Aus dem Institut für Zelluläre und Molekulare Immunologie
(Prof. Dr. rer. nat. J. Wienands)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Untersuchungen zur Pathogenese und Therapie der Notch1-abhängigen T-ALL in einem transgenen Rattenmodell

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Kai-Torben Helbron

aus Kiel

Göttingen 2016

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer
Referent:	Prof. Dr. rer. nat. H.M. Reichardt
Ko-Referentin:	Prof. Dr. med. H.E. Hahn
Promoter:	Prof. Dr. med. M. Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 18. Oktober 2016

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Untersuchungen zur Pathogenese und Therapie der Notch1-abhängigen T-ALL in einem transgenen Rattenmodell" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den …… ……

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... **I**

Abbildungsverzeichnis ..... **IV**

Tabellenverzeichnis ..... **VI**

Abkürzungsverzeichnis ..... **VII**

1 Einleitung **1**

1.1 Die T-Zell-Entwicklung 2

1.2 T-Akute Lymphoblastische Leukämie (T-ALL) 5

1.3 Notch1 10

1.3.1 Notch1 in der T-Zell-Entwicklung 12

1.3.2 Notch1 in T-ALL 14

1.3.3 Notch1IC-transgene (NICA-) Ratten 16

1.4 Glukokortikoide 18

1.4.1 Glukokortikoide in der T-ALL-Therapie 21

1.4.2 In PEGylierte Liposomen verpacktes Prednisolon 23

1.4.3 GC-Resistenz in Lymphoblasten 26

1.5 Bortezomib 28

1.6 Zielsetzung 33

2 Material und Methoden **34**

2.1 Material 34

2.1.1 Geräte 34

2.1.2 Verbrauchsmaterialien 35

2.1.3 Software 35

2.1.4 Chemikalien 35

2.1.5 Arzneimittel 36

2.1.6 Biologische Materialien 36

2.1.7 Puffer und Lösungen 37

2.1.8 Enzyme und Reagenzien-Kits 38

2.1.9 Antikörper 38

2.1.10 Weitere Reagenzien 39

2.1.11 Primer 39

2.1.12 Versuchstiere 40

2.1.13 Verwendete Zellen 40

2.2 Methoden 41

2.2.1 Lymphomtransfer 41

2.2.2 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen 41

2.2.3 Blut- und Organentnahme 42

2.2.4 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus lymphatischen Organen 42

2.2.5 Bestimmung der Zellzahl 42

2.2.6 Durchflusszytometrie (FACS) 43

2.2.7 Extrazelluläre Färbungen 43
2.2.8 Erythrolyse mittels *OptiLyse* 44
2.2.9 Magnetische Zellseparation (MACS) 45
2.2.10 Kultivierug von NICA Lymphomzellen *in vitro* 46
2.2.11 Apoptose-Assay 46
2.2.12 *In-vivo*-Pharmakotherapie 46
2.2.13 RNA-Extraktion aus Gewebe 47
2.2.14 cDNA-Synthese 48
2.2.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 48
2.2.16 Quantitative Real-Time PCR 49
2.2.17 Agarosegel-Elektrophorese 50
2.2.18 Histologie 51
2.2.19 Statistik 52

3 Ergebnisse 53

3.1 Lymphome aus NICA-Ratten lassen sich wiederholt in syngene Wirte transferieren und induzieren dort neues und aggressives Tumorwachstum 53
3.1.1 Gewichtsverlauf und Detektion von Lymphomzellen im Blut als Verlaufsparameter *in vivo* 53
3.1.2 Infiltration von lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen 57
3.1.3 Lymphomzellen infiltrieren nicht-lymphatische Organe fokal von den Gefäßen ausgehend 59
3.1.4 Einzelne Lymphomzellen regulieren im Wirt die Expression von eGFP herunter 61
3.1.5 Die Abwesenheit zytotoxischer T-Zellen des Wirttieres hat keinen Einfluss auf die Lymphomprogression 63
3.2 Subklone der Lymphome aus NICA-Ratten differieren im zellulären Phänotyp 65
3.3 NICA-Lymphomzellen neigen zu Spontanapoptose *ex vivo* 69
3.4 Neue Therapieansätze zur Pharmakotherapie der Notch1IC-abhängigen T-ALL 71
3.4.1 Liposomen erbringen im Vergleich mit freiem Dex keine Lebensverlängerung 72
3.4.2 Monotherapie der Notch1-abhängigen T-ALL mit Bortezomib führt im Vergleich mit Dex zu keinem Überlebensvorteil 77
3.4.3 Insuffiziente antineoplastische Wirkung von Bortezomib nach Auftreten einer Glukokortikoid-Resistenz 84
3.5 Dex-Apoptose-Assay verifiziert die dosisabhängige Resistenz-Entwicklung 85
3.6 Die Herunterregulierung des Glukokortikoid-Rezeptors in therapierefraktären Lymphomzellen 86

4 Diskussion 88

4.1 Etablierung eines T-ALL-Rattenmodells aus NICA-Ratten 88
4.2 Therapie der T-ALL mit in PEGylierte Liposomen verpacktem Prednisolon 98
4.3 GC-Resistenz in NICA-Lymphoblasten 102
4.4 Neuer Therapieansatz mit Bortezomib 105
4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick 112

5 Zusammenfassung 115

6 Anhang 117

6.1 Analysierte Oberflächenproteine der Ratte 117

7 Literaturverzeichnis 119

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 Stadien der T-Zell-Entwicklung und an der Entstehung von T-Zell-Leukämien beteiligte Onkogene 4

Abb. 1-2 Der Notch1-Signaltransduktionsweg 11

Abb. 1-3 Schematische Darstellung des Notch1IC-Transgenkonstrukts 17

Abb. 1-4 Molekulare Wirkungsweise des GR 19

Abb. 1-5 Schematische Darstellung eines Liposoms 24

Abb. 1-6 Schema des 26S-Proteasoms. 29

Abb. 1-7 Der Nf-κB-Signalweg. 30

Abb. 1-8 Die Strukturformel von Bortezomib und seine Bindungsstelle im 26S-Proteasom 31

Abb. 3-1 Zur Analyse des Krankheitsverlaufs der Wirttiere wurden Körpergewichte bestimmt und der prozentuale Anteil an Lymphomzellen an allen Lymphozyten im Blut durchflusszytometrisch erfasst 54

Abb. 3-2 Abgrenzung der T-Lymphozyten und Lymphomzellen in der Durchfluss-zytometrie. 55

Abb. 3-3 Durchflusszytometrische Erfassung der prozentualen Infiltrationsrate der doppelt-positiven Lymphomzellen im Blut der Wirte 55

Abb. 3-4 Direkter Nachweis der Lymphomzellen mittels FACS anhand der Expression von eGFP 56

Abb. 3-5 Relative Gewichte ausgewählter lymphatischer und nicht-lymphatischer Organe von gleichaltrigen Kontrolltieren ohne Lymphom und Wirttieren im finalen Krankheitsstadium 57

Abb. 3-6 Beispiel einer durchflusszytometrischen Analyse lymphatischer Organe zur Erfassung der Infiltrationsrate 58

Abb. 3-7 Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Paraffinschnitte von der Leber eines gesunden Kontrolltieres und der eines moribunden Wirttieres im finalen Krankheitsstadium 59

Abb. 3-8 Vierhundertfache Vergrößerung eines HE-gefärbten Paraffinschnittes der Leber von einem Wirttier im finalen Krankheitsstadium 60

Abb. 3-9 Divergierende Rate an eGFP-exprimierenden Lymphomzellen zwischen verschiedenen Tumorzelllinien 61

Abb. 3-10 Divergenz der Expression von eGFP je nach infiltriertem Organ innerhalb einer Tumorzelllinie eines Wirttieres 62

Abb. 3-11 Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von eGFP der unterschiedlichen Tumorzelllinien in Relation zu eGFP-negativen $CD4^+$-T-Zellen der Wirte 63

Abb. 3-12 Durchflusszytometrischer Vergleich von hochgradig infiltrierten Lymphknoten eines Wildtyp- und eines CD8 knock-out-Wirttieres am Tag 20 nach Lymphomtransfer 64

Abb. 3-13 Darstellung der Lymphomaggressivität in Wildtyp- und CD8ko-Wirttieren 64

Abb. 3-14 Divergierende Expression der β-Kette des TCR im Vergleich der unterschiedlichen Tumorzellklone 66

Abb. 3-15 MFI ausgewählter Oberflächenproteine auf den Lymphomzellen der Tumorzellsubklone 67

Abb. 3-16 Durchschnittliches Expressionsniveau ausgewählter Oberflächenproteine der Lymphome 68

Abb. 3-17 FACS-Verlaufsanalyse zur Ermittlung der Überlebensrate von Lymphomzellen ex vivo 70

Abb. 3-18 Durchflusszytometrische Verlaufsanalyse der Infiltrationsrate im Blut von Wirttieren unter Pharmakotherapie mit Dex oder Liposomen im Vergleich mit Kontrollwirten ohne Behandlung 73

Abb. 3-19 Durchschnittliche Raten an reifen T-Lymphozyten($TCR\beta^+$) in Relation zur zusammengefassten Population aller nicht-neoplastischen Lymphozyten und Monozyten im Blut der Wirte ab dem Zeitpunkt der ersten Pharmakotherapie 74

Abb. 3-20 Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Wirttiere unter Therapie mit Liposomen beziehungsweise Dex und ohne Behandlung (Kontrollen) 74

Abb. 3-21 Relative Gewichte der sekundären lymphatischen Organe und der Leber von Wirten der Kontroll-, Liposomen- und Dex-Gruppe 72 Stunden nach einmaliger Pharmakotherapie 75

Abb. 3-22 Leukämische Infiltration von Lymphknoten, Knochenmark und Milz in der Kontroll-, Liposomen- und Dex-Gruppe. 76

Abb. 3-23 Mikroskopische Vergrößerungen der Leberhistologie von Kontrolltier und je einem Wirt der mit Liposomen oder Dex behandelten Gruppe 72 Stunden nach der ersten Behandlung 77

Abb. 3-24 Verlauf der relativen Körpergewichte und der Anteile von Lymphomzellen an allen Lymphozyten im Blut von mit Bortezomib oder mit Dex behandelten Wirttieren und von unbehandelten Kontrollen 79

Abb. 3-25 Relative Überlebensraten der Wirttiere unter Therapie mit Bortezomib oder Dex und ohne Behandlung (Kontrolle) 80

Abb. 3-26 Relative Gewichte der sekundären lymphatischen Organe und der Leber von Wirten der Kontroll-, Bortezomib- und Dex-Gruppe 72 Stunden nach einmaliger Pharmakotherapie 81

Abb. 3-27 Infiltration von Lymphknoten, Knochenmark und Milz in der Kontroll-, Bortezomib und Dex-Kohorte 82

Abb. 3-28 Beeinträchtigung des wirtseigenen Immunsystems durch Bortezomib und Dex 83

Abb. 3-29 Mikroskopische Analyse der Leber eines Kontrolltieres und je eines Wirts der mit Bortezomib oder Dex behandelten Kohorte 72 Stunden nach der ersten Pharmakotherapie 83

Abb. 3-30 Insuffiziente Wirkung von Bortezomib nach Abnahme der Glukokortikoid-Sensitivität 84

Abb. 3-31 Dex-Apoptose-Assay *in vitro* nach mehrmaliger *In-vivo*-Behandlung der Lymphomzellen mit Dex 85

Abb. 3-32 Darstellung der relativen mRNA-Expression der Gene GIMAP5, GR und Notch1 mittels quantitativer Real-Time-PCR 86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Geräte 34

Tabelle 2 Verbrauchsmaterialien 35

Tabelle 3 Software 35

Tabelle 4 Chemikalien 35

Tabelle 5 Arzneimittel 36

Tabelle 6 Biologische Materalien 36

Tabelle 7 Puffer und Lösungen 37

Tabelle 8 Enzyme und Reagenzien Kits 38

Tabelle 9 Antikörper 38

Tabelle 10 Weitere Reagenzien 39

Tabelle 11 Verwendete Zellen 41

Tabelle 12 Kulturbedingungen und temporäre Überlebensraten der Lymphomzellen ex vivo 71

Tabelle 13 Analysierte Oberflächenproteine der Ratte 117

Abkürzungsverzeichnis

AAD	Aminoactinomycin
Abb.	Abbildung
ABC	*accelerated blood clearance*
ADAM	*A Disintegrin And Metalloproteinase*
AML	Akute myeloische Leukämie
AP	*Activator protein*
APC	Antigen präsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	*B-cell lymphoma 2*
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
BSA	*bovine serum albumin*
CBF1	*C-promoter binding factor 1*
CBG	*corticosteroid-binding globulin*
CD	*cluster of differentation*
cDNA	*complementary DNA*
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CLP	*common lymphoid progenitor*
CSL	CBF1/Suppressor of Hairless/LAG-1
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dex	Dexamethason
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DL4	*Delta-like 4*
DMEM	*Dulbeco´s Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	*double negative,* doppeltnegativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DP	*double positive*, doppeltpositiv
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	*enhanced Green Fluorescent Protein*
EGIL	*European Group for the Immunological Characterization of Leukemias*
EMA	*European Medicines Agency*
ETP	*early thymic progenitor*
FAB	French-American-British

FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	*fetal calf serum* (Fetales Kälberserum)
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FSC	*forward scatter*, Vorwärtsstreulicht
FTOC	Fetale Thymus Organ Kultur
GC	Glukokortikoid(e)
GICD	*GC-induced cell death*
GIMAP5	*GTPase of the immunity-associated protein family 5*
GMALL	*German Multicenter ALL Study Group*
GM-CSF	*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	*glucocortidoid responsive elements*
GSI	γ-Sekretase-Inhibitoren
GTP	Guanosintriphosphat
HD	*heterodimerization domain*
HE	Hämatoxylin-Eosin
HES-1	Hairy/Enhancer of Split 1
hGH	*human growth hormon*
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HSC	Hämatopoietische Stammzellen
IAN	*immuneassociated nucleotide gene*
ICAM-1	*intercellular adhesion molecule 1*
IKK	IκB-Kinasen
IL	Interleukin
IκB	*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor*
ko	knock-out
Lck	*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*
LFA-1	*leucocyte function associated antigen 1*
LSC	leukämische Stammzelle(n)
LT	Lymphomtransfer
MACS	*magnetic bead-activated cell sorting*, Magnetische Zellseparation
MAML1	Mastermind-like 1 Protein
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	*major histocompability complex*
MM	Multiples Myelom
MRD	*minimal residual disease*
mRNA	*messenger* Ribonukleinsäure
MYC	abgleitet von "Myelocytomatose"
n. s.	nicht signifikant
NaCl	Natrium-Chlorid
NF-AT	*Nuclear factor of activated T cells*

NF-κB	*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NICD	Notch Intrazelluläre Domäne
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NMIg	Normal-Mouse-Immunglobulin
Notch1IC	Notch1 Intrazelluläre Domäne
p. i.	post injectionem
PBS	*phophat buffered saline*
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PEST	*polypeptide enriched in Proline, glutamic acid(E), Serine and Threonin*
pH	lat. *potentia hydrogenii*
RES	Retikuloendotheliales System
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	*rounds per minute*
RPMI	abgeleitet von Roswell Park Memorial Institute
S	Svedberg, Maßeinheit des Sedimentationskoeffizienten
SA	Streptavidin
SCF	*Skp, Cullin, F-box containing complex*
siRNA	*small interfering RNA*
SP	*single positive*, einzelpositiv
SSC	*side scatter*, Seitwärtsstreulicht
TAC	Tris-Ammonium-Chlorid
TAE	Tris-Acetat-EDTA
T-ALL	T-akute lymphoblastische Leumämie
TAM	tumorassoziierte Makrophagen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEC	thymische Epithelzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TRegs	regulatorische T-Zellen
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	ultraviolett
VLA	*very late antigen*
vs.	versus
WHO	*World Health Organization,* Weltgesundheitsorganisation
Wt	Wildtyp
YFP	*yellow fluorescent protein reporter*
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Jeder Organismus bedarf zu seiner Selbsterhaltung eines stetigen Stoffaustausches mit der Umwelt. In diesem offenen System nehmen Lebewesen Nährstoffe auf und geben Stoffwechselprodukte ab, wodurch sich potentielle Eintrittspforten für Krankheitserreger ergeben. Jedes Individuum ist permanent von einer Vielzahl an Pathogenen wie Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten bedroht. Die Fähigkeit, sich diesen Eindringlingen effektiv zur Wehr zu setzen, ergibt einen Selektionsvorteil, sodass sich seit der evolutionären Entwicklung vielzelliger Organismen hochkomplexe Abwehrsysteme entwickelt haben.

Ein Immunsystem (lat. immunis= frei, unberührt, rein) setzt sich aus Zellen und Proteinen zusammen, deren Aufgabe es ist, die Integrität des Organismus zu erhalten. Hierbei besteht ein grundsätzliches Problem darin, körpereigene von fremden Strukturen zu unterscheiden, zumal Pathogene aus den gleichen Molekülarten wie höhere Organismen aufgebaut sind. Daneben hat das Immunsystem zusätzlich die Funktion, auch körpereigene entartete Zellen als solche zu erkennen und zu eliminieren. Um diesen komplexen Anforderungen gerecht zu werden, besitzt das Immunsystem verschiedene und zum Teil hochspezialisierte Abwehrmechanismen, nach denen es ferner unterteilt wird.

Die angeborene Immunität bekämpft Krankheitserreger als sogenannte natürliche Resistenz prompt, aber weitgehend unspezifisch. Sie wird neben mechanischen, physiologischen und chemischen Schutzbarrieren durch unmittelbar verfügbare Abwehrzellen vermittelt, die charakteristische Pathogenstrukturen schon beim Erstkontakt erkennen und ohne vorherige Aktivierung auf diese reagieren können.

Im Laufe der Phylogenese der Wirbeltiere entwickelte sich zusätzlich eine adaptive Immunität, die durch die Ausbildung spezieller Rezeptoren fremde Strukturen mit hoher Spezifität erkennen und als verzögerte Abwehr gezielt eliminieren kann. Im Unterschied zur angeborenen Abwehr identifiziert dieses erst im Laufe der Individualentwicklung erworbene Immunsystem keine typischen Pathogenmuster, sondern vielmehr ganz bestimmte Antigene, welche in aller Regel von spezialisierten Zellen, den sogenannten APCs (Antigen-präsentierende Zellen) dargeboten werden. Das erworbene Abwehrsystem zeichnet sich zudem durch die Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Krankheits-erregern sowie durch ein sogenanntes immunologisches Gedächtnis aus. So bleiben spezifische Gedächtniszellen nach einer manifesten Infektion erhalten, um bei erneuter Konfrontation mit dem betreffenden Pathogen binnen kurzer Zeit eine äußerst effiziente Abwehrreaktion zu ermöglichen.

Die zelluläre Hauptkomponente des erworbenen Immunsystems stellen die T- und B-Lymphozyten dar. Letztere sind nach entsprechender Aktivierung durch spezifische Antigen-Wechselwirkungen in der Lage, lösliche Immunglobuline zu produzieren und sezernieren, welche das Pathogen erkennen, binden und alsdann verschiedene Effektorzellen rekrutieren. Im Unterschied zu den B-Zellen wird der Antigen-Rezeptor der

T-Lymphozyten, auch T-Zell-Rezeptor (TCR) genannt, während der Effektorphase nicht sezerniert, sondern erfordert zur aktivierenden Interaktion mit dem Antigen direkten Zell-Zell-Kontakt. Hierbei erkennen T-Zellen über ihren TCR nur Peptide, wenn diese auf der Oberfläche körpereigener Zellen an Antigen-präsentierende Moleküle gebunden sind, welche vom individuell unterschiedlichen Hauptgewebe-Verträglichkeitskomplex (engl. *Major Histocompatibility Complex* (MHC)) codiert werden (Zinkernagel und Doherty 1974a, 1974b; Rothbard und Gefter 1991; Germain 1994). Nahezu jede Zelle präsentiert Peptide aus der zelleigenen Proteinsynthese über MHC-Klasse-I-Moleküle (Bjorkman et al. 1987). An MHC-Klasse-II-gebundene Proteinfragmente sind hingegen von APCs endozytierte und prozessierte Antigene extrazellulärer Abstammung (Daar et al. 1984; Ramachandra et al. 1999).

Die Hauptpopulation der peripheren T-Zellen, die den aus einer α- und einer β-Kette bestehenden αβTCR trägt, lässt sich anhand ihrer MHC-Restriktion in T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen (CTL) unterteilen (Biddison et al. 1982; Swain 1983). Die T-Helferzellen exprimieren als charakteristisches Oberflächenmolekül das CD4-Molekül, welches im Rahmen der Antigenerkennung als aktivierender Korezeptor des TCR fungiert und spezifische Strukturen des MHC-Klasse-II-Proteins bindet (Janeway 1992). Korrespondierend erkennt das CD8-Molekül der zytotoxischen T-Zellen auf präzise Weise das MHC-Klasse-I-Protein (Littman 1987; Norment et al. 1988). Während CD4-positive T-Helferzellen ($CD4^+$-Single Positive) im Zuge einer Immunantwort maßgeblich in der Regulation anderer Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems involviert sind (Luckheeram et al. 2012), besteht die Hauptfunktion der CD8-positiven T-Zellen ($CD8^+$-Single Positive) in der Zerstörung viral infizierter (Townsend et al. 1985; Rötzschke et al. 1990) oder neoplastisch transformierter Körperzellen (Robbins und Kawakami 1996; Weigelin et al. 2011).

Um diesen komplexen Anforderungen in Anbetracht der denkbaren Fülle körpereigener und -fremder Antigenstrukturen gerecht zu werden, bedarf es zur Generierung immunkompetenter T-Lymphozyten beider Subgruppen einer differenzierten und kontrollierten T-Zell-Entwicklung, die im Zuge der vielschichtigen Reifungsphasen gleichfalls der potentiellen Entstehung autoreaktiver Zellen (Fowlkes und Ramsdell 1993) oder maligner Transformationen (Greaves 1986) suffizient vorbeugt.

1.1 Die T-Zell-Entwicklung

Die T-Lymphozyten gehen wie alle Zellen des Immunsystems auf die pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen (HSC) aus der fetalen Leber oder dem adulten Knochenmark zurück (Kondo et al. 1997). Allerdings findet ihre definitive Reifung, die sogenannte T-Lymphopoese, im Gegensatz zu den anderen hämatopoietischen Zelllinien nicht im Knochenmark, sondern im Thymus statt, dem die T-Zellen ihre Bezeichnung verdanken und der hierfür von zirkulierenden Stammzellen besiedelt wird (Scollay et al. 1986; Donskoy und Goldschneider 1992; Ciofani und Zúñiga-Pflücker 2007). Obgleich die elementare

Identität der sogenannten frühen thymischen Vorläuferzellen (engl. *early thymic progenitors* (ETPs)), die je nach Verfügbarkeit von freien Nischen in das Mikromileu des Thymus einwandern (Foss et al. 2001; Prockop und Petrie 2004), inzwischen allgemein anerkannt wird (Allman et al. 2003; Porritt et al. 2004), ist deren exakte Charakterisierung neben dem genauen Zeitpunkt ihrer MHC-Restriktion bis heute Gegenstand intensiver Forschung (Schwarz und Bhandoola 2004; Adolfsson et al. 2005; Lai und Kondo 2007; Krueger und Boehmer 2007; Bhandoola et al. 2007; Benz et al. 2008; Serwold et al. 2009; Saran et al. 2010).

Bis zu seiner Involution im Erwachsenenalter sorgt der in Rinde und Mark unterteilte Thymus mithilfe seines Geflechts aus hochspezialisierten epithelialen, monozytären und dendritischen Zellen für ein optimales Mikromilieu zur abgestimmten Reifung der T-Zellen zu immunkompetenten und selbsttoleranten Effektorzellen (Ramsdell und Fowlkes 1990; van Ewijk 1991; Anderson et al. 2000; Petrie und Zúñiga-Pflücker 2007; Anderson und Takahama 2012). Während ihrer Entwicklung im Thymus durchlaufen die Thymozyten eine Reihe von Kontrollpunkten und temporären Entwicklungsstadien, die durch die qualitativ oder quantitativ variierende Expression von spezifischen Oberflächenmolekülen charakterisiert sind und sich mithilfe durchflusszytometrischer Analysen bestimmen lassen (Terstappen et al. 1992; Möröy und Karsunky 2000; Werlen et al. 2003; Blom und Spits 2006; Hayday und Pennington 2007, siehe Abb. 1-1). Schlüsselmarker auf der Zelloberfläche der Thymozyten sind insbesondere das CD4- und das CD8-Molekül, nach denen sich in zeitlich entsprechender Abfolge doppelt-negative (DN, $CD4^-CD8^-$), doppelt-positive (DP, $CD4^+CD8^+$) und reife CD4- oder CD8-einzel-positive (SP) T-Zellen in vier Untergruppen einteilen lassen (Boehmer 1990; Shortman und Wu 1996; Ellmeier et al. 1999; Bommhardt et al. 2004; Weerkamp et al. 2005).

