der Viabilitätsverlustanalysen mittels Zombie Aqua Messmethode am FACS Gerät – 10 ng/ml IL10/TGF $\beta$ <sub>1</sub> (blau-dunkel).

Der Lebendzellanteil von PDX\_2\_6\_7 und PDX\_9 wurde bei gleicher Inkubationsdauer und Zytokinkonzentration ebenfalls mittels Zombie Aqua Färbung analysiert und ausgewertet (Abbildung 13). Bei dieser Methode zeigen PDX\_2 und PDX\_7 eine annähernd identische Reaktion. Bei PDX\_9 und vor allem PDX\_6 ist im Gegensatz zur FSC/SSC Viabilitätsverlustanalyse eine deutliche Reduktion des Lebendzellanteils zu

sehen. Der Lebendzellanteil der Mediumkontrollen lag im Median bei 47,05 % (Tabelle 12).

Letztlich ist auch bei den untersuchten Patientenzellen festzustellen, dass nur  $TGF\beta_1$  in der Lage ist eine eindeutige Viabilitätsabnahme auszulösen. IL10 zeigt auch hier kaum einen Effekt. Dieses Reaktionsmuster ist nach einer Inkubationsdauer von 48 h am deutlichsten zu erkennen, zeichnet sich aber bereits nach 24 h ab und erweist sich bei den gegenüber  $TGF\beta_1$  reagiblen Zellen ebenfalls als heterogen. Eine relevante gegenseitige Beeinflussung der Zytokinwirkung in Kombinationstherapie kann, wie oben dargestellt, nicht festgestellt werden.

### 3.3 Einfluss der Zytokin-Milieus auf die Zellzyklusphasen der B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien

Um den prozentualen Anteil der einzelnen Zellzyklusphasen jeder Zelllinie und dessen Veränderung unter Behandlung im proinflammatorischen und immunregulatorischen Zytokin-Milieu zu analysieren, wurde ein FITC BrdU Flow Kit verwendet und die Messung am Durchflusszytometer durchgeführt. Detektiert wurden die Phasen sub G1 als Phase der toten Zellen, G0/G1 als Phase der ruhenden Zellen respektive der Zellen zwischen stattgehabter Zellteilung und Synthesephase, S als Synthesephase zur Verdopplung der DNA im Zellkern und G2/M als postsynthetische oder prämitotische Phase respektive Mitose-Phase.

Die Auswahl der in Material und Methoden beschriebenen Inkubationszeit der Zelllinien von 96 h, wurde anhand der ermittelten Zellverdopplungszeit der Zelllinien und durch Voruntersuchungen an der Zelllinie MHH-CALL-4 im proinflammatorischen Zytokin-Milieu überprüft. Mit zunehmend kürzerer Inkubationszeit (72 h/48 h) war insbesondere nach 48 h behandlungsunabhängig ein deutlicher Anstieg der G0/G1 Phase sowie eine klare Abnahme der S Phase zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Durch eine kürzere Inkubationszeit als 96 h, ließen sich die Zytokineffekte im Vergleich nicht deutlich genug erkennen. Angelehnt an die mittlere Zellverdopplungszeit der Zelllinien von gerundet 90 h, erschien die Auswahl einer 96-stündigen Inkubationszeit für alle Zelllinien daher als sinnvoll.



### 3.3.1 Analyse im T<sub>H</sub>1 spezifischen Zytokin-Milieu

Bei der FACS basierten Zellzyklusanalyse der sechs Zelllinien im proinflammatorischen Zytokin-Milieu ergaben sich für die unbehandelten Kontrollen nach 96 h Inkubationszeit die in der folgenden Tabelle 13 dargestellten Median- sowie Minimum- und Maximum-Werte der prozentualen Anteile der einzelnen Zellzyklusphasen. Abgebildet sind die Werte der Mediumkontrollen zu den in Tabelle 14 gezeigten Versuchsergebnissen.

**Tabelle 13: Prozentuale Anteile der einzelnen Zellzyklusphasen der Mediumkontrollen der Zelllinien in den dargestellten Versuchsergebnissen zur Behandlung mit IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  nach 96 h Inkubation – Median-, Minimum- und Maximum-Werte**

<b>Kontrollen</b>	<b>sub G1</b>	<b>G0/G1</b>	<b>S</b>	<b>G2/M</b>
<b>Median</b>	2,54	50,93	39,50	5,86
<b>Minimum</b>	1,26	39,31	30,87	2,07
<b>Maximum</b>	10,80	58,87	50,36	7,15

In den unbehandelten Kontrollen hat die Phase der ruhenden Zellen respektive der Zellen zwischen stattgehabter Zellteilung und Synthesephase (G0/G1), wie zu erwarten, den größten Anteil (Median 50,93 %) der Zellzyklusphasen, gefolgt von der Synthesephase (S) (Median 39,50 %). Die Anteile der einzelnen Zellzyklusphasen in der Mediumkontrolle einer untersuchten Zelllinie werden als Bezugsgröße für mögliche Veränderungen durch die Zytokinbehandlung herangezogen.

Wie in Tabelle 14 zu sehen ist, wurde im proinflammatorischen Zytokin-Milieu für die Zelllinien MHH-CALL-4 und NALM-16 eine Einzel- und Kombinationstherapie mit einer Zytokinkonzentration von 5 respektive 10 ng/ml durchgeführt. Bei MHH-CALL-4 bewirkt TNF $\alpha$  eine deutliche Viabilitätsabnahme mit begleitender Proliferationsreduktion. Diese Reaktion wird in Kombinationstherapie mit IFN $\gamma$ , welches in Einzeltherapie keinen Effekt zeigt, noch verstärkt, wodurch im Vergleich zur Mediumkontrolle die sub G1 Phase um 18 % steigt und die S Phase um 13 % sinkt.

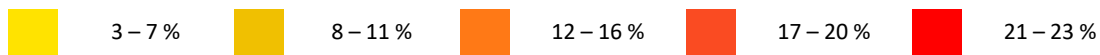
Reziprok ist diese Beobachtung bei NALM-16 zu machen. Hier gilt IFN $\gamma$  als Hauptakteur, wobei sich die Wirkung des in Einzeltherapie kaum effektbringenden TNF $\alpha$  in Kombinationstherapie zu der Wirkung von IFN $\gamma$  addiert. IFN $\gamma$  allein sowie die Kombination der T<sub>H</sub>1 Zytokine bewirkt bei NALM-16 eine deutliche Proliferationsreduktion mit moderater Viabilitätsabnahme.

In einem zweiten, unabhängigen Versuch mit gleichen Versuchsbedingungen ließen sich die eben erläuterten Erkenntnisse reproduzieren.

**Tabelle 14: Zellzyklusphasen und deren Änderung bei den Zelllinien nach 96 h Inkubation mit T<sub>H</sub>1 Zytokinen – sub G1: Phase der toten Zellen; G0/G1: Phase der ruhenden Zellen respektive der Zellen zwischen stattgehabter Zellteilung und Synthesephase; S: Synthesephase zur Verdopplung der DNA im Zellkern; G2/M: postsynthetische oder prämitotische Phase respektive Mitose-Phase. Zeichenerklärung:**

- = keine Veränderung

↑/↓ = (starke/schwache) Zunahme/Abnahme im Vergleich zur Mediumkontrolle



Zelllinie	Therapie	Phasen				
		sub G1	G0/G1	S	G2/M	
MHH-CALL-4	5 ng/ml	IFN $\gamma$	-	-	-	-
		TNF $\alpha$	↑↑	↓	↓	-
		Kombi	↑↑↑	↓↓	↓↓	↑
NALM-16	10 ng/ml	IFN $\gamma$	↑	-	↓↓	↑↑
		TNF $\alpha$	-	-	↓	-
		Kombi	↑	↓	↓↓↓	↑↑
REH	10 ng/ml Kombitherapie		↑	-	↓	-
RS4;11			-	↑	↓↓	-
KOPN-8			-	↑	↓	-
NALM-6			-	-	-	-

Bei den restlichen vier Zelllinien ist in Kombinationstherapie kein größerer Einfluss der Zytokine auf die einzelnen Zellzyklusphasen festzustellen. Der maximale Effekt liegt hier bei 8,09 % Reduktion der S Phase bei RS4;11. Aus diesem Grund wurden diese Zelllinien nicht in Einzel- und Kombinationstherapieversuche aufgenommen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die T<sub>H</sub>1 Zytokine bei den reagiblen Zelllinien überwiegend eine Proliferationsreduktion mit gleichzeitiger Viabilitätsabnahme bewirken. Diese Reaktion zeigt sich bei den Einzeltherapien mit TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  in

Abhängigkeit von der Zelllinie in unterschiedlicher Ausprägung. Analog zu den Ergebnissen in Kapitel 3.1.1 ist auch bei den Zellzyklusveränderungen eine synergistische Wirkung respektive Addition der Wirkung der T<sub>H</sub>1 Zytokine in Kombinationstherapie bei den Zelllinien MHH-CALL-4 und NALM-16 zu erkennen.

### 3.3.2 Analyse im immunregulatorischen Zytokin-Milieu

Für die unbehandelten Kontrollen im Rahmen der Zellzyklusanalysen der Zelllinien im immunregulatorischen Zytokin-Milieu ergaben sich nach 96 h Inkubationszeit die in der folgenden Tabelle 15 dargestellten Median- sowie Minimum- und Maximum-Werte der prozentualen Anteile der einzelnen Zellzyklusphasen. Es sind die Werte der Mediumkontrollen zu den in Tabelle 16 gezeigten Versuchsergebnissen abgebildet.

**Tabelle 15: Prozentuale Anteile der einzelnen Zellzyklusphasen der Mediumkontrollen der Zelllinien in den dargestellten Versuchsergebnissen zur Behandlung mit IL10/TGFβ<sub>1</sub> nach 96 h Inkubation – Median-, Minimum- und Maximum-Werte**

<b>Kontrollen</b>	<b>sub G1</b>	<b>G0/G1</b>	<b>S</b>	<b>G2/M</b>
<b>Median</b>	7,28	48,33	42,30	4,98
<b>Minimum</b>	2,36	40,46	33,43	2,23
<b>Maximum</b>	11,99	50,09	47,54	5,55

Ähnlich zu den Werten der Mediumkontrollen in den Versuchen mit den T<sub>H</sub>1 Zytokinen, ist auch hier die G0/G1 Phase mit dem größten Anteil an den Zellzyklusphasen (Median 48,33 %), gefolgt von der S Phase (Median 42,30 %), auszumachen.

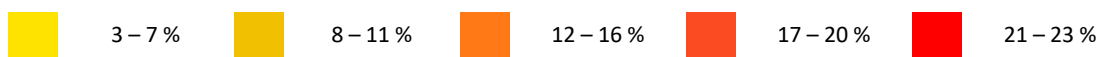
In den Einzel- und Kombinationstherapieversuchen mit den Zelllinien MHH-CALL-4, NALM-16, RS4;11 und KOPN-8 und einer Zytokinkonzentration von 10 ng/ml zeigt IL10 bei allen der vier genannten Zelllinien keinen Effekt (Tabelle 16). TGFβ<sub>1</sub> hingegen bewirkt bei den drei erstgenannten Zelllinien eine deutliche Wachstumsreduktion. Diese äußert sich in einer Zunahme der G0/G1 Phase um 8 bis 23 % und in einer Abnahme der S-Phase um 12 bis 23 %. Hinzukommt ein moderater Viabilitätsverlust, welcher zwischen 3 und 7 % liegt. Diese Versuchsergebnisse ließen sich ebenfalls in einem zweiten, unabhängigen Versuch bestätigen.

Bei den Zelllinien REH und NALM-6 ist, ähnlich zu KOPN-8, lediglich eine geringe Wachstumsreduktion durch die immunregulatorischen Zytokine in Kombinationstherapie festzustellen.

**Tabelle 16: Zellzyklusphasen und deren Änderung bei den Zelllinien nach 96 h Inkubation mit immunregulatorischen Zytokinen** – sub G1: Phase der toten Zellen; G0/G1: Phase der ruhenden Zellen respektive der Zellen zwischen stattgehabter Zellteilung und Synthesephase; S: Synthesephase zur Verdopplung der DNA im Zellkern; G2/M: postsynthetische oder prämitotische Phase respektive Mitose-Phase. Zeichenerklärung:

- = keine Veränderung

↑/↓ = (starke/schwache) Zunahme/Abnahme im Vergleich zur Mediumkontrolle



Zelllinie	Therapie	Phasen				
		sub G1	G0/G1	S	G2/M	
MHH-CALL-4	10 ng/ml	IL-10	-	-	-	-
		TGFβ <sub>1</sub>	↑	↑↑↑	↓↓↓	-
		Kombi	↑	↑↑↑	↓↓↓	-
NALM-16	10 ng/ml	IL-10	-	-	-	-
		TGFβ <sub>1</sub>	↑	↑↑	↓↓	-
		Kombi	↑	↑↑	↓↓	-
RS4;11	10 ng/ml	IL-10	-	-	-	-
		TGFβ <sub>1</sub>	↑	↑↑	↓↓	-
		Kombi	↑	↑↑	↓↓	-
KOPN-8	10 ng/ml	IL-10	-	-	-	-
		TGFβ <sub>1</sub>	-	↑	↓	-
		Kombi	-	↑	↓	-
REH	10 ng/ml Kombitherapie		-	↑	↓	-
NALM-6			-	↑	↓	-

Analog zu den Viabilitätsuntersuchungen in Kapitel 3.2 ist demnach auch bei der Analyse der Zellzyklusveränderungen im immunregulatorischen Zytokin-Milieu zu sehen, dass nur TGFβ<sub>1</sub> in der Lage ist, eine Reaktion der Zellen auszulösen. Im Rahmen der dargestellten Zellzyklusanalysen dominiert dabei die Abnahme der Wachstumsrate bei

den Zelllinien. Ein Viabilitätsverlust ist bei den hochreagiblen Zelllinien (MHH-CALL-4, NALM-16 und RS4;11) nur gering ausgeprägt.

### 3.4 Analyse des Zelltodmechanismus an B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien sowie Patientenleukämiezellen

Um im Falle eines Viabilitätsverlustes durch die verwendeten Zytokin-Milieus bei B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien sowie Patientenblasten zwischen einer Apoptose oder Nekrose der Zellen differenzieren zu können, wurden zwei verschiedene Analysen durchgeführt. Die Methode der FITC Annexin V Färbung wurde nur bei den ALL-Zelllinien unter Therapie mit T<sub>H</sub>1 Zytokinen angewandt. Die Messung der Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 wurde vorerst exemplarisch im proinflammatorischen Zytokin-Milieu an den zwei Zelllinien MHH-CALL-4 und NALM-6 durchgeführt, um den Unterschied zwischen einer reagiblen und einer nicht reagiblen Zelllinie darstellen zu können. Im Anschluss erfolgte auch die Analyse der Caspasen-Aktivität an vier Patientenblasten.