Die unreifsten Thymozyten im doppeltnegativen Stadium exprimieren keine der beiden Ketten des heterodimeren TCR und sind vornehmlich im randständigen Thymuskortex lokalisiert (Ceredig und Rolink 2002; Germain 2002). Ihre weitere Entwicklung umfasst grob vier einzelne Reifungsprozesse, die Stadien DN1 bis DN4 (Godfrey et al. 1993; Zúñiga-Pflücker und Lenardo 1996; Porritt et al. 2004), in denen zunächst die Gensegmente der β-Kette des TCR rekombiniert werden (Mallick et al. 1993; Dudley et al. 1994; Hoffman et al. 1996; Livák et al. 1999). Auf die parallele Entwicklung von Thymozyten mit einem TCR, bestehend aus einer γ- und einer δ-Kette, soll hier nicht eingegangen werden (Hayday et al. 1985; Pardoll et al. 1987; Passoni et al. 1997; Kang et al. 1998; Ciofani und Zúñiga-Pflücker 2010; Wong und Zúñiga-Pflücker 2010).

Die produktiv rekombinierte β-Kette lagert sich im Zuge der sogenannten β-Selektion kovalent mit einer invarianten prä-Tα-Kette sowie CD3-Molekülen zum prä-TCR-Komplex zusammen (Groettrup et al. 1993; Saint-Ruf et al. 1994; Boehmer und Fehling 1997), dessen Signale in der weiteren Entwicklung Überleben, Expansion und Differenzierung der Thymozyten steuern (Boehmer et al. 1999; Michie und Zúñiga-Pflücker 2002; Bommhardt et al. 2004). Durch die Expression eines funktionellen prä-TCRs erreichen die Thymozyten über ein kurzes Übergangsstadium unreifer einfach-positiver T-Tellen (iCD8/iCD4-ISP, engl. *immature single positive*, in der Ratte ausschließlich CD8-Expression), in welchem die somatische

Rekombination der α-Kette des TCR initiiert wird (Hünig et al. 2001), das im Thymus zahlenmäßig überwiegende Stadium der DP-Thymozyten (Robey und Fowlkes 1994; Dudley et al. 1994).

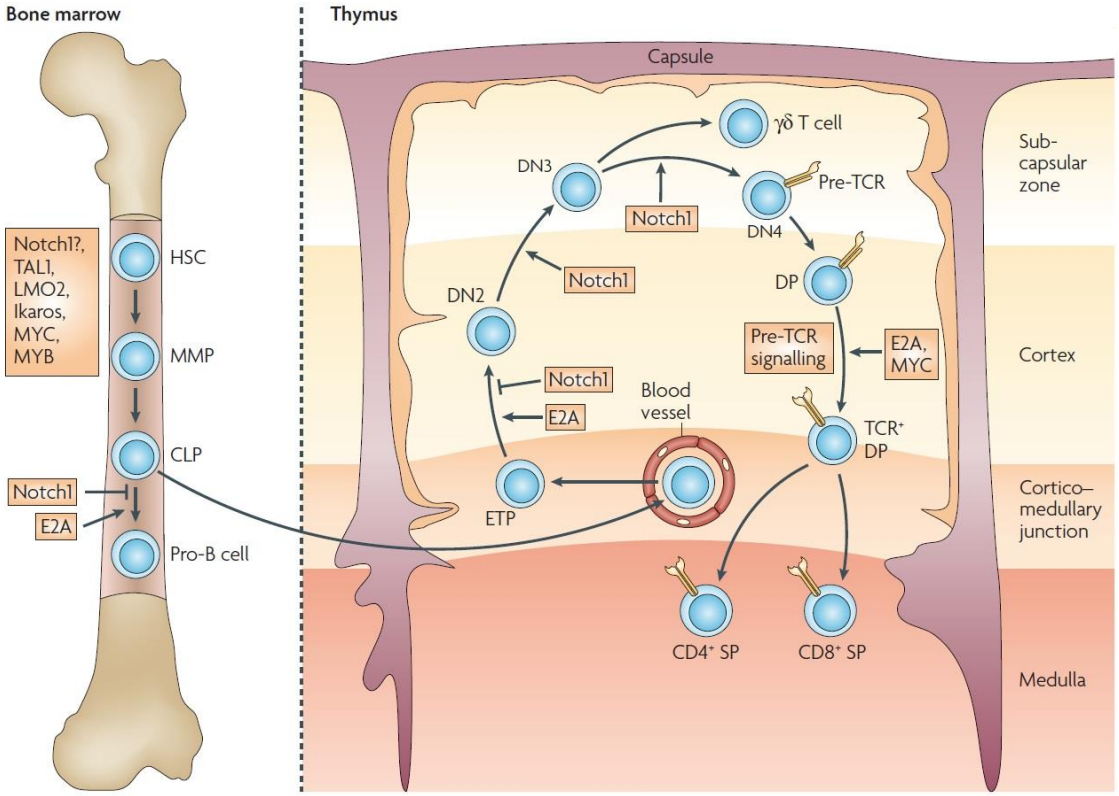

Abb. 1-1 Stadien der T-Zell-Entwicklung und an der Entstehung von T-Zell-Leukämien beteiligte Onkogene. HSC entwickeln sich im Knochenmark zu lymphozytären Vorläuferzellen (engl. *common lymphoid progenitors*(CLPs)) und wandern als sogenannte frühe thymische Vorläuferzellen (ETPs) in den Thymus ein, wo sie die doppelt-negativen Stadien (DN) durchlaufen, in denen die Gensegmente der β-Kette des TCR rekombiniert werden. Durch die Expression und Signale eines funktionellen prä-TCRs auf ihrer Zelloberfläche erreichen die Thymozyten das doppelt-positive Stadium (DP), in dem nach vollständiger Rekombination des TCR-α-Genlocus und konsekutiver Etablierung eines funktionalen heterodimeren αβTCR der Prozess der positiven oder negativen Selektion stattfindet. Erfolgreich selektionierte T-Zellen verlassen anschließend den Thymus als reife einfach-positive (SP) $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Lymphozyten. Die Grafik zeigt zudem eine Auswahl der in den verschiedenen Entwicklungsstadien relevanten Onkogene wie Notch1 und MYC, die mit der Entstehung einer akuten T-lymphoblastischen Leukämie assoziiert werden. Grafik nach Aifantis et al. 2008. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Macmillan Publishers-Verlags (Nature Reviews Immunology ©2008).

Mit vollständig rekombiniertem TCR-α-Genlocus und konsekutiver Etablierung eines funktionalen heterodimeren αβ-TCR werden die sodann proliferierenden DP-Zellen in der weiteren Entwicklung anhand ihrer Avidität gegenüber körpereigenen MHC-Molekülen „negativ“ oder „positiv“ selektioniert (Sebzda et al. 1999; Starr et al. 2003) und reifen daraufhin mit Herunterregulation des CD4- oder CD8-Corezeptors zu immunkompetenten, MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-abhängigen SP Thymozyten, die nunmehr für eine Emigration in die Peripherie gerüstet sind (Bosselut 2004; Kappes et al. 2005; Ciofani und Zúñiga-Pflücker 2007; Rothenberg et al. 2008; Dervović und Zúñiga-Pflücker 2010; Moran und Hogquist 2012).

Die genauen Ereignisse im Thymus, die für die Kontrolle der Linienentscheidung und Selektion der Thymozyten verantwortlich sind, werden im Detail bis heute nicht vollends verstanden. Zahlreiche Modelle versuchen zu erklären, wie differenzierte TCR-Signale die angenommene Schwelle für Thymozyten-Selektion und -Differenzierung im Zuge der Entwicklung beeinflussen (Singer et al. 2008). Neuere Ansätze vertreten die Hypothese, dass TCR-Signale unterschiedlicher Stärke, Dauer und Kinetik zusammen mit dem lokalen Einfluss des Stromas (Takahama 2006) sowie seiner Zytokin- (Alves et al. 2009; Park et al. 2010), Morphogen- (Crompton et al. 2007) und Notch-Signale (Laky und Fowlkes 2008, siehe Kapitel 1.3) die Linienentscheidung und Selektion regulieren.

1.2 T-Akute Lymphoblastische Leukämie (T-ALL)

T-Zellen durchlaufen im Thymus eine Reihe von spezifischen Entwicklungsschritten (Bommhardt et al. 2004). Diese Prozesse werden von einem komplexen System aus Transkriptionsfaktoren, spezifischen Ligand-Rezeptor-Interaktionen und trophischen Faktoren gesteuert (Rodewald und Fehling 1998; Rothenberg et al. 2008). Eine Fehlregulierung dieser Abläufe in Kombination mit erworbenen Genveränderungen kann dabei in eine maligne Transformation resultieren (Greaves 1986; Bain et al. 1997; Murre 2000; Aifantis et al. 2008). Durch Untersuchungen an soliden, insbesondere epithelialen Tumoren hat sich ferner das Konzept etabliert, dass eine Tumorgenese aufgrund eines mehrstufigen Prozesses durch Ansammlung von genetischen und molekularen Ereignissen zustande kommt (Hanahan und Weinberg 2000).

Zahlreiche Genveränderungen als Folge von chromosomalen Translokationen, Punktmutationen, Deletionen und Amplifikationen sind in den letzten Jahren identifiziert worden, die zu einer Störung des normalen Reifungsprozesses, zu Apoptose-Resistenz und abnormer Proliferation von Thymozyten und somit zu ihrer malignen Transformation führen können (Burnett et al. 1994; Graux et al. 2006; Sulong et al. 2009; Meijerink 2010; Hagemeijer und Graux 2010; Koch und Radtke 2011b; Kraszewska et al. 2012; van Vlierberghe und Ferrando 2012; Neumann et al. 2012). Der maligne Klon einer lymphoblastischen Leukämie geht hierbei regelhaft aus einem Entwicklungsarrest unreifer Thymozyten hervor (Reinherz und Schlossman 1980; Reinherz et al. 1980; Uckun et al. 1997). Neue genomweite Analysen zum Expressionsprofil und TCR-Rekombinationsstatus der malignen Thymoblasten untermauern diese Erkenntnis (Ferrando et al. 2002; Soulier et al. 2005; Staal et al. 2007; Mullighan und Downing 2009).

Die akuten lymphoblastischen Leukämien und Lymphome lassen sich demnach anhand ihres entsprechenden Differenzierungsarrestes beziehungsweise physiologischen Entwicklungspendants durch eine Immunphänotypisierung klassifizieren (Smith et al. 1983; Bene et al. 1995). Schon die frühen Einteilungen der T-ALL-Zelllinien basierten daher im Wesentlichen auf immunphänotypische und genotypische Analysen von an der T-Zell-Differenzierung beteiligten Antigenen, wie zum Beispiel den Bausteinen des T-Zell-Rezeptors, und verdeut-

lichten frühzeitig, dass die akute lymphoblastische Leukämie vom T-Zell-Typ eine äußerst heterogene Gruppe darstellt (Harris et al. 1994).

Zusätzlich zu den Unterschieden zwischen den einzelnen Tumorzelllinien bemerkte die Arbeitsgruppe um Minowada bereits im Jahr 1981, dass eine erhebliche Heterogenität bezüglich des Markerprofils auch innerhalb derselben Lymphom- oder Leukämiezelllinie bestehen kann. Die kürzlich nachgewiesene prognostische Signifikanz der molekular-zytogenetischen Untergruppierungen der T-ALL könnte an der Differenz des jeweiligen Entwicklungsstopps während der T-Zell-Entwicklung liegen (Greaves 1986; Asnafi et al. 2003; Tucci und Arico 2008; van Grotel et al. 2007; van Dongen et al. 2012).

Trotz vergleichbarem klinischen Erscheinungsbildes der T-Zell-Lymphome (Helbron et al. 1979) wurden diese konventionell durch das Auftreten eines mediastinalen oder andernorts gelegenen Tumor- oder Lymphknotenkonglomerats (*bulky disease*) sowie minimaler oder gar fehlender Beteiligung von Blut und Knochenmark von den leukämischen Formen abgegrenzt. Definitionsgemäß lag früher bei einem Blastenanteil im Knochenmark von unter 25 % ein akutes Lymphom vor (Cortelazzo et al. 2011). In der kürzlich überarbeiteten WHO-Klassifikation maligner Lymphome (Campo et al. 2011) wurde auf eine Abgrenzung beziehungsweise Trennung beider Entitäten verzichtet (Dürkop et al. 2011), auch wenn mehrere zeitnah publizierten Studien relevante Unterschiede zwischen den molekularen Markerprofilen beider T-Zell-Neoplasien gezeigt haben (Raetz et al. 2006; Hoelzer und Gökbuget 2009; Uyttebroeck et al. 2008).

Die inzwischen vierte Auflage der WHO-Klassifikation von lymphatischen und hämatopoetischen Neoplasien aus dem Jahr 2008 (Swerdlow et al. 2008) repräsentiert dessen ungeachtet einen aktuell weltweiten Konsens und basiert auf den früheren etablierten Einteilungen nach French-American-British (FAB) (Bennett et al. 1985) und der European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL) (Bene et al. 1995). Letztere differenzierte vier Subgruppen der T-ALL anhand bestimmter Oberflächenproteine und des daraus abgeleiteten Entwicklungsstadiums (Crist et al. 1988; Ludwig et al. 1993). Die morphologische Klassifikation nach FAB spielt nur noch für die initiale Identifikation einer reifzelligen B-ALL eine wesentliche Rolle. Für die klinische Praxis in Deutschland findet heute vornehmlich die therapierelevante Klassifikation der GMALL (German Multicenter ALL Study Group) -Studiengruppe mit den Differenzierungsstufen ‚early', thymische und ‚mature' T-ALL Verwendung (Reiter et al. 2000; Hoelzer und Gökbuget 2002).

Die entarteten Zellen unterscheiden sich von normalen Thymozyten insbesondere durch eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Malyukova et al. 2007; Gutierrez et al. 2011) oder häufiger durch eine Überexpression bestimmter Onkogene, hier bevorzugt Vertreter der Notch-Familie (siehe Kapitel 1.3), die physiologisch insbesondere an der frühen Thymozyten-Entwicklung beteiligt sind (Wenig et al. 2004; Mansour et al. 2006; Palomero et al. 2006c; Lee et al. 2007). Bei Erwachsenen wird die Pathogenese meist durch mehrere genetische Aberrationen verursacht, die im Laufe des Lebens erworben werden. Die genauen

Entstehungsursachen der ALL sind jedoch insbesondere bei Kindern weitestgehend ungeklärt. Die Manifestation der Leukämie im frühen Kindesalter sowie Studien an eineiigen Zwillingen mit Nachweis hoher Konkordanzraten für die ALL legen eine genetische Prädisposition sowie pränatale beziehungsweise intrauterine Klonbildung mit gegebenenfalls nachfolgend transplacentalem Blutaustausch zwischen den Zwillingen nahe (Ford et al. 1997; Mori et al. 2002; Greaves et al. 2003; Pui et al. 2004a; 2008). Dieses Konzept wird seit etwa einem Jahrzehnt nicht zuletzt durch Untersuchungen an venösem Nabelschnurblut von Neugeborenen mit Detektion leukämischer Blasten akzeptiert (Wiemels et al. 1999; Taub et al. 2002; Ravindranath 2003; Greaves 2005). Interessanterweise haben gerade die Studien an identischen Zwillingen gezeigt, dass die singuläre intrauterine Genveränderung für eine Leukämieentwicklung unzureichend ist und, in Anbetracht der variablen Latenz bis zur klinischen Erkrankungsmanifestation, sekundäre postnatale Ereignisse für eine maligne Transformation vonnöten sind (Wiemels et al. 1999; Greaves 2002; Pui et al. 2004a). Diese zusätzlich erforderlichen Einflussfaktoren zur Etablierung einer Leukämie sind bis heute weitestgehend unbekannt. Eindeutige Ätiologien umweltbezogener oder genetischer Beschaffenheit können nur in seltenen Fällen ausgemacht werden (wie zum Beispiel die Assoziation mit Immundefekten, Aneuploidie-Syndromen, bestimmten Virusinfektionen, Neurofibromatose, Ataxia teleangiectacia, Hemihypertrophie und anderen genetisch bedingten Störungen beziehungsweise eine Exposition gegenüber Pestiziden, myelotoxischen Chemikalien oder ionisierender Strahlung) (Lafiura et al. 2007; Kaatsch et al. 2008; Stiller et al. 2008).

Laut dem Jahresbericht 2012 des deutschen Kinderkrebsregisters erkranken jährlich in Deutschland etwa 650 Kinder unter 15 Jahren an Leukämie, davon entfallen 83 % auf die ALL, die als häufigste Krebserkrankung im Kindesalter an Inzidenz in Deutschland und Europa weiter zunimmt (ca. 0,7 % pro Jahr) (Wood et al. 1998; Spix et al. 2008; Hunger et al. 2012; Kaatsch und Spix 2012). Die T-ALL macht mit leichter Prädominanz des männlichen Geschlechts etwa 15 % der ALL-Fälle bei Kindern und 25 % der bei Erwachsenen aus (Ferrando et al. 2002; Schmid et al. 2009), wobei ihre Prognose im Vergleich zur B-ALL deutlich schlechter ist (Crist et al. 1988; Shuster et al. 1990; Uckun et al. 1998; Pui und Evans 2006).

Klinisch manifestiert sich eine ALL durch eine meist rasch einsetzende, grippeähnliche Verschlechterung des Allgemeinzustandes, welche von Blässe sowie einer erhöhten Blutungs- und Infektneigung begleitet wird. Diese charakteristischen Symptome lassen sich direkt auf die Proliferation und Akkumulation klonaler Lymphoblasten in Knochenmark und Blut mit Verdrängung der normalen Hämatopoese und konsekutiver Knochenmarksinsuffizienz im Sinne einer Panzytopenie aller drei Zellreihen (Anämie, Thrombo- und Granulozytopenie) zurückführen (van Vlierberghe und Ferrando 2012). Durch die Ausschwemmung der Blasten in die Peripherie kommt es kurzfristig zu einer Beteiligung des lymphatischen Systems mit ubiquitären, meist indolenten Lymphknotenschwellungen und einer Hepatosplenomegalie, die sich klinisch durch epigastrische Beschwerden äußern kann. Insbesondere bei der T-ALL wird gelegentlich ein Thymustumor oder eine ausgeprägte

mediastinale Lymphknotenvergrößerung mit bedrohlicher Einengung der Trachea und Vena cava superior beobachtet, die eine Dyspnoe und obere Einflussstauung hervorzurufen vermag (Hoelzer und Gökbuget 2009). Ein Viertel der Fälle fällt initial mit Knochen- und Gelenkschmerzen auf, was eine differentialdiagnostische Abgrenzung gegenüber Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis mitunter erschwert, zumal wegweisende Veränderungen des Blutbildes nicht obligat vorliegen und oft nur diskret bestehen. In einem nicht unerheblichen Anteil der Fälle liegt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits eine ZNS-Manifestation mit Hirndruckzeichen oder Hirnnervenlähmungen vor (Aifantis et al. 2008). Etwa 10 % aller männlichen Betroffenen entwickeln ferner eine testikuläre Metastasierung. Im Verlauf der leukämischen Infiltration können prinzipiell alle lymphatischen und nicht-lymphatischen Organe wie zum Beispiel die Niere, Lunge, Pleura, Haut und Retina befallen werden. Unbehandelt führt die T-ALL innerhalb von Wochen bis Monaten zum Tode.

Neben Anamnese und Differentialblutbild ist zur initialen Diagnosesicherung eine Knochenmarkspunktion obligat. Hier findet sich in ungefähr 90 % der Fälle eine morphologisch uniforme Blastenpopulation im gewonnenen Aspirat. Zur weiteren (Sub-)Klassifikation und zur Detektion eines veränderten Antigenprofils erfolgt mithilfe der fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometrie (FACS, siehe Kapitel 2.2.6) eine Immunphänotypisierung unter Verwendung monoklonaler Antikörper (Cools und Vandenberghe 2009; Vardiman et al. 2009). Diese schnell verfügbaren Ergebnisse ermöglichen anschließend den gezielten Einsatz von speziellen Analyseverfahren zur Erfassung molekularer oder genetischer Veränderungen der Blasten sowie zur Identifikation unabhängiger Prognosefaktoren (Pui et al. 1990; Peters und Ansari 2011).

In der Therapie der T-ALL ist ein wesentliches Element die risikoadaptierte Stratifizierung. Die Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie beschäftigt sich seit vielen Jahren mit der Entwicklung risikobestimmter und effektiverer Therapiekonzepte (Schrappe et al. 2000c; Möricke et al. 2008; Tallen et al. 2010). Klinische Faktoren wie die initiale Leukozytenlast oder das Patientenalter sind zwar für eine orientierende Risikoabschätzung nützlich, erlauben aber keine hinreichend spezifische Charakterisierung zur Legitimation einer angepassten Therapie (Vaitkevičienė et al. 2011). Neben biologischen Faktoren wie chromosomale Aberrationen und andere genetische Veränderungen, die sich in der Vergangenheit als prognostische Marker herausgestellt haben (Forestier et al. 2000; Aricò et al. 2000; Stams et al. 2005), ist ein wichtiger Indikator für ein hohes Rezidiv-Risiko das inadäquate Ansprechen auf synthetische Glukokortikoide (GC) wie Prednisolon oder Dexamethason (Riehm et al. 1987; Kato et al. 1993; Schrappe et al. 1998; Dördelmann et al. 1999). Dieses Ansprechen der Patienten auf eine initale GC-Behandlung ist zudem einer der verlässlichsten Marker für eine in etwa 10 % der Fälle vorliegende Multiresistenz der Leukämiezellen gegenüber unterschiedlichen konventionellen Chemotherapeutika und damit ein bedeutendes Signal für ein schlechteres Gesamtüberleben (Riehm et al. 1987; Reiter et al. 1994; Hongo et al. 1997; Schrappe 2004; Pui und Evans 2006). Die Ursachen für die unterschiedliche

Sensitivität beziehungsweise Resistenz der leukämischen Blasten gegenüber einer Therapie mit GC oder Zytostatika sind bis heute weitestgehend unbekannt (siehe auch Kapitel 1.4.3) (Klumper et al. 1995; Ramdas et al. 1999; Pedersen et al. 2004; Kaspers et al. 2005; Wang et al. 2006; Real und Ferrando 2009).

Als weiteres und inzwischen obligates Stratifizierungsmaß zur Risikoabschätzung hat sich neben der initialen GC-Sensitivität die sogenannte minimal verbleibende Resterkrankung (engl. *minimal residual disease*, MRD) bewährt, die zu zwei definierten Zeitpunkten der therapeutischen Konsolidierungsphase mittels PCR oder Durchflusszytometrie erfasst wird und eine hohe Sensitivität bei zudem verbessertem Einschätzungspotential des Rezidiv-Risikos aufweist (Biondi et al. 2000; van der Velden et al. 2004; Flohr et al. 2008; Brüggemann et al. 2010; Gökbuget et al. 2012).

Die zytostatische Therapie der T-ALL wird in die Phasen Induktions-, Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie unterteilt (Hoelzer und Gökbuget 2002). Nach richtungsweisenden Studien der ALL-BFM-Studiengruppe (Henze et al. 1990; Riehm et al. 1990; Kamps et al. 1999; Schrappe et al. 2000c) kommt heute zusätzlich eine Reintensivierungsphase nach mehrwöchigem Intervall ähnlich einer erneuten Induktionsphase (sog. Re-Induktion) zum Einsatz (Nachman et al. 1998; Gaynon et al. 2000; Pui et al. 2004b; Stanulla und Schrappe 2009; Aldoss et al. 2013). Ziel der initialen Induktionstherapie ist das Erreichen einer kompletten Remission der Erkrankung, was die Grundvoraussetzung für ein Langzeitüberleben beziehungsweise eine Heilung darstellt. Nach einer steroid- oder cyclophosphamidbasierten Vorphase-Therapie zur Vermeidung eines Tumorlyse-Syndroms kommen für die Remissionsinduktion GCs (Prednisolon oder seltener Dexamethason), L-Asparaginase, Vincristin, Anthrazykline (Dauno- oder Doxorubicin) und intrathekales Methotrexat zum Einsatz (Reiter et al. 1994; Riehm et al. 1977; Henze et al. 1982; Schrappe et al. 1987; Rivera et al. 1991; Laport und Larson 1997). Mit Ausnahme der älteren Patienten wird hierbei die pegylierte Form (siehe Kapitel 1.4.2) von L-Asparaginase eingesetzt (Rosen et al. 2003). Neben der hierdurch verlängerten Wirkdauer unterscheidet sich die spezifisch bei ALL wirksame L-Asparaginase im Hinblick auf Wirkungsmechanismus, Resistenz und Nebenwirkungsspektrum von den anderen Zytostatika (Avramis et al. 2002; Hawkins et al. 2004; Pession et al. 2005). Zusätzlich erfolgt je nach Risikogruppe in der frühen Induktionsphase die Zugabe weiterer Medikamente wie Cyclophosphamid, Cytosin-Arabinosid und 6-Mercaptopurin. Die sich anschließende Durchführung einer intensiven Konsolidierungstherapie zielt unter bevorzugter Verwendung von hochdosiertem Methotrexat insbesondere auf das Erreichen von Extrakompartimenten wie Keimdrüsen und ZNS ab (Schrappe et al. 2000b; Pui et al. 2001; Kager et al. 2005). Des Weiteren wird in dieser Phase und vornehmlich bei Hochrisiko-Patienten die allogene selten autologe Knochenmarktransplantation durchgeführt (Ladenstein et al. 1997; Storb 2003; Hunault et al. 2004; Thomas et al. 2004; Hahn et al. 2005; Gökbuget et al. 2012). Abschließend ist eine konventionelle Erhaltungstherapie mit Mercaptopurin und Methotrexat Behandlungsstandard, da alle bisherigen Studien mit generellem Verzicht auf

eine Erhaltungstherapie deutlich ungünstigere Gesamtergebnisse gezeigt haben (Reiter et al. 1994; Schrappe et al. 2000a, 2000c; Pui und Evans 2006).

Durch die risikoadaptierte Therapieoptimierung und durch Einführung der kombinierten Polychemotherapie hat sich bei geringem therapieassoziierten Zweitmalignomrisiko die langfristige Überlebenswahrscheinlichkeit der an T-ALL erkrankten Kinder von einst 20-30 % auf heute über 80 % erhöht (Schrappe et al. 2000c; Pui et al. 2004a; Fielding et al. 2006; Möricke et al. 2010; Dores et al. 2012; Pui et al. 2012; Hunger et al. 2012). Weniger Erfolg wurde in der Therapie erwachsener T-ALL-Patienten erzielt, deren Langzeitüberlebensraten weiterhin bei unter 50 % liegen (Hunault et al. 2004; Thomas et al. 2004; Rowe et al. 2005; Grabher et al. 2006; Pui et al. 2008; Marks et al. 2009; Pulte et al. 2013). Auch wenn die Mehrheit der Patienten initial eine komplette Remission erreicht, sind Rezidive mit begleitend drastischer Verschlechterung der Prognose nicht selten (Oudot et al. 2008). Zudem leiden Patienten jeden Alters an den schweren Nebenwirkungen und häufig lebenslangen Spätschäden der intensiven zytostatischen Behandlung, was die Erforschung und Etablierung neuer und effizienterer Therapieansätze notwendig macht.

1.3 Notch1

Aktivierende Mutationen des Notch1-Gens können in bis zu 60 % der Patienten mit T-ALL nachgewiesen werden (Weng et al. 2004; van Grotel et al. 2007; Asnafi et al. 2009).

Notch-Proteine sind eine Familie von evolutionär hochkonservierten Transmembran-rezeptoren, die insbesondere Entwicklung, Differenzierung und Wachstum von zahlreichen Zelltypen in unterschiedlichsten Organismen, von Würmern bis zu den Menschen, regulieren (Egan et al. 1998; Artavanis-Tsakonas et al. 1999; Mumm und Kopan 2000; Kojika und Griffin 2001; Lai 2004). Die Übersetzung von „Notch“ aus dem Englischen („Kerbe“) geht auf eine heterozygote Mutation dieses Gens in der Fruchtfliege Drosophila melanogaster zurück, welche zu Kerben an den Flügelrändern führt und erstmalig im Jahre 1917 von Thomas Hunt Morgan beschrieben wurde.

Notch-Rezeptoren können in eine extra- und intrazelluläre Domäne sowie einen Transmembranteil untergliedert werden (Kidd et al. 1986; Sanchez-Irizarry et al. 2004). Säugetiere besitzen vier homologe Notch-Proteine (Notch1-4), die fünf verschiedene Liganden aus der Delta-Serrate-LAG-2-Familie zu binden vermögen (Bray 2006; D'Souza et al. 2008) und unter anderem Schlüsselrollen in der T-Zell-Entwicklung (Deftos et al. 2000; Bommhardt et al. 2004) und -Funktion einnehmen (Amsen et al. 2004; Eagar et al. 2004; Radtke et al. 2010).

Die molekularen und biochemischen Details der Notch-Signalkaskade wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht (Ehebauer et al. 2006; Gordon et al. 2008; Kopan und Ilagan 2009; Kovall und Blacklow 2010), wobei im Weiteren nur auf Notch1 eingegangen werden soll.

Ausgehend von einer extrazellulären Ligand-Rezeptor-Interaktion zwischen benachbarten Zellen vollzieht sich die Notch1-Signaltransduktion sukzessive über zwei proteolytische Spaltungen des Rezeptors (Abb. 1-2). Die erste enzymatische Abspaltung betrifft die extrazelluläre Domäne, wird durch Metalloproteasen der ADAM-Familie vermittelt (Brou et al. 2000; Mumm und Kopan 2000) und stellt einen wichtigen Regulationsschritt der Notch1-Aktivierung dar (Kopan und Ilagan 2009).

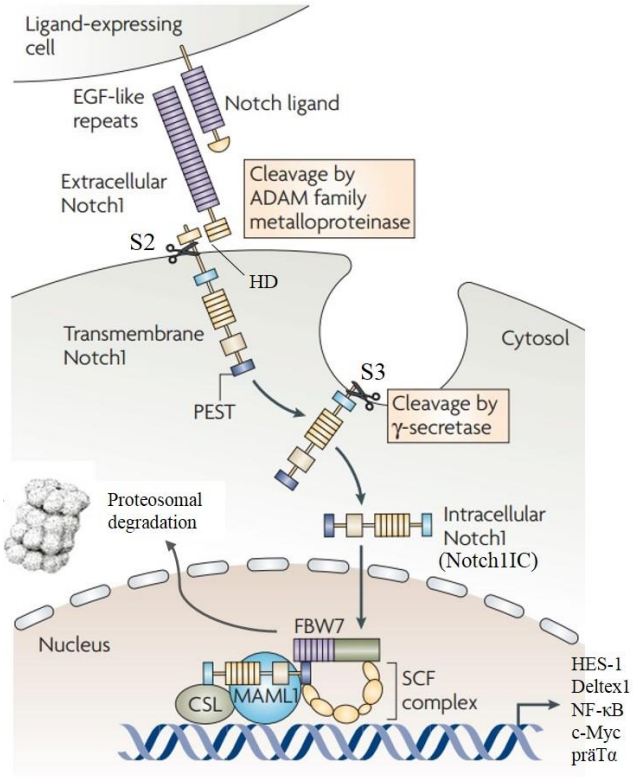

Abb. 1-2 Der Notch1-Signaltransduktionsweg. Der Notch1-Rezeptor ist als Heterodimer an der Zelloberfläche exprimiert. Durch Bindung eines Notch-Liganden werden zwei proteolytische Spaltungen des Rezeptors ausgelöst. Die erste erfolgt durch die ADAM-Metalloprotease an Stelle S2 und führt zu einer Heteromerisierung im membrannahen Bereich der extrazellulären Notch-Rezeptor-Domäne. Die zweite Spaltung innerhalb der Transmembrandomäne wird durch die γ-Sekretase vermittelt und impliziert die Bildung von aktiviertem Notch1IC und dessen anschließende Translokation in den Zellkern. Dort bindet es im Komplex mit Co-Aktivatoren wie MAML1 an den Transkrikptionsfaktor CSL und induziert die Transkription von Zielgenen. Limitiert wird das Notch1-Signal durch die E3-Ubiquitin-Ligase Fbw7, die Notch1IC über den SCF-Komplex für den proteasomalen Abbau markiert. HD: Heterodimerization domain; PEST: polypeptide enriched in Proline, glutamic acid(E), Serine and Threonin; MAML1: Mastermind-like 1 Protein; SCF complex: Skp, Cullin, F-box containing complex. Modifiziert nach Aifantis et al. 2008. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Macmillan Publishers-Verlags (Nature Reviews Immunology ©2008).

Die zweite Proteolyse im Bereich der Transmembrandomäne erfolgt durch die γ-Sekretase (Fortini 2002) eines Presenilin- (Chen et al. 2006) und Nicastrin- (Zhang et al. 2005) enthaltenden Multiproteinkomplexes und resultiert in der Abspaltung der intrazellulären Notch1-Domäne (Notch1IC, NICD) (Jarriault et al. 1995; Kopan et al. 1996; Schroeter et al. 1998; Hsieh et al. 1999; Tagami et al. 2008). Das freigesetzte Notch1IC bindet anschließend im Zellkern an den DNA-assoziierten Transkriptionsfaktor CSL (Kimble und Simpson 1997; Struhl und Adachi 1998; Strooper et al. 1999; Han et al. 2002; Nam et al. 2003) (auch bekannt als CBF1 im Menschen, Supressor of Hairless in Drosophila und RBP-Jκ in der Maus), der in Abwesenheit des

Notch-Signals die Transkription seiner Zielgene reprimiert (Dou et al. 1994; Waltzer et al. 1995; Hsieh et al. 1996; Oswald et al. 2002; Hamidi et al. 2011; VanderWielen et al. 2011). Nach erfolgter Zusammenlagerung rekrutiert der CSL-NICD-Komplex sodann Co-Aktivatoren, wie zum Beispiel Mastermind-like (MAML)-Proteine (Wu et al. 2000, 2002; Jeffries et al. 2002) und Histon-Acetyltransferasen (Kurooka und Honjo 2000; Wallberg et al. 2002), und induziert durch Bindung an die entsprechenden *Response Elements* und an die DNA eine direkte Aktivierung der transkriptionellen Expression von Notch1-Zielgenen (zum Beispiel Hairy/Enhancer of Split 1 (HES-1) (Jarriault et al. 1995; Lecourtois und Schweisguth 1995; Deftos et al. 2000; Iso et al. 2003; Fryer et al. 2004; Weerkamp et al. 2006), Deltex1 (Deftos et al. 1998), NF-κB (Oswald et al. 1998; Cheng et al. 2001; Shin et al. 2006; Vilimas et al. 2006), c-Myc (Wenig et al. 2006; Palomero et al. 2006b; Klinakis et al. 2006) und prä-Tα (Reizis und Leder 2002; Campese et al. 2006)). Die Cyclin-abhängige Phosphorylierung von aktiviertem NICD an der C-terminalen PEST-Domäne (engl. *polypeptide enriched in Proline, glutamic acid(E), Serine and Threonin* (Rogers et al. 1986; Rechsteiner 1988)) limitiert schließlich den NICD-Effekt, initiiert die Markierung durch die E3-Ubiquitin-Ligase Fbw7 und leitet die proteolytische Degradation von Notch1 durch das Proteosom ein (Gupta-Rossi et al. 2001; Oberg et al. 2001; Wu et al. 2001; Fryer et al. 2004; Thompson et al. 2008).

1.3.1 Notch1 in der T-Zell-Entwicklung

Notch1-Proteine sind an der Regulation von Entwicklung und Linienentscheidungen zahlreicher Zellarten unterschiedlichster Organismen beteiligt (Artavanis-Tsakonas et al. 1999).

Insbesondere in der T-Zell-Entwicklung nimmt Notch1 eine Schlüsselrolle ein (Radtke et al. 2004; Tanigaki et al. 2004; Visan et al. 2006). Loss-of-function-Experimente konnten zeigen, dass Notch1 maßgeblich an der Linienentscheidung zwischen B- und T-Zelle beteiligt ist (Sambandam et al. 2005; Li und Boehmer 2011). So verhindert die spezifische Deletion von Notch1 in HSCs das Besiedeln des Thymus und induziert einen Entwicklungsstopp der T-Zellreihe zugunsten einer ektopen Akkumulation unreifer B-Lymphozyten im Thymus (Radtke et al. 1999; Wilson et al. 2001). Ein vergleichbarer Phänotyp wurde in einem Maus-Modell mit konditioneller Inaktivierung des Notch1-Transkriptionsfaktors RBP-Jκ beobachtet (Han et al. 2002). Darüber hinaus führen Hemmungen in der Ligand-Rezeptor-Interaktion, der Notch1-Signalkaskade oder der Notch1-induzierten Genexpression zu Störungen der T-Zellreifung und einer Begünstigung der B-Zellentwicklung (Koch et al. 2001; Izon et al. 2002; Yun und Bevan 2003; Maillard et al. 2004).

Umgekehrt zeigte sich in Gain-of-function-Studien, dass die Überexpression des konstitutiv aktiven Notch1IC oder eines Notch1-Liganden in HSCs eine Unterdrückung der B-Zellentwicklung im Knochenmark zugunsten einer extrathymischen T-Zellentwicklung zur Folge hat (Pui et al. 1999; Yan et al. 2001; Jaleco et al. 2001; Schmitt und Zúñiga-Pflücker 2002; Dorsch et al. 2002). Überdies werden Notch1-Liganden wie beispielsweise DL4 in hoher Dichte von thymischen Epithelzellen (TEC) exprimiert, die auf diese Weise entscheidend die

Proliferation und Differenzierung der T-Vorläuferzellen beeinflussen (Besseyrias et al. 2007; Heinzel et al. 2007; Hozumi et al. 2008; Koch et al. 2008; Thompson und Zúñiga-Pflücker 2011). Während Notch1 bei der Entwicklung von γδ-T-Lymphozyten nicht involviert zu sein scheint (Ciofani et al. 2006; Lauritsen et al. 2009), führt die Inaktivierung von Notch1 in doppelt-negativen Thymozyten zu einer schweren Störung der αβ-T-Zell-Entwicklung und der Rekombination der TCR-β-Kette mit konsekutivem Entwicklungsarrest der Thymozyten am prä-TCR-Kontrollpunkt (Wolfer et al. 2002).

Zúñiga-Pflücker und Kollegen konnten eine OP9-DL1 Zellkultur etablieren (Schmitt und Zúñiga-Pflücker 2002; Zúñiga-Pflücker 2004), mithilfe derer das Zusammenwirken der Signale des prä-TCR und der Notch1-Ligand-Interaktion bei der β-Selektion und Thymozyten-reifung vom doppelt-negativen zum doppelt-positiven Stadium aufgedeckt werden konnte (Reizis und Leder 2002; Ciofani et al. 2004; Tan et al. 2005; Ciofani und Zúñiga-Pflücker 2005; Garbe et al. 2006; Ciofani et al. 2006). Mit Ausnahme dieser Kooperation von Notch1 und prä-TCR wird angenommen, dass beide Signalwege in der weiteren T-Zell-Entwicklung unabhängig voneinander fungieren (Maillard et al. 2006). So können beispielsweise Thymozyten mit einerseits konditionellem Verlust von Notch1 oder andererseits ausgeschaltetem prä-TCR und hierbei simultanem Erhalt eines suffizienten Notch-Signals nicht bis zum doppelt-positiven Stadium heranreifen (Allman et al. 2001; Wolfer et al. 2002; Koch und Radtke 2011a). Andererseits ist bekannt, dass Notch1 direkt die Transkription der prä-Tα-Gene aktiviert (Reizis und Leder 2002; Bellavia et al. 2007), was eine unmittelbare Schnittstelle zwischen Notch1 und dem prä-TCR andeutet (Radtke et al. 2010).

Unter dem Einfluss des prä-TCR-Signals regulieren Thymozyten nach der β-Selektion über verschiedene Mechanismen die Notch1-Expression herunter (Taghon et al. 2006; Yashiro-Ohtani et al. 2009), um nicht zuletzt dem onkogenen Potential eines persistierenden Notch1-Signals entgegen zu wirken (Tanigaki et al. 2004; Wenig et al. 2006; Kleinmann et al. 2008; Jeannet et al. 2010; Gómez-del Arco et al. 2010). Interessanterweise führt dies nicht zu einem Abfall des vom späten doppelt-negativen bis zum doppelt-positiven Stadium nahezu konstanten Expressionsniveaus von Notch1 an der Zelloberfläche der β-selektionierten Thymozyten (Huang et al. 2003; Fiorini et al. 2009).

Zum heutigen Zeitpunkt wird trotz kontroverser Diskussion mehrheitlich angenommen, dass Notch1 an der direkten Regulation der Linienentscheidung zwischen CD4- und CD8-SP Thymozyten nach der β-Selektion nicht beteiligt ist (Wolfer et al. 2001; Radtke et al. 2004; Laky und Fowlkes 2008; Koch und Radtke 2011a; Rothenberg et al. 2013). Erneute Notch1-Signale findet man erst in reifen peripheren T-Lymphozyten wieder, wodurch die Funktion der Effektorzellen kontrolliert wird (Bheeshmachar et al. 2006; Amsen et al. 2009).

Zusammenfassend zeigen die bisher gewonnenen Erkenntnisse, dass sich Notch1 als Schlüsselrezeptor auf in den Thymus einwandernden Zellen maßgeblich für die Entwicklung von funktionalen T-Lymphozyten verantwortlich zeichnet (Radtke et al. 2010).

1.3.2 Notch1 in T-ALL

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass fehlregulierte Notch-Signale in der Karzinogenese zahlreicher, insbesondere hämatopoietischer Zellarten involviert sind (Hernandez Tejada et al. 2014). Je nach exprimierender Zellart kann Notch hierbei als Onkogen (van Es et al. 2005; Balint et al. 2005; Roy et al. 2007; Lino et al. 2010), Tumorsuppressor (Nicolas et al. 2003; Klinakis et al. 2011) oder unter Umständen sogar in beiden Rollen agieren (Mazur et al. 2010; Hanlon et al. 2010).

Das humane Homolog des aus Drosophila bekannten Notch1-Genes wurde erstmals von der Arbeitsgruppe um Jeff Sklar in den späten 1980ern (Reynolds et al. 1987) und Anfang der 1990er (Ellisen et al. 1991) durch klonale Sequenzierung einer chromosomalen Translokation t(7;9)(q34;q34.3) identifiziert, die ein kleines Patientenkollektiv mit seltener Variante einer T-ALL betrifft. In der Originalarbeit zeigten vier von vierzig Patienten diese chromosomale Translokation, in deren Zuge ein etwa 100 Basenpaar langes Notch1-Genfragment (Notch1IC) mit der Enhancer-Sequenz der TCR-β-Kette fusioniert und zur Ligand-unabhängigen Expression eines konstitutiv aktiven Notch1-Proteins in T-Zellen führt (Ellisen et al. 1991; Greenwald 1994; Capobianco et al. 1997). Übertragen in ein Mausmodell fungierte dieses konstitutiv aktive Notch1IC als Onkoprotein für in Knochenmark transplantierte T-Zellen mit konsekutiver T-ALL-Entwicklung ähnlich wie in den ursprünglichen Patienten (Pear et al. 1996).

In den darauffolgenden Jahren wurden aktivierende Mutationen von Notch1 oder inaktivierende Mutationen von inhibierenden Regulatoren des Notch1-Signalweges mit hoher Frequenz in vielen hämatologischen Malignomen sowie insbesondere in mehr als 50 % der humanen T-ALL identifiziert und somit Notch1 als zentrales Onkogen in der Lymphomgenese bestätigt (Weng et al. 2004; O'Neil et al. 2006; Lin et al. 2006; Palomero et al. 2006c; Thompson et al. 2007; Jundt et al. 2008; Aifantis et al. 2008; Pancewicz und Nicot 2011).

Sequenzanalysen humaner T-ALL-Zellen zeigten, dass die überwiegende Mehrzahl dieser Mutationen in der HD-Domäne (40 %), der PEST-Domäne (15 %) oder in beiden dieser Segmente (20 %) von Notch1 auftreten (Weng et al. 2004; van Grotel et al. 2007; Eguchi-Ishimae et al. 2007; Asnafi et al. 2009). Ursächlich für das Ligand-unabhängig erhöhte Notch1-Signal nach einer solchen Mutation ist eine kontinuierliche NotchIC-Abspaltung (Malecki et al. 2006) oder die Stabiliserung von Notch1IC mit Ausbleiben des proteasomalen Abbaus durch die Ubiquitin-Ligase Fbw7 (Maillard et al. 2004; Chiang et al. 2006; Thompson et al. 2007; O'Neil et al. 2007). Inaktivierende Mutationen in Fbw7 werden darüber hinaus in etwa 20 % der T-ALL-Fälle detektiert und scheinen ähnlich wie die Mutationen in der PEST-Domäne mit einem verlängerten Notch-Signal assoziiert zu sein sowie eine Notch1-unabhängige Therapieresistenz zu bedingen (Thompson et al. 2007; O'Neil et al. 2007; Malyukova et al. 2007; Onoyama et al. 2007; Maser et al. 2007; Larson Gedman et al. 2009).

Neuere Erkenntnisse, vorwiegend aus Tiermodellen, lassen jedoch darauf schließen, dass Notch1-Mutationen (HD- oder PEST-Domäne) alleine für eine maligne Zelltransformation

von Thymozyten nicht ausreichen, aber im Zusammenwirken mit anderen onkogenen Defekten die Entwicklung einer T-ALL begünstigen können (Mansour et al. 2007; Chiang et al. 2008; Blackburn et al. 2012; Lobry et al. 2014).

Notch1-Zielgene von onkogener Relevanz sind hauptsächlich Hes-1 (Dudley et al. 2009), c-Myc (Weng et al. 2006) und NF-κB (Bellavia et al. 2000; Vilimas et al. 2006; Espinosa et al. 2010). Die Induktion von c-Myc durch ein konstitutives Notch-Signal wird als einer der Hauptmechanismen der leukämischen T-Zell-Transformation angesehen (Weng et al. 2006; Klinakis et al. 2006; Sharma et al. 2006; Palomero et al. 2006b). NF-κB ist ein wichtiger Regulator von Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben und ist für seine vielfache Beteiligung an verschiedensten malignen Zelltransformationen bekannt (Karin 2006)(siehe Kapitel 1.5). Man geht davon aus, dass die konstitutive Expression von Notch1 und Hes-1 in T-All neben direkten transkriptionellen Aktivierungsmechanismen auch die Hemmung von NF-κB durch sein Inhibitorprotein IκB unterbindet (Vilimas et al. 2006; Shin et al. 2006; Espinosa et al. 2010).

Im Gegensatz zur ALL der T-Zellreihe fungiert Notch1 in verschiedenen Gewebearten, wie zum Beispiel in anderen hämatologischen Malignomen, interessanterweise als potenter Tumorsuppressor (Ellisen et al. 1991; Nicolas et al. 2003; Zweidler-McKay et al. 2005; Kannan et al. 2011; Zage et al. 2012; Lobry et al. 2014). Dies zeigt abermals, dass die genaue Rolle von Notch1 in der Entwicklung maligner Erkrankungen bei weitem nicht abschließend geklärt ist. Durch die neuen Erkenntnisse zur molekularen Genese und Pathophysiologie der Notch1-abhängigen T-ALL haben sich gleichwohl in den letzten Jahren zahlreiche neue Therapieansätze ergeben, die auf den Notch1-Signalweg respektive auf die gezielte Hemmung von Notch1, der γ-Sekretase oder des NF-κB-Signalweges abzielen (Miele et al. 2006; Vilimas et al. 2006; Roy et al. 2007; Dos Santos et al. 2010; Tosello und Ferrando 2013; Fu et al. 2014; Hales et al. 2014; Koyama et al. 2014).

Trotz vielversprechender Ansprechraten von Notch1-abhängiger T-ALL-Zellen auf die Behandlung mit γ-Sekretase-Inhibitoren (GSI) in Zellkulturstudien (Palomero et al. 2006a; Lewis et al. 2007) und in einigen Mausmodellen (Cullion et al. 2009; Tatarek et al. 2011) zeigten GSI in weiteren klinischen Therapiestudien allerdings sowohl eine Insuffizienz ihrer anti-leukämischen Zytotoxizität als auch eine schwere gastrointestinale Toxizität, was ihren klinischen Einsatz vorerst ausschließt (Searfoss et al. 2003; Milano et al. 2004; Wong et al. 2004; van Es et al. 2005; Deangelo et al. 2006). In einem kürzlichen hoffnungsvollen Ansatz scheint die Kombination eines GSI mit einem GC überaus synergistische Effekte zu bieten und die gastrointestinalen Nebenwirkungen der GSI, denen die generalisierte Hemmung des Notch1-Signalweges in intestinalen Vorläuferzellen zugrunde liegt (Riccio et al. 2008), zu begrenzen (Real und Ferrando 2009; Real et al. 2008; Wei et al. 2010; Samon et al. 2012).