#### 3.4.1 Analyse an B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien im T<sub>H</sub>1 spezifischen Zytokin-Milieu

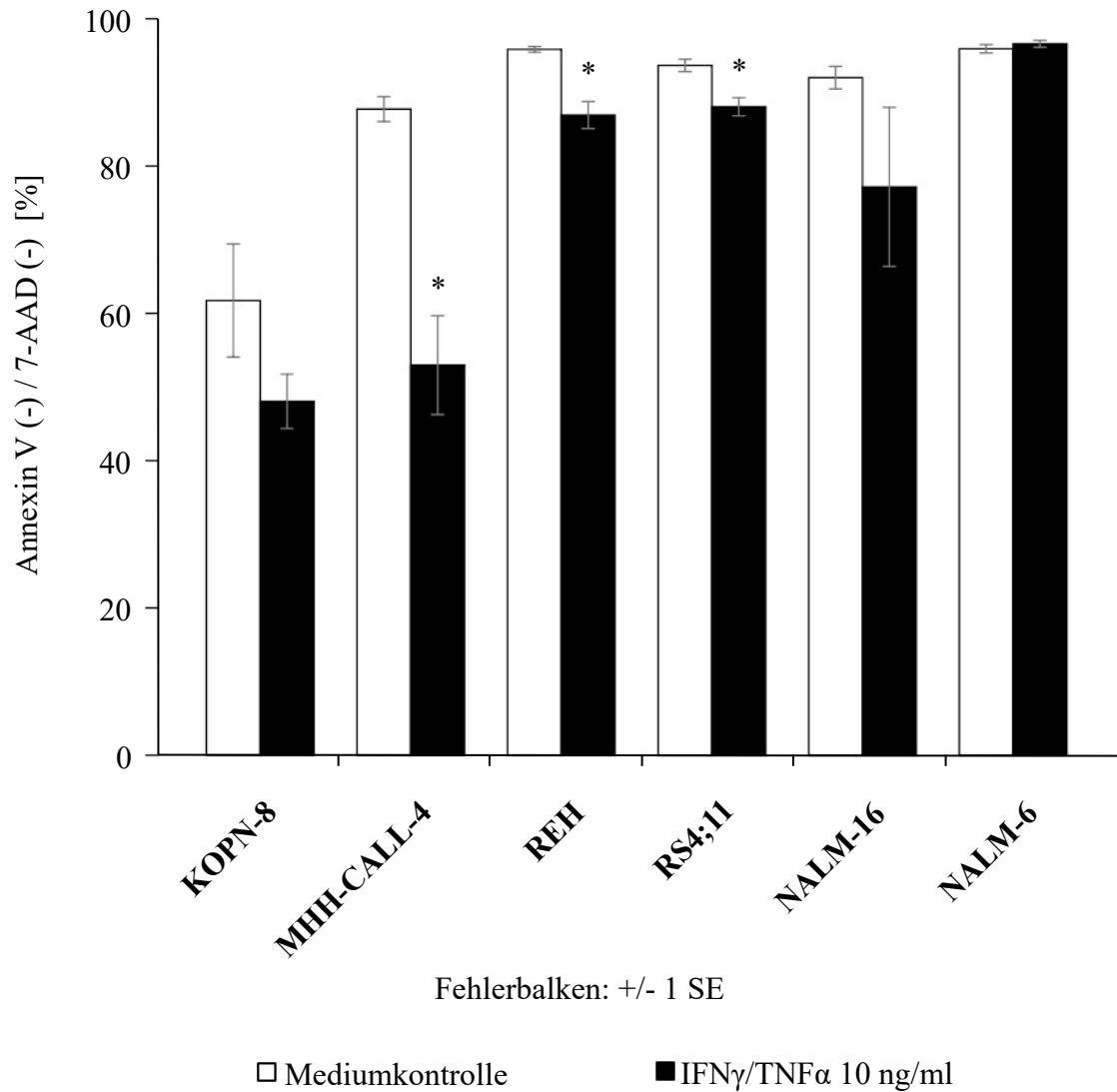
##### FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit mit 7-AAD

Bei der Zelltodanalyse der sechs Zelllinien im proinflammatorischen Zytokin-Milieu mittels durchflusszytometrischer Untersuchung, wurden pro Zelllinie drei unabhängige Versuchsreihen durchgeführt. Die Viabilität der Mediumkontrollen, welche in jeder Versuchsreihe anhand des prozentualen Anteils der Zellen in Q4 des finalen Auswertungs-Dotplots bestimmt wurde, lag nach 72 h Inkubationszeit im Median bei 93,16 % (Tabelle 17). Bei KOPN-8 war hier im Vergleich zu den anderen Zelllinien der Anteil lebender Zellen deutlich niedriger und lag im Mittel bei nur 61,74 %.

**Tabelle 17: Viabilität der Mediumkontrollen der Zelllinien (in Prozent) in den durchgeführten Versuchsreihen zur Zelltodanalyse mittels FITC Annexin V und 7-AAD Färbung unter Behandlung mit IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  – VR: Versuchsreihe**

Viabilität	KOPN-8	MHH-CALL-4	REH	RS4;11	NALM-16	NALM-6
1. VR	46,82	84,35	95,35	92,72	88,93	96,32
2. VR	72,34	89,49	95,58	92,92	93,68	94,82
3. VR	66,06	89,36	96,60	95,34	93,39	96,64

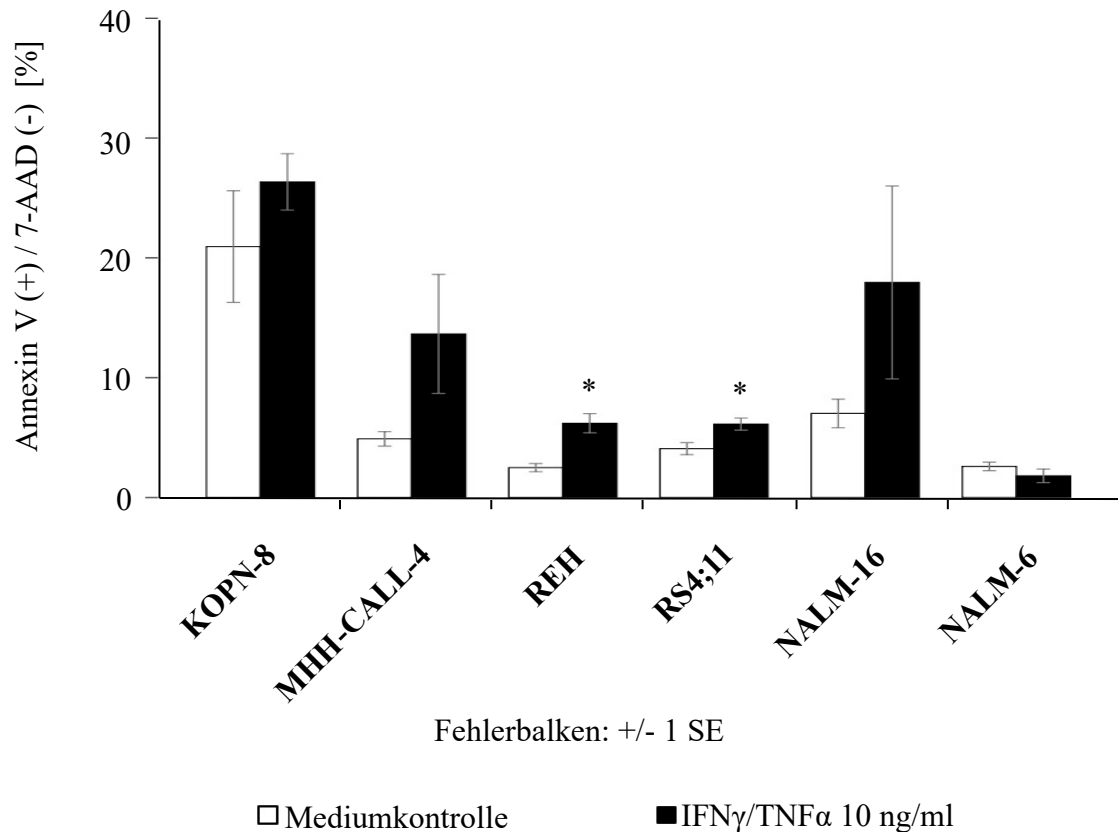
Analog zu den Analysen des Viabilitätsverlustes in Kapitel 3.1.1 geht aus Abbildung 14 hervor, dass in Kombinationstherapie beider proinflammatorischen Zytokine bei fünf der sechs Zelllinien ein Effekt im Sinne einer Viabilitätsreduktion zu verzeichnen ist.



**Abbildung 14:** Q4 der finalen Auswertungs-Dotplots der Zelllinien (lebende Zellen) nach 72 h Inkubation mit T<sub>H</sub>1 Zytokinen im Rahmen der Zelltodanalysen mittels FITC Annexin V und 7-AAD Färbung – Mittelwerte des prozentualen Anteils der Annexin V (-) und 7-AAD (-) Zellen jeder Zelllinie aus drei Versuchsreihen +/- einfachem Standardfehler. Viabilität der Mediumkontrolle (weiß); Viabilität der Behandlungsgruppe 10 ng/ml IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  (schwarz); \*: Signifikante Abweichung der Mittelwerte von Behandlungsgruppe und Mediumkontrolle (Signifikanzniveau  $\leq 5\%$ )

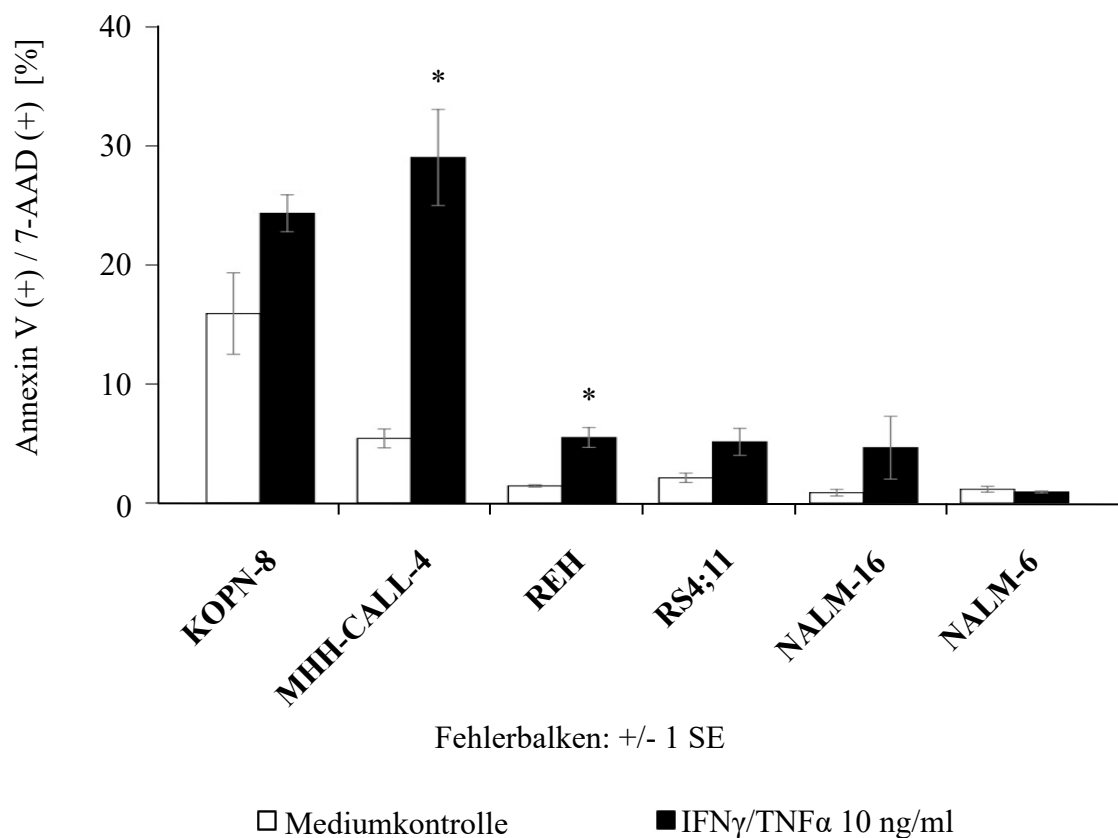
Für MHH-CALL-4 ( $t(2,253) = 5,022$ ;  $p = 0,029$ ), REH ( $t(4) = 4,778$ ;  $p = 0,009$ ) sowie RS4;11 ( $t(4) = 3,762$ ;  $p = 0,020$ ) sind diese Viabilitätsreduktionen signifikant (Signifikanzniveau  $\leq 5\%$ ).

Um bei dem durch die Behandlung verursachten Zelltod letztlich zwischen einer Apoptose oder Nekrose unterscheiden zu können, muss das Ergebnis der Annexin V und 7-AAD Färbung der Quadranten Q1, Q2 und Q3 in Betracht gezogen werden.



**Abbildung 15: Q1 der finalen Auswertungs-Dotplots der Zelllinien (früh-apoptotische Zellen) nach 72 h Inkubation mit T<sub>H</sub>1 Zytokinen im Rahmen der Zelltodanalysen mittels FITC Annexin V und 7-AAD Färbung – Mittelwerte des prozentualen Anteils der Annexin V (+) und 7-AAD (-) Zellen jeder Zelllinie aus drei Versuchsreihen +/- einfachem Standardfehler. Mittelwert der Mediumkontrolle (weiß); Mittelwert der Behandlungsgruppe IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  (schwarz); \*: Signifikante Abweichung der Mittelwerte von Behandlungsgruppe und Mediumkontrolle (Signifikanzniveau  $\leq$  5 %)**

Wie aus Abbildung 15 hervorgeht, ist zu erkennen, dass bei REH ( $t(4) = -4,275$ ;  $p = 0,013$ ) und RS4;11 ( $t(4) = -2,878$ ;  $p = 0,045$ ) ein signifikanter Unterschied des Anteils früh-apoptotischer, Annexin V positiver Zellen zwischen der Mediumkontrolle und der Behandlungsgruppe besteht. Bei MHH-CALL-4 ist der graphisch dargestellte Effekt nicht signifikant ( $p = 0,155$ ). Die Mittelwerte doppelt gefärbter, spät-apoptotischer Zellen der Mediumkontrollen und Behandlungsgruppen sind der Abbildung 16 zu entnehmen. Hierbei zeigt sich eine signifikante Zunahme des Anteils spät-apoptotischer Zellen unter Behandlung bei den Zelllinien MHH-CALL-4 ( $t(2,155) = -5,740$ ;  $p = 0,024$ ) und REH ( $t(4) = -4,805$ ;  $p = 0,009$ ). Bei RS4;11 ist der graphisch dargestellte Effekt knapp nicht signifikant ( $p = 0,066$ ).



**Abbildung 16: Q2 der finalen Auswertungs-Dotplots der Zelllinien (spät-apoptotische Zellen) nach 72 h Inkubation mit T<sub>H</sub>1 Zytokinen im Rahmen der Zelltodanalysen mittels FITC Annexin V und 7-AAD Färbung – Mittelwerte des prozentualen Anteils der Annexin V (+) und 7-AAD (+) Zellen jeder Zelllinie aus drei Versuchsreihen +/- einfachem Standardfehler. Mittelwert der Mediumkontrolle (weiß); Mittelwert der Behandlungsgruppe IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  (schwarz); \*: Signifikante Abweichung der Mittelwerte von Behandlungsgruppe und Mediumkontrolle (Signifikanzniveau  $\leq$  5%)**

Die Anteile nekrotischer Zellen, welche lediglich vom Lebend-/Totfarbstoff 7-AAD gefärbt werden und dadurch im Quadranten Q3 abgebildet sind, zeigen zwischen der Behandlungsgruppe und der Mediumkontrolle bei keiner der untersuchten Zelllinien einen signifikanten Unterschied. Im Anhang lassen sich aus Tabelle 27 bis 30 die statistischen Werte aller oben dargestellter Auswertungen entnehmen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass bei den Zelllinien REH und RS4;11, welche neben MHH-CALL-4 auf die Behandlung mittels 10 ng/ml IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  mit einer signifikanten Viabilitätsabnahme reagieren, eine Apoptose als Zelltodmechanismus auszumachen ist. Bei MHH-CALL-4 ist in dieser Versuchsreihe die Apoptose als Zelltodmechanismus nicht eindeutig nachzuvollziehen, zumal sich kein signifikantes Ergebnis bezüglich der Einzelfärbung mit Annexin V zeigt. Das Ergebnis der singulären



Färbung mittels 7-AAD deutet jedoch daraufhin, dass keine der untersuchten Zelllinien durch die Behandlung primär nekrotisch wird.