Ein alternativer Therapieansatz in Notch1-abhängiger T-ALL zielt auf eine Hemmung von NF-κB mithilfe von Proteasom-Inhibitoren wie zum Beispiel Bortezomib (siehe Kapitel 1.5) ab, welche den Abbau des NF-κB-spezifischen Inhibitorproteins IκB verhindern und damit

das NF-κB-Signal zu unterdrücken vermögen (Vilimas et al. 2006; Hideshima et al. 2009; Espinosa et al. 2010; Huang et al. 2012).

Die intensive Suche nach einem spezifischen, potenten und zugleich verträglichen Medikament zur effektiveren Behandlung der Notch1-exprimierenden T-ALL hält gegenwärtig an und ist wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

1.3.3 Notch1IC-transgene (NICA-) Ratten

An der Regulation von T-Zell-Entwicklung und -Linienentscheidung sind zahlreiche Signalwege beteiligt. Die unbestritten wichtige Rolle von Notch1 insbesondere in späteren Stadien der T-Zell-Entwicklung ist nach wie vor im Detail nicht aufgedeckt (Laky und Fowlkes 2008).

Zunächst ergaben unabhängige Knock-out- und Transgen-Experimente im Mausmodell widersprüchliche Interpretationen in Bezug auf die Funktion von Notch1 während der Entwicklung einzel-positiver T-Lymphozyten (Radtke et al. 2004; Robey und Bluestone 2004). So wurde von den unterschiedlichen Autoren angenommen, dass das Notch1-Signal entweder die Entwicklung von CD8-SP begünstige (Robey et al. 1996), oder die Reifung von einzel-positiven Thymozyten generell fördere (Deftos et al. 2000) oder aber auch generell hemme (Izon et al. 2001) oder, dass Notch1 überhaupt keinen Einfluss auf die CD4/CD8-Lininenentscheidung nehme (Wolfer et al. 2001). Robey und Kollegen (1996) hatten in ihrem Ansatz eine Notch1-transgene Maus generiert, die Notch1IC ohne PEST-Domäne unter der Kontrolle des Thymus-spezifischen proximalen Lck-Promotors exprimiert und eine auffällige Zunahme der CD8-SP im Thymus bei unveränderter Anzahl der CD4-SP aufweist. In der Notch1-transgenen Mauslinie von Deftos et al. (2000) wurde Notch1IC hingegen zusammen mit der PEST-Domäne überexprimiert. Hier beobachteten die Autoren eine Anreicherung beider einzel-positiven Zelllinien im Thymus. Dieses Ergebnis wurde im direkten Vergleich beider Mauslinien dem unmittelbaren Einfluss der sodann kurzfristigen Entstehung einer Leukämie zugeschrieben und zunächst eine präferierte CD8-SP-Entwicklung durch Notch1 postuliert (Fowlkes und Robey 2002; Robey und Bluestone 2004).

In einem ähnlichen Ansatz mit Knochenmarkvorläuferzellen, die retroviral eingebrachtes Notch1IC exprimieren, wurde eine schwere Entwicklungsstörung vom doppelt- zum einzel-positiven Stadium infolge eines kompromittierten TCR-Signals und des konsekutiven Ausbleibens der positiven Selektion beobachtet (Izon et al. 2001). Die konditionelle Inaktivierung von Notch1 nach dem prä-TCR-Kontrollpunkt (Wolfer et al. 2001) oder die Überexpression des Notch-Inhibitors Numb mit dadurch vermindertem Notch-Signal (French et al. 2002) zeigte hingegen keine Störung oder Veränderung der CD4/CD8-SP-Entwicklung und legt eine entbehrliche Rolle und/oder adäquate Substitution von Notch1 bei der positiven Selektion nahe (Radtke et al. 2004; Robey und Bluestone 2004).

Vor dem Hintergrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse der vorangegangenen Studien entwickelte unsere eigene Arbeitsgruppe eine Notch1IC-transgene Ratte (NICA), bei der etwa 30 Kopien des konstitutiv aktiven Notch1IC unter der Kontrolle des proximalen Lck-Promoters, folglich ab den späten doppelt-negativen Stadien der Thymozyten-entwicklung, exprimiert wird (van den Brandt et al. 2005). Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten wurde hierbei das identische Genkonstrukt wie von Robey et al. (1996) verwendet (Abb. 1-3).

Abb. 1-3 Schematische Darstellung des Notch1IC-Transgenkonstrukts. Die intrazelluläre Domäne von Notch1 wird unter der Kontrolle des proximalen lck-Promoters (plckP) exprimiert. Das Transgenkonstrukt besteht zudem aus einem FLAG-Epitop und einem menschlichen Wachstumshormon-Minigen (hGH).

Die Thymozyten der jungen NICA-Ratten zeigten eine anhaltende ektopische prä-TCR-Expression, die den Mechanismus der Selektion und die Entwicklung zum einzel-positiven Stadium erheblich behindert. Interessanterweise ist die Reifung zu CD4-SP Zellen durch das fehlregulierte TCR-Signal stärker beeinträchtigt als diejenige zu CD8-SP Zellen (van den Brandt et al. 2005). Spätere Studien, die auf einer Hemmung des Notch-Signals durch bedingte Deletion von Presenilin-Varianten im Sekretase-Multiproteinkomplex beruhen, untermauern die Annahme eines potenzierenden Einflusses von Notch1 auf die TCR-Expression in doppelt-positiven Thymozyten, jedoch ohne direkte Beteiligung von Notch1 an der CD4/CD8-Linienentscheidung (Laky und Fowlkes 2007).

Als wesentliche Voraussetzung für das experimentelle Vorgehen in dieser Arbeit entwickeln die NICA-Ratten mit hoher Inzidenz kurz nach dem Entwöhnen im Alter von etwa 4 Wochen große thymische Lymphome, die -ähnlich der humanen Variante- im Zuge einer leukämischen Phase lymphatische und nicht-lymphatische Organe infiltrieren und innerhalb weniger Wochen zum Tode der Tiere führen (van den Brandt et al. 2006). Eine vergleichbare Entstehung von T-ALL wurde in Notch1IC-transgenen Zebrafischen (Chen et al. 2007) sowie in einem Maus-Modell beobachtet, in dem HSCs aktiviertes Notch1IC retroviral exprimieren (Pear et al. 1996). Darüber hinaus entwickelten zwei unterschiedliche Stämme von thymus-spezifischen Notch1IC-transgenen Mäusen ebenfalls T-Zell-Lymphome, wenn hier auch mit auffallend variabler Latenz und Inzidenz (Fowlkes und Robey 2002).

Die Thymomzellen der NICA-Ratten sind monoklonalen Ursprungs, doppeltpositiv ($CD4^+CD8\alpha\alpha^+$) und haben die Rekombination der TCR-β-Kette abgeschlossen. Des Weiteren exprimieren sie nachhaltig prä-Tα beziehungsweise den prä-TCR, wie es zuvor von Bellavia et al. (2002) als essentielle Voraussetzung zur Lymphomentstehung in Notch3IC-transgenen Mäusen beschrieben worden ist, auch wenn dies in prä-Tα-transgenen Mäusen nicht zur malignen Transformation genügt (Lacorazza et al. 2001). Die Notch1IC-Lymphome der NICA-Ratten zeigen überdies einen bisher in Publikationen zu T-ALL in Säugetieren nicht dokumentierten Phänotyp. Im Detail exprimieren sie in hoher Dichte das

Oberflächenprotein CD30, ein anerkannter Marker für das Hodgkin- und anaplastische Riesenzell-Lymphom (Chiarle et al. 1999; Horie et al. 2002; al-Shamkhani 2004). Typische Charakteristika von T-ALL aus Maus oder Mensch wie konstitutives NF-κB-Signal (Rayet und Gélinas 1999; Kordes et al. 2000) oder eine Überexpression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 (Linette et al. 1995; Chao und Korsmeyer 1998) fehlen hingegen (van den Brandt et al. 2006). Bemerkenswerterweise führt das verstärkte Notch1-Signal in den NICA-Ratten zu einer Hochregulation der Notch3-Expression, welches seinerseits aufgrund seines häufigen Vorkommens in humanen T-ALL-Proben mit der Pathogenese von T-ALL in Verbindung gebracht wird (Bellavia et al. 2000; 2002).

Zur vereinfachten durchflusszytometrischen Detektion der Lymphomzellen und zur Aufklärung, ob eine Lymphomübertragung in neue Empfängertiere mit der Induktion neuen Tumorwachstums realisierbar sei, verpaarte unsere Arbeitsgruppe die NICA-Ratten mit syngenen eGFP-transgenen Ratten (van den Brandt et al. 2004a, 2006).

Zusammengefasst sind Lymphomzellen aus NICA-Ratten eine vielversprechende Quelle von Lymphomzellen mit fehlreguliertem Notch-Signal zur Untersuchung von Pathogenese, Phänotyp und alternativen Therapieansätzen der Notch1-induzierten T-ALL.

1.4 Glukokortikoide

Signale innerhalb eines Organismus werden häufig über lösliche Botenstoffe wie Hormone an zum Teil weit entfernte Erfolgsorgane übermittelt. Diese binden zur Signalübertragung an spezifische intra-oder extrazelluläre Rezeptoren der Zielzelle und nehmen Einfluss auf Stoffwechsel, Kreislauf und das Immunsystem. GCs spielen hierbei eine wichtige Rolle (Tuckermann et al. 2005). Sie gehören zur Gruppe der Steroidhormone und werden in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde aus Cholesterinderivaten gebildet. Ihre zirkadian rhythmisierte Sekretion unterliegt der positiven und negativen Rückkopplung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA) (Reichardt et al. 1998; Webster et al. 2002).

Aufgrund ihrer immunmodulatorischen beziehungsweise -suppressiven Wirkung auf zahlreiche Zellen, Gewebearten und Organe des Immunsystems sind GCs und ihre zahlreichen synthetischen Derivate die weltweit am häufigsten verordneten Medikamente insbesondere zur Behandlung von entzündlichen, autoimmunen oder hämato-onkologischen Erkrankungen (Frankfurt und Rosen 2004; Ploner et al. 2005; Buttgereit et al. 2005; Thiele et al. 2005). Ihre immunmodulatorischen Eigenschaften beruhen nicht zuletzt auf dem Potenzial, in T-Lymphozyten den Vorgang des programmierten Zelltodes, die Apoptose, zu initiieren (Wyllie 1980; Cohen et al. 1992; Tuckermann et al. 2005; Herold et al. 2006). Insbesondere von DP Thymozyten ist seit langem eine hohe Sensibilität gegenüber einer durch GCs ausgelösten Apoptose bekannt (Wyllie 1980). Dank ihrer Lipophilie können GCs -physiologisch als Cortisol im Menschen oder Corticosteron in Nagetieren- passiv durch Zellmembranen diffundieren und im Zytosol spezifisch an den GC-Rezeptor (GR)

binden (Beato et al. 1995), der im inaktiven Zustand in einem Multiproteinkomplex aus verschiedenen Hitzeschockproteinen vorliegt (Pratt et al. 1996; Reichardt 2004; Buttgereit et al. 2004; Munck 2005, Abb. 1-4).

Der GR gehört zur Superfamilie der Kernrezeptoren und ist an der Regulation zahlreicher physiologischer Prozesse wie dem Energiehaushalt, der adaptiven Immunität oder der T-Zell-Entwicklung beteiligt (Beato et al. 1995; Mangelsdorf et al. 1995; Winoto und Littman 2002; Reichardt 2004; Herold et al. 2006; van Brandt et al. 2007; Rose et al. 2010). Nach Bindung des GCs und der anschließenden Dissoziation von seinen Stabilisatorproteinen kann der aktivierte GR homodimerisieren, in den Zellkern wandern und dort als Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor mit spezifischen DNA-Bindungsstellen interagieren. Diese palindromischen Sequenzen bezeichnet man als *glucocortidoid responsive elements* (GRE). Infolge der Bindung des GR an die GRE wird die Expression bestimmter Zielgene zumeist positiv beeinflußt, weshalb man auch von Transaktivierung spricht (Tsai et al. 1988; Luisi et al. 1991; Reichardt et al. 1998; Jenkins et al. 2001; Zhou und Cidlowski 2005).

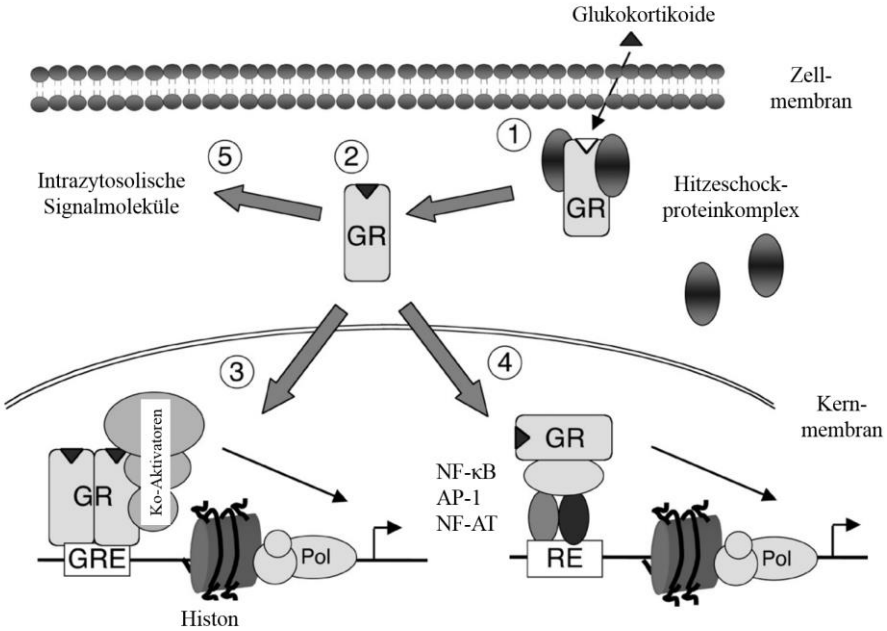

Abb. 1-4 Molekulare Wirkungsweise des GR. Nach passiver Diffusion der GC in die Zelle und Bindung an den GR (1) dissoziiert dieser von seinen Stabilisatorproteinen (2), wandert in den Zellkern und aktiviert dort die Genexpression entweder als ligandgebundenes Dimer zusammen mit Koaktivatoren an den GRE (3) der DNA oder als Monomer über eine Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren (4). Alternativ werden über intrazytosolische Signalmoleküle nicht-genomische Effekte vermittelt (5). Modifiziert nach Herold et al. 2006. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags (Cellular and Molecular Life Sciences ©2006).

Über einen alternativen, indirekt genomischen Mechanismus, die sogenannte Transrepression, ist der monomere GC/GR-Komplex durch vornehmlich inhibierende Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel NF-κB (Heck et al. 1997), AP-1 (Activator protein 1) (Heck et al. 1994) oder NF-AT (*Nuclear factor of activated T cells*) (Vacca et al. 1992) imstande, die Bildung immunregulatorischer und inflammatorischer Zytokine zu modulieren (Ray und Prefontaine 1994; Almawi et al. 1996; Tissing et al. 2003; Buttgereit

et al. 2004; Tuckermann et al. 2005). Über beide Signalwege kann die Zytokinproduktion gehemmt (Arya et al. 1984), die Expression verschiedener Onkogene (wie c-Myc) reguliert (Forsthoefel und Thompson 1987; Schuchard et al. 1993) sowie Zellzyklus-Arrest (Harmon et al. 1979) und Apoptose (Herold et al. 2006) induziert werden.

Weiterhin werden auch nicht-genomische und dadurch vergleichsweise schnell ablaufende Wirkungen von GCs postuliert (Chen und Qiu 1999; Lösel und Wehling 2003), die durch Bindung der Steroidhormone an einen vermuteten membranständigen GR, zum Beispiel auf humanen Leukozyten (Gametchu et al. 1993; Buttgereit und Scheffold 2002; Bartholome et al. 2004), oder durch Interaktion des Ligand-gebundenen GR mit dem TCR oder anderen Signalkaskaden im Zytosol vermittelt werden (Limbourg et al. 2002; Löwenberg et al. 2005; Song und Buttgereit 2006; Löwenberg et al. 2007; Boldizsar et al. 2010; Thomas 2012; Muller et al. 2013).

Aufgrund ihres seit langem bekannten Potentials, in T-Lymphozyten und hier in verstärktem Maße in reifenden DP Thymozyten (Wyllie 1980; Screpanti et al. 1989; Cohen 1992; van den Brandt et al. 2004b) effektiv Apoptose zu induzieren (Herold et al. 2006), stellen GCs und ihre synthetischen Derivate einen obligaten Grundpfeiler in der Behandlung von hämatologischen Neoplasien wie der T-ALL dar (Kaspers et al. 1994; Tissing et al. 2003; Frankfurt und Rosen 2004; Ploner et al. 2005; Inaba und Pui 2010; Ahmad und Kumar 2011), obgleich nicht alle Mechanismen des GC-induzierten Zelltodes (GICD, *GC-induced cell death*) vollständig aufgeklärt sind (Vacchio und Ashwell 2000; Brewer et al. 2002; Distelhorst 2002; Buttgereit und Scheffold 2002; Schmidt et al. 2004; Löwenberg et al. 2007; Muller et al. 2013).

Man geht davon aus, dass zur Auslösung der Apoptose durch GCs die Anwesenheit des GR sowie die de novo-Expression bestimmter Gene erforderlich sind (Reichardt 2004). Aufgrund der ubiqitären Expression des GR auch in nicht-hämatopoietischen Zellarten weisen endogene und insbesondere therapeutische GCs allerdings oft beträchtliche und unvermeidbare Nebenwirkungen auf, die je nach Derivat, Applikation, Dosierung, Wirkungsdauer und Kombination mit anderen Medikamenten variieren und einen beschränkenden Faktor der Therapie darstellen (Song et al. 2005; Kleiman und Tuckermann 2007; McDonough et al. 2008). Es wird vermutet, dass ein Großteil der Nebenwirkungen maßgeblich über den transaktivierenden Mechanismus des GR vermittelt wird (Reichardt und Schütz 1998; Kellendonk et al. 1999; Reichardt et al. 2000). Der kurzfristige GC-Einsatz wie bei der Puls- oder Stoßtherapie führt zu keiner wesentlichen Beeinflussung der HPA-Achse (Leussink et al. 2001) und die hierbei auftretenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen -vorwiegend psychische und gastrointestinale Störungen sowie Ceph- und Myalgien- sind unter supportiver Therapie in der Regel rasch reversibel (Pozzilli et al. 2004).

Im Gegensatz dazu kann eine länger anhaltende oder kontinuierliche und insbesondere systemische Behandlung mit hochdosierten GCs schwerwiegende Nebenwirkungen hervorrufen, die mitunter zur Entwicklung einer GC-induzierten Insulinresistenz beziehungsweise eines sekundären Diabetes mellitus, einer frakturgefährdeten Osteoporose

oder einer Steatosis hepatis führen können (Miller und Neilson 1964; Cole et al. 1982; Pagano et al. 1983; Schäcke et al. 2002, 2004; Trence 2003; Pozzilli et al. 2004).

Darüberhinaus kann es neben Myopathien, cushoider Stammfettsucht, kognitiven oder kardiovaskulären Beeinträchtigungen, Hautatrophie und Linsen- oder Glaskörpertrübung (Steroidkatarakt, -glaukom) insbesondere zu schweren Infektionen kommen (Schäcke et al. 2002, 2004; Stahn et al. 2007). Ein weiteres Hauptproblem in der steroidalen Behandlung entzündlicher oder hämatoonkologischer Erkrankungen stellt die Entwicklung einer GC-Resistenz mit anschließendem Versagen der GC-Therapie dar (siehe Kapitel 1.4.3, Adcock und Lane 2003; Wikström 2003; Pui und Evans 2006).

In Anbetracht des vielfältigen Spektrums an zum Teil schwerwiegenden Nebenwirkungen und der vergleichsweise häufigen Entwicklung einer therapiekompromittierenden GC-Resistenz in der kurativen Behandlung akut lebensbedrohlicher Erkrankungen wie der T-ALL bedarf es trotz intensiver Forschungsbemühungen der letzten Jahre auf diesem Gebiet zwingend einer weiteren Entwicklung effizienterer GC-Analoga oder selektiverer GR-Liganden beziehungsweise -Modulatoren, zumal bis dato alternativ erprobte Substanzgruppen der Effizienz der GCs deutlich unterlegen waren und sich für den klinischen Einsatz als ungeeignet erwiesen haben (Schäcke et al. 2007; Inaba und Pui 2010; Schweingruber et al. 2012).

1.4.1 Glukokortikoide in der T-ALL-Therapie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die synthetischen GCs Dexamethason (Dex) und in PEGylierte Liposomen verpacktes Prednisolon verwendet, die sich beide von dem natürlich vorkommendem Kortisol (Hydrocortison) ableiten und dank einer stärkeren Bindung an den GR sowie verlängerter biologischer Halbwertszeiten ein verbessertes Wirkungs- und Nebenwirkungs-Profil bezüglich der anti-inflammatorischen und anti-neoplastischen Therapie aufweisen (Meikle und Tyler 1977; Rose und Saccar 1978; Ponec et al. 1986).

Als nicht-halogeniertes Kortisolanalogon besitzt Prednisolon eine vierfach höhere glukokortikoide Potenz bei verringerter mineralokortikoider Nebenwirkung (Stahn et al. 2007). Dex ist ein Isomer des fluoridierten Betamethason und zeichnet sich durch eine nahezu fehlende mineralokortikoide Wirkung bei etwa 30-fach stärkerer Immunsuppression im Vergleich zu körpereigenem Kortisol aus (Cantrill et al. 1975; Rose und Saccar 1978). Als Phosphat ist Dex zudem wasserlöslich und somit zur intravenösen Applikation geeignet.

Die klinische Potenz der verschiedenen synthetischen GC-Analoga ist durch ihre Bioverfügbarkeit und erreichte Konzentration im Zielgewebe sowie durch ihre Affinität zum GR, ihre Wirkdauer und Metabolisierung beziehungsweise Ausscheidungskinetik bedingt (Schäcke et al. 2002). Obgleich Studien zur Bioäquivalenz von Dex und Prednisolon diskordante Ergebnisse erbrachten, wird Dex eine etwa fünf- bis zehnfach stärke anti-inflammatorische Wirkung im Vergleich zu Prednisolon zugeschrieben (Cantrill et al. 1975; Ballard et al. 1975; Rose und Saccar 1978; Inaba und Pui 2010).

Während bis zu 90 % des im Blutstrom zirkulierenden endogenen Kortisols mit hoher Affinität an das Plasmaprotein Transkortin (engl. *corticosteroid-binding globulin*, CBG) gebunden ist, werden synthetische GCs mit Ausnahme von Prednisolon zumeist an Albumin gebunden transportiert (Reichardt 2004). Nur der kleine Anteil an ungebundenem freiem GC kann seine biologische Aktivität auf Zielzellen entfalten, wohingegen an Proteine gebundene Steroide dem metabolischen Abbau entgehen (Schäcke et al. 2002).

Aufgrund ihrer pro-apoptotischen Wirkung auf lymphoide Zellen sind GCs seit Anbeginn der medikamentösen Behandlung der T-ALL ein essentielles Therapieelement (Pearson und Eliel 1950; Pui und Evans 2006; Inaba und Pui 2010). Ihre Bedeutung wird durch die enge Assoziation zwischen Ansprechen der Lymphomzellen auf die GC-Therapie und der Prognose der kindlichen ALL deutlich (Real und Ferrando 2009; Jiang et al. 2011), auch wenn trotz ihrer Behandlungseffizienz der alleinige Einsatz von GCs keine Heilung von einer ALL bewirken kann (Kaspers et al. 1994).