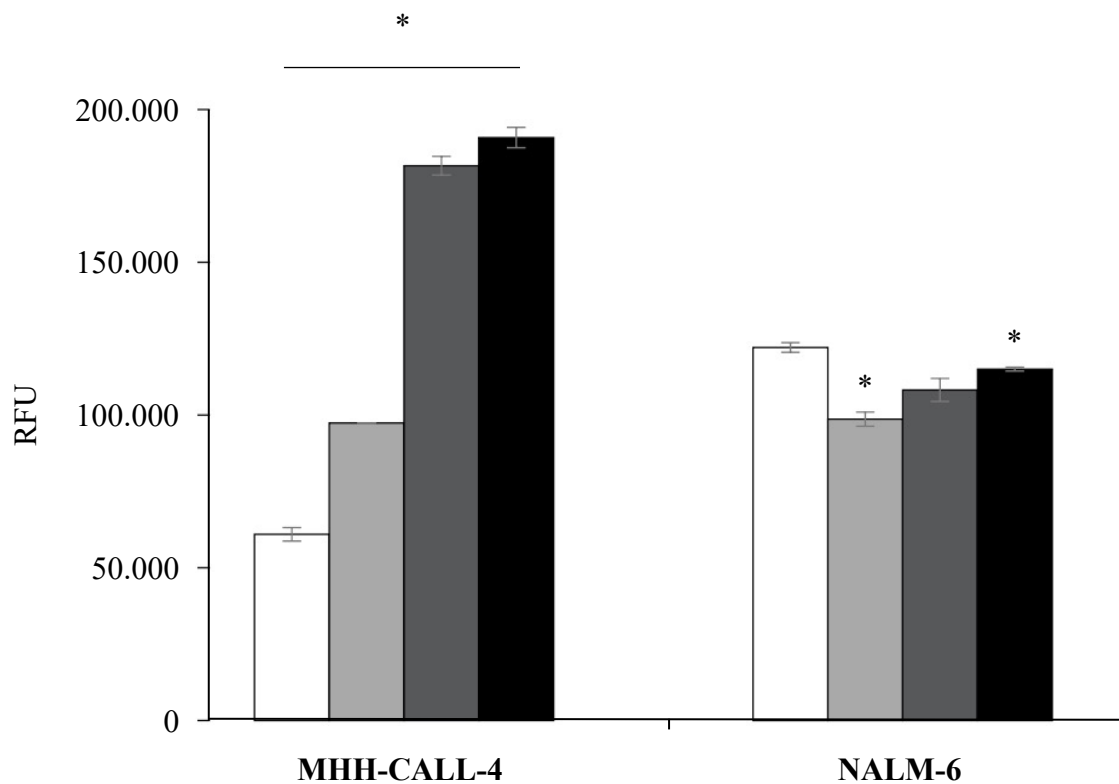
#### Aktivitätsmessung der Effektor-Caspasen 3 und 7

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurde zunächst die im Vorhinein reagibel erscheinende Zelllinie MHH-CALL-4 und die nicht reagibel wirkende Zelllinie NALM-6 analysiert. Da es sich hierbei um einen Vorversuch zur Anwendung an den Patientenblasten handelte, wurde der Effekt bei insgesamt vier Konzentrationen (0,1/1/10 und 100 ng/ml IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ ) untersucht. Dabei sind pro Behandlungsgruppe und Zelllinie zwei unabhängige Proben angesetzt worden. Für die Negativ- und Mediumkontrollen (Blanks) wurden drei und für die Positivkontrollen je Staurosporin-Konzentration eine Probe ausgelegt.

Die Menge an fluoreszierendem Produkt beziehungsweise die gemessene Fluoreszenzintensität ist proportional zu der Menge an aktiven Effektor-Caspasen 3 und 7 in der jeweiligen Probe. Eine prozentuale Angabe des Anteils lebender Zellen in den Negativkontrollen innerhalb dieses Versuchs ist aufgrund der Messmethode nicht möglich. Die Hintergrundfluoreszenz (Blank RFU) für das Medium mit 20 % FCS beträgt im Mittel 13008 RFU für das Medium mit 10 % FCS 12513 RFU. Wie aus Tabelle 18 zu entnehmen ist, liegt die mittlere Fluoreszenzintensität (relative Fluoreszenzeinheit (RFU)) der Negativkontrollen nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz für MHH-CALL-4 bei 60956 RFU und für NALM-6 bei 122103 RFU. Die Zugabe von Staurosporin (1  $\mu$ M) als Positivkontrolle zeigt einen deutlichen Effekt im Sinne eines Anstiegs der Fluoreszenzintensität und ist der Tabelle 18 als Einzelwert zu entnehmen.

**Tabelle 18: Mittelwerte der relativen Fluoreszenzeinheit (RFU) der Negativkontrollen sowie RFU-Einzelwerte der Positivkontrollen der Zelllinien (MHH-CALL-4 und NALM-6) in der durchgeführten Versuchsreihe zur Zelltodanalyse mittels photometrischer Aktivitätsmessung der Effektorcaspasen 3 und 7 unter Behandlung mit IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  – RFU-Mittelwerte und RFU-Einzelwerte ohne Hintergrundfluoreszenz (Assay RFU – Blank RFU); Positivkontrollen mit 1  $\mu$ M Staurosporin; SD: Standardabweichung**

<b>Mittelwert RFU</b>	<b>Negativkontrolle</b>	<b>Positivkontrolle (1 <math>\mu</math>M)</b>
<b>MHH-CALL-4</b>	60956 RFU (SD 3824)	182898 RFU
<b>NALM-6</b>	122103 RFU (SD 2733)	947416 RFU



Fehlerbalken: +/- 1 SE

- Negativkontrolle
- IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  1 ng/ml
- IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  0,1 ng/ml
- IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  10 ng/ml

**Abbildung 17: Mittelwerte der relativen Fluoreszenzeinheit (RFU) +/- einfachem Standardfehler der Zelllinien (MHH-CALL-4 und NALM-6) nach 72 h Inkubation mit T<sub>H</sub>1 Zytokinen im Rahmen der Zelltodanalysen mittels photometrischer Aktivitätsmessung der Effektorcaspasen 3 und 7 – RFU-Mittelwerte ohne Hintergrundfluoreszenz (Assay RFU – Blank RFU). Mittelwert der Negativkontrollen (weiß); Mittelwerte der Behandlungsgruppen in aufsteigender Konzentration: 0,1 ng/ml IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  (grau-hell); 1 ng/ml IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  (grau-dunkel); 10 ng/ml IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  (schwarz); \*: Signifikante Abweichung der Mittelwerte von Behandlungsgruppe und Negativkontrolle (Signifikanzniveau  $\leq$  5 %)**

Durch die Behandlung mittels IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  ist bei der Zelllinie MHH-CALL-4 mit zunehmender Konzentration ein höchst signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität ( $p \leq 0,001$ ), respektive der Aktivität der Caspasen 3 und 7 im Vergleich zur Negativkontrolle zu beobachten und in Abbildung 17 dargestellt. Bei der nicht reagiblen Zelllinie NALM-6 hingegen zeigt sich unter Behandlung, analog zur Viabilitätsanalyse in Kapitel 3.1.1, sogar ein gegenteiliger Effekt im Sinne einer geringeren Aktivität der Caspasen 3 und 7. Für 0,1 ng/ml als auch 10 ng/ml IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  ist diese Aktivitätsabnahme signifikant (Signifikanzniveau  $\leq$  5 %). Durch eine Zytokinkonzentration von 100 ng/ml verstärkt sich der dargelegte Effekt bei

MHH-CALL-4, jedoch scheint sich dieser bereits ab einer Konzentration von 10 ng/ml einem Plateau anzunähern. Bei NALM-6 bewirkt eine Konzentration von 100 ng/ml letztlich eine nicht signifikante Zunahme der Caspasen-Aktivität im Vergleich zur Negativkontrolle (Daten nicht gezeigt). Aus Tabelle 31 im Anhang sind die statistischen Werte der oben dargestellten Auswertungen zu entnehmen.

Nachdem sich für MHH-CALL-4 in der Zelltodanalyse mittels FITC Annexin V Färbung kein eindeutiger Nachweis einer Apoptose als Ursache des Viabilitätsverlustes durch proinflammatorische Zytokine ergab, liegt mittels der Aktivitätsbestimmung der Caspasen 3 und 7 nun ein klares Ergebnis vor. Zusätzlich werden die Methode selbst sowie die vorangegangenen Ergebnisse durch den zu erwartenden fehlenden Anstieg der Caspasen-Aktivität unter Behandlung bei NALM-6 bestätigt.

### 3.4.2 Analyse an Patientenblasten im proinflammatorischen und immunregulatorischen Zytokin-Milieu

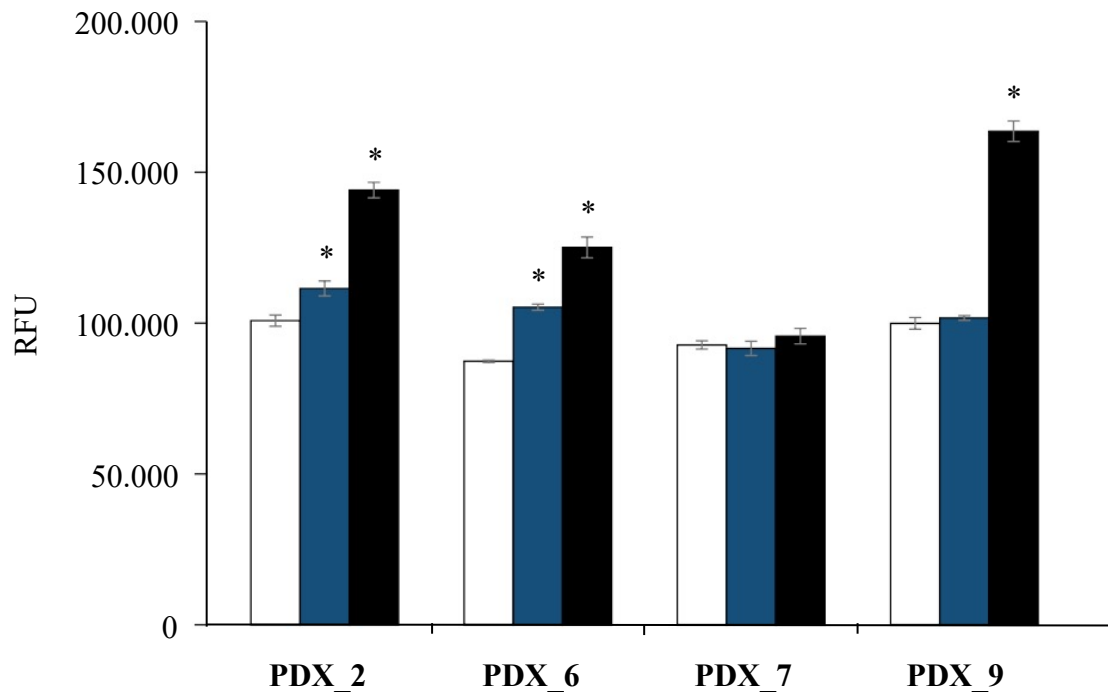
Nachdem sich unter anderem im Vorversuch, bei der Messung der Caspasen-Aktivität von MHH-CALL-4 und NALM-6, als auch in den Viabilitätsanalysen unter 3.1 und 3.2 die Auswertung des Effekts bei einer Zytokinkonzentration von 10 ng/ml als sinnvoll erwies, wurde diese auch in der Analyse der Caspasen-Aktivität bei den Patientenblasten angewandt. Dabei wurden pro Behandlungsgruppe und Patient drei unabhängige Proben angesetzt. Dies gilt auch für die Negativ- und Positivkontrollen sowie Mediumkontrollen (Blanks). Die Hintergrundfluoreszenz (Blank RFU) für das verwendete Medium mit 20 % FCS liegt ähnlich zum Vorversuch im Mittel bei 13056 RFU. Aus Tabelle 19 gehen die

**Tabelle 19: Mittelwerte der relativen Fluoreszenzeinheit (RFU) der Negativkontrollen und Positivkontrollen der Patientenblasten (PDX\_2\_6\_7 und PDX\_9) in der durchgeführten Versuchsreihe zur Zelltodanalyse mittels photometrischer Aktivitätsmessung der Effektorcaspasen 3 und 7 unter Behandlung mit IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  und IL10/TGF $\beta_1$  – RFU-Mittelwerte ohne Hintergrundfluoreszenz (Assay RFU – Blank RFU); Positivkontrollen mit 1  $\mu$ M Staurosporin; SD: Standardabweichung**

Mittelwert RFU	Negativkontrolle	Positivkontrolle (1 $\mu$ M)
<b>PDX_2</b>	100817 RFU (SD 3186)	158484 RFU (SD 1695)
<b>PDX_6</b>	87364 RFU (SD 661)	156447 RFU (SD 9685)
<b>PDX_7</b>	92760 RFU (SD 2374)	103116 RFU (SD 5262)
<b>PDX_9</b>	99915 RFU (SD 3358)	142716 RFU (SD 965)

mittleren Fluoreszenzintensitäten der Negativ- und Positivkontrollen sowie deren Standardabweichungen nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz hervor.

Unter Behandlung mit 10 ng/ml IL10 und TGF $\beta$ <sub>1</sub> zeigt sich eine signifikante Zunahme der Caspasen-Aktivität bei PDX\_2 ( $t(4) = -3,451$ ;  $p = 0,026$ ) und PDX\_6 ( $t(4) = -16,319$ ;  $p = 0,000$ ). Demnach ist eine Apoptose als Zelltodmechanismus anzunehmen und es bestätigt sich für beide Patienten zugleich das Ergebnis der Viabilitätsanalyse mittels Zombie Aqua Färbung in Kapitel 3.2.2. Bei PDX\_7 hingegen ist trotz nachgewiesener, deutlicher Viabilitätsabnahme in Kapitel 3.2.2 eine nahezu unveränderte Fluoreszenzintensität nach Behandlung mit IL10 und TGF $\beta$ <sub>1</sub> im Vergleich zur Negativkontrolle festzustellen.



Fehlerbalken: +/- 1 SE

□ Negativkontrolle ■ IL10/TGF $\beta$ <sub>1</sub> 10 ng/ml ■ IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  10 ng/ml

**Abbildung 18:** Mittelwerte der relativen Fluoreszenzeinheit (RFU) +/- einfachem Standardfehler der Patientenblasten (PDX\_2\_6\_7 und PDX\_9) nach 48 h Inkubation mit T<sub>H</sub>1 Zytokinen und immunregulatorischen Zytokinen im Rahmen der Zelltodanalysen mittels photometrischer Aktivitätsmessung der Effektorcaspasen 3 und 7 – RFU-Mittelwerte ohne Hintergrundfluoreszenz (Assay RFU – Blank RFU). Mittelwert der Negativkontrollen (weiß); Mittelwerte der Behandlungsgruppen: 10 ng/ml IL10/TGF $\beta$ <sub>1</sub> (blau-dunkel); 10 ng/ml IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  (schwarz); \*: Signifikante Abweichung der Mittelwerte von Behandlungsgruppe und Negativkontrolle (Signifikanzniveau  $\leq 5\%$ )

PDX\_9 zeigt analog zu den Ergebnissen der FSC/SSC Viabilitätsanalyse nur eine minimale, nicht signifikante Zunahme des Messsignals (Abbildung 18).

Für die Behandlung mit 10 ng/ml IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  ergibt sich für PDX\_2 ( $t(4) = -13,689$ ;  $p = 0,000$ ) sowie PDX\_6 ( $t(4) = -10,835$ ;  $p = 0,000$ ) und PDX\_9 ( $t(4) = -16,255$ ;  $p = 0,000$ ) eine höchst signifikante Aktivitätszunahme der Caspasen 3 und 7. Für PDX\_2 und PDX\_6 ist dieses Ergebnis mit den vorangegangenen Viabilitätsanalysen vereinbar und weist auf eine durch proinflammatorische Zytokine ausgelöste Apoptose hin. PDX\_7 zeigt im Vergleich zur Negativkontrolle ein nahezu unverändertes Messsignal in der Behandlungsgruppe. Die deutlich gesteigerte Aktivität der Caspasen bei PDX\_9 hingegen ist unerwartet und damit ohne konkreten Bezug zum Ergebnis in Kapitel 3.1.2. Aus Tabelle 32 im Anhang sind die statistischen Werte der oben dargestellten Auswertungen zu entnehmen.

Letztlich zeigt sich, dass unter Behandlung in beiden Zytokin-Milieus zum weitaus überwiegenden Teil eine Apoptose als Zelltodmechanismus bei den Patientenzellen auszumachen ist, welche in den Viabilitätsanalysen mit einer Reduktion des Lebendzellanteils reagieren. Zu klären bleibt, ob bei einer fehlenden Apoptosedetektion und bei offensichtlicher Viabilitätsabnahme in den Vorversuchen, im Umkehrschluss eine Nekrose als Zelltodmechanismus angenommen werden kann. Diesbezüglich wären weiterführende Analysen notwendig.

### 3.5 Rezeptorstatus der behandelten Zelllinien sowie Patientenleukämiezellen

#### Zelllinien

In der FACS basierten Analyse der Rezeptorverteilung auf der Zelloberfläche der Zelllinien wurden für jeden untersuchten Rezeptor drei unabhängige Versuchsreihen durchgeführt. Dabei ergaben sich die in Tabelle 20 aufgelisteten Mittelwerte der gemessenen Antikörperbindungskapazitäten der jeweiligen Rezeptoren. Eine Regressionsanalyse zur Überprüfung einer möglichen Beziehung zwischen der Rezeptorverteilung des entsprechenden Zytokinrezeptors und dem in den Vorversuchen bestimmten, durch das Zytokin ausgelösten spezifischen Zelltod, ergibt für alle der untersuchten Rezeptoren kein signifikantes Ergebnis. Für den Rezeptor TNFR-2 ist jedoch die Tendenz zu erkennen, dass mit steigender Rezeptordichte, der durch TNF $\alpha$  ausgelöste spezifische Zelltod zunimmt ( $R^2 = 0,309$ ,  $p = 0,252$ ).

**Tabelle 20: Gegenüberstellung der Mittelwerte der Antikörperbindungskapazitäten (ABC) der Rezeptoren IFNGR1, TNFR-1 und TNFR-2 sowie von mTNF $\alpha$  und dem spezifischen Zelltod (in Prozent) der Zelllinien nach 72 h Inkubation mit 10 ng/ml TNF $\alpha$  respektive 10 ng/ml IFN $\gamma$ .**

	TNF $\alpha$				IFN $\gamma$	
	ABC TNFR-1	ABC TNFR-2	ABC m. TNF $\alpha$	Spez. Zelltod	ABC IFNGR1	Spez. Zelltod
<b>KOPN-8</b>	1246	3834	783	5,14	12265	0,79
<b>MHH-CALL-4</b>	564	6777	936	14,21	3521	-0,08
<b>REH</b>	1079	300	789	10,24	5955	0,12
<b>RS4;11</b>	569	1447	1316	5,51	3768	1,20
<b>NALM-16</b>	782	1235	1228	-0,71	5746	2,57
<b>NALM-6</b>	712	1802	730	0,20	6983	-0,34

### Patientenblasten

Die Zytokinrezeptorverteilung bei den Patientenblasten ist anhand der Antikörperbindungskapazität eines jeden Rezeptors in Tabelle 21 aufgezeigt und dem durch das Zytokin ausgelösten spezifischen Zelltod gegenübergestellt.

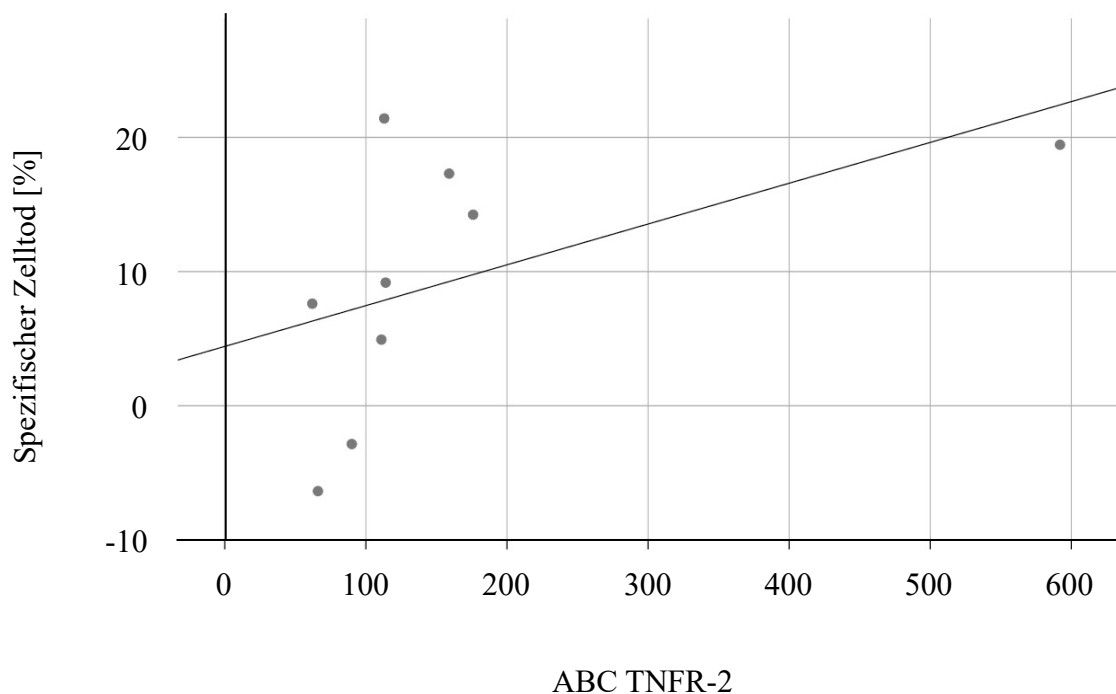
**Tabelle 21: Gegenüberstellung der Antikörperbindungskapazität (ABC) der Rezeptoren IFNGR1, TNFR-1 und TNFR-2 sowie von mTNF $\alpha$  und dem spezifischen Zelltod (in Prozent) der Patientenblasten nach 48 h Inkubation mit 10 ng/ml TNF $\alpha$  respektive 10 ng/ml IFN $\gamma$ .**

	TNF $\alpha$				IFN $\gamma$	
	ABC TNFR-1	ABC TNFR-2	ABC m. TNF $\alpha$	Spez. Zelltod	ABC IFNGR1	Spez. Zelltod
<b>PDX_1</b>	293	113	547	21,41	6175	11,67
<b>PDX_2</b>	345	62	225	7,61	4035	12,37
<b>PDX_3</b>	254	176	424	14,24	2746	6,47
<b>PDX_4</b>	214	111	348	4,93	3018	1,19
<b>PDX_5</b>	248	114	267	9,18	5410	-3,97
<b>PDX_6</b>	538	159	244	17,3	3935	5,4
<b>PDX_7</b>	432	90	263	-2,85	4904	-14,11
<b>PDX_8</b>	325	66	264	-6,36	3456	-24,21
<b>PDX_9</b>	496	592	177	19,45	3074	-36,35

Analog zur Analyse bei den Zelllinien, zeigt sich bei den Patientenleukämiezellen ein heterogenes Verteilungsmuster der untersuchten Rezeptoren. Mittels einer Regressionsanalyse kann für die Rezeptoren IFNGR1 ( $R^2 = 0,091$ ,  $p = 0,431$ ) und TNFR-1 ( $R^2 = 0,042$ ,  $p = 0,595$ ) sowie für membrangebundenes TNF $\alpha$  ( $R^2 = 0,101$ ,  $p = 0,405$ ) kein signifikanter Zusammenhang, mit dem durch das entsprechende Zytokin ausgelösten

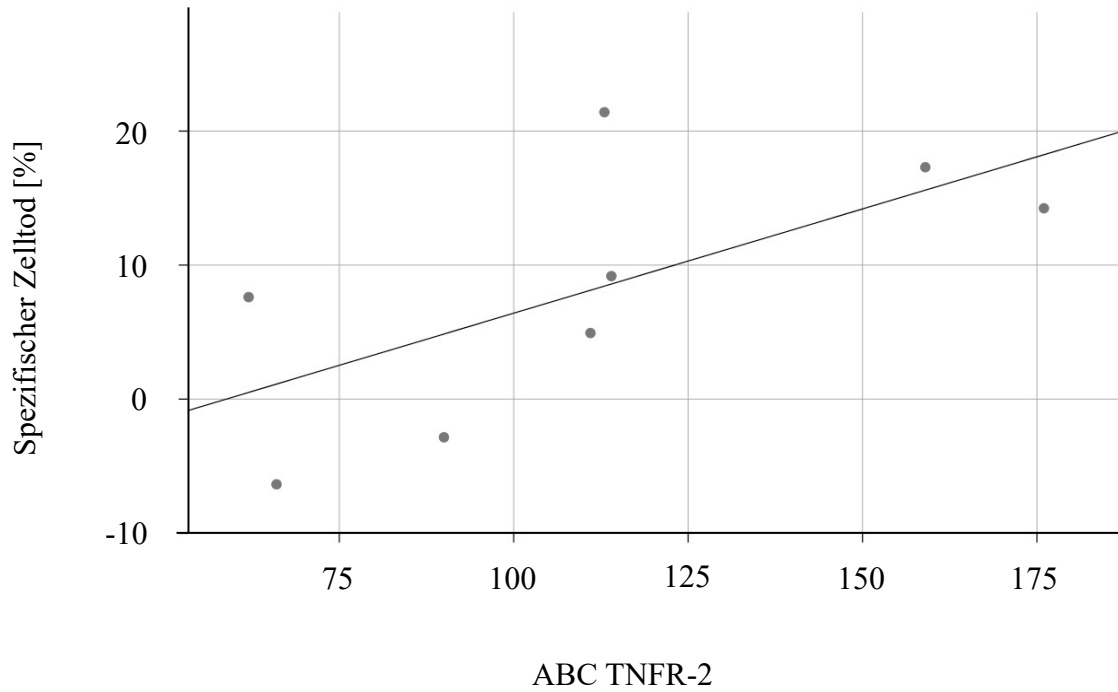
spezifischen Zelltod, festgestellt werden. Dabei ist auch keine Tendenz einer möglichen direkten Beziehung zu erkennen.

Ferner ist für die TNFR-2 Verteilung bei den Patientenblasten in gleicher Weise eine Beziehung zur TNF $\alpha$ -bedingten Viabilitätsabnahme festzustellen. In Abbildung 19 ist eine Regression abgebildet, die diesen Zusammenhang visualisiert, sich jedoch ebenfalls als nicht signifikant erweist ( $R^2 = 0,266$ ,  $p = 0,155$ ). Betrachtet man in diesem Punktediagramm den unteren Bereich der Antikörperbindungskapazität von TNFR-2 genauer und grenzt dabei den Ausreißer (PDX\_9) von der Auswertung aus, ergibt sich die in Abbildung 20 dargestellte Regressionsgerade ( $R^2 = 0,432$ ,  $p = 0,077$ ).

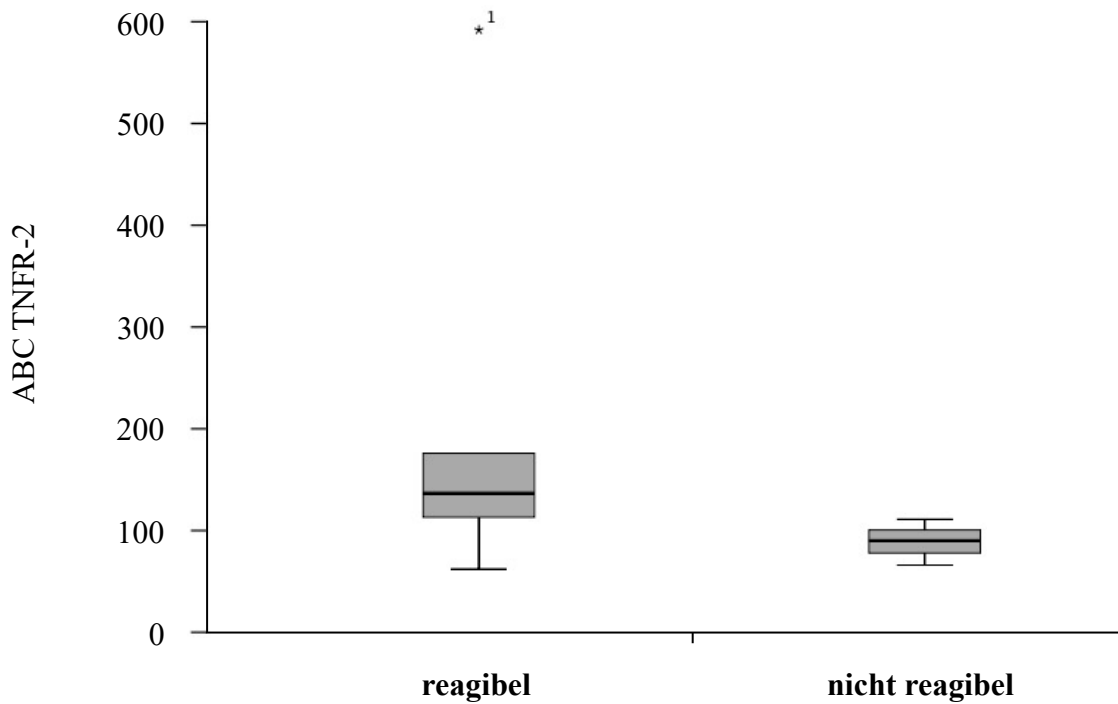


**Abbildung 19: Regression (mit Ausreißer) der Antikörperbindungskapazität (ABC) von TNFR-2 und dem spezifischen Zelltod der Patientenblasten nach 48 h Inkubation mit 10 ng/ml TNF $\alpha$  – Regressionsgleichung ( $y = 4,43 + 0,03 x$ );  $R^2 = 0,266$**

Wählt man einen Grenzwert des spezifischen Zelltods durch das jeweilige Zytokin, um zwischen reagiblen und nicht reagiblen Patientenblasten zu unterscheiden, ist eine gruppierte Darstellung möglich. In Abbildung 21 sind, bei einem Cut-off von 5 % spezifischem Zelltod durch 10 ng/ml TNF $\alpha$ , die beiden Gruppen reagibler respektive nicht reagibler Patientenleukämiezellen als Boxplot der gemessenen Antikörperbindungskapazität von TNFR-2 dargestellt.



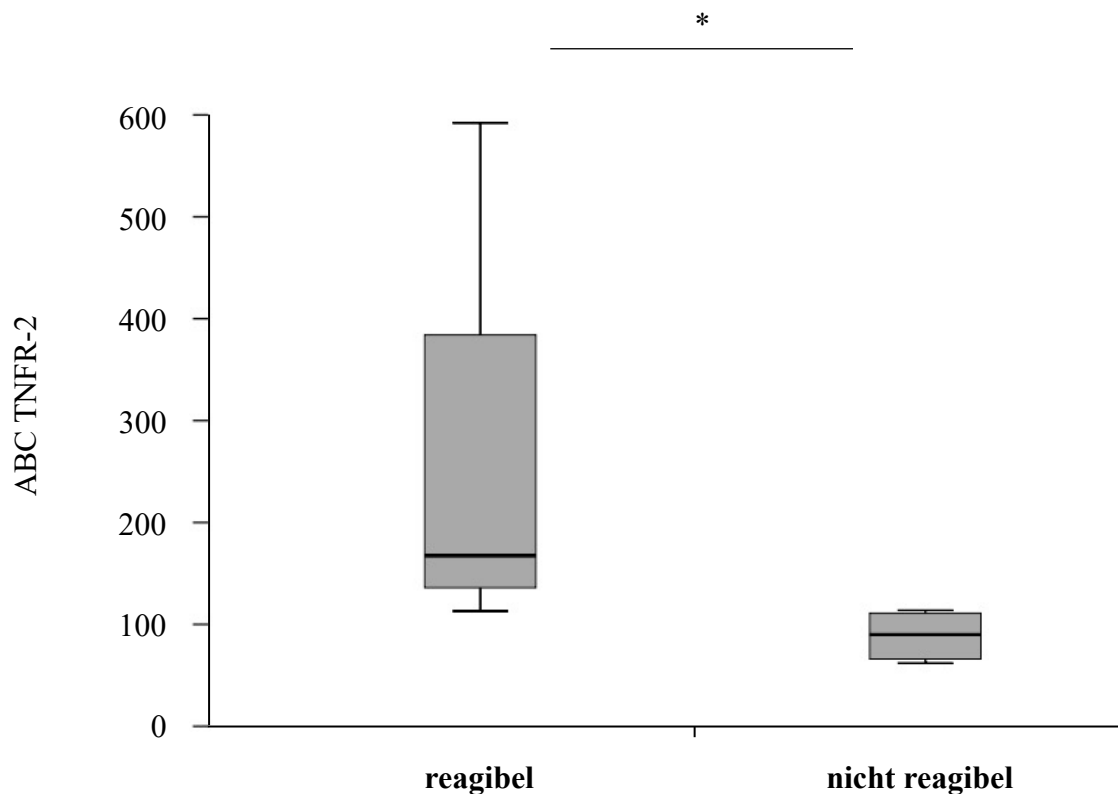
**Abbildung 20:** Regression (ohne Ausreißer) der Antikörperbindungskapazität (ABC) von TNFR-2 und dem spezifischen Zelltod der Patientenblasten nach 48 h Inkubation mit 10 ng/ml TNF $\alpha$  – Regressionsgleichung ( $y = -9,15 + 0,16 x$ );  $R^2 = 0,432$



**Abbildung 21:** Gruppiertes Boxplot der Antikörperbindungskapazität (ABC) von TNFR-2 der Patientenblasten. Cut-off reagibel/nicht reagibel bei 5 % spezifischem Zelltod nach 48 h Inkubation mittels 10 ng/ml TNF $\alpha$  – \*<sup>1</sup>: Ausreißer (PDX\_9) mittels Sternchen dargestellt



Ein Vergleich der Mittelwerte durch den Mann-Whitney-U-Test zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $p = 0,167$ , Exakte Signifikanz). Legt man den Cut-off bei 10 % spezifischem Zelltod durch die Behandlung mit  $TNF\alpha$  fest, ist bei der Gruppierung reagibler respektive nicht reagibler Patientenblasten ein signifikanter Unterschied in der TNFR-2 Rezeptorverteilung zu erkennen ( $p = 0,032$ , exakte Signifikanz;  $r = 0,735$ ). Die graphische Darstellung ist der Abbildung 22 zu entnehmen.