Nach ursprünglich vorwiegender Verwendung von Prednisolon in der ALL-Behandlung wird in den letzten Jahren und hier insbesondere in der Induktions- und Konsolidierungsphase der T-ALL zunehmend Dex eingesetzt, da seine stärkere Penetration des zentralen Nervensystems und seine längere Halbwertszeit zu einer geringeren Rate an meist zentralnervösen Rezidiven und zu einem verbessertem Ansprechen in den durchgeführten Vergleichsstudien geführt haben (Balis et al. 1987; Bostrom et al. 2003; Mitchell et al. 2005; Pui und Howard 2008; Inaba und Pui 2010). *In vitro* wurde zudem eine höhere Zytotoxizität von Dex gegenüber humanen ALL-Zellen im Vergleich zu Prednisolon nachgewiesen (Ito et al. 1996; Manabe et al. 1992), obgleich die genauen Hintergründe hierfür unbekannt sind (Inaba und Pui 2010). Ob dies darauf beruht, dass in ALL-Zellen ein hochspezifischer GR existiert, der Dex mit größerer Affinität, Spezifität und Stabilität als Prednisolon bindet, ist äußerst zweifelhaft (Lippman et al. 1973; Iacobelli et al. 1981; Ichii et al. 1984). Andererseits ist bekannt, dass im Vergleich zu Prednisolon eine Therapie mit Dex grundsätzlich mit einer höheren Toxizitäts- und Nebenwirkungsrate assoziiert ist (Bostrom et al. 2003; Belgaumi et al. 2003; Inaba und Pui 2010).

Weitere Untersuchungen zum exakten Mechanismus der Zytotoxizitäten dieser beiden GCs sind nötig, um in naher Zukunft Wahl und Verabreichungszeitpunkt des potentiell wirksameren GCs nach individuellen Patienteneigenschaften zu treffen (Inaba und Pui 2010). Darüber hinaus besteht die realistische Hoffnung, durch den optimierten Einsatz einer Dex-basierten Polychemotherapie die bislang obligate Durchführung einer nebenwirkungsreichen prophylaktischen Schädelbestrahlung in der T-ALL-Therapie ohne Kompromittierung des onkologischen Ausgangs vermeiden zu können (Pui und Howard 2008; Veerman et al. 2009; Pui et al. 2009; Kox et al. 2010).

1.4.2 In PEGylierte Liposomen verpacktes Prednisolon

Angesichts der Ambivalenz zwischen der herausragenden therapeutischen Potenz der GCs auf der einen Seite und der ausgeprägten unerwünschten Nebenwirkungen ihres hochfrequenten oder -dosierten Einsatzes auf der anderen Seite, folgte als logische Konsequenz eine intensivierte Suche in den letzten Jahrzehnten nach effizienteren Substanzen mit erhaltener Wirksamkeit klassischer GCs bei zugleich verträglicherem Nebenwirkungsprofil (Schäcke et al. 2007; Stahn et al. 2007). Bis heute sind eine Fülle an chemischen Derivaten mit unterschiedlichen Eigenschaften bezüglich Wirkung und Nebenwirkung erforscht worden, von denen allerdings nur wenige klinische Relevanz erlangen konnten. Neben der innovativen Entwicklung selektiver GR-Liganden (Lin et al. 2002; Schäcke et al. 2007) sowie chemischer Modifikationen mit Ligation von Stickstoff-Monoxid (Perretti et al. 2003; Hyun et al. 2004; Doggrell 2005) stellen im Besonderen liposomale „Verpackungen" von GCs einen vielversprechenden Ansatz zur Steigerung ihrer Therapieeffizienz dar (Woodle et al. 1994).

Liposomen sind etwa 100 nm durchmessende Vesikel, deren hydrophiler Kern von einer zelltypischen Lipiddoppelschicht ummantelt ist und wasserlösliche Substanzen aufnehmen sowie geschützt *in vivo* transportieren kann (Drummond et al. 1999; Stahn et al. 2007; Song et al. 2012; Abb. 1-5). Vornehmlich bei hohem Cholesterinanteil in der Lipiddoppelschicht kann eine verlängerte Halbwertszeit in der Zirkulation beziehungsweise ein langsamerer Abbau im Blut sowie eine insgesamt verbesserte Pharmakokinetik des verpackten Arzneimittels realisiert werden (Love et al. 1990; Allen und Hansen 1991; Immordino et al. 2006; Drummond et al. 2008).

Nach ihrer elektronenmikroskopischen Entdeckung im Jahr 1964 (Bangham und Horne 1964) erzielten Liposomen erste therapeutische Erfolge in den 1970ern in der Behandlung von genetisch bedingten Enzymdefekten (Gregoriadis und Ryman 1971; Gregoriadis et al. 1971; Jain et al. 2007), Schwermetallvergiftungen (Rahman et al. 1974) und metastasierenden Krebserkrankungen (Gregoriadis et al. 1974). Die frühen Generationen von Liposomen wurden *in vivo* allerdings aufgrund ihrer Antigenizität rasch vom Retikuloendothelialen System (RES) in Leber und Milz phagozytiert (Patel 1992).

Infolge dessen wurden in der weiteren Entwicklung hydrophile Polyethylenglykol (PEG)-Anker an die Oberfläche der Liposomen assoziiert (Woodle und Lasic 1992; Oku und Namba 1994), die durch eine sterische Barriere die Bindung von Plasmaproteinen wie beispielsweise Komplementkomponenten und damit die Opsonierung verhindern (sog. „stealth"[dtsch. getarnte] Liposomen) (Immordino et al. 2006). Hierdurch werden Plasma-Halbwertszeiten von bis zu 50 Stunden ermöglicht (Allen und Hansen 1991; Lasic et al. 1991; Papahadjopoulos et al. 1991; Woodle et al. 1994; Teshima et al. 2006; Yang et al. 2007b; Maitani et al. 2012). Ihre Ähnlichkeit mit physiologischen Zellmembranen reduziert zugleich die Immunogenizität der PEGylierten Liposomen im Organismus (Cattel et al. 2004).

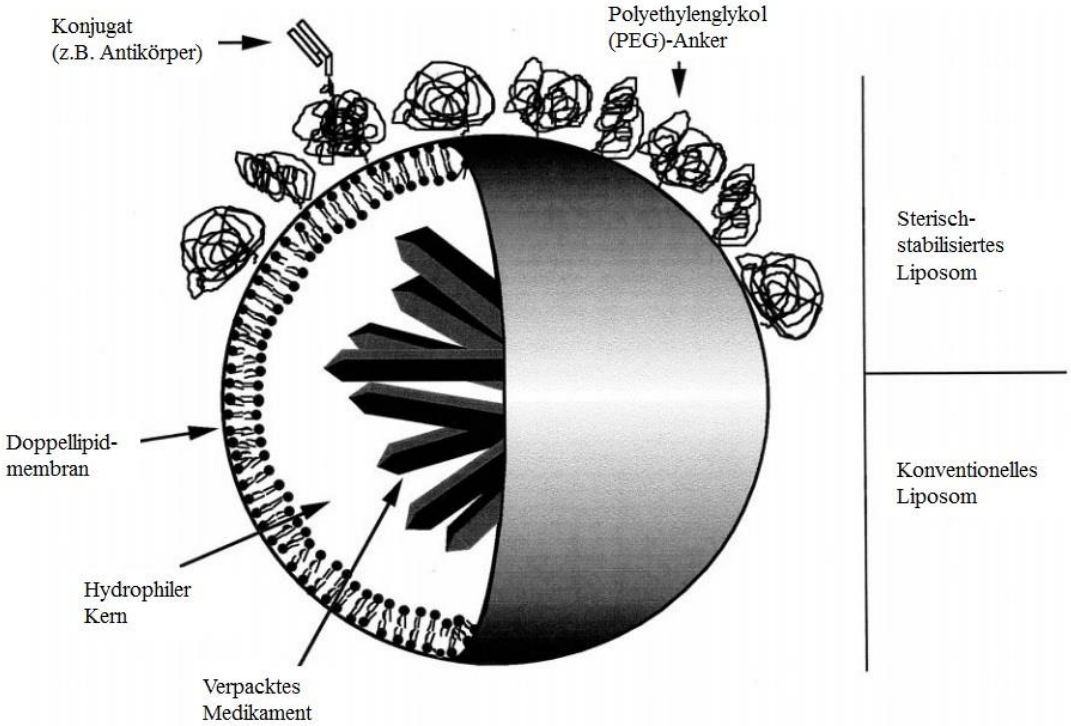

Abb. 1-5 Schematische Darstellung eines Liposoms. Das Liposom besteht aus einer Lipiddoppelschicht, die einen hydrophilen Kern umschließt, in dem Medikamente aufgenommen und transportiert werden können. In der oberen Hälfte ist ein sterisch-stabilisertes Liposomen mit Verankerungen von Polyethylenglykolresten (PEG-Anker) an der Doppellipidmembran gezeigt, in der unteren Hälfte das konventionelle Pendant. Weitere Modifikationen an der Oberfläche des Liposomens durch kovalente Bindung ausgewählter Liganden wie zum Beispiel spezifischen Antikörpern ermöglichen die gezielte Endozytose des Liposoms durch die Rezeptor-exprimierende Zielzelle. Modifiziert nach Drummond et al. 1999. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics (Pharmacological Reviews ©1999).

Als Ausdruck der Überlegenheit gegenüber konventionellen Applikationsformen korreliert die längere Halbwertszeit der Liposomen im Blut mit einer gesteigerten therapeutischen Effizienz und im speziellen Fall von verpackten GCs zusätzlich mit ihrer hochkonzentrierten Akkumulation sowohl in fokalen Entzündungsherden (Metselaar et al. 2004; Chono et al. 2005; Stahn et al. 2007; Avnir et al. 2008) als bemerkenswerterweise auch in soliden Malignomen (Newman et al. 1999; Harrington et al. 2001; Schiffelers et al. 2005; Zalipsky et al. 2007; Zamboni et al. 2007; Drummond et al. 2008; Kluza et al. 2011; Bae und Park 2011). Hier wird für den nachgewiesenen anti-neoplastischen Effekt verpackter GCs in erster Linie die Hemmung der tumorbedingten Angiogenese und der tumorassoziierten Makrophagen (TAM) verantwortlich gemacht (Pucci et al. 1988; van Rooijen und Sanders 1994; Oussoren und Storm 1999; Buttgereit und Scheffold 2002; Pollard 2004; Buttgereit et al. 2004; Banciu et al. 2008; Ozbakir et al. 2014).

Darüberhinaus wird angenommen, dass eine gestörte vaskulär-endotheliale Schrankenfunktion der Kapillaren im entzündeten oder neoplastischen Zielgewebe eine Art „drug-targeting“ der hierdurch niedriger dosierbaren Liposomen ermöglicht (Matsumura und Maeda 1986; Huang et al. 1992; 1993; Yuan et al. 1994; Nagayasu et al. 1999; Maeda et al. 2000; Moghimi et al. 2001; Peer et al. 2007; Fang et al. 2011). So erwiesen sich liposomale GCs als überaus wirksam

in der Behandung der rheumatoiden Arthritis (Metselaar et al. 2003; Ulmansky et al. 2012; Kapoor et al. 2014) und der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem weit verbreiteten Tiermodell für Multiple Sklerose (Schmidt et al. 2003; Linker et al. 2008; Schweingruber et al. 2011).

Als eine der ersten Nachweise der gesteigerten *in-vivo*-Aktivität liposomal verpackter Krebsmedikamente gelang es im Bereich der onkologisch orientierten Forschung, eine signifikante Verlängerung des Überlebens von Mäusen mit akuter Leukämie zu erzielen, die mit dem liposomal verpackten Zytostatikum Cytosin-Arabinosid behandelt wurden (Kobayashi et al. 1975; Mayhew et al. 1976). Dies hatte eine Phase intensiver Forschung zur Behandlung von Krebspatienten vor allem mit liposomalen Amphotericin B (Lopez-Berestein et al. 1985) und Doxorubicin (Gabizon et al. 1989) zur Folge und führte zu den ersten klinischen Studien mit liposomalen Medikamenten (Allen und Cullis 2013).

Vor einer wegweisenden humanen Studie zu liposomalen Doxorubicin (Gabizon et al. 1994) konnte für liposomales Vincristin in zwei unterschiedlichen Tiermodellen mit ALL bereits eine deutliche Steigerung der Therapieeffizienz im Vergleich mit freiem Vincristin gezeigt werden (Mayer et al. 1990, 1993; Boman et al. 1994). Heute haben in der klinischen Krebstherapie langzirkulierende Liposomen mit Doxorubicin, Vincristin und Paclitaxel bereits einen wesentlichen Stellenwert in verschiedenen, überwiegend Zweit- oder Drittlinien-Therapieregimes maligner meist hämatopoietischer Neoplasien inne (Visani et al. 2005; Pulini et al. 2007; Rodriguez et al. 2009; Zhang et al. 2009; Fan et al. 2011; Barenholz 2012; Allen und Cullis 2013; Pathak et al. 2014). Zahlreiche weitere liposomal verpackte Substanzen, wie unter anderem Daunorubicin, Irinotecan und Oxaliplatin, waren oder sind Gegenstand vielversprechender experimenteller und klinischer Therapiestudien (Schiffelers et al. 2005; O'Brien 2008; Perche und Torchilin 2013).

Neueste Hoffnung wird auf hochspezifische Konjugate wie Antikörper oder Peptide gesetzt, die an Liposomen assoziiert noch selektiver zu einer Akkumulation im Zielgewebe beitragen, indem sie sich gezielt oder auch pH-abhängig an molekulare Marker von Tumorzellen oder benachbarten Endothelzellen des Tumormikromilieus binden (Stuart et al. 2000; Moreira et al. 2001; Allen et al. 2005; Yang et al. 2007a; Laginha et al. 2008; ElBayoumi und Torchilin 2009; Chuang et al. 2010; Kamaly et al. 2012). So konnten zum Beispiel Tuscano et al. (2010) in einem Mausmodell zur Behandlung des B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphoms zeigen, dass die Konjugation von PEGylierten Doxorubicin-Liposomen an einen Antikörper gegen das lymphozytenspezifische CD22-Protein auf den Lymphomzellen zu einer gesteigerten Akkumulation von Doxorubicin im Lymphomgewebe und zu einem verlängerten Überleben im Vergleich zum Einsatz unkonjugierter Doxorubicin-Liposomen führen kann. Die klinische Wirksamkeit dieses Ansatzes der sogenannten Immunoliposomen hängt allerdings im besonderen Maße von der Wahl des Konjugates und seiner Immunogenizität sowie Zielspezifität ab (Allen 2002), was die nötige Erforschung neuer spezifischer Oberflächenmarker der malignen Zielzelle sowie optimierter anti-neoplastischer Arzneimittel für eine effektive Therapie bekräftigt (Fonseca et al. 2005; Kirpotin et al. 2006; Perche und Torchilin 2013).

Liposomale GCs sind bisher fast ausschließlich in der Behandlung autoimmuner Erkrankungen und solider Tumoren in meist präklinischen Tiermodellen getestet worden (Metselaar et al. 2003; Schiffelers et al. 2005; Asgeirsdóttir et al. 2008; Rauchhaus et al. 2009; Hegeman et al. 2011; Bartneck et al. 2014). Mao et al. konnten 2013 allerdings *in vitro* nachweisen, dass die liposomale Verpackung von Dex sowie eine anschließende Konjugation an den spezifisch gegen das CD74-Epitop auf B-Zellen gerichteten Antikörper Milatuzumab zu einer gesteigerten Zielzellspezifität und zu verbesserten Effekten auf eine CD74-exprimierende B-CLL führt. Die Autoren konstatierten unter anderem, dass die direkte Erreichbarkeit einer Vielzahl der hämatologischen Malignomzellen im Blutstrom durch das zielgerichtete Immunoliposom einen Behandlungsvorteil gegenüber soliden Tumoren nahelege (Mao et al. 2013).

Erkenntnisse zur Wirksamkeit von liposomalen GCs in der Therapie hämatologischer Neoplasien der T-Zellreihe -ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit- sind allerdings bisher nicht gewonnen beziehungsweise nicht publiziert worden.

1.4.3 GC-Resistenz in Lymphoblasten

Die *In-vitro*- oder *In-vivo*-Resistenz von leukämischen Lymphoblasten gegenüber GCs ist kurz- wie langfristig ein bedeutender negativer Prognosefaktor der Erkrankung (Klumper et al. 1995; Kaspers et al. 1998; den Boer et al. 2003; Dördelmann et al. 1999). Zahlreiche mögliche Mechanismen der Resistenzentstehung und weitestgehend auch die molekulare Wirkungsweise der GC-Behandlung sind in diesem Zusammenhang bereits untersucht wurden (Reichardt et al. 1998; Schaaf und Cidlowski 2002; Abrams et al. 2004; Pui und Evans 2006; Hulleman et al. 2009; Shah und Kumar 2013).

Insbesondere vorbestehende oder erworbene Modifikationen von Konfiguration, Aktivierung und Zellkerneintritt des GR einerseits sowie von seiner transkriptionellen Aktivierung und Repression andererseits werden als primäre Ursachen für eine ausbleibende GC-Wirkung in der resistenten Zielzelle vermutet. Obgleich die genauen Abläufe der individuell variierenden Resistenzentwicklung bis heute nicht vollends aufgeklärt sind, ist prinzipiell bekannt, dass die Ausbildung eines funktionierenden GR in ausreichender Quantität eine obligate (Greenstein et al. 2002; Reichardt 2004; Zilberman et al. 2004; Schwartz et al. 2010), wenn auch allein wohl ungenügende Komponente zur GC-induzierten Lymphozytolyse darstellt (Thompson und Johnson 2003; Thompson 2008). Demnach ist eine Herunterregulierung oder eine ausbleibende Autoinduktion der GR-Expression in hämatologischen Malignomen oft mit einer GC-Resistenz assoziiert (Gomi et al. 1990; Moalli et al. 1992; Renner et al. 2003; Ploner et al. 2005).

Zahlreiche Studien zum Mechanismus der Resistenz konnten ferner zeigen, dass überdies eine effektive Expressionssteigerung von GR-Zielgenen unter dem Einfluss der GC-Therapie essentiell für eine Induktion der Apoptose in humanen Leukämiezellen ist

(Leventhal 1981; Levine et al. 1985; Eisen et al. 1988; Pedersen und Vedeckis 2003; Pedersen et al. 2004; Schwartz et al. 2012).

Gleichfalls wurde der Entwicklung einer GC-Resistenz in initial überaus sensitiven Lymphoblasten, die wiederholt mit GCs konfrontiert wurden, eine nachgewiesene Herunterregulierung des GR zugeschrieben (Burnstein et al. 1990, 1994; Schaaf und Cidlowski 2002; Zilberman et al. 2004). Trotz der engen Korrelation zwischen Ansprechen der GC-Therapie und dem Expressionsniveau des GR in unterschiedlichen Varianten der kindlichen ALL, der CLL und maligner Lymphome (Ramdas et al. 1999; Hillmann et al. 2000; Gruber et al. 2009), findet sich allerdings in den meisten GC-resistenten ALL-Biopsaten eine ausreichende Menge an funktionellem GR (Gaynon und Carrel 1999; Smets et al. 1999; Frankfurt und Rosen 2004; Bachmann et al. 2010). In der Mehrzahl der primären ALL-Zellen liegt sogar eine Phänotyp- oder Sensitivitäts-unabhängige Hochregulierung der GR-Expression unter GC-Therapie vor, was eine Dominanz differentieller Faktoren der Resistenzentstehung nahelegt (Haarman et al. 2004; Tissing et al. 2006; Bachmann et al. 2007; Thompson 2008).

Neben der veränderten GR-Expression werden des Weiteren Modifikationen der GR-Signaltransduktion und -Zielgenexpression sowie seiner interagierenden Transkriptionsfaktoren für eine Resistenzentwicklung verantwortlich gemacht (Ploner et al. 2009; Bhadri et al. 2012; Sionov 2013). Etwa die Hälfte der bislang identifizierten Zielgene des GR ist funktionell mit den drei elementaren Signalwegen für Zellproliferation, Glukose-Metabolismus und NF-κB verbunden, deren vermuteter Beitrag zur GC-Resistenzentstehung hier nicht weiter ausgeführt werden soll (Holleman et al. 2004; Tissing et al. 2006, 2007; Hulleman et al. 2009). GC-resistente ALL-Zellen weisen zudem eine Veränderung der Genexpression des Proteasom-Signalweges auf (Ploner et al. 2009; Sanda et al. 2010).

Im Vergleich mit den anderen hämatologischen Malignomen wie zum Beispiel der B-Zellreihe stellt sowohl die therapienaive als insbesondere auch die rezidivierte ALL der T-Zellreihe nach langdauernder GC-basierender Behandlung eine vergleichsweise therapieresistente Entität dar (Hongo und Fujii 1991; Klumper et al. 1995; Pieters et al. 1998).

Indes haben zahlreiche Studien zeigen können, dass T-ALL-Lymphoblasten mit Gain-of-function-Mutationen von Notch1 (und/oder FBXW7) signifikant besser auf eine GC-Therapie ansprechen als eine T-ALL ohne solche Mutationen und dass damit simultan im direkten Vergleich eine deutlich bessere Prognose vergesellschaftet ist (Breit et al. 2006; Asnafi et al. 2009; Pui 2009). Interessanterweise verhindert aktiviertes Notch1 allerdings die GC-induzierte Apoptose durch Aktivierung von anti-apoptotischen Proteinen (wie zum Beispiel NF-κB (Bellavia et al. 2000; Shin et al. 2006), p56Lck (Sade et al. 2004) und GIMAP5 (GTPase of the immunity-associated protein family 5 (Chadwick et al. 2009, 2010)) sowie durch eine Transaktivierung seiner Zielgene Deltex, c-Myc und Hes-1 (Medh et al. 2001; Real et al. 2008). Für c-Myc ist beispielsweise bekannt, dass einerseits seine Transkription im Zuge der GC-induzierten Apoptose durch GCs schnell und selektiv gehemmt wird (Yuh und Thompson 1989; Medh et al. 1998; Thompson et al. 1995) und andererseits seine anhaltende

Expression, die unter anderem durch ein aberrantes Notch1-Signal induziert wird (Palomero et al. 2006b; Sharma et al. 2006; Weng et al. 2006), eine GC-abhängige Apoptose modulieren (Ausserlechner et al. 2004) oder partiell sogar verhindern kann (Medh et al. 2001; Thompson 2008).

Kürzlich wurde zudem berichtet, dass die Sensitivität von T-ALL-Zellen gegenüber GCs eng mit der GR-vermittelten Hemmung der Notch1-Expression assoziiert ist (Cialfi et al. 2013). Zuvor hatten Real et al. (2008) *in vitro* und in einem Mausmodell anhand GC-resistenter T-ALL-Zellen bereits gezeigt, dass die Hemmung des Notch1-Signals durch die Verwendung eines γ-Sekretase-Hemmers (GSI) zu einer Hochregulierung der GR-Expression und zur therapieeffektiven Revision der GC-Resistenz in zuvor GC-resistenten T-ALL-Zellen führt (Real und Ferrando 2009). Bei einer vorliegenden Resistenz gegenüber konventionellen Chemotherapeutika wie Vincristine, Daunorubicin oder L-Asparaginase in humanen T-ALL-Zellen war dieser sensibilisierende Effekt durch den Einsatz eines potenten GSI *in vitro* allerdings nur partiell reproduzierbar (Liu et al. 2009b). Das bereits genannte gute Ansprechen von T-ALL-Zellen mit aktivierenden Notch1-Mutationen auf eine steroidale Therapie zeigt ferner, dass das Notch1-Signal alleine wohl unzureichend zur Ausbildung einer therapie-limitierenden GC-Resistenz zu sein scheint (Pui 2009) oder die hochdosierte Behandlung mit GCs die Notch1-vermittelte Resistenz zu überwinden vermag (Spokoini et al. 2010; Inaba und Pui 2010; Sionov 2013). Elementare Zusammenhänge in diesem Kontext sind noch weitestgehend ungeklärt und hinsichtlich der bedeutsamen klinischen Relevanz Gegenstand intensiver aktueller Forschungsbemühungen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das langfristige Ansprechen der Notch1-induzierten T-ALL-Zellen aus NICA-Ratten auf eine hochdosierte GC-Therapie erfasst und die molekulare Genese einer sich potentiell entwickelnden GC-Resistenz genauer untersucht werden.

1.5 Bortezomib

In eukaryotischen Zellen werden die meisten Proteine letztlich selektiv und ATP-abhängig durch den 26S-Proteasomkomplex abgebaut. Er bildet das Zentrum des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS), das durch die proteolytische und extralysosomale Degradation von Makromolekülen verschiedenste Signalwege und nicht zuletzt die Zellhomöostase zu regulieren vermag (Ciechanover und Schwartz 1998; Bhaumik und Malik 2008; Frankland-Searby und Bhaumik 2012).

Eine Störung dieser Abläufe, wie zum Beispiel der Steuerung von Zellzyklus und Apoptose, kann zur Entstehung neoplastischer Zellen führen, weshalb das Proteasom in den Fokus neuer Therapieansätze für zahlreiche Krebsarten gerückt ist, zumal in entarteten Zellen oft eine fehlregulierte Aktivität oder erhöhte Konzentration dieses Multienzymkomplexes gefunden wird (Kumatori et al. 1990; Naujokat und Hoffmann 2002; Dahlmann 2007).

Vollständige aktive Proteasomen finden sich sowohl im zytosolischen als auch im nukleären Zellkompartiment (Peters et al. 1994), besitzen meist einen Sedimentationskoeffizienten von 26S (Chitra et al. 2012) und bestehen aus einem hochkonservierten zylindrischen 20S-Kernkomplex, dessen Enden von ein oder zwei regulierenden 19S-Komponenten flankiert werden (Abb. 1-6), die das proteolytisch aktive Zentrum verschließen und zur Erkennung und Entfaltung der durch Poly-Ubiquitinierung markierten Substrate dienen (Hershko und Ciechanover 1992; Adams 2003; Tomko und Hochstrasser 2011).

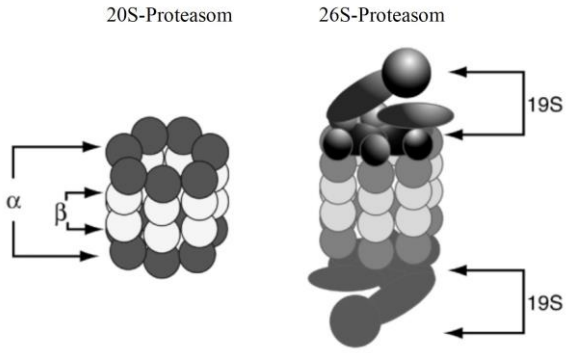

Abb. 1-6 Schema des 26S-Proteasoms. Das 26S-Proteasom ist ein Multiproteinkomplex, dessen proteolytisch aktiver 20S-Kernkomplex von 19S-Regulatorkomponenten eingefasst ist, die die markierten Proteine erkennen und in das aktive Zentrum des Proteasoms dirigieren (Adams 2004a). Der Abdruck erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags (Cancer Cell ©2004).

Im Zuge der Prozessierung werden die isopeptidisch verknüpften Ubiquitinmoleküle direkt zurück ins Zytosol entlassen, während die Zielproteine im Kernkomplex proteolytisch zu kleinen Polypeptiden zerlegt werden (Nussbaum et al. 1998). Neben fehlerhaften Proteinen aus dem Zytosol oder dem Endoplasmatischem Retikulum zählen zu den Substraten des UPS ebenso Tumorsuppressorproteine (Inoue et al. 2001), Zellzyklusproteine (Carrano et al. 1999; Pagano et al. 1995) sowie Transkriptionsfaktoren wie Nf-κB (Flinn et al. 1998; Salghetti et al. 1999; Palombella et al. 1994; Orian et al. 2000) und deren Inhibitoren (Dai et al. 1998; Karin et al. 2002). Entsprechend konnten mehrere Forschungsarbeiten zeigen, dass das UPS einen wichtigen Mechanismus bei der Entstehung von Karzinomen und Metastasen darstellt (King et al. 1996; Orlowski und Dees 2003; Adams 2004b; Chen et al. 2009), sei es direkt über die Beeinflussung des Zellzyklus oder indirekt über Transkriptionsaktivatoren wie insbesondere Nf-κB (Adams 2004a).

Nf-κB ist ein Heterodimer, das aus den Proteinen p50 und p65 besteht (Wong und Tergaonkar 2009), wobei das 26S-Proteasom maßgeblich an der Generierung von p50 aus dem Vorläuferprotein p105 beteiligt ist (Lin et al. 1998). Im Zytoplasma bindet IκB spezifisch an Nf-κB und verhindert so seine Translokation in den Zellkern sowie die anschließende Genaktivierung (Baldwin 1996; Ghosh und Karin 2002; Abb. 1-7). Durch externe Einflüsse wie Zytokine (z. B. TNF-α) wird eine gezielte Phosphorylierung von IκB durch sogenannte IκB-Kinasen (IKK) induziert, was eine Polyubiquitinierung mit anschließendem Abbau von IκB durch den 26S-Proteasomkomplex zur Folge hat und dem freigegebenen Nf-κB eine

Einwanderung in den Zellkern zur Aktivierung seiner Zielgene ermöglicht (Tergaonkar et al. 2005; Vallabhapurapu und Karin 2009).

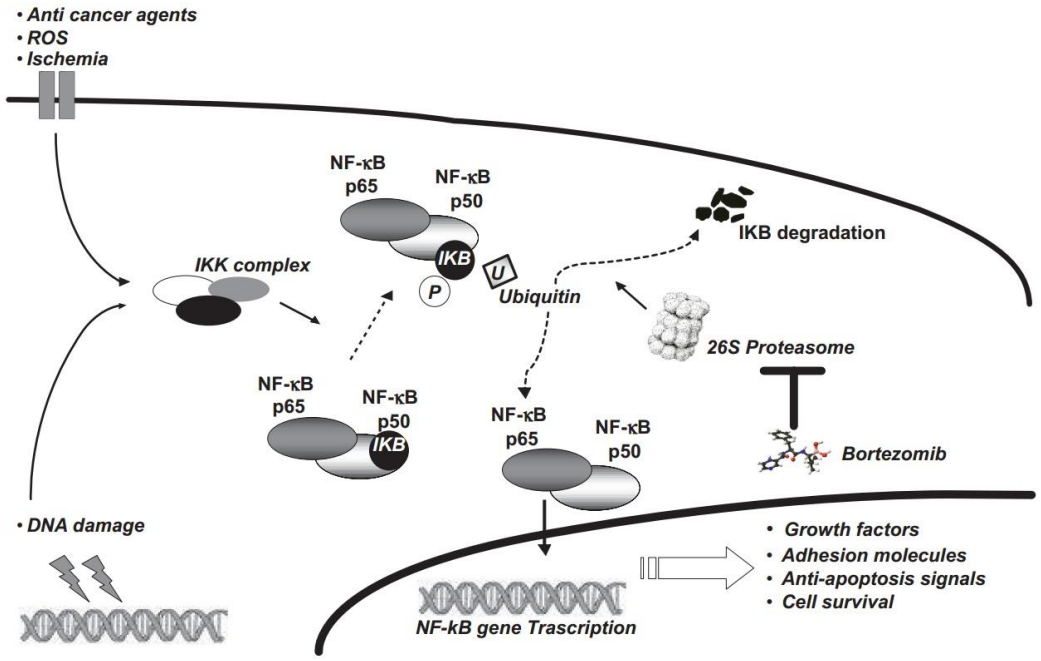

Abb. 1-7 Der Nf-ϰB-Signalweg. Verschiedene intra- wie extrazelluläre Einflüsse führen zu einer Phosphorylierung von IϰB durch IKK, was die Ubiquitinierung und proteasomale Degradation von IϰB durch das 26S-Proteasom zur Folge hat. Der als Heterodimer aus p65 und p50 bestehende Nf-ϰB-Komplex kann daraufhin in den Zellkern wandern und dort über die Interaktion mit der DNA die Transkription seiner Zielgene initiieren, was in der Hemmung von Apoptose und in einer Steigerung zellüberlebender und wachstumsfördernder Signale mündet. Bortezomib greift unter anderem über eine Hemmung des 26S-Proteasoms in diesen Signalweg ein und verhindert letztlich die Translokation von Nf-ϰB in den Zellkern. ROS: *reactive oxygen species*. Grafik nach Milano et al. 2009. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Dove Medical Press (OncoTargets and Therapy ©2009).

Eine fehlregulierte, meist konstitutiv aktive Form von Nf-ϰB (Frankland-Searby und Bhaumik 2012) wurde in zahlreichen soliden sowie hamätopoietischen Krebsarten (zum Beispiel Mamma- und Prostatakarzinom, Multiples Myelom und Leukämien) detektiert (Orlowski et al. 2002; Cortes et al. 2004; Ditsworth und Zong 2004; Luqman und Pezzuto 2010) und wird angesichts der gesteigerten Expression von anti-apoptotischen, zellproliferativen, angiogenetischen und pro-invasiven Faktoren neben einem aggressiven Phänotyp mit einer unabhängigen Therapieresistenz assoziiert (Aggarwal 2004; Monks et al. 2004; Montagut et al. 2006; Reddy et al. 2006; Bassères und Baldwin 2006). Speziell in den meisten Fällen von akuten myeloischen wie lymphatischen Leukämien konnte zum einen eine auffällige Nf-ϰB-Aktivität (Kordes et al. 2000; Guzman et al. 2001; Davis et al. 2001) und zum anderen eine direkte Beeinflussung beziehungsweise Aktivierung von Nf-ϰB durch ein aberrantes Notch1-Signal (in T-ALL) nachgewiesen werden (Screpanti et al. 2003; Shin et al. 2006; Vilimas et al. 2006). Ein konstitutives Notch1-Signal in T-ALL fördert demzufolge den Abbau von IϰB durch IKK, während eine medikamentöse Proteasom-Hemmung dies verhindert und folglich via IϰB und ausbleibender p105-Degradation das Nf-ϰB-Signal zu blockieren vermag (Palombella et al. 1994; Barnes und Karin 1997; Espinosa et al. 2010).

Weiterhin ist seit längerem bekannt, dass leukämische Zellen deutlich sensibler auf eine gezielte Hemmung des Proteasoms reagieren als normale Knochenmark-Vorläuferzellen oder periphere Lymphozyten (Masdehors et al. 1999; Soligo et al. 2001; Guzman et al. 2002; Stoffel 2005). So kommt es durch den Einsatz von Proteasomen-Inhibitoren in einer Vielzahl von Tumorzelllinien, wie unter anderem auch in Lymphomen, zu einer Herunterregulierung von angiogenetischen und proliferativen Faktoren zugunsten pro-apoptotischer und anti-neoplastischer Signale (Karin und Ben-Neriah 2000; Mitsiades et al. 2002; Hideshima et al. 2003; Qin et al. 2005; Anderson 2011; Adams 2002; Williams et al. 2003; Yu et al. 2004; Pérez-Galán et al. 2006; Scagliotti 2006).

Weiterhin bewirken die Proteasomen-Inhibitoren einen Zellzyklusarrest und unterdrücken DNA-Reparaturmechanismen. Durch die Entwicklung spezifischer Inhibitoren der proteolytischen Aktivität des UPS konnten zudem weitere therapeutische Ansatzpunkte erschlossen werden (Kisselev und Goldberg 2001).

Eine von fünf elementaren Wirkstoffgruppen der Proteasomen-Inhibitoren stellen die wasserlöslichen Peptidboronsäuren dar, die sich sowohl durch eine hohe Selektivität und Stabilität als auch durch ein vergleichsweise günstiges Nebenwirkungsprofil auszeichnen. Hier sind insbesondere milde, gut kontrollierbare Begleiterscheinungen wie Asthenie, gastrointestinale Symptome, Thrombozytopenie, periphere Neuropathie, Fieber und psychiatrische Störungen zu nennen (Curran und McKeage 2009; Cvek 2012). Wichtigster Vetreter dieser Klasse ist Bortezomib, auch bekannt unter dem Studiennamen PS-341 oder dem Handelsnamen Velcade® (Abb. 1-8). Es bindet spezifisch, hochaffin und reversibel an das chymotrypsinartige, aktive Zentrum des 26S-Proteasoms, verringert hierdurch drastisch die intrazelluläre Proteindegradation und wies in initialen *In-vitro*-Studien eine beachtliche therapeutische Potenz gegen ein breites Spektrum an diversen Krebszelllinien auf (Adams et al. 1999; Kisselev und Goldberg 2001; Almond und Cohen 2002; Adams 2003). Darüber hinaus besitzt Bortezomib keine bekannte Aktivität gegenüber anderen zellulären Proteasen (Kisselev und Goldberg 2001). Es zeigte in klinischen Phase-I- und II-Studien eine effektive Proteasomen-Hemmung bei vertretbarer Verträglichkeit (Orlowski et al. 2002; Aghajanian et al. 2002; Papandreou et al. 2004; Cortes et al. 2004; Portnow et al. 2012) und ein gutes Therapieansprechen insbesondere in der Behandlung von Patienten mit rezidiviertem Multiplem Myelom (Richardson et al. 2003). Hier konnte es in der Phase-III-Studie die Überlebensrate gegenüber der Therapie mit Dex deutlich übertreffen (Richardson et al. 2005) und wurde sodann rasch von der FDA und der EMEA als erster Proteasomen-Hemmer zur Dritt- und später auch Zweitlinien-Therapie des

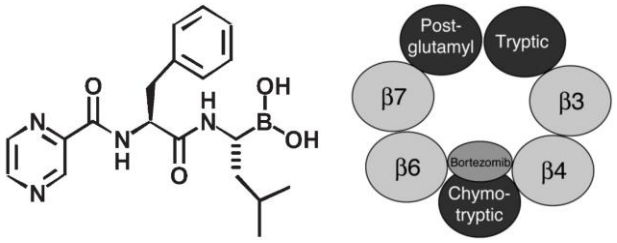

Abb. 1-8 Die Strukturformel von Bortezomib und seine Bindungsstelle im 26S-Proteasom (Querschnitt). Der Proteasomen-Hemmer Bortezomib ist ein Vertreter der Dipeptidyl-Boronsäuren (links). Er interagiert spezifisch mit dem proteolytisch aktiven und chymotrypsinartigen Zentrum des Proteasoms (rechts)(Adams 2004a). Der Abdruck erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags (Cancer Cell ©2004).

rezidiviertem Multiplem Myelom zugelassen (Kane et al. 2006). Inzwischen wird Bortezomib weitverbreitet in der Therapie des erstdiagnostizierten und rezidivierten Multiplem Myeloms (Moreau et al. 2012b) sowie des Mantelzelllymphoms eingesetzt (Kane et al. 2007; Orlowski und Kuhn 2008).

Die guten klinischen Ergebnisse beim Multiplen Myelom haben nicht zuletzt das Konzept der Proteasomen-Hemmung in der Krebstherapie mehr als gerechtfertigt und den Weg für weitere klinische Studien zur Effizienz von Bortezomib in der Behandlung vieler anderer Krebsentitäten, hierunter auch insbesondere die der akuten Leukämien (Vink et al. 2006), geebnet, zumal in präklinischen Ansätzen für eine Einzeltherapie mit Bortezomib bereits signifikante Antitumor-Aktivitäten auch gegenüber akuten lymphoblastischen Leukämien nachgewiesen werden konnten (Houghton et al. 2008; Huang et al. 2012).

Allerdings zeigten die bisherigen klinischen Studien nur eine unzureichende Wirkung der Bortezomib-Monotherapie in Erwachsenen (Cortes et al. 2004) und Kindern (Horton et al. 2007) mit therapierefraktärer oder rezidivierter akuter Leukämie. Demgegenüber verstärkt Bortezomib allerdings den Effekt vieler konventioneller Zytostatika und vermag eine Resistenz gegenüber diesen Substanzen zu überwinden (Ma et al. 2003; Mitsiades et al. 2003; Nikrad et al. 2005). So wurde es mit akzeptabler Toxizität in Kombination mit einer Vielzahl anderer Substanzen wie Doxorubicin, Vincristin und Dex getestet (Hideshima et al. 2001b; Horton et al. 2007; San Miguel et al. 2008; Messinger et al. 2010; Lancet et al. 2011).

Auch wenn bis dato die genauen Wirkmechanismen von Bortezomib nicht vollends aufgedeckt sind (Hideshima et al. 2009; Du und Chen 2013), werden diese zumeist auf die Hemmung des Nf-κB-Signalweges zurückgeführt (Russo et al. 2001; Cusack et al. 2001). So sind insbesondere diejenigen Tumorentitäten mit konstitutiver Expression von Nf-κB in den Fokus einer solchen Therapie gerückt (Adams 2004a).

Vor dem Hintergund, dass insbesondere in T-ALL häufig ein verstärktes Notch1-Signal zu einer prä-TCR-unabhängigen Aktivierung des Nf-κB-Signalweges führt (Vilimas et al. 2006; Sanda et al. 2006; Saitoh et al. 2008), ist der Einsatz von Bortezomib in T-ALL folgerichtig (Du und Chen 2013). Entsprechend konnten Aifantis und Kollegen anhand humaner T-ALL-Zelllinien mit konstitutivem Notch1 *in vitro* zeigen, dass Bortezomib die DNA-Bindung von Nf-κB verhindern und Apoptose in T-ALL-Zellen einleiten kann (Vilimas et al. 2006). Weiterführende Studien im Mausmodell mit Hemmung der IκB-Kinasen (IKK) ergaben analoge Ergebnisse und ein signifikant verlängertes Überleben der Versuchstiere mit T-ALL (Espinosa et al. 2010). Jüngste Arbeiten haben die Zytotoxizität von Bortezomib gegenüber T-ALL-Zellen *in vitro* und *in vivo* bestätigt (Huang et al. 2012; Koyama et al. 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Bortezomib in der experimentellen Behandlung von Ratten mit Notch1IC-überexprimierender T-ALL eingesetzt und dessen Ansprechen sowie Verträglichkeit randomisiert mit der GC-Therapie verglichen. Dieser Studienansatz in der Ratte ist bis dato in der Literatur nicht beschrieben.

1.6 Zielsetzung

Die T-ALL stellt insbesondere bei Kindern eine häufige und aggressive Krebserkrankung mit insgesamt schlechter Prognose dar (Pui et al. 2008). Die Entdeckung, dass aktivierende Mutationen des Notch1-Gens in bis zu 60 % der Patienten mit T-ALL detektiert werden (Weng et al. 2004), rückten diesen Signalweg als Ansatzpunkt für neue Therapien in den Fokus aktueller Forschungsstrategien, auch wenn die gezielte Hemmung von Notch1 oder der γ-Sekretase bislang keine klinische Relevanz erlangt hat (Dos Santos et al. 2010; Tosello und Ferrando 2013). Vor dem Hintergrund widersprüchlicher Ergebnisse zur Rolle von Notch1 in der T-Zellentwicklung generierte unsere Arbeitsgruppe eine Notch1IC-transgene Ratte (NICA) (van den Brandt et al. 2005), die früh und mit hoher Inzidenz eine T-ALL mit unerwarteten phänotypischen Eigenschaften entwickelt (van den Brandt et al. 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Rattenmodell der T-ALL durch adoptiven Transfer von Lymphomzellen aus NICA-Ratten etabliert und der Phänotyp der Lymphomzellen mittels Durchflusszytometrie charakterisiert werden. Unter Verwendung von CD8 knock-out- und GFP-transgenen-Ratten sollten darüber hinaus Erkenntnisse zur Progression, Metastasierung und Differenzierung der Lymphome erfasst werden. Neben der exakten Klassifizierung bestand ferner die Absicht, anhand von charakteristischen Antigenen neue Ansatzpunkte für eine Zelllinien-spezifische Therapie auszumachen. Zur Durchführung von vergleichenden Therapiestudien sollten überdies geeignete Bedingungen für ein Zellkulturmodell der Lymphomzellen konstituiert und hierbei die Neigung der Lymphome zur Spontanapoptose ex vivo evaluiert werden.

Weiterhin sollten anhand des Rattenmodells neue Therapieansätze in der Behandlung der T-ALL mit konstitutiv aktivem Notch1 ermittelt werden. Da die Verwendung von GCs durch das Auftreten schwerer Nebenwirkungen und Resistenzen limitiert ist, sollte als möglicher Ansatz zur Optimierung dieser Therapie deren liposomale Verpackung getestet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierzu erstmalig liposomales Prednisolon in Therapiestudien zu T-ALL im direkten Vergleich mit freiem Dex getestet und therapielimitierende Faktoren erfasst. Darüber hinaus wurde die Frage adressiert, inwieweit eine medikamentöse Hemmung von NF-κB durch die Verwendung des Proetasomen-Inhibitors Bortezomib eine therapeutische Wirkung auf die T-ALL im Modell der NICA-Ratten entfalten würde können. Hierzu sollte Bortezomib im direkten Vergleich mit Dex in der *In-vivo*-Therapie der T-ALL eingesetzt und Therapieansprechen wie Verträglichkeit evaluiert werden.

Zusammengefasst zielten die experimentellen Ansätze dieser Arbeit darauf ab, durch Etablierung eines T-ALL-Modells mit dysreguliertem Notch1 einerseits zu einem besseren Verständnis der Pathologie dieser Erkrankung beizutragen und andererseits neue Therapieansätze zu evaluieren. Dies könnte letztendlich zu einer Verbesserung von Risikostratifizierung, spezifischer Behandlungsmöglichkeit und Prognose an T-ALL erkrankter Kinder und Erwachsenen führen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1 Geräte

Analysewaage	MC1	Sartorius, Göttingen, Deutschland
	Acculab	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Brutschrank	HeraCell 150	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Durchlichtmikroskop	Axiovert 35	Zeiss, Jena, Deutschland
Einbetter	EG 1160	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland
Entwässerer	TP 1020	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland
FACS	FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Heizblock	Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Homogenisator	Ultra Turrax T 18 basic	IKA, Staufen, Deutschland
Kühlschränke	Gastro line, -4 °C, -20 °C, -80 °C	Liebherr AG, Bulle, Schweiz
Kühltruhe	Ultra low, -150 °C	Sanyo, Bad Nenndorf, Deutschland
MACS	Handsäule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Zählkammer	Neubauer improved	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PC	Notebook	Medion AG, Essen, Deutschland
PCR-Thermocycler	Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten		Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Power Supply		Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland
Real-Time PCR Cycler		Applied Biosystems, Foster City, Deutschland
Schlitten-Mikrotom	SM 2000R	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland
Spektrophotometer	BioPhoto	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilbank	Hera Safe	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Vortex	Vortex-Genie 2	Bender und Hopstein, Zürich, Schweiz
Wasserbad	W 12	Medingen, Dresden, Deutschland
	Medax 25900	Nagel GmbH, Kiel, Deutschland
Zentrifuge	5804 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Menzel-Gläser 24 x 40 mm	Thermo Scientific Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Einmal-Insulinspritzen	Omnican® 40, 0,30 x 12 mm	B.Braun Petzold GmbH, Melsungen, Deutschland
Einwegspritzen	2 ml, 5 ml, 10 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS-Röhrchen	5 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Falcon®	12 ml, 15 ml, 50 ml	Greiner, Solingen, Deutschland
Kanülen	0,9 x 40 mm, 20Gx1½“	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Kryoröhrchen	1,8 ml; 2 ml	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark Greiner, Solingen, Deutschland
Latexhandschuhe	Peha-Soft	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
MACS® Separation Columns	LS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikrotiterplatten	Suspensionskultur, Gewebekultur 6,12 ,48, 96 Wells Flachboden	Greiner, Solingen, Deutschland
Objektträger	Menzel-Gläser Superfrost® Plus	Thermo Scientific Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Petrischalen	90mm, rund	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen	blau, gelb	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sterilfilter	0,2µm	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zellsieb steril	40µm	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	1,5 ml; 2 ml	Eppendorf,Hamburg, Deutschland

2.1.3 Software

Tabelle 3 Software

FACS - Analysen	FlowJo 7.5	Tree Star, Inc., Ashland, USA
Statistik, Text- und Bildverarbeitung	Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Statistik und Graphen	GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA

2.1.4 Chemikalien

Tabelle 4 Chemikalien

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Agarose UltraPure	Invitrogen, Carlsbad, USA
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Chloroform ($CHCl_3$)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chlorwasserstoff (HCL)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Citronensäure ($C_6H_8O_7$)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
D(+) Glucose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Entellan® Microscopy	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin G (Pulver)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (EtOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glutamin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid (NaN_3)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Optilyse® B	Beckmann Coulter, Brea, USA
Orange G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA), Histofix 4 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Xylol (Isomere)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.5 Arzneimittel

Tabelle 5 Arzneimittel

Dexamethason-Phosphat (Pulver)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bortezomib (Pulver)	Ortho Biotech, Neuss, Deutschland
Prednisolon (in peg. Liposomen verpackt; Lösung) (Schweingruber et al. 2011)	Institut für Multiple-Sklerose-Forschung, Abteilung Neuroimmunologie, Universitätsmedizin Göttingen (UMG)

2.1.6 Biologische Materialien

Tabelle 6 Biologische Materalien

BSA (Rinderserumalbumin)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMEM - Kulturmedium (Dulbeco´s Modified Eagle Medium)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
FCS (Fötales Kälber-Serum)	HyClon, Perbio Science, Bonn, Deutschland
Non-essential Aminosäuren	Invitrogen, Carlsbad, USA
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, USA

Pyruvat	Invitrogen, Carlsbad, USA
Rattenserum	Institutseigene Herstellung aus Lewis-Ratten
RPMI 1640 - Kulturmedium	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*)	Immuno Tools, Friesoythe, Deutschland
Interleukin-7	Immuno Tools, Friesoythe, Deutschland

2.1.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 7 Puffer und Lösungen

Alsever's Lösung	1 l H_2O 4,2 g NaCl 8,8 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 0,6 g Citronensäure 22,5 g D(+) Glucose
Annexinbindungspuffer 10x	5 mM HEPES (pH 7,2) 25 mM $CaCl_2$ 1,4 M NaCl
DNAseI-Puffer 10x	500 mM Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM $CaCl_2$ 1 mM DTT
Einfriermedium	RPMI 1640 $^{++}$ 10 % DMSO
FACS-Puffer	PBS (pH 7,2) 0,1 % BSA 0,01 % NaN_3
MACS-Waschpuffer	PBS 1 mM EDTA
MACS-Laufpuffer	PBS 1 mM EDTA 0,5 % BSA
PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)	13 mM NaCl 2,6 mM KCl 6,5 mM Na_2HPO_4*2 H_2O 3,6 mM $CaCl_2$*4 H_20 0,5 mM $MgCl_2$ * 6 H_2O
RPMI Kulturmedium $^{++}$	RPMI 1640 (+ L-Glutamin) 10 % hitzeinaktiviertes FCS (30 Minuten 56 °C) 1 % Pyruvat (100 mM) 1 % NE-Aminosäuren 1 % Penicillin / Streptomycin 0,01 % β-Mercaptoethanol

TAC(Tris-Ammonium-Chlorid)-Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 7,2) 155 mM Ammonium-Chlorid
TAE (Tris-Acetat-EDTA) -Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA

2.1.8 Enzyme und Reagenzien-Kits

Tabelle 8 Enzyme und Reagenzien-Kits

DNase I , RNase-free	Roche, Pensberg, Deutschland
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, Hercules, Californien, USA
RNeasy™ Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SYBR-Green Powermix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Taq-Polymerase	Genaxxon Bioscience, Biberach, Deutschland

2.1.9 Antikörper

Alle verwendeten Antikörper wurden, wenn nicht näher bezeichnet, von BD Biosciences bezogen.