**Abbildung 22:** Gruppiertes Boxplot der Antikörperbindungskapazität (ABC) von TNFR-2 der Patientenblasten. Cut-off reagibel/nicht reagibel bei 10 % spezifischem Zelltod nach 48 h Inkubation mittels 10 ng/ml  $TNF\alpha$  – \*: Signifikant stärkere Expression von TNFR-2 auf reagiblen Patientenblasten (Mann-Whitney-U-Test, exakte Signifikanz, Signifikanzniveau  $\leq 5\%$ )

Bei der durchgeführten Analyse des Rezeptorstatus der behandelten Zelllinien und Patientenleukämiezellen zeigt sich demnach zum Großteil ein unspezifisches Verteilungsmuster der untersuchten Rezeptoren und von membrangebundenem  $TNF\alpha$ . Bei genauerer Betrachtung kristallisiert sich jedoch ein möglicher Zusammenhang zwischen der Expression des Rezeptors TNFR-2 und der Viabilitätsabnahme durch  $TNF\alpha$  heraus.

## 4. Diskussion

### 4.1 Effekte der proinflammatorischen Zytokine mit Bezug auf das Therapieansprechen, die Risikogruppierung und den Rezeptorstatus der ALL

#### Viabilitätsanalysen

In den Viabilitätsanalysen der Patientenblasten konnte für IFN $\gamma$  bei manchen Patientenproben eine Viabilitätsabnahme bei anderen aber auch eine Zunahme der Viabilität beobachtet werden. Ersvaer und Kollegen (2007) konnten diesen divergenten Effekt von IFN $\gamma$  auch an AML-Blasten nach einer Inkubationszeit von 48 h nachweisen. Durch die Kombinationstherapie mit TNF $\alpha$ , wurde die bei drei Patientenblasten in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene deutliche Viabilitätszunahme hingegen abgeschwächt. Allgemein betrachtet überwog bei Inkubation mit IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  ein Zelltod auslösender Effekt. Sowohl bei den Zelllinien (4/6) nach 72 h als auch den Patientenblasten (6/9) nach 48 h Inkubation mit IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ , lässt sich ein Viabilitätsverlust mit einem spezifischen Zelltod > 5 % respektive > 10 % nachweisen. In einigen dieser Fälle ist eine synergistische Wirkung der T<sub>H</sub>1 Zytokine zu erkennen. Winkler und Kollegen (2015) konnten bei pädiatrischen ALL-Patienten zum Diagnosezeitpunkt eine niedrigere Expression von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  durch T-Zellen im Vergleich zu altersgleichen Kontrollen nachweisen. Dieser Unterschied erwies sich zwischen den ALL-Risikogruppen zum Diagnosezeitpunkt auch als signifikant. Dabei hatten Patienten der Hochrisikogruppe eine niedrigere Produktion an IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  als Patienten, die einer Standard- oder Mittleren-Risikogruppe zugehörten. Auch die initiale periphere Blastenzahl korrelierte negativ mit der IFN $\gamma$  Expression durch T-Zellen. Insgesamt unterstreicht dies einen möglichen protektiven Effekt von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ . Anhand des IFN $\gamma$ -Polymorphismus an Position +874 des Intron1 bei der kindlichen B-Linien ALL konnte ein deutlicher Einfluss von IFN $\gamma$  auf die Immunüberwachung maligner B-Zellklone und die Einteilung mittels klinischer Risikoparameter nachgewiesen werden (Cloppenburg et al., 2005). So haben Patienten mit expressionsstarken IFN $\gamma$ -Allelen einen signifikant späteren Manifestationszeitpunkt. Patienten der Hochrisikogruppe, mit fehlendem Ansprechen auf eine Prednison-Therapie, weisen hingegen mit signifikant höherer Wahrscheinlichkeit expressionsschwache IFN $\gamma$ -

Allele auf. Letztere Beobachtung ist möglicherweise durch die von IFN $\gamma$  bedingte Steigerung der Glukokortikoid-Rezeptor Expression zu erklären, welche an Maus-Makrophagen nachgewiesen wurde (Salkowski & Vogel, 1992). Bezüglich des TNF-Polymorphismus an Position -308 der TNF $\alpha$  Promotorregion, konnte für Patienten mit dem expressionsstarken TNF1/TNF2 Genotyp kein Zusammenhang mit dem Ansprechen auf eine Prednison-Therapie bei pädiatrischen ALL-Patienten gezeigt werden. Patienten mit einem schlechten Ansprechen auf eine Steroidtherapie zeigten hingegen ein signifikant erhöhtes Rezidivrisiko, wenn sie den TNF1/TNF2 respektive TNF $\alpha$  G/A Genotyp trugen (Lauten et al., 2002).

### Zellzyklusanalysen

In den durchgeführten Zellzyklusanalysen der Zelllinien dominierte eine Proliferationsreduktion und ein Viabilitätsverlust mit Abnahme der S Phase und Anstieg der sub G1 Phase. Analog zu den Ergebnissen der Viabilitätsassays war auch hier zum Teil eine synergistische Wirkung der T<sub>H</sub>1 Zytokine festzustellen. Ein durch T<sub>H</sub>1 Zytokine ausgelöster permanenter Wachstumsarrest, wie er durch Braumüller und Kollegen (2013) an verschiedenen Tumoren gezeigt wurde, lässt sich auf die hier durchgeführten Analysen nicht übertragen. Ein Rückgang der Wachstumsrate, mit Reduktion der S-Phase und Anstieg der G0/G1 Fraktion, war lediglich bei zwei der sechs Zelllinien in milder Ausprägung zu beobachten.

### Zelltodanalysen

Anhand der Zelltodanalysen mittels Annexin V/7-AAD Färbung und der Aktivitätsmessung der Effektor-Caspasen 3/7, ließ sich bei drei von vier Zelllinien, welche zuvor einen Viabilitätsverlust von > 5 % auf die Inkubation mit IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  zeigten, eine Apoptose als Zelltodmechanismus nachweisen ( $p < 5 \%$ ). Bei zwei ausgewählten Patientenblasten (PDX\_2 und PDX\_6), welche in den Vorversuchen mit einer Viabilitätsabnahme von > 15 % auf die Inkubation mit IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  reagierten, konnte mittels Messung der Caspasen-Aktivität ebenfalls eine Apoptose detektiert werden ( $p < 0,1 \%$ ). Eine negative Korrelation der Zellviabilität und dem prozentualen Anteil apoptotischer Zellen wurde für IFN $\gamma$  auch an AML Blasten gezeigt (Ersvaer et al., 2007). Braumüller und Kollegen (2013) konnten hingegen keinen Anstieg der Caspase 3

positiven Zellen und daher keinen Apoptose auslösenden Effekt der T<sub>H</sub>1 Zytokine in ihrem Tumormodell nachweisen.

### Rezeptorstatus

In den Untersuchungen zum Rezeptorstatus ließ sich für TNFR-1 kein Zusammenhang zwischen dessen Expression auf der Zelloberfläche und dem durch TNF $\alpha$  vermittelten spezifischen Zelltod feststellen. Für TNFR-2 hingegen zeigte sich in den Regressionsanalysen bei den Zelllinien bereits die Tendenz einer positiven Korrelation zwischen der Rezeptorverteilung und dem ausgelösten spezifischen Zelltod durch TNF $\alpha$ . Bei den Patientenblasten erwies sich die Rezeptorverteilung von TNFR-2 nach einer Gruppierung in reagibel und nicht reagibel Zellen (Cut-off reagibel/nicht reagibel bei 10 %) letztlich als signifikant unterschiedlich ( $p < 5 \%$ ). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die eingangs beschriebene auto- oder parakrine Aktivierung von TNFR-1 durch endogen produziertes membrangebundenes TNF $\alpha$  (Grell et al., 1999). Darüber hinaus konnten Aguadé-Gorgorió und Kollegen (2020) zeigen, dass eine SMAC (Second Mitochondria derived Activator of Caspase mimetics)-induzierte und RIP1-abhängige Apoptose und Nekroptose, Liganden unabhängig, über TNFR-2 vermittelt wird. Eine Korrelation zwischen der Expression von membrangebundenem TNF und einem damit verbundenen Überlebensvorteil zeigte sich in den Analysen dieser Arbeit nicht. Gu und Kollegen (2006) wiesen jedoch einen das Zellüberleben fördernden Effekt von durch ALL-Zellen selbst produziertem endogenem TNF $\alpha$  nach, welcher über TNFR-2 und den nachgeschalteten PI3K/Proteinkinase B Signalweg vermittelt wird.

In der Regressionsanalyse für den Rezeptor IFNGR1 konnte kein signifikanter Zusammenhang mit dem durch IFN $\gamma$  ausgelösten spezifischen Zelltod detektiert werden. Die IFNGR1 Expression variiert stark zwischen unterschiedlichen Geweben, wobei der Umfang der Expression nicht mit dem Ausmaß des durch IFN $\gamma$  induzierten Signals in den Zellen zusammenhängt (Farrar & Schreiber, 1993). Die stärker regulierte Expression von IFNGR2 wird hingegen als ausschlaggebend für die Empfänglichkeit des IFN $\gamma$ -Signals einer Zelle angenommen und sollte daher in weiterführenden Analysen in Betracht gezogen werden.

#### 4.2 Effekte der immunregulatorischen Zytokine mit Bezug auf das Therapieansprechen, die Risikogruppierung und Hypothesen zur Genese der ALL

##### Viabilitätsanalysen

In den Viabilitätsanalysen induzierte TGF $\beta$ <sub>1</sub>, als Hauptakteur des immunregulatorischen Zytokin-Milieus, sowohl bei den Zelllinien (4/6) nach 72 h als auch bei den Patientenblasten (5/9) nach 48 h Inkubation eine deutliche Abnahme des Lebendzellanteils (spezifischer Zelltod > 5 %, respektive > 12 %). Wie Winkler und Kollegen (2015) zeigen konnten, korreliert eine höhere TGF $\beta$ <sub>1</sub> Expression von T-Zellen bei pädiatrischen ALL-Patienten in Remission und vor Erhaltungstherapie auch mit einem besseren ereignisfreien Überleben. Bezüglich des TGF $\beta$ <sub>1</sub> Polymorphismus an Codon 25 wurde hingegen eine geringere Rezidivrate und ein signifikant besseres ereignisfreies Überleben für den niedrig produzierenden Genotyp TGF $\beta$ <sub>1</sub> C/C im Vergleich zu den mittel- und stark produzierenden Genotypen TGF $\beta$ <sub>1</sub> G/C und TGF $\beta$ <sub>1</sub> G/G nachgewiesen. Der stark produzierende Genotyp TGF $\beta$ <sub>1</sub> T/T an Codon 10 ist zudem signifikant häufiger bei Patienten der Hochrisikogruppe im Vergleich zu jenen der Standard- oder Mittleren-Risikogruppe verteilt. Expressionsstarke TGF $\beta$ <sub>1</sub> Genotypen können daher mit einem erhöhten Risikoprofil von ALL-Patienten assoziiert werden und bergen eine schlechtere Prognose. Ein Zellüberleben fördernder Effekt nach Therapie mit TGF $\beta$ <sub>1</sub> konnte in unseren Analysen jedoch nicht gezeigt werden. Hierdurch wird die funktionale Dualität von TGF $\beta$ <sub>1</sub> verdeutlicht, welche eingangs bereits erwähnt wurde (Winkler et al., 2015; Yang et al., 2010).

Für IL10 konnte in allen durchgeführten Analysen als Einzeleffekt lediglich eine leichte Viabilitätszunahme bei zwei Patienten festgestellt werden. Ein synergistischer Effekt von IL10 und TGF $\beta$ <sub>1</sub> wurde nicht detektiert. Die Detektion eines möglichen Zellüberlebensvorteils durch IL10 zeigt sich auch anhand der initialen peripheren Blastenzahl, welche signifikant positiv mit der IL10 Expression von T-Zellen korreliert (Winkler et al., 2015). Wie zu Beginn erwähnt, ist für hämatologische und solide Tumore zudem eine negative Korrelation zwischen den IL10 Serumwerten und der Prognose der Patienten beschrieben. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, unter anderem, die Wirkung von IL10 als Wachstumsfaktor oder -kofaktor, wie es für B-Zellen gezeigt wurde (Rousset et al., 1992). B-Zelltumore können *in vitro* durch IL10 zur Proliferation angeregt werden (Lu et al., 1995). In humanen Melanometastasen hingegen konnte ein besseres

Ansprechen der Krebszellen auf die antitumorogenen Effekte von systemisch appliziertem IL2 nachgewiesen werden, bei welchen eine höhere IL10 mRNA Expression vor Therapiebeginn vorlag (Mocellin et al., 2001). Es wird davon ausgegangen, dass IL10 die Mikroumgebung der Tumore gegenüber einem weiteren proinflammatorischen Stimulus, wie der IL2 Gabe, vorbereitet und die Therapie-Empfänglichkeit der Tumore dadurch erhöht wird (Mocellin et al., 2003). Für pädiatrische ALL-Patienten mit dem expressionsstarken homozygoten IL10 G/G Genotyp des Polymorphismus an Position -1082 der IL10 Promotorregion, konnte ein signifikant protektiver Effekt von IL10, mit gutem Ansprechen auf eine Prednison-Therapie, gezeigt werden (Lauten et al., 2002). Dieser Effekt ist möglicherweise durch die von IL10 bedingte Steigerung der Glukokortikoid-Rezeptor Konzentration zu erklären, welche an Monozyten nachgewiesen wurde (Franchimont et al., 1999). Winkler und Kollegen (2015) wiesen ein erhöhtes Gesamtüberleben sowie eine signifikant geringere Rezidivrate bei den mittel- und stark produzierenden Genotypen IL10 G/A und IL10 G/G nach. Der expressionsstarke Genotyp war darüber hinaus signifikant weniger häufig in pädiatrischen ALL-Patienten als in gesunden Kontrollen verteilt. Ferner konnte gezeigt werden, dass mit niedrigeren IL10 Serumwerten zur Geburt ein erhöhtes Risiko zur Entstehung einer akuten lymphoblastischen Leukämie einhergeht (Chang et al., 2011). Chang und Kollegen verfolgen hierbei die Hypothese einer infektionsgetriggerten Genese der ALL bei Kindern, wobei der niedrige IL10 Spiegel als Ausdruck eines dysfunktionalen Immunsystems zur Geburt angesehen wird.

#### Hypothese zur infektionsgetriggerten Genese der ALL

Greaves (2018) geht noch ausführlicher auf die Hypothese zur infektionsgetriggerten Entstehung der ALL ein und beschreibt ein Zwei-Stufen-Modell. Als zentraler Punkt wird hierbei die reduzierte Exposition des menschlichen Organismus gegenüber Mikroorganismen in der perinatalen und postnatalen Periode in der modernen Gesellschaft gesehen, wodurch Defizite in der Prägung des Immunsystems entstehen. Durch eine konsekutive Dysregulation von Immunantworten im Rahmen von Infektionen wird ein zweites Mutationsereignis provoziert. Bei bereits *in utero* vorliegenden prä-leukämischen B-Zellklone, kann dieses letztlich zur klinischen Manifestation einer ALL im Kindesalter führen (Ma et al., 2013). Einen plausiblen Pathomechanismus hierfür

liefern die Analysen von Ford und Kollegen (2009). B-ALL Vorläuferzellen, welche das Fusionsgen TEL-AML1 tragen, sind resistent gegenüber der antiproliferativen Wirkung von TGF $\beta$ <sub>1</sub>. Folglich kommt es in der Gegenwart von TGF $\beta$ <sub>1</sub> zu einer selektiven Expansion eines prä-leukämischen Zellklons, wodurch sekundäre Mutationen, die zur Manifestation einer ALL führen, begünstigt werden können. In den Viabilitäts- und Zellzyklusanalysen mit TGF $\beta$ <sub>1</sub> zeigte die Zelllinie REH, mit der Translokation t(12;21) und dem daraus resultierendem Fusionsgen TEL-AML1, ebenfalls keine Reaktion. Auch PDX\_9 war nicht reagibel auf TGF $\beta$ <sub>1</sub> und trägt das Fusionsgen TEL-AML1.

### Zellzyklusanalysen

Der in den Zellzyklusanalysen der Zelllinien dargestellte, durch TGF $\beta$ <sub>1</sub> ausgelöste Rückgang der Wachstumsrate, mit Anstieg der G0/G1 Fraktion und Reduktion der S-Phase, kann Ausdruck eines vorliegenden Wachstumsarrests sein. Versuche zum Nachweis eines permanenten Wachstumsarrests oder spezifischer Seneszenzmarker erfolgten jedoch nicht. Senturk und Kollegen (2010) konnten in hepatozellulären Karzinomzellen eine durch TGF $\beta$ <sub>1</sub> ausgelöste Seneszenz nachweisen, welche mit der Induktion von p15<sup>INK4B</sup> und p21<sup>CIP1</sup> einhergeht. Auch in Melanomzellen wurde ein von TGF $\beta$ <sub>1</sub> und dem Downstream-Produkt Leukemia Inhibitory Factor (LIF) abhängiger Zellzyklusarrest sowie eine Caspase-vermittelte Apoptose beschrieben (Humbert et al., 2015).