Tabelle 9 Antikörper

Antigen	**Klon**	**Konjugat**
CD2	Ox34	PE
CD3	G4.18	Bio
CD4	Ox35	APC, PE-Cy™5
	Ox38	PE
	W3/25	PE-Cy7
CD5	Ox19	unkonjugiert
CD8α	Ox8	PE, PerCP, Bio, FITC
CD8β	3.4.1	FITC , Bio, unkonjugiert
CD11α (LFA-1)	WT.1	PE
CD25	Ox39	Bio, PE
CD28	JJ319	PE
CD31	TLD-3A12	PE
CD44H	Ox49	FITC
CD45RA	Ox33	PE
CD45RC	Ox22	unkonjugiert
CD49d (VLA-4)	TA-2	PE
CD53	Ox44	unkonjugiert
CD54	1A29	Bio
CD62L	HRL1	Bio
CD90 (Thy1)	Ox7	PerCP
CD134	Ox40	Bio
βTCR	R73	PerCP, PE
γδTCR	V65	PE

Vβ3.3	C-A11	Bio
Vα4	G99	FITC
Vα8	G177	FITC
Vβ8.2	R78	PE
Vβ8.5	B73	unkonjugiert
Vβ10	G101	PE, unkonjugiert
Vβ13	18B1	Bio
Vβ16	HIS42	FITC
RT1A	Ox18	Bio
RT1B	Ox6	Bio, PE
RT1D	14-4-4S	Bio
	Streptavidin (SA)	APC, PE-Cy7,APC-Cy7
	Goat-anti-mouse	PE-Cy7
	NMIg	

2.1.10 Weitere Reagenzien

Tabelle 10 Weitere Reagenzien

Phosphatidylserin	AnnexinV	FITC, Cy5
DNA	7-Aminoactinomycin (7-AAD)	
CD8α	G28	Microbeads, Miltenyi Biotec

2.1.11 Primer

5‘ → 3‘

β-Actin forward AGC CAT GTA CGT AGC CAT CCA GGC T

β-Actin reverse CTC TCA GCT GTG GTG GTG AAG CTG T

GIMAP5 forward GCA GTT CTG CTG TGT TCT GG

GIMAP5 reverse GGC CTT CCA TTC TCT TCT GA

GRrat forward GTC CAT GGG GCT GTA TAT GG

GRrat reverse TGC AGA CGT TGA ACT CTT GG

mNotch1 forward GGA CAT CAC GGA TCA CAT GG

mNotch1 reverse CCC TGT GTG GCA GCA GAC TTG AG

Die Sequenzen wurden mittels des Online-Tools *Primer-Blast* (National Center for Biotechnology Information, USA) ausgewählt.

2.1.12 Versuchstiere

In allen Experimenten wurden Ratten des Inzuchtstamms Lewis (LEW/Crl, Sulzfeld, Deutschland) in einem Alter von sechs bis zwölf Wochen verwendet. Es handelte sich hierbei entweder um Wildtyp-Tiere oder CD8 knock-out(ko)-Ratten. Letztere waren auf Lewis-Ratten zurückgekreuzte Nachkommen eines männlichen Tieres vom Stamm Sprague-Dawley, welches wie von Zan et al. (2003) beschrieben mit dem Mutagen N-ethyl-N-nitroso-Harnstoff behandelt wurde und daraufhin zufällig eine missense-Mutation im CD8α-Gen entwickelte (Taurog et al. 2009). Die CD8ko-Lewis-Ratten exprimieren weder die CD8α noch die CD8β Kette auf der Zelloberläche und sind zu keiner adäquaten Immunantwort der CTL auf spezifische Antigene in der Lage.

Die Tiere wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen entsprechend den gesetzlichen Tierschutzauflagen in Käfigen mit autoklaviertem Streu gehalten und mit Futter und Wasser ad libitum versorgt. Alle Versuche wurden nach den gültigen Richtlinien bezüglich Haltung und Verwendung von Versuchstieren durchgeführt und vom Tierschutzbeauftragten der Universität Göttingen sowie von der Bezirksregierung Braunschweig befürwortet und genehmigt (Tierversuchsgenehmigung Aktenzeichen: 33.11.42502-04-023/08).

Vor Beginn der tierexperimentellen Versuche dieser Dissertation hat der Promovend erfolgreich einen den FELASA-B-Richtlinien entsprechenden Kurs in Versuchstierkunde abgeschlossen und hat anschließend sämtliche Tierversuche selbstständig unter Anleitung durchgeführt.

2.1.13 Verwendete Zellen

Im Rahmen früherer Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe war ein transgenes Rattenmodell entwickelt worden, bei welchem T-Zellen die intrazelluläre Domäne von Notch1 (Notch1IC) konstitutiv exprimieren. Zur besseren Vergleichbarkeit mit zuvor veröffentlichten Experimenten wurde dasselbe Transgen-Konstrukt verwendet wie bei Robey et al. (1996) beschrieben. Haplotype Transgenträger wurden mittels PCR und Southern Blot identifiziert und für mindestens fünf Generationen auf Lewis-Inzuchtratten zurückgekreuzt. Die transgenen Tiere zeigten eine gestörte T-Zell-Entwicklung und erkrankten innerhalb der ersten Lebenswochen an thymischen Lymphomen, welche sich anschließend als T-ALL mit Infiltration von lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen manifestierten.

Die verwendeten Lymphomzellen wurden aus Thymus und/oder Knochenmark der erkrankten NICA-Ratten isoliert und in flüssigem Stickstoff gelagert. Die verschiedenen Tumorzelllinien sind durch das jeweilige Ursprungstier und dessen Generation im Rahmen der Rückkreuzung auf Lewis-Inzuchtratten gekennzeichnet (Tabelle 11).

Tabelle 11 Verwendete Zellen

Tumor-zelllinie (NICA)	Generation (Rückkreuzung)	Alter des NICA-Tieres (Wochen)	Ursprungsorgan	CD4/CD8 Phänotyp
1450	R6	15	Thymus, Knochenmark	DP (doppeltpositiv)
1507	R6	16	Knochenmark	DP (bis CD4-SP)
1529	R6	14	Thymus	DP
1534	R6	13	Knochenmark	DP
1779	R6	15	Thymus	DP
1781	R6	18	Thymus	DP
2010	R9	12	Thymus	DP
2188	R10	17	Thymus	DP (bis CD4-SP)
2413	R11	19	Thymus	DP
2623	R11	14	Thymus	DP
2625	R11	23	Thymus	DP
2689	R11	20	Thymus	CD8-SP
2882	R13	14	Thymus	DP
2891	R13	14	Thymus	DP
2892	R13	14	Thymus	DP
2893	R13	14	Thymus	DP bis CD4-SP

2.2 Methoden

2.2.1 Lymphomtransfer

Die zu transferierenden Zellen wurden mit PBS gewaschen und zentrifugiert (1200 rpm, 4 °C, 6 min). Für den Transfer wurden die Zellen anschließend je nach Konzentration und Zahl der Empfängertiere in so viel PBS aufgenommen, dass pro Tier genau 300 µl Zellsuspension mit jeweils $1x10^7$ Zellen zur Verfügung standen. Der Lymphomtransfer erfolgte grundsätzlich mithilfe einer Insulinspritze als intravenöse Injektion am Schwanz der Ratte. Einzelne Tumorzelllinien konnten auf diese Weise generationsübergreifend von einem Tier auf das nächste übertragen und beliebig oft *in vivo* etabliert werden.

2.2.2 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Zelllinien wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Um beim Einfrieren die Bildung von zytotoxischen Eiskristallen zu vermeiden, wurden jeweils $2x10^8$ Zellen in Einfriermedium aufgenommen, in einem thermostabilen Kryoröhrchen langsam auf -80 °C gekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Im flüssigen Stickstoff eingefrorene Zellen wurden schnell im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und sofort in Kulturmedium resuspendiert, gewaschen und zentrifugiert (1200 rpm, 4 °C, 6 min), um das zelltoxische DMSO im Einfriermedium weitgehend zu verdünnen.

2.2.3 Blut- und Organentnahme

Für die Blutentnahme wurde eine Schwanzvene der Ratten mit einer Kanüle punktiert und 3-5 Blutstropfen in ein mit Alsevers gefülltes FACS-Röhrchen getropft. Dieser Citratpuffer verhindert hierbei die Koagulation des Blutes. Nachdem die Proben anschließend 5 min bei 4 °C und 1550 rpm zentrifugiert und die Überstände verworfen worden waren, wurden die Zellen extrazellulär gefärbt (siehe 2.2.7) und anschließend erythrolysiert (2.2.8).

Die zu analysierenden Ratten wurden mittels einer gesättigten CO_2-Atmosphäre getötet. Unmittelbar danach erfolgte die Organentnahme und -präparation. Zuerst wurden die cervikalen und peritonealen, dann die mesenterialen und paraaortalen Lymphknoten entnommen, anschließend die Milz, beide Nieren, Herz, Leber, Lunge und in einigen seltenen Fällen zusätzlich Rückenmark und Thymus. Direkt nach Entnahme und nach weitestgehender Ausblutung der Organe wurden diese mittels Analysewaage gewogen. Zur Gewinnung des Knochenmarks wurden Ober- und Unterschenkelknochen vollständig vom umgebenden Weichteilgewebe befreit, eröffnet und anschließend die Knochenspongiosa mithilfe einer kleinen Kanüle und einer 5 ml oder 10 ml Spritze mit PBS durchspült. Die so gewonnene Zellsuspension wurde in einem Well einer 6-Well-Platte auf Eis aufgefangen, die anderen Organe dort bis zur Weiterverwertung in 2-3 ml PBS gegeben und gekühlt.

2.2.4 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus lymphatischen Organen

Um aus Thymus, Lymphknoten und Milz Einzelzellsuspensionen herzustellen, wurden die Organe in je ein 40µm Nylon-Zellsieb gegeben und während andauernder Spülung mit PBS mithilfe eines 10 ml-Spritzenstempels in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen gerieben. Anschließend wurde das Röhrchen mit der entsprechenden Lösung aufgefüllt, zentrifugiert (1550 rpm, 5 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet im gewünschten Medium resuspendiert. Um die in der Milz befindlichen Erythrozyten durch osmotischen Druck zu lysieren, wurde die Zellsuspension zusätzlich 1:6 mit TAC vermengt und 12 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (1550 rpm, 5 min, 4 °C), Verwerfen des Überstandes und Resuspensation in PBS, konnte von allen Zellsuspensionen die Zellkonzentration bestimmt werden.

2.2.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zellreiche Suspensionen wurden zuvor 1:10 oder 1:100 mit PBS verdünnt. Anschließend wurden 10 µl dieser gut vermischten Verdünnung 1:1 mit einer Trypanblaulösung versetzt und unter das Deckgläschen der Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die lebenden Zellen, welche kein Trypanblau aufnehmen, wurden mikroskopisch in 2-3 Quadranten ausgezählt. Das Produkt aus der gezählten Zellzahl gemittelt pro Quadrant und dem Kammerfaktor(10^4) mit Berücksichtigung der Verdünnung ergibt die Zellkonzentration pro ml, aus der sich anhand des Gesamtvolumens die Gesamtzellzahl in der Suspension ergibt.

2.2.6 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie oder auch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) bietet die Möglichkeit, Zellen anhand ihrer Morphologie und Oberflächenexpression zu unterscheiden. Insbesondere quantitative Informationen über Größe und Granularität sowie die Menge und das Vorhandensein extra- und intrazellulärer Antigene können anhand optischer Signale gewonnen werden, wenn die Zellen einen Laserstrahl passieren. Hierbei werden die Zellen im FACS-Gerät durch eine Kapillare gesaugt und im Sensormodul einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Dabei korreliert die von einer Zelle reflektierte und gestreute Strahlung des Lasers mit ihrer Größe und Komplexität. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, „forward scatter“) ist ein Maß für die Beugung des Lichtes und liefert Informationen über Größe und Volumen der Zelle. Dagegen erlaubt das durch die Brechung des Lichtes entstehende Seitwärtsstreulicht (SSC, „side scatter“) eine Aussage über die Granularität der Zelle und die Beschaffenheit ihres Zellkerns. Dies ermöglicht bereits eine Abgrenzung von Subpopulationen der Zellen. Die Durchflusszytometrie ermöglicht es zudem Zellen zu untersuchen, die nach Bindung von Farbstoff-gekoppelten Antikörpern in bis zu sechs unterschiedlichen Lichtwellenlängen eine Fluoreszenz aufweisen, welche durch den Laserstrahl angeregt wird. Insbesondere die quantitative Expression bestimmter Moleküle wie etwa Oberflächenantigene wird durch die Messung von Fluoreszenz ermittelt. Diese Fluoreszenz kann entweder indirekt von der Bindung mit Fluorochromen assoziierter Antikörper (siehe 2.2.7) oder direkt von der Expression eines autofluoreszierenden Proteins, wie z. B. eGFP (enhanced green fluorescent protein), herrühren, welches zuvor in die Zelle eingebracht wurde. Beispiele für Fluorochrome sind Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE).

In der Regel wurden 10.000-50.000 Zellen gemessen, wobei mithilfe eines virtuellen Fensters („gate“) und anhand der Parameter Größe und Granularität lebende von toten Zellen sowie einzelne Subpopulationen der Zellen hierarchisch abgegrenzt, gezählt und gesondert betrachtet werden können. Die Auswertung der gespeicherten FACS-Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo als eindimensionale Histogramme oder zweidimensionale Punktwolkendarstellung („Dot-Plots“).

2.2.7 Extrazelluläre Färbungen

Für die extrazellulären Färbungen zur durchflusszytometrischen Analyse wurden in der Regel etwa 400.000 Zellen in 100 µl FACS-Puffer in ein FACS-Röhrchen überführt und die entsprechenden Antikörperkombinationen in zuvor austitrierten, gesättigten Konzentrationen hinzugemischt. Bei den eingesetzten Antikörpern handelte es sich generell um monoklonale Antikörper, die spezifisch gegen ein bestimmtes Oberflächenantigen auf der Zielzelle gerichtet waren. Alle Antikörperverdünnungen wurden zuvor so in FACS-Puffer angesetzt, dass etwa 20 µl pro Antikörper für eine Zellprobe sättigend ausreichten. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei 4 °C in Dunkelheit wurden die überschüssigen

Antikörper nach (je)dem Färbeschritt durch Waschen mit 4 ml FACS-Puffer (5 min, 4 °C, 1550 rpm) und Verwerfen des Überstandes entfernt.

Neben der konventionellen Ein-Schritt-Färbung mit einem Antikörper bedarf es bei biotinylierten Antikörpern, die keine Fluorochrome zur Detektion im FACS-Gerät enthalten, eines Sekundärkonjugats. In der Regel handelte es sich hierbei um fluorochrom-assoziiertes Streptavidin, welches nach der primären Markierung von Zellen mit Biotin-gekoppelten Antikörpern in einem zweiten Färbeschritt hinzugefügt wurde und mit hoher Affinität an das Biotin bindet. In einer anderen Mehrschritt-Färbung wurde als entsprechendes Sekundärkonjugat ein fluorochromassoziierter Goat-anti-Mouse-Antikörper verwendet, welcher an einen zuvor eingesetzten primären Maus-Antikörper bindet. Überschüssiges, nicht ausgewaschenes Goat-anti-Mouse wurde anschließend durch die Zugabe von Normal-Mouse-Immunglobulin (NMIg) eliminiert, bevor sich weitere Färbeschritte mit konjugierten Antikörpern anschließen konnten. Nach einem finalen Waschschritt wurden die Zellsedimente schließlich in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert.

Je nach Verwendung verschiedener Antikörperkombinationen konnten unterschiedliche Oberflächenproteine quantitativ detektiert und auf dieser Grundlage einzelne Zellpopulationen charakterisiert werden. Etwas anders verhält es sich mit der AnnexinV/7-AAD-Färbung zur Ermittlung der Apoptoserate. Sie dient dazu, apoptotische oder nekrotische Zellen in der Durchflusszytometrie von lebenden zu unterscheiden. Das Protein AnnexinV bindet hierbei hochaffin an Phosphatidylserin, ein Phospholipid, welches im Zuge der Apoptose von der zytoplasmatischen Innenseite auf die Aussenseite der Zellmembran transloziert. 7-AAD (7-Aminoactinomycin) interkaliert wiederum spezifisch in der DNA zwischen Cytosin und Guanin und verändert seine Fluoreszenzeigenschaft. Da AnnexinV und 7-AAD nicht in der Lage sind, in eine intakte Zelle zu diffundieren, werden ausschließlich avitale Zellen markiert („Avitalfarbstoffe“). Im Gegensatz zu den anderen extrazellulären Färbungen wurden hierbei pro Probe 2 µl AnnexinV und 3 µl 7-AAD in 100 µl Annexinbindungspuffer gelöst und dieses Gemisch zu den Zellen gegeben. Ohne den üblichen finalen Waschschritt wurden die Proben direkt nach der Inkubation (15 min, 4 °C, im Dunkeln) durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.8 Erythrolyse mittels *OptiLyse*

Bei der Durchflusszytometrie ist es von Vorteil, wenn Leukozyten frei von potentiell interferierenden Erythrozyten analysiert werden können. Die Befreiung der zu analysierenden Vollblutprobe von Zelltrümmern und roten Blutzellen ohne langwierige Wasch- oder Zentrifugationsschritte ermöglicht dabei die OptiLyse® B Lösung, welche im Anschluss an die Zellfärbung die Erythrozyten lysiert und die Leukozyten stabilisiert.

Nach dem letzten Färbe- und Waschschritt wurde das Pellet der Vollblutprobe hierzu in 100 µl der Optilyse-Lösung gut resuspendiert. Die Probe inkubierte anschließend 12 min bei

Raumtemperatur in Dunkelheit, bevor 1 ml Wasser zugesetzt und vermengt wurde. Nach einer weiteren Inkubationszeit von mindestens 30 min erfolgte vor der durchfluss-zytometrischen Analyse ein letzter Waschschritt mit 3 ml FACS-Puffer (4 °C, 5 min, 1550 rpm).

2.2.9 Magnetische Zellseparation (MACS)

Die Expression charakteristischer Oberflächenproteine kann zur Isolierung oder Anreicherung von Leukozytensubpopulationen genutzt werden. Ein wichtiger Vertreter der parallelen Zelltrennverfahren, mit denen viele Zellen gleichzeitig anhand einer einzigen Eigenschaft sortiert werden können, ist die magnetische Zellseparation (*Magnetic Activated Cell Sorting; MACS*). Bei dieser Methode werden die Zielzellen durch Konjugate aus monoklonalen Antikörpern und kleinen magnetischen Partikeln („Microbeads") markiert und anschließend auf eine Trennsäule pipettiert, die eine Matrix aus magnetischen Kügelchen enthält und in ein Magnetfeld platziert wird. Dieses Permanentmagnet-System sorgt dafür, dass die magnetisch markierte Zellpopulation in der Säule hängen bleibt, wohingegen unmarkierte Zellen frei hindurchfließen können. Die markierten Zellen von Interesse können daraufhin nach Aufhebung der magnetischen Wechselwirkungen eluiert und verwendet werden.

Alle hier durchgeführten Zellsortierungen wurden mit einer MACS-Handsäule (LS-column) von Miltenyi Biotec durchgeführt und ihre Reinheit mithilfe der Durchflusszytometrie evaluiert. Zur direkten Selektion von Zellen, welche das CD8-Epitop auf ihrer Oberfläche exprimieren (im Rahmen dieser Arbeit insbesondere CD8-positive Lymphomzellen aus CD8ko-Wirttieren) wurde die anzureichernde Zellsuspension zunächst in ein FACS-Röhrchen überführt. Unter sterilen Bedingungen wurden anschließend für je $1x10^7$ Zellen 20 µl Bead-gekoppelte Antikörper gegen das CD8-Epitop hinzugegeben und der Ansatz 20 min bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Proben mit je 4 ml MACS-Laufpuffer (1200 rpm, 4 °C, 6 min), wurde das Zellpellet in 500 µl MACS-Laufpuffer resuspendiert und anschließend auf die Trennsäule gegeben, die zuvor unter sterilen Bedingungen zunächst mit 2 ml MACS-Laufpuffer äquilibriert und senkrecht in den Magneten eingespannt wurde. Durch das angelegte Magnetfeld wurden markierte $CD8^+$ Zellen in der MidiMACS® LS Handsäule zurückgehalten, während andere Zellen die Säule ungehindert passierten und in einem 15-ml-Falcon-Röhrchen als negative Fraktion aufgefangen wurden. Nach mehrmaligem Waschen mit Laufpuffer wurde die Handsäule aus dem Magnetfeld entfernt, auf einem Falcon-Röhrchen platziert und mit 5 ml MACS-Puffer aufgefüllt. Die markierten Zielzellen wurden als positive Fraktion mit einem Stempel eluiert und ein weiteres Mal mit MACS-Laufpuffer gewaschen und resuspendiert. Je ein Aliquot der positiven und negativen Fraktion wurde im FACS auf den Erfolg der Anreicherung analysiert.

2.2.10 Kultivierug von NICA Lymphomzellen *in vitro*

Die Arbeit mit Zellkulturen wurde grundsätzlich unter einer Sterilbank durchgeführt. Zur Etablierung einer Lymphomzellen-Kultur wurden verschiedene Kulturmedien, Mikrotiterplatten (Suspensions- und Gewebekultur) und Zusatzkombinationen eingesetzt (siehe Tabelle 12 in Kapitel 3.3) und die Zellen bei wassergesättigter Atmosphäre unter 5 % CO_2 bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Vor ihrer Verwendung wurden FCS und Rattenserum steril filtriert (0,2 µm- Sterilfilter) und die Zellsuspensionen von Interesse nach der Magnetischen Zellseparation (siehe Kapitel 2.2.9) im entsprechenden Medium schonend gewaschen (4 °C, 5 min, 1200 rpm). Je Ansatz und Well wurden $2x10^6$ Zellen in 5 ml Endvolumen resuspendiert. Alle 72 Stunden erfolgten eine lichtmikroskopische Kontrolle der Mikrotiterplatten und ein Mediumwechsel inklusive aller Zusätze. Zur Evaluation des Kultivierungserfolges wurden die Zellen nach vier und acht Tagen geerntet, mit FACS-Puffer gewaschen und mittels monoklonaler Antikörper (CD4/CD8) sowie AnnexinV/7-AAD zur durchflusszytometrischen Ermittlung der Überlebensrate gefärbt.