### Zelltodanalysen

Der Zelltodmechanismus im immunregulatorischen Zytokin-Milieu wurde exemplarisch an vier primären Patientenblasten mittels Aktivitätsmessung der Effektor-Caspasen 3/7 evaluiert. Dabei konnte für zwei Patientenblasten eine Apoptose als Zelltodmechanismus festgestellt werden. Weiterführende Analysen mittels Annexin V/7-AAD Färbung müssten durchgeführt werden, um bei einer fehlenden Apoptosedetektion im Caspase 3/7 Assay, jedoch offensichtlicher Viabilitätsabnahme in den Vorversuchen, eine Nekrose als möglichen Zelltodmechanismus zu detektieren. Die pro-apoptotischen Effekte von TGF $\beta$ <sub>1</sub> sind, wie Valderrama-Carvajal und Kollegen (2002) zeigen konnten, besonders stark bei Immunzellen ausgeprägt. Hierfür ist die Expression der Inositol Phosphatase SHIP durch TGF $\beta$ <sub>1</sub> entscheidend.

Neben dem hier evaluierten, direkten antitumorogenen Effekt auf Krebszellen, ist die zu Beginn erwähnte Funktionsstörung von NK-Zellen durch TGF $\beta$ <sub>1</sub> von Bedeutung. Von ALL-Blasten produziertes TGF $\beta$ <sub>1</sub> führt über einen SMAD-abhängigen Signalweg zur signifikanten Beeinträchtigung der NK-Zell-Funktion. Hierdurch entziehen sich die ALL-Blasten von pädiatrischen B-ALL-Patienten einer Immunreaktion der NK-Zellen (Rouce et al., 2016).

#### 4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen erkennen, dass sowohl bei den Reaktionsmustern der untersuchten Vorläufer B-ALL-Zellen in Folge der Inkubation mit ausgewählten proinflammatorischen und immunregulatorischen Zytokinen, als auch bei der Rezeptorverteilung auf der Zelloberfläche eine große Heterogenität vorliegt. Neben teils konträren Effekten ein und desselben Zytokins, sind synergistische Wirkungen, insbesondere in der Kombination der T<sub>H</sub>1 Zytokine IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ , aber auch das Ausbleiben eines zellulären Effekts bei unterschiedlichen Leukämiezellen festzustellen. Wie aus der aktuellen wissenschaftlichen Literatur bereits hervorgeht, lässt auch diese Arbeit keine einfache Charakterisierung der direkten, zellulären Zytokinwirkung auf die B-Zell Vorläufer ALL zu. Gründe für die Heterogenität sind einerseits in der breit gefächerten Signaltransduktion eines einzelnen Zytokins zu finden (Jorgovanovic et al., 2020; Moore et al., 2001; Wang & Lin, 2008; Yang et al., 2010). Andererseits ist die veränderte Zellbiologie der Vorläufer B-ALL-Zellen entscheidend (Ford et al., 2009; Roberts & Mullighan, 2020). Des Weiteren unterliegen Zytokine einem Feedback-Mechanismus, welcher im physiologischen Zustand eine Homöostase bedingt. In unterschiedlichen Phasen der Krebserkrankung und der Krebstherapie kann es jedoch zu vielfältigen und teils widersprüchlichen Funktionen der einzelnen Zytokine kommen, mit Auswirkungen auf die Prognose der Patienten (Wiegering et al., 2013; Winkler et al., 2015). Dennoch war es möglich, anhand der *in vitro* Versuche mit Vorläufer B-ALL-Zellen für die ausgewählten Zytokine, respektive Zytokin-Milieus eine Wirkungstendenz bei den reagiblen Zellen festzustellen. Darüber hinaus ließ sich im Rahmen dieser Arbeit ein signifikanter Zusammenhang zwischen der TNFR-2 Verteilung und der Viabilitätsabnahme durch TNF $\alpha$  darstellen. Solche und weitere konkrete Reaktionsmuster und Oberflächenmerkmale sowie Nachweise spezifischer



Signalwegsprofile oder Beeinflussungen der Mikroumgebung der Leukämiezellen ermöglichen sowohl einen differenzierteren Blick auf die Vorläufer B-ALL im Allgemeinen, als auch auf bestimmte Subgruppen im Speziellen (Ford et al., 2009; Rouce et al., 2016). Dabei liegt der Fokus zum einen auf den immunologischen und zellbiologischen Eigenschaften der Leukämie selbst, zum anderen auf der Immunkonstitution des Patienten mit den zellulären und humoralen Effektoren des Immunsystems (Lauten et al., 2002; Wiegering et al., 2013). Aus diesen Erkenntnissen lassen sich neue potentielle Bio- und Prognosemarker ermitteln (Aguadé-Gorgorió et al., 2020; Cloppenborg et al., 2005; Winkler et al., 2015). Ferner befinden sich neue, hocheffektive Immuntherapien im Einsatz, wie der zu Beginn erwähnte bispezifische Antikörper Blinatumomab (Clesham et al., 2020; Keating et al., 2019; Schlegel et al., 2014) oder die Verwendung von CAR T-Zellen im Rahmen von klinischen Studien (Maude et al., 2018). Die an Patienten im Rahmen der Therapie mit CAR T-Zellen zu messenden Zytokin-Serumkonzentrationen, von unter anderem IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL10, erreichen dabei Spitzenwerte, welche bis in den Bereich von Nanogramm pro Milliliter gehen (Grupp et al., 2013). Die in der vorliegenden Arbeit gewählten Zytokinkonzentrationen stellen daher realistische Werte *in vivo* dar.

Durch den voranschreitenden wissenschaftlichen Fortschritt wird es möglich sein, weitere Biomarker zur Therapie-Stratifizierung als auch zur Prognosevorhersage zu etablieren sowie neue immuntherapeutische Ansätze zu entwickeln. Mit einer zum Diagnosezeitpunkt spezifischeren, individuellen Charakterisierung der Vorläufer B-ALL, könnte eine bessere Risiko-adaptierte Therapie ermöglicht und eine Über- als auch Untertherapie vermieden werden.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnten, trotz Vorhandenseins einer großen Heterogenität, spezifische Reaktionsmuster von B-Zell Vorläufer ALL-Zellen auf die *in vitro* Behandlung mit proinflammatorischen und immunregulatorischen Zytokinen charakterisiert werden. Neben der Verwendung von B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien, wurden auch primäre Patientenleukämiezellen von pädiatrischen B-ALL-Patienten aus einem bereits bestehenden Mäuse-Xenotransplantationsmodell analysiert. Dabei kamen

etablierte und gut standardisierte Methoden zur Anwendung, welche zuvor an Probeexperimenten validiert wurden. Mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen konnten Viabilitäts- und Zellzyklusveränderungen nach Inkubation mit Zytokinen detektiert und zugrundeliegende Zelltodmechanismen analysiert werden. Zur Quantifizierung spezifischer Zytokinrezeptoren auf der Zelloberfläche wurden diese mit monoklonalen direkt konjugierten IgG FACS-Antikörpern markiert. Zusätzlich zu den FACS basierten Messmethoden kamen photometrische Messungen zur Bestimmung der Caspase-Aktivität zur Anwendung.

Das proinflammatorische T<sub>H</sub>1 Zytokin IFN $\gamma$  bewirkte bei manchen Patientenproben eine Viabilitätsabnahme bei anderen aber auch eine Zunahme der Viabilität. TNF $\alpha$  führte in Einzeltherapie bei reagiblen Zellen nahezu ausschließlich zu einem Anstieg des Zelltods durch Apoptose. In den Zellzyklusanalysen der Zelllinien dominierte im proinflammatorischen Zytokin-Milieu eine Proliferationsreduktion mit Abnahme der S-Phase und Anstieg der apoptotischen sub G1 Fraktion. Neben einer Addition der Einzeleffekte konnte, bei dem überwiegend größeren Teil der reagiblen Zellen, auch eine synergistische Wirkung in Kombinationstherapie beider T<sub>H</sub>1 Zytokine beobachtet werden. Für den TNF $\alpha$  Rezeptor TNFR-2 zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Rezeptorverteilung und dem spezifischen Zelltod bei den Patientenblasten. Die Rezeptorverteilung von TNFR-1 und IFNGRI sowie die Expression von membrangebundenem TNF $\alpha$  korrelierte hingegen nicht mit der durch das entsprechende Zytokin ausgelösten Viabilitätsveränderung. Im immunregulatorischen Zytokin-Milieu gilt TGF $\beta$ <sub>1</sub> als Hauptakteur der beiden untersuchten Zytokine. Als Einzeleffekt von IL10 war in allen durchgeführten Analysen nur eine leichte Viabilitätszunahme bei zwei Patientenblasten festzustellen. TGF $\beta$ <sub>1</sub> zeigte insbesondere bei den Patientenblasten in einigen Fällen eine deutliche Abnahme des Lebendzellanteils. Dabei wurde an zwei exemplarischen Fällen eine Apoptose durch Caspase-Aktivierung als Zelltodmechanismus detektiert. In den Zellzyklusanalysen der Zelllinien konnte ein Rückgang der Wachstumsrate, mit Anstieg der G0/G1 Fraktion und Reduktion der S-Phase, festgestellt werden.

In Bezug auf den aktuellen wissenschaftlichen Forschungs- und Kenntnisstand, sind die Ergebnisse der durchgeführten Analysen einerseits nachvollziehbar und darin einzuordnen. Andererseits stellen sie eine Erweiterung der bisherigen *in vitro*

Untersuchungen zur direkten zellulären Zytokinwirkung an B-Zell Vorläufer ALL-Zellen dar. Unstrittig bleibt dennoch, dass es nur mit Hilfe voranschreitender Erkenntnisse über die Vorläufer B-ALL und ihre Subtypen möglich ist und weiterhin sein wird, einzelne vielversprechende präklinische Forschungsergebnisse im Rahmen von großen klinischen Studien für die klinische Anwendung zu validieren und dadurch die Diagnostik sowie die Therapie betroffener Patienten zu verbessern.

## 6. Literaturverzeichnis

- Aguadé-Gorgorió, J., McComb, S., Eckert, C., Guinot, A., Marovca, B., Bornhauser, B. C. et al. (2020) 'TNFR2 is required for RIP1-dependent cell death in human leukemia', *Blood Advances*, 4(19), pp. 4823–4833. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000796.
- Asadullah, K., Sterry, W. & Volk, H. D. (2003) 'Interleukin-10 therapy--review of a new approach', *Pharmacological Reviews*, 55(2), pp. 241–269. doi: 10.1124/pr.55.2.4.
- Bach, E. A., Aguet, M. & Schreiber, R. D. (1997) 'The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling', *Annual Review of Immunology*, 15, pp. 563–591. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.563.
- Balkwill, F. (2002) 'Tumor necrosis factor or tumor promoting factor?', *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13(2), pp. 135–141. doi: 10.1016/s1359-6101(01)00020-x.
- Braumüller, H., Wieder, T., Brenner, E., Aßmann S., Hahn, M., Röcken, M. et al. (2013) 'T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence', *Nature*, 494(7437), pp. 361–365. doi: 10.1038/nature11824.
- Cario, G., Izraeli, S., Teichert, A., Rhein, P., Skokowa, J., Stanulla, M. et al. (2007) 'High interleukin-15 expression characterizes childhood acute lymphoblastic leukemia with involvement of the CNS', *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(30), pp. 4813–4820. doi: 10.1200/JCO.2007.11.8166.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. & Williamson, B. (1975) 'An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(9), pp. 3666–3670. doi: 10.1073/pnas.72.9.3666.
- Chang, J. S., Zhou, M., Buffler, P. A., Chokkalingam, A. P., Metayer, C. & Wiemels, J. L. (2011) 'Profound deficit of IL10 at birth in children who develop childhood acute lymphoblastic leukemia', *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 20(8), pp. 1736–1740. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-11-0162.
- Clesham, K., Rao, V., Bartram, J., Ancliff, P., Ghorashian, S., Vora, A. et al. (2020) 'Blinatumomab for infant acute lymphoblastic leukemia', *Blood*, 135(17), pp. 1501–1504. doi: 10.1182/blood.2019004008.
- Cloppenborg, T., Stanulla, M., Zimmermann, M., Schrappe, M., Welte, K. & Klein, C. (2005) 'Immunosurveillance of childhood ALL: polymorphic interferon-gamma alleles are associated with age at diagnosis and clinical risk groups', *Leukemia*, 19(1), pp. 44–48. doi: 10.1038/sj.leu.2403553.
- Coley, W. B. (1910) 'The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus)', *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 3(Surg Sect), pp. 1–48.

- Conter, V., Bartram, C. R., Valsecchi, M. G., Schrauder, A., Panzer-Grümayer, R., Schrappe, M. et al. (2010) 'Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study', *Blood*, 115(16), pp. 3206–3214. doi: 10.1182/blood-2009-10-248146.
- Ersvaer, E., Skavland, J., Ulvestad, E., Gjertsen, B. T. & Bruserud, O. (2007) 'Effects of interferon gamma on native human acute myelogenous leukaemia cells', *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 56(1), pp. 13–24. doi: 10.1007/s00262-006-0159-1.
- Farrar, M. A. & Schreiber, R. D. (1993) 'The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor', *Annual Review of Immunology*, 11, pp. 571–611. doi: 10.1146/annurev.iy.11.040193.003035.
- Ford, A. M., Palmi, C., Bueno, C., Hong, D., Cardus, P., Greaves, M. et al. (2009) 'The TEL-AML1 leukemia fusion gene dysregulates the TGF-beta pathway in early B lineage progenitor cells', *The Journal of Clinical Investigation*, 119(4), pp. 826–836. doi: 10.1172/JCI36428.
- Formenti, S. C., Lee, P., Adams, S., Goldberg, J. D., Li, X., McBride, W. H. et al. (2018) 'Focal Irradiation and Systemic TGFβ Blockade in Metastatic Breast Cancer', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 24(11), pp. 2493–2504. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3322.
- Franchimont, D., Martens, H., Hagelstein, M. T., Louis, E., Dewe, W., Geenen, V. et al. (1999) 'Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(8), pp. 2834–2839. doi: 10.1210/jcem.84.8.5931.
- Fulda, S., Sieverts, H., Friesen, C., Herr, I. & Debatin, K. M. (1997) 'The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells', *Cancer Research*, 57(17), pp. 3823–3829.
- Gore, L., Locatelli, F., Zugmaier, G., Handgretinger, R., O'Brien, M. M., von Stackelberg, A. et al. (2018) 'Survival after blinatumomab treatment in pediatric patients with relapsed/refractory B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia', *Blood Cancer Journal*, 8(9). doi: 10.1038/s41408-018-0117-0.
- Goto, H. (2015) 'Childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia: Biology and recent treatment progress', *Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society*, 57(6), pp. 1059–1066. doi: 10.1111/ped.12837.
- Greaves, M. (2018) 'A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia', *Nature Reviews. Cancer*, 18(8), pp. 471–484. doi: 10.1038/s41568-018-0015-6.
- Grell, M., Scheurich, P., Meager, A. & Pfizenmaier, K. (1993) 'TR60 and TR80 tumor necrosis factor (TNF)-receptors can independently mediate cytotoxicity', *Lymphokine and Cytokine Research*, 12(3), pp. 143–148.

- Grell, M., Zimmermann, G., Gottfried, E., Chen, C. M., Grünwald, U., Strasser, A. et al. (1999) 'Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF', *The EMBO journal*, 18(11), pp. 3034–3043. doi: 10.1093/emboj/18.11.3034.
- Grupp, S. A., Kalos, M., Barrett, D., Aplenc, R., Porter, D. L., June, C. H. et al. (2013) 'Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia', *The New England Journal of Medicine*, 368(16), pp. 1509–1518. doi: 10.1056/NEJMoa1215134.
- Gu, L., Findley, H. W., Zhu, N. & Zhou, M. (2006) 'Endogenous TNF  $\alpha$  mediates cell survival and chemotherapy resistance by activating the PI3K/Akt pathway in acute lymphoblastic leukemia cells', *Leukemia*, 20(5), pp. 900–904. doi: 10.1038/sj.leu.2404160.
- Hehlgans, T. & Pfeffer, K. (2005) 'The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games', *Immunology*, 115(1), pp. 1–20. doi: 10.1111/j.1365-2567.2005.02143.x.
- Heikamp, E. B. & Pui, C.-H. (2018) 'Next Generation Evaluation and Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia', *The Journal of pediatrics*, 203, pp. 14–24.e2. doi: 10.1016/j.jpeds.2018.07.039.
- Humbert, L., Ghozlan, M., Canaff, L., Tian, J. & Lebrun, J.-J. (2015) 'The leukemia inhibitory factor (LIF) and p21 mediate the TGF $\beta$  tumor suppressive effects in human cutaneous melanoma', *BMC cancer*, 15, p. 200. doi: 10.1186/s12885-015-1177-1.
- Inaba, H. & Mullighan, C. G. (2020) 'Pediatric acute lymphoblastic leukemia', *Haematologica*, 105(11). doi: 10.3324/haematol.2020.247031.
- Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L. & Zhang, Y. (2020) 'Roles of IFN- $\gamma$  in tumor progression and regression: a review', *Biomarker Research*, 8, p. 49. doi: 10.1186/s40364-020-00228-x.
- Kato, M. & Manabe, A. (2018) 'Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia', *Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society*, 60(1), pp. 4–12. doi: 10.1111/ped.13457.
- Keating, A. K., Gossai, N., Phillips, C. L., Maloney, K., Campbell, K., Verneris, M. R. et al. (2019) 'Reducing minimal residual disease with blinatumomab prior to HCT for pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia', *Blood Advances*, 3(13), pp. 1926–1929. doi: 10.1182/bloodadvances.2018025726.
- Lauten, M., Matthias, T., Stanulla, M., Berger, C., Welte, K. & Schrappe, M. (2002) 'Association of initial response to prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms within the tumour necrosis factor and the interleukin-10 genes', *Leukemia*, 16(8), pp. 1437–1442. doi: 10.1038/sj.leu.2402545.

- Locatelli, F., Whitlock, J. A., Peters, C., Chen-Santel, C., Chia, V., Sun, W. et al. (2020) ‘Blinatumomab versus historical standard therapy in pediatric patients with relapsed/refractory Ph-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia’, *Leukemia*, 34(9), pp. 2473–2478. doi: 10.1038/s41375-020-0770-8.
- Locksley, R. M., Killeen, N. & Lenardo, M. J. (2001) ‘The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology’, *Cell*, 104(4), pp. 487–501. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00237-9.
- Lu, Z. Y., Zhang, X. G., Rodriguez, C., Wijdenes, J., Gu, Z. J., Klein, B. et al. (1995) ‘Interleukin-10 is a proliferation factor but not a differentiation factor for human myeloma cells’, *Blood*, 85(9), pp. 2521–2527.
- Ma, Y., Dobbins, S. E., Sherborne, A. L., Chubb, D., Galbiati, M., Houlston, R. S. et al. (2013) ‘Developmental timing of mutations revealed by whole-genome sequencing of twins with acute lymphoblastic leukemia’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(18), pp. 7429–7433. doi: 10.1073/pnas.1221099110.
- Manabe, A., Coustan-Smith, E., Kumagai, M., Behm, F. G., Raimondi, S. C., Campana, D. et al. (1994) ‘Interleukin-4 induces programmed cell death (apoptosis) in cases of high-risk acute lymphoblastic leukemia’, *Blood*, 83(7), pp. 1731–1737. doi: 10.1182/blood.V83.7.1731.1731.
- Massagué, J. (2008) ‘TGF $\beta$  in Cancer’, *Cell*, 134(2), pp. 215–230. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.001.
- Maude, S. L., Frey, N., Shaw, P. A., Aplenc, R., Barrett, D. M., Grupp S. A. et al. (2014) ‘Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia’, *The New England journal of medicine*, 371(16), pp. 1507–1517. doi: 10.1056/NEJMoa1407222.
- Maude, S. L., Laetsch, T. W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Grupp, S. A. et al. (2018) ‘Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia’, *The New England journal of medicine*, 378(5), pp. 439–448. doi: 10.1056/NEJMoa1709866.
- Mocellin, S., Ohnmacht, G. A., Wang, E. & Marincola, F. M. (2001) ‘Kinetics of cytokine expression in melanoma metastases classifies immune responsiveness’, *International Journal of Cancer*, 93(2), pp. 236–242. doi: 10.1002/ijc.1328.
- Mocellin, S., Panelli, M. C., Wang, E., Nagorsen, D. & Marincola, F. M. (2003) ‘The dual role of IL-10’, *Trends in Immunology*, 24(1), pp. 36–43. doi: 10.1016/s1471-4906(02)00009-1.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O’Garra, A. (2001) ‘Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor’, *Annual Review of Immunology*, 19, pp. 683–765. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683.
- Möricke, A., Zimmermann, M., Reiter, A., Henze, G., Schrauder, A., Schrappe, M. et al. (2010) ‘Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000’, *Leukemia*, 24(2), pp. 265–284. doi: 10.1038/leu.2009.257.

- Nagaraj, N. S. & Datta, P. K. (2010) 'Targeting the Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling Pathway in Human Cancer', *Expert opinion on investigational drugs*, 19(1), pp. 77–91. doi: 10.1517/13543780903382609.
- Neel, J.-C., Humbert, L. & Lebrun, J.-J. (2012) 'The dual role of TGF $\beta$  in human cancer: from tumor suppression to cancer metastasis', *Medecine sciences: M/S*, 2018. doi: 10.1155/2018/1497218.
- Pallasch, C. P., Leskov, I., Braun, C. J., Vorholt, D., Drake, A., Hemann, M. T. et al. (2014) 'Sensitizing protective tumor microenvironments to antibody-mediated therapy', *Cell*, 156(3), pp. 590–602. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.041.
- Parker, B. S., Rautela, J. & Hertzog, P. J. (2016) 'Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy', *Nature Reviews. Cancer*, 16(3), pp. 131–144. doi: 10.1038/nrc.2016.14.
- Peng, Z. H., Xing, T. H., Qiu, G. Q. & Tang, H. M. (2001) 'Relationship between Fas/FasL expression and apoptosis of colon adenocarcinoma cell lines', *World Journal of Gastroenterology*, 7(1), pp. 88–92. doi: 10.3748/wjg.v7.i1.88.
- Pennica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H., Derynck, R., Goeddel, D. V. et al. (1984) 'Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin', *Nature*, 312(5996), pp. 724–729. doi: 10.1038/312724a0.
- Podhorecka, M., Macheta, A., Chocholska, S., Bojarska-Junak, A., Szymczyk, A., Hus, M. et al. (2016) 'Danazol induces apoptosis and cytotoxicity of leukemic cells alone and in combination with purine nucleoside analogs in chronic lymphocytic leukemia', *Annals of Hematology*, 95, pp. 425–435. doi: 10.1007/s00277-015-2579-5.
- Pui, C.-H., Carroll, W. L., Meshinchi, S. & Arceci, R. J. (2011) 'Biology, Risk Stratification, and Therapy of Pediatric Acute Leukemias: An Update', *Journal of Clinical Oncology*, 29(5), pp. 551–565. doi: 10.1200/JCO.2010.30.7405.
- Roberts, K. G. & Mullighan, C. G. (2020) 'The Biology of B-Progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(7). doi: 10.1101/cshperspect.a034835.
- Rouce, R. H., Shaim, H., Sekine, T., Weber, G., Ballard, B., Rezvani, K. et al. (2016) 'The TGF- $\beta$ /SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B-acute lymphoblastic leukemia', *Leukemia*, 30(4), pp. 800–811. doi: 10.1038/leu.2015.327.
- Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Péronne, C., Vezzio, N., Banchereau J. et al. (1992) 'Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(5), pp. 1890–1893. doi: 10.1073/pnas.89.5.1890.
- Salkowski, C. A. & Vogel, S. N. (1992) 'IFN-gamma mediates increased glucocorticoid receptor expression in murine macrophages', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 148(9), pp. 2770–2777.



- Schlegel, P., Lang, P., Zugmaier, G., Ebinger, M., Kreyenberg, H., Handgretinger, R. et al. (2014) 'Pediatric posttransplant relapsed/refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia shows durable remission by therapy with the T-cell engaging bispecific antibody blinatumomab', *Haematologica*, 99(7), pp. 1212–1219. doi: 10.3324/haematol.2013.100073.
- Senturk, S., Mumcuoglu, M., Gursoy-Yuzugullu, O., Cingoz, B., Akcali, K. C. & Ozturk, M. (2010) 'Transforming growth factor-beta induces senescence in hepatocellular carcinoma cells and inhibits tumor growth', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 52(3), pp. 966–974. doi: 10.1002/hep.23769.
- von Stackelberg, A., Locatelli, F., Zugmaier, G., Handgretinger, R., Trippett, T. M., Gore, L. et al. (2016) 'Phase I/Phase II Study of Blinatumomab in Pediatric Patients With Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia', *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34(36), pp. 4381–4389. doi: 10.1200/JCO.2016.67.3301.
- Valderrama-Carvajal, H., Cocolakis, E., Lacerte, A., Lee, E.-H., Krystal, G., Lebrun, J.-J. et al. (2002) 'Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP', *Nature Cell Biology*, 4(12), pp. 963–969. doi: 10.1038/ncb885.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. (2003) 'Tumor necrosis factor signaling', *Cell Death & Differentiation*, 10(1), pp. 45–65. doi: 10.1038/sj.cdd.4401189.
- Wang, X. & Lin, Y. (2008) 'Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes?', *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(11), pp. 1275–1288. doi: 10.1111/j.1745-7254.2008.00889.x.
- Wheelock, E. F. (1965) 'Interferon-Like Virus-Inhibitor Induced in Human Leukocytes by Phytohemagglutinin', *Science (New York, N.Y.)*, 149(3681), pp. 310–311. doi: 10.1126/science.149.3681.310.
- Wiegering, V., Winkler, B., Haubitz, I., Wöfl, M., Schlegel, P. G. & Eyrich, M. (2013) 'Lower TGFβ serum levels and higher frequency of IFNγ-producing T cells during early immune reconstitution in surviving children after allogeneic stem cell transplantation', *Pediatric Blood & Cancer*, 60(1), pp. 121–128. doi: 10.1002/pbc.24208.
- Williams, M. T. S., Yousafzai, Y., Cox, C., Blair, A., Carmody, R., Halsey, C. et al. (2014) 'Interleukin-15 enhances cellular proliferation and upregulates CNS homing molecules in pre-B acute lymphoblastic leukemia', *Blood*, 123(20), pp. 3116–3127. doi: 10.1182/blood-2013-05-499970.
- Winkler, B., Taschik, J., Haubitz, I., Eyrich, M., Schlegel, P. G. & Wiegering, V. (2015) 'TGFβ and IL10 have an impact on risk group and prognosis in childhood ALL', *Pediatric Blood & Cancer*, 62(1), pp. 72–79. doi: 10.1002/pbc.25142.
- Yang, L., Pang, Y. & Moses, H. L. (2010) 'TGF-β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression', *Trends in immunology*, 31(6), pp. 220–227. doi: 10.1016/j.it.2010.04.002.

- Yang, Y., Yang, H. H., Tang, B., Wu, A. M. L., Flanders, K. C., Wakefield, L. M. et al. (2020) 'The Outcome of TGF $\beta$  Antagonism in Metastatic Breast Cancer Models In Vivo Reflects a Complex Balance between Tumor-Suppressive and Proprogression Activities of TGF $\beta$ ', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 26(3), pp. 643–656. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-2370.
- Yotnda, P., Mintz, P., Grigoriadou, K., Lemonnier, F., Vilmer, E. & Langlade-Demoyen, P. (1999) 'Analysis of T-cell defects in the specific immune response against acute lymphoblastic leukemia cells', *Experimental Hematology*, 27(9), pp. 1375–1383. doi: 10.1016/S0301-472X(99)00083-1.
- Yu, Y. & Feng, X.-H. (2019) 'TGF- $\beta$  signaling in cell fate control and cancer', *Current Opinion in Cell Biology*, 61, pp. 56–63. doi: 10.1016/j.ccb.2019.07.007.
- Zhao, S., Wu, D., Wu, P., Wang, Z. & Huang, J. (2015) 'Serum IL-10 Predicts Worse Outcome in Cancer Patients: A Meta-Analysis', *PLoS ONE*, 10(10). doi: 10.1371/journal.pone.0139598.

## 7. Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin in der Abteilung Kinderheilkunde I (Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie) des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Professor Dr. R. Handgretinger durchgeführt.

Die Konzeption der Versuchsreihen erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. M. Queudeville, Funktionsoberärztin der Kinderheilkunde I. Frau Queudeville hat die Laborarbeiten und das Forschungsprojekt geleitet und das Manuskript korrigiert.

Die Laborassistentin Frau J. Rottenberger führte das in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Mäuse-Xenotransplantationsmodell durch, wobei sie die Bereitstellung der benötigten Patientenblasten zu den jeweiligen, von mir durchgeführten Versuchen organisierte. Die Immunphänotypisierung der verwendeten Zelllinien erfolgte vor Beginn meiner Laborarbeiten ebenfalls durch die Laborassistentin. Des Weiteren kümmerte sich Frau J. Rottenberger zu Beginn meiner Versuchsreihen um die Bereitstellung der Zelllinien. Diese wurden dann von mir übernommen und in Kultur gehalten.

Die Versuche zur Analyse des Viabilitätsverlustes mittels FSC/SSC Messmethode bei den Zelllinien im immunregulatorischen Zytokin-Milieu sowie bei den Patientenblasten im immunregulatorischen und proinflammatorischen Zytokin-Milieu, die Versuche zur Analyse der Zellzyklusveränderungen bei den Zelllinien in beiden Zytokin-Milieus als auch die Versuche zur Bestimmung des Zelltodmechanismus bei den Zelllinien und Patientenblasten anhand der Aktivitätsmessung der Effektor-Caspasen 3 und 7 wurden (nach anfänglicher Einarbeitung durch die Laborassistentin Frau J. Rottenberger) von mir eigenständig durchgeführt. Hierzu gehören auch alle Versuche zur Analyse des Viabilitätsverlustes mit dem Lebend-/Totfarbstoff Zombie Aqua sowie die Untersuchungen zur Verteilung von membrangebundenem TNF $\alpha$  bei den Zelllinien und Patientenblasten sowie die Analysen des Rezeptorstatus der Patientenblasten. Die Versuche zur Analyse des Viabilitätsverlustes mittels FSC/SSC Messmethode bei den Zelllinien im proinflammatorischen Zytokin-Milieu, die Versuche zur Bestimmung des Zelltodmechanismus bei den Zelllinien mittels FITC Annexin V/7-AAD Messmethode

sowie die Untersuchungen zum Rezeptorstatus der Zelllinien wurden von Frau J. Beck, der damaligen Masterstudentin im Studiengang Molekulare Medizin, durchgeführt.

Sämtliche Auswertungen der Rohdaten der durchflusszytometrischen und photometrischen Untersuchungen sowie die anschließenden statistischen Auswertungen erfolgten eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen dabei verwendet zu haben.