2.2.11 Apoptose-Assay

Die Empfindlichkeit von Lymphomzellen auf Glukokortikoide wurde *in vitro* mithilfe eines Dexamethason-Apoptose-Assays untersucht. Das Überleben der Tumorzellen unter Dexamethason wurde hierbei anhand einer Verdünnungsreihe (Konzentrationsbereiche von 10^{-6} bis 10^{-10} mol/l) mit dem von Wildtyp-Thymozyten aus Lewis-Ratten verglichen. Als Negativkontrolle wurde PBS eingesetzt.

Unter sterilen Bedingungen wurden $3x10^5$ Zellen pro Well einer 96-Napf-Platte (Suspensionskultur) in je 300 µl Dex-Medium (Dexamethason-Verdünnungsreihe in $RPMI^{++}$-Kulturmedium) für 10 oder 20 Stunden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2) kultiviert. Die geernteten Zellen wurden anschließend in FACS-Röhrchen überführt, mit FACS-Puffer gewaschen (4 °C, 6 min, 1200 rpm) und zur Ermittlung der Apoptoserate am Durchflusszytometer neben den zellspezifischen Antikörpern (CD4, CD8) mit AnnexinV/7-AAD gefärbt (siehe Extrazelluläre Färbungen, 2.2.7).

2.2.12 *In-vivo*-Pharmakotherapie

Dexamethason und Bortezomib lagen als Pulver vor und wurden zunächst in Lösung gebracht. Mit einer Feinwaage wurde 0,2 g Dexamethason-Pulver ausgewogen und mit 10 ml PBS in einem 15 ml Falcon-Röhrchen resuspendiert, sodass in 1,5 ml-Aliquoten der Lösung jeweils 20 mg Dexamethason-Phosphat enthalten waren (13,3 mg/ml). 3,5 mg des Bortezomib-Pulvers wurden in 14 ml Kochsalzlösung (NaCl) aufgelöst, ebenfalls in Zentrifugenröhrchen aliquotiert (0,25 mg/ml) und zusammen mit den Dexamethason-Lösungen bei -20 °C gelagert. Die liposomalen Glukokortikoide wurden bei 4 °C aufbewahrt

und konnten als vorrätige Lösung direkt verwendet werden (Konzentration nach Herstellerangaben 1,1 mg/ml).

Für die therapeutische Behandlung wurde die gewünschte Menge der Wirkstofflösung mit einer Insulinspritze intravenös (i.v.) in eine Schwanzvene oder intraperitoneal (i.p.) in den linken unteren Quadranten des Abdomen als Bolus appliziert. Dexamethason wurde hierbei in einer Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht und Bortezomib von 0,25 mg/kg Körpergewicht verabreicht (vgl. Fissolo et al. 2008).

Da durch die verfügbare Konzentration der liposomalen Glukokortikoidlösung das speziespezifische tolerable Gesamtvolumen für eine intravenöse Bolus-Injektion überstiegen wurde, konnten die Liposomen in den Therapiestudien mit Ratten ausschließlich intraperitoneal in einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht verabreicht werden.

Vorweggenommen ist zu sagen, dass sich in der proliferationshemmenden Wirksamkeit von Dexamethason und Bortezomib kein signifikanter Unterschied zwischen intravenöser und intraperitonealer Applikation zeigte, sodass die initial geplante Trennung beider Applikationsformen in zwei Kohorten aufgehoben und die Daten der jeweiligen Versuchstiere für die Analyse fusioniert wurden.

2.2.13 RNA-Extraktion aus Gewebe

Für das Arbeiten mit RNA gilt generell die Verwendung von RNase-freien Materialien und DEPC-Wasser zur Inaktivierung von Ribonukleasen. Das 70 %ige Ethanol wurde ebenfalls mit DEPC-H_2O angesetzt.

Zu 100 mg Gewebeprobe wurde jeweils 1 ml Trizol pipettiert. Mit einem Homogenisator wurden anschließend die Gewebestücke homogenisiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform pro 1 ml Trizol wurden die Proben 15 Sekunden gut gemischt (gevortext) und dann bei 4 °C und 14.000 rpm für 15 min zentrifugiert. Die obere farblose Phase, in der sich die DNA und die RNA befanden, wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und gut mit 500 µl Isopropanol vermischt. Zur Präzipitation der RNA wurden die Proben nach einer Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert (4 °C, 14.000 rpm, 10 min). Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und verworfen, das Pellet mit 1 ml 70 %-Ethanol (in DEPC-Wasser) gewaschen, 5 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert, getrocknet und in 89 µl DEPC-H_2O und 10 µl 10x DNaseI-Puffer resuspendiert. Für den Verdau der DNA wurden die Proben mit 1 µl DNaseI für 30 min bei 37 °C im Heizblock inkubiert.

Die folgende Aufreinigung der RNA erfolgte unter Verwednung des *RNeasy Kit* von Qiagen. Pro Probe wurde 350 µl RLT-Puffer (Kitkomponente) benötigt, der zu Beginn in einer 1:100-Mischung mit β-Mercaptoethanol hergestellt und anschließend zusammen mit 250 µl absolutem Ethanol zugegeben und vorsichtig resuspendiert wurde. Dieser Ansatz wurde auf eine RNeasy Säule pipettiert und zentrifugiert (15 Sekunden, 15 °C, 8.800 rpm),

danach das Eluat verworfen und die Säule in einem neuen Reaktionsgefäß zweimal mit 500 µl RPE-Puffer (Kitkomponente) gewaschen (erst 15 Sekunden, dann 2 min, Raumtemperatur, 8.800 rpm), welcher als Durchlauf nach jedem Zentrifugationsschritt verworfen wurde. Zum Schluss wurde die RNA mit 50 µl nukleasefreiem DEPC-Wasser eluiert (Inkubation 1 min; Zentrifugation 1 min, Raumtemperatur, 8.800 rpm).

Die Konzentrationsbestimmung der RNA-Lösung erfolgte daraufhin durch die Absorption bei 260 nm und 280 nm im Spektrophometer. Um zusätzlich die Qualität der Präparation beurteilen zu können, wurden 2 µl der RNA-Lösung 1:10 mit DEPC-Wasser verdünnt, mit 2 µl Orange G versetzt und auf ein 1 % Ethidium-Agarosegel aufgetragen. Nach spannungskonstanter Elektrophorese bei 120 Volt für 16 min wurden die 18 S- und 28 S-rRNA unter UV-Licht visualisiert (siehe 2.2.17). Die RNA wurde bei -150 °C aufbewahrt und später für die cDNA-Synthese und Real-Time PCR verwendet.

2.2.14 cDNA-Synthese

Nach Aufreinigung der RNA erfolgte das Umschreiben der mRNA in cDNA (von engl. *complementary DNA*). Hierbei macht man sich zu Nutze, dass eukaryotische mRNA am 3'-Ende durch einen polyA-Schwanz gekennzeichnet ist, an den oligodT-Nukleotide binden und daher als Primer verwendet werden können. Das Enzym Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, kann anschließend die mRNA unter Verwendung von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) in cDNA umschreiben.

Die Durchführung erfolgte mit dem *iScript™ cDNA Synthesis Kit* gemäß dem Herstellerprotokoll. Zwischen 100 fg und 1 µg RNA wurden hierbei mit *iScript Reaction Mix–Puffer* und *iScript reverser Transkriptase* versetzt und anschließend für 5 min bei 25 °C inkubiert. Es folgten weitere Inkubationen für 30 min bei 42 °C und für 5 min bei 85 °C. Der Erfolg der cDNA-Synthese wurde anhand einer Test-PCR für den Zytoskelettanteil β-Actin (Primer-spezifische Annealing-Temperatur 60 °C) mit anschließender Visualisierung durch eine Elektrophorese auf Agarosegel evaluiert (siehe Kapitel 2.2.15 und 2.2.17).

2.2.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR (Polymerase Chain Reaction) beruht auf der enzymatischen Vervielfältigung spezifischer DNA-Fragmente *in vitro* durch eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase (aus Thermophilus aquaticus). Die Zielsequenz wird hierbei durch ein gegeneinander gerichtetes Oligonukleotid-Primerpaar begrenzt. Die Primer werden so entworfen, dass sie komplementär zu kurzen, ca. 20 Basenpaare umfassenden DNA-Abschnitten sind und den jeweiligen Startpunkt des Syntheseschritts von beiden Seiten des gewählten DNA-Bereichs festlegen. Der komplette Vorgang besteht aus zyklischen Wiederholungen einzelner Teilschritte. Da die Produkte vorheriger Zyklen als Ausgangsmaterial für den nächsten Zyklus dienen und somit eine exponentielle

Vervielfältigung ermöglichen, spricht man in diesem Zusammenhang von einer „Kettenreaktion“.

Im ersten Schritt der PCR wird die doppelsträngige DNA durch eine Temperaturerhöhung auf 95 °C in Einzelstränge aufgetrennt (*Denaturierung*). Anschließend hybridisieren die Oligonukleotid-Primer im zweiten Schritt durch eine Primer-abhängige Temperatursenkung komplementär an die Matrizen-DNA (Anlagerung/*Annealing*) und flankieren die zu amplifizierende Zielregion. Dieses für jeden Primer spezifische Temperaturoptimum errechnet sich in Annäherung anhand seiner Basenzusammensetzung. Nach Anlagerung der Primer erfolgt im dritten Schritt bei 72 °C ihre Verlängerung komplementär nach Vorgabe der DNA-Matrize mithilfe der thermostabilen Taq-Polymerase (*Elongation*), wobei ein neuer DNA-Doppelstrang entsteht. Durch 35 Wiederholungen des Amplifikationszyklus, der aus diesen drei Teilschritten besteht, wird eine exponentielle Akkumulation des durch die Primer flankierten DNA-Abschnittes erreicht.

Für die Kettenreaktion in einem ThermoCycler wurde folgender Ansatz pipettiert:

1 µl	Template-cDNA
0,5 µl	Primermix (10 µM; Forward und Reverse Primer)
2,5 µl	10x Puffer (15 mM $MgCl_2$)
0,2 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
1 µl	Nukleosidtriphosphatmix (je 5 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
19,8 µl	H_2O Aqua dest.

PCR-Zyklusprogramm:

5 min	95 °C	*Denaturierung*	
1 min	95 °C		
1 min	Primer-spezifische *Annealing*-Temperatur		35 Zyklen
1 min	72 °C		
10 min	72 °C	*Elongation*	

Um die Reinheit und Konzentration der spezifischen PCR-Produkte zu bestimmen, wurden die Ansätze anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

2.2.16 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR ist eine Methode, die nach dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion zusätzlich die Quantifizierung der amplifizierten DNA ermöglicht. Entscheidend hierbei ist, dass die Menge an ursprünglich vorhandenen mRNA-Transkripten mit der Menge an PCR-Produkt korreliert. Je höher in einer Probe also die Anzahl an cDNA-Matrizen ist, desto mehr DNA wird amplifiziert. Durch die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green, welcher nur in doppelsträngige DNA

wie PCR-Produkte interkaliert, kann nach Anregung durch blaues Licht die gemessene Emission des DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplexes direkten Aufschluss über die Menge an amplifizierter DNA geben. Je mehr PCR-Produkt vorhanden ist, desto mehr SYBR Green kann binden und umso höher ist proportional die Fluoreszenzintensität, welche nach jedem PCR-Zyklus gemessen wird. Die relative Menge an mRNA-Transkripten des zu untersuchenden Gens ergibt der Quotient aus der Anzahl an Transkripten dieses interessierenden Gens und der eines unregulierten Haushaltsgens (z. B. β-Aktin), dessen Kopienzahl unbeeinflusst sein sollte.

Der Ansatz für die Real-Time PCR bestand aus folgenden Komponenten:

1 µl	cDNA (umgeschriebene RNA aus unterschiedlichen Zellpopulationen isoliert)
12,5 µl	SYBR-Green Powermix (Reaktionsgemisch inklusive Taq-Polymerase und Nukleotide)
0,5 µl	Primermix (10 µM)
x µl	Aqua dest. ad 25 µl Endvolumen

Alle Proben wurden als Duplikate in einer speziellen 96-Well-Platte angesetzt und die Amplifikation mit einer Real-Time PCR-Maschine durchgeführt. Als Kontrolle diente das Ratten-Haushaltsgen für den Zytoskelettanteil β-Aktin. Das Cycler-Programm bestand wie bei einer herkömmlichen PCR aus Wiederholungen von Denaturierung, Hybridisierung und Verlängerung der DNA. Vor der Reaktion bedarf es zusätzlich einer 15-minütigen Aktivierung der Enzyme bei 95 °C. Das Erstellen einer Schmelzkurve am Ende der PCR-Reaktion durch eine langsame Erhöhung der Temperatur bis auf 95 °C diente dazu, die Spezifität der Amplifikation zu bestimmen.

2.2.17 Agarosegel-Elektrophorese

Die Elektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, mithilfe derer Makromoleküle unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes in einer als Molekularsieb wirkenden Gelmatrix anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Für die Trennung von negativ geladenen Nukleinsäure-Fragmenten (RNA oder DNA) mit einer Größe von 400 bis 20.000 Basenpaaren eignen sich in ionischer Pufferlösung vorliegende Agarosegele. Diese bestehen vornehmlich aus dem hochreinen Algenextrakt Agarose, welcher sich engmaschig zu langen Fäden aus Polymeren vernetzt und die zu trennenden Moleküle bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld behindert. Je höher die Agarose konzentriert ist, desto kleiner sind die Poren des Gels, die wie ein Sieb wirken und zusammen mit der negativen Ladung der Nukleinsäure-Stränge die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle bestimmen. Dabei werden kleine Fragmente der anionischen Nukleinsäuren besonders schnell durch das gallertartige Medium in Richtung der positiv geladenen Anode verschoben.

Unter Berücksichtigung der Länge der zu untersuchenden Fragmente wurde zur Analyse von PCR-Produkten ein 1 %iges Agarosegel mit einer Porengröße von etwa 150 nm verwendet. Durch Verwendung von Ethidiumbromid (0,1 µg/ml), eines zwischen die Basen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes, können die nativ unsichtbaren Nukleinsäuren nach erfolgter Auftrennung im Trägermedium als typische Banden im UV-Transilluminator visualisiert werden. Die Intensität des emittierten Lichtes unter UV-Anregung bei einer Wellenlänge von 254 nm korreliert hierbei mit der Menge der separierten Nukleinsäure.

Zur Herstellung der Gele wurde entsprechend eingewogene Agarosemenge in 1x TAE-Puffer aufgekocht und nach dem Abkühlen auf 60 °C mit Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml in H_2O) versetzt. Anschließend wurde das Agarosegel in einen vorbereiteten Gelschlitten mit Kamm gegossen und nach dem Erstarren in eine mit 1x TAE gefüllte Laufkammer gesetzt. Die durch den Kamm gebildeten Taschen im Gel wurden hier mit den Proben beladen, die zuvor mit Orange G versetzt wurden. Als Größenmarker diente ein 1 kb-Molekulargewichts-Standard. Die Elektrophorese erfolgte spannungskonstant bei 120 Volt, bevor die im Gel aufgetrennten Nukleinsäuren abschließend unter UV-Licht visualisiert und bei Bedarf fotografiert wurden.

2.2.18 Histologie

Für histologische Zwecke wurden die Organe direkt nach der Entnahme für mindestens zwei Stunden in 4 %-igem Paraformaldehyd fixiert. Mit einem Skalpell wurden von den fixierten Organen 5 mm dicke Querschnitte angefertigt und in Einbettungskassetten mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (1x Ethanol 50 %, 1x Ethanol 70 %, 2x Ethanol 80 %, 2x Ethanol 96 %, 2x Ethanol 100 %, 2x Xylol, 2x Paraffin) über Nacht entwässert. Dann folgte die Einbettung in flüssiges Paraffin.

Anschließend wurde von den auf Eis ausgehärteten Paraffin-Blöcken 3 µm dünne Organquerschnitte mithilfe eines Schlitten-Mikrotoms angefertigt, welche in einem Wasserbad auf Objektträger platziert und über Nacht bei 50 °C getrocknet wurden. Zur morphologischen Beurteilung und Differenzierung der Präparate wurden diese abschließend mit Mayers Hämalaun- und einer Eosin G-Lösung angefärbt (Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung). Hierfür wurden die Schnitte zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (2x 15 min Xylol, 2x 2 min Ethanol 99 %, 2x 2 min Ethanol 96 %, 2x 2 min Ethanol 70 %, 1x kurz mit Aqua dest gespült).

Die Kernfärbung erfolgte daraufhin für 10 min in Hämalaun-Lösung, in welcher Hämatoxylin mit positiv geladenen Aluminiumionen eine Komplexverbindung eingeht und im sauren Milieu an die negativ geladenen Phosphatreste der Zellkern-DNA bindet. Eine selektive Kernfärbung wird durch die Azidität der Färbelösung und einen Überschuss an Alaun erreicht.

Nach einer kurzen Spülung mit Aqua dest und einer 10-minütigen Wässerung unter fließendem Leitungswasser, erfolgte im Anschluss an eine weitere Spülung mit destilliertem

Wasser die Gegenfärbung des Zytoplasmas für zwei Minuten in einer 0,1 %igen Eosin G-Lösung. Eosin ist ein saurer Xanthen-Farbstoff, der vornehmlich an Proteine gebunden wird und auf diese Weise Zytoplasma, Kollagen, Keratin und Erythrozyten rot färbt. Nach kurzem Spülen in Aqua dest wurden die Schnitte anschließend mit der aufsteigenden Alkoholreihe (analog zur absteigenden Alkoholreihe in umgekehrter Reihenfolge) erneut entwässert. Zum Abschluss folgte mithilfe des Einschlussmittels Entellan® das Eindecken unter Deckgläschen.

Die vergleichende Auswertung der Schnitte mithilfe eines Lichtmikroskops wurde bei 40-, 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung fotografisch festgehalten.

2.2.19 Statistik

Alle statistischen Analysen wurden computergestützt mit den Programmen GraphPad Prism 5 und Excel 2010 durchgeführt. Alle Daten sind nach Möglichkeit als Mittelwert ± Standardfehler angegeben und wurden mittels ungepaartem Student-t-Test auf signifikante Unterschiede getestet. P-Werte > 0,05 wurden als nicht signifikant betrachtet (n.s.); $*p \leq 0{,}05$, $**p \leq 0{,}01$, $***p \leq 0{,}001$.

3 Ergebnisse

In der Mehrzahl der T-ALL des Menschen werden aktivierende Mutationen im Notch1-Gen gefunden (Weng et al. 2004). Die bislang publizierten Transgen- und Knock-out-Experimente zur Funktionsanalyse von Notch1 in der Lymphomgenese der Maus erbrachten teilweise widersprüchliche Ergebnisse (Radtke et al. 2004; Robey und Bluestone 2004). Im Rahmen früherer Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe wurde daher ein transgenes Rattenmodell entwickelt, in welchem Notch1IC unter der Kontrolle des Thymus-spezifischen proximalen Lck-Promoters exprimiert wird (siehe Abb. 1-3, Kapitel 1.3.3). Junge Notch1IC-transgene (NICA-) Ratten zeigten eine anhaltende prä-TCR-Expression und eine schwer gestörte T-Zellreifung. Früh entwickelten sie thymische Lymphome, die im Zuge einer leukämischen Phase lymphatische und nicht-lymphatische Organe infiltrierten und innerhalb weniger Wochen zum Tode der NICA-Tiere führten.

In der vorliegenden Arbeit sollten unterschiedliche Subklone der NICA-Lymphome charakterisiert, geeignete Bedingungen für eine *In-vitro*-Kultivierung der Lymphomzellen etabliert sowie ihre Sensitivität auf tumorspezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und die Pharmaka Dex, pegyliertes Prednisolon (Liposomen) und Bortezomib im Tierversuch analysiert und miteinander verglichen werden.

3.1 Lymphome aus NICA-Ratten lassen sich wiederholt in syngene Wirte transferieren und induzieren dort neues und aggressives Tumorwachstum

Die verwendeten Lymphomzellen aus NICA-Ratten lagen zu Beginn der Versuchsreihe in cryokonservierter Form vor. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die NICA-Lymphome in syngene Wirte transplantiert und damit neuer Tumorprogress induziert werden könne und ob sich der Phänotyp der Lymphomzellen im Zuge wiederholter Transplantationen verändern würde.

3.1.1 Gewichtsverlauf und Detektion von Lymphomzellen im Blut als Verlaufsparameter *in vivo*

Um den Krankheitsverlauf der Wirte nach dem Lymphomtransfer objektiv abbilden zu können, wurden als Verlaufsparameter deren relativen Körpergewichte erfasst sowie erythrolysiertes Venenblut durchflusszytometrisch auf Lymphomzellen untersucht. Als Wirttiere wurden ausschließlich Lewis-Inzuchtratten in einem Alter von vier bis zehn Wochen und mit einem initialen Körpergewicht zum Zeitpunkt des Lymphomtransfers von 150 bis 250 Gramm verwendet.

Nach einer Latenz von wenigen Tagen nach Lymphomtransplantation stagnierte die physiologische Gewichtszunahme der transplantierten Jungtiere und erste Lymphomzellen

konnten im Venenblut detektiert werden. Im weiteren Verlauf kam es zu einer raschen Abnahme des Körpergewichts mit einem gleichzeitig nahezu exponentiellen Anstieg der leukämischen Infiltrationsrate im Venenblut der Wirte (Abb. 3-1). Bei einem kurzfristigen Körpergewichtsverlust von mehr als 20 % und ausgeprägter Erkrankungssymptomatik wurden die Tiere aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet.

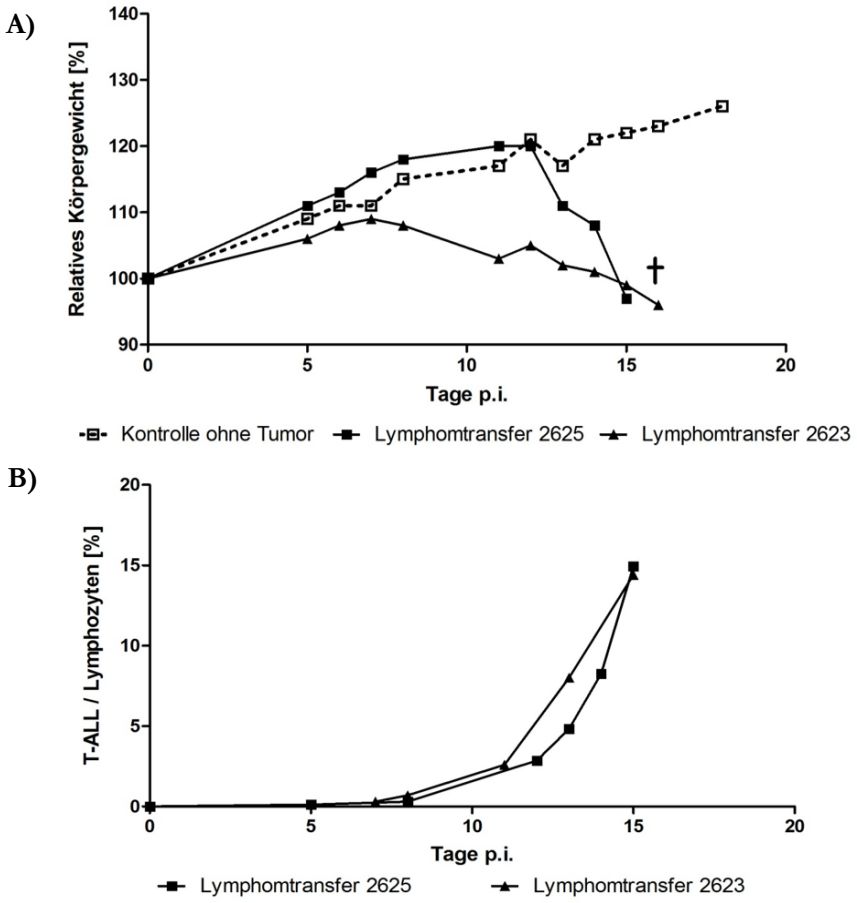

Abb. 3-1 Zur Analyse des Krankheitsverlaufs der Wirttiere wurden Körpergewichte bestimmt und der prozentuale Anteil an Lymphomzellen an allen Lymphozyten im Blut durchflusszytometrisch erfasst. A) Gezeigt ist der zeitliche Verlauf des relativen Körpergewichts nach Lymphomtransfer. Beispielhaft sind hier zwei Wirttiere, in welche unterschiedliche Tumorzelllinien (Lymphomtransfers 2625 und 2623) transplantiert wurden, sowie ein Kontrolltier aufgetragen. Bezugsgröße ist das Initialgewicht zum Zeitpunkt