Augsburg, den 29.11.2021

---

Johannes, Hilz

## Anhang

**Tabelle 22: Auflistung der verwendeten Medien und Zytokine mit Katalognummer und Firma.**

Medien/Zytokine	Katalognummer	Firma
FCS	10270106	ThermoFisher
Rekombinantes humanes IL-10	200-10	Peprotech
Rekombinantes humanes INF- $\gamma$ -1b Imukin <sup>®</sup>	-	Boehringer Ingelheim
Rekombinantes humanes TGF- $\beta$ <sub>1</sub>	100-21	Peprotech
Rekombinantes humanes TNF- $\alpha$	300-01A	Peprotech
Rekombinantes humanes TNF- $\alpha$	210-TA	R&D Systems
RPMI 1640 Medium 500ml	F 1215	BiochromAG

**Tabelle 23: Auflistung der verwendeten Reagenzien und Chemikalien mit Katalognummer und Firma.**

Reagenzien/Chemikalien	Katalognummer	Firma
Apo-ONE <sup>®</sup> Homogenous Caspase-3/7 Assay	G7790	Promega
CryoSure-DMSO	WAK-DMSO-10	WAK-Chemie
FACSClean	BD 340345	Becton Dickinson
FACSFlow	BD 342003	Becton Dickinson
FACSRinse	BD 340346	Becton Dickinson
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD	640922	BioLegend
FITC BrdU Flow Kit	559619	Becton Dickinson
PBS	D8537-500ML	Sigma-Aldrich
Quantum Simply Cellular <sup>®</sup> anti-Mouse IgG Beads	815	Bangs Laboratories
Staurosporin	S6942-200UL	Sigma-Aldrich
Trypanblau	T8154	Sigma-Aldrich
Zombie Aqua	423102	BioLegend

**Tabelle 24: Merkmale der verwendeten B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien** – pB: peripheres Blut; KM: Knochenmark

Zelllinie	DMSZ Nr.	Herkunft	Zytogenetik/Translokation	Fusionsgen
KOPN-8	ACC 552	pB: 3M, weiblich	Hypodiploid / t(11;19) (q23;p13)	KMT2A-MLLT1 (MLL-MLLT1; MLL-ENL)
MHH-CALL-4	ACC 337	pB: 10J, männlich, Diagnose	Hypodiploid	
NALM-6	ACC 128	pB: 19J, männlich, Rezidiv	Annähernd diploid	
NALM-16	ACC 680	pB: 12J, weiblich, Rezidiv	Hyperdiploid	
REH	ACC 22	pB: 15J weiblich, 1. Rezidiv	Pseudodiploid / t(12;21)	ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)
RS4;11	ACC 508	KM: 32J, weiblich, 1. Rezidiv	Hyperdiploid / t(4;11) (q21;q23)	KMT2A-AFF1 (MLL-AFF1; MLL-AF4)

**Tabelle 25: Immunphänotyp der verwendeten B-Zell Vorläufer ALL-Zelllinien.**

Zelllinie	CD3	CD10	CD13	CD19	CD20	CD34	CD37	CD38	cyCD79a	CD80	CD138	HLA-DR
KOPN-8	-	+	-	+	-	-		+		-	-	+
MHH-CALL-4	-	+	+	+	+	-	-	+		-	-	+
NALM-6	-	+		+			-		+	-	+	+
NALM-16	-	+	-	+	+					-	+	+
REH	-	+	-	+		-	-	+	+	-	+	+
RS4;11	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+

Zelllinie	sm/cyIgG	sm/cyIgM	sm/cykappa	sm/cylambda
KOPN-8	-	+		
MHH-CALL-4	-	-	-	-
NALM-6	-	-	-	-
NALM-16	-	-	-	-
REH	-	-	-	-
RS4;11	-	-	-	-



**Tabelle 26: Merkmale der verwendeten Patientenzellen (PDX) – J: Jahr/e; M: Monat/e; ED: Erstdiagnose; RG: Risikogruppe; SR: Standard-Risikogruppe; MR: Mittlere-Risikogruppe; HR: Hochrisikogruppe**

PDX	Alter bei			Zytogenetik/Fusionsgen	RG	Material von	Outcome	Kommentar
	ED	1. Rezidiv	2. Rezidiv					
PDX_1	1J, 4M	3J, 7M	4J, 10M	MLL-AF9	HR	2. Rezidiv	an Rezidiv verstorben	-
PDX_2	2J, 1M	-	-	keine bek. Aberration	SR	ED	Remission	-
PDX_3	4J, 5M	-	-	keine bek. Aberration	HR	therapierefr. ED	an Rezidiv verstorben	-
PDX_4	2J, 4M	-	-	keine bek. Aberration	MR	ED	Remission	M. Down
PDX_5	2J, 0M	3J, 1M	-	atyp. TEL-AML1; Verlust von TP53	HR	1. Rezidiv	an Rezidiv verstorben	-
PDX_6	3J, 0M	-	-	Hyperdiploid	SR	ED	Remission	-
PDX_7	15J, 3M	-	-	keine bek. Aberration	MR	ED	Remission	-
PDX_8	6J, 2M	-	-	PBX1-TCF3	SR	ED	Remission	-
PDX_9	5J, 3M	-	-	TEL-AML1	HR	ED	Remission	-

**Tabelle 27: Auswertung von Q1 zur Analyse des Zelltodmechanismus mittels FITC Annexin V und 7-AAD Färbung an den Zelllinien nach 72 h Inkubation mit 10 ng/ml IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  – Dargestellt sind die statistischen Werte (n=3) der Annexin positiven und 7-AAD negativen Zellen (früh-apoptotische Zellen) aufgeteilt in Behandlungsgruppe (Beh.) und Kontrollgruppe (Kontr.).**

Q1 Annexin V (+)/7-AAD (-)		N	Mittelwert	Std.- Abweichung	Std.- Fehler	95 %-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum	p-Wert
						Untergrenze	Obergrenze			
KOPN-8	Kontr.	3	20,9433	8,07092	4,65975	0,8941	40,9926	14,21	29,89	0,359
	Beh.	3	26,3433	4,07471	2,35253	16,2212	36,4655	23,38	30,99	
MHH-CALL-4	Kontr.	3	4,8967	1,04386	0,60267	2,3036	7,4897	3,70	5,62	0,155
	Beh.	3	13,6567	8,59805	4,96409	-7,7021	35,0154	5,88	22,89	
REH	Kontr.	3	2,4967	0,58960	0,34041	1,0320	3,9613	1,82	2,90	0,013
	Beh.	3	6,2000	1,37971	0,79658	2,7726	9,6274	4,64	7,26	
RS4;11	Kontr.	3	4,0800	0,86712	0,50063	1,9260	6,2340	3,18	4,91	0,045
	Beh.	3	6,1267	0,87500	0,50518	3,9530	8,3003	5,47	7,12	
NALM-16	Kontr.	3	7,0200	2,06255	1,19081	1,8963	12,1437	5,51	9,37	0,307
	Beh.	3	17,9500	13,94525	8,05129	-16,6919	52,5919	9,65	34,05	
NALM-6	Kontr.	3	2,6000	0,61944	0,35763	1,0612	4,1388	2,17	3,31	0,301
	Beh.	3	1,8100	0,97340	0,56199	-0,6081	4,2281	1,06	2,91	

**Tabelle 28: Auswertung von Q2 zur Analyse des Zelltodmechanismus mittels FITC Annexin V und 7-AAD Färbung an den Zelllinien nach 72 h Inkubation mit 10 ng/ml IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  – Dargestellt sind die statistischen Werte (n=3) der Annexin positiven und 7-AAD positiven Zellen (spät-apoptotische Zellen) aufgeteilt in Behandlungsgruppe (Beh.) und Kontrollgruppe (Kontr.).**

Q2 Annexin V (+)/7-AAD (+)		N	Mittelwert	Std.- Abweichung	Std.- Fehler	95 %-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum	p-Wert
						Untergrenze	Obergrenze			
KOPN-8	Kontr.	3	15,9200	5,92863	3,42290	1,1925	30,6475	11,39	22,63	0,088
	Beh.	3	24,3467	2,68545	1,55044	17,6756	31,0177	21,69	27,06	
MHH-CALL-4	Kontr.	3	5,4267	1,37885	0,79608	2,0014	8,8519	4,49	7,01	0,024
	Beh.	3	29,0367	6,98983	4,03558	11,6730	46,4004	23,87	36,99	
REH	Kontr.	3	1,4367	0,17898	0,10333	0,9921	1,8813	1,24	1,59	0,009
	Beh.	3	5,5067	1,45603	0,84064	1,8897	9,1237	4,02	6,93	
RS4;11	Kontr.	3	2,1133	0,68501	0,39549	0,4117	3,8150	1,43	2,80	0,066
	Beh.	3	5,1367	1,96760	1,13599	0,2489	10,0244	3,31	7,22	
NALM-16	Kontr.	3	0,8700	0,48280	0,27875	-0,3294	2,0694	0,42	1,38	0,288
	Beh.	3	4,6467	4,57039	2,63871	-6,7068	16,0001	1,83	9,92	
NALM-6	Kontr.	3	1,1567	0,42194	0,24361	0,1085	2,2048	0,82	1,63	0,428
	Beh.	3	0,9300	0,14177	0,08185	0,5778	1,2822	0,82	1,09	

**Tabelle 29: Auswertung von Q3 zur Analyse des Zelltodmechanismus mittels FITC Annexin V und 7-AAD Färbung an den Zelllinien nach 72 h Inkubation mit 10 ng/ml IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  – Dargestellt sind die statistischen Werte (n=3) der Annexin negativen und 7-AAD positiven Zellen (nekrotische Zellen) aufgeteilt in Behandlungsgruppe (Beh.) und Kontrollgruppe (Kontr.).**

Q3 Annexin V (-)/7-AAD (+)		N	Mittelwert	Std.- Abweichung	Std.- Fehler	95 %-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum	p-Wert
						Untergrenze	Obergrenze			
KOPN-8	Kontr.	3	1,4000	0,70760	0,40853	-0,3578	3,1578	0,66	2,07	0,775
	Beh.	3	1,2533	0,43501	0,25115	0,1727	2,3340	0,82	1,69	
MHH-CALL-4	Kontr.	3	1,9467	2,60826	1,50588	-4,5326	8,4259	0,25	4,95	0,469
	Beh.	3	4,3400	4,48989	2,59224	-6,8135	15,4935	0,53	9,29	
REH	Kontr.	3	0,2233	0,15948	0,09207	-0,1728	0,6195	0,04	0,33	0,157
	Beh.	3	1,3600	1,12254	0,64810	-1,4285	4,1485	0,32	2,55	
RS4;11	Kontr.	3	0,1467	0,15885	0,09171	-0,2479	0,5413	0,05	0,33	0,164
	Beh.	3	0,6800	0,51971	0,30006	-0,6110	1,9710	0,08	0,99	
NALM-16	Kontr.	3	0,1100	0,17321	0,10000	-0,3203	0,5403	0,01	0,31	0,462
	Beh.	3	0,2333	0,19732	0,11392	-0,2568	0,7235	0,10	0,46	
NALM-6	Kontr.	3	0,3167	0,07095	0,04096	0,1404	0,4929	0,24	0,38	0,141
	Beh.	3	0,6633	0,32021	0,18487	-0,1321	1,4588	0,35	0,99	

**Tabelle 30: Auswertung von Q4 zur Analyse des Zelltodmechanismus mittels FITC Annexin V und 7-AAD Färbung an den Zelllinien nach 72 h Inkubation mit 10 ng/ml IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  – Dargestellt sind die statistischen Werte (n=3) der Annexin negativen und 7-AAD negativen Zellen (Viabilität) aufgeteilt in Behandlungsgruppe (Beh.) und Kontrollgruppe (Kontr.).**

Q4 Annexin V (-)/7-AAD (-)		N	Mittelwert	Std.- Abweichung	Std.- Fehler	95 %-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum	p-Wert
						Untergrenze	Obergrenze			
KOPN-8	Kontr.	3	61,7400	13,29716	7,67712	28,7080	94,7720	46,82	72,34	0,183
	Beh.	3	48,0567	6,38351	3,68552	32,1991	63,9142	40,69	51,96	
MHH-CALL-4	Kontr.	3	87,7333	2,93077	1,69208	80,4529	95,0138	84,35	89,49	0,029
	Beh.	3	52,9667	11,62614	6,71236	24,0857	81,8476	39,60	60,73	
REH	Kontr.	3	95,8433	0,66531	0,38412	94,1906	97,4960	95,35	96,60	0,009
	Beh.	3	86,9333	3,16064	1,82480	79,0819	94,7848	83,81	90,13	
RS4;11	Kontr.	3	93,6600	1,45836	0,84198	90,0372	97,2828	92,72	95,34	0,020
	Beh.	3	88,0567	2,12829	1,22877	82,7697	93,3436	86,00	90,25	
NALM-16	Kontr.	3	92,0000	2,66265	1,53728	85,3856	98,6144	88,93	93,68	0,303
	Beh.	3	77,1700	18,70622	10,80004	30,7012	123,6388	55,57	88,02	
NALM-6	Kontr.	3	95,9267	0,97167	0,56099	93,5129	98,3404	94,82	96,64	0,412
	Beh.	3	96,5967	0,81365	0,46976	94,5754	98,6179	95,86	97,47	

**Tabelle 31: Auswertung der photometrischen Aktivitätsmessung der Effektor-Caspasen 3 und 7 zur Analyse des Zelltodmechanismus an den Zelllinien MHH-CALL-4 und NALM-6 nach 72 h Inkubation mit 0,1/1 und 10 ng/ml IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  – Dargestellt sind die statistischen Werte der Fluoreszenzintensität ohne Hintergrundfluoreszenz (Blank RFU) aufgeteilt in Behandlungsgruppe (Beh.) (n=2) und Kontrollgruppe (Kontr.) (n=3).**

Fluoreszenzintensität (Assay RFU – Blank RFU)		N	Mittelwert	Std.- Abweichung	Std.- Fehler	95 %-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum	p-Wert
						Untergrenze	Obergrenze			
MHH- CALL-4	0,1 Kontr.	3	60956,4	3824,0	2207,8	51457,0	70455,7	57062,7	64706,7	0,001
	ng/ml Beh.	2	97372,7	25,5	18,0	97144,0	97601,4	97354,7	97390,7	
	1 Kontr.	3	60956,4	3824,0	2207,8	51457,0	70455,7	57062,7	64706,7	0,000
	ng/ml Beh.	2	181618,7	7493,9	5299,0	114288,5	248948,9	176319,7	186917,7	
	10 Kontr.	3	60956,4	3824,0	2207,8	51457,0	70455,7	57062,7	64706,7	0,000
	ng/ml Beh.	2	190845,7	8196,8	5796,0	117200,5	264490,9	185049,7	196641,7	
NALM-6	0,1 Kontr.	3	122103,0	2732,7	1577,7	115314,7	128891,3	118957,3	123890,3	0,007
	ng/ml Beh.	2	98644,8	5678,8	4015,5	47623,0	149666,6	94629,3	102660,3	
	1 Kontr.	3	122103,0	2732,7	1577,7	115314,7	128891,3	118957,3	123890,3	0,265
	ng/ml Beh.	2	108206,8	9222,8	6521,5	25343,3	191070,3	101685,3	114728,3	
	10 Kontr.	3	122103,0	2732,7	1577,7	115314,7	128891,3	118957,3	123890,3	0,048
	ng/ml Beh.	2	115031,3	1538,7	1088,0	101206,9	128855,7	113943,3	116119,3	

**Tabelle 32: Auswertung der photometrischen Aktivitätsmessung der Effektor-Caspasen 3 und 7 zur Analyse des Zelltodmechanismus an den Patientenzellen PDX\_2\_6\_7 und PDX\_9 nach 48 h Inkubation mit 10 ng/ml IL10/TGFβ<sub>1</sub>, respektive 10 ng/ml IFNγ/TNFα – Dargestellt sind die statistischen Werte (n=3) der Fluoreszenzintensität ohne Hintergrundfluoreszenz (Blank RFU) aufgeteilt in Behandlungsgruppe (Beh.) und Kontrollgruppe (Kontr.).**

Fluoreszenzintensität (Assay RFU – Blank RFU)		N	Mittelwert	Std.- Abweichung	Std.- Fehler	95 %-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum	p-Wert
						Untergrenze	Obergrenze			
10 ng/ml IL10/TGFβ <sub>1</sub>	PDX_2 Kontr.	3	100817,3	3186,3	1839,6	92902,2	108732,5	97213,0	103259,0	0,026
	Beh.	3	111474,7	4296,1	2480,4	100802,5	122146,8	107087,0	115673,0	
	PDX_6 Kontr.	3	87364,0	661,1	381,7	85721,8	89006,2	86799,0	88091,0	0,000
	Beh.	3	105260,3	1780,7	1028,1	100836,8	109683,9	103228,0	106547,0	
	PDX_7 Kontr.	3	92760,3	2374,2	1370,7	86862,6	98658,1	90030,0	94339,0	0,695
	Beh.	3	91610,0	4082,3	2356,9	81469,1	101750,9	86899,0	94106,0	
	PDX_9 Kontr.	3	99915,3	3358,8	1939,2	91571,7	108259,0	96041,0	102006,0	0,440
	Beh.	3	101700,3	1326,3	765,7	98405,7	104995,0	100284,0	102913,0	
10 ng/ml IFNγ/TNFα	PDX_2 Kontr.	3	100817,3	3186,3	1839,6	92902,2	108732,5	97213,0	103259,0	0,000
	Beh.	3	144091,3	4452,7	2570,8	133030,3	155152,4	139479,0	148365,0	
	PDX_6 Kontr.	3	87364,0	661,1	381,7	85721,8	89006,2	86799,0	88091,0	0,000
	Beh.	3	125065,0	5990,5	3458,6	110183,8	139946,2	118565,0	130364,0	
	PDX_7 Kontr.	3	92760,3	2374,2	1370,7	86862,6	98658,1	90030,0	94339,0	0,372
	Beh.	3	95682,3	4440,0	2563,4	84653,0	106711,7	91433,0	100291,0	
	PDX_9 Kontr.	3	99915,3	3358,8	1939,2	91571,7	108259,0	96041,0	102006,0	0,000
	Beh.	3	163608,3	5897,4	3404,9	148958,3	178258,3	157839,0	169626,0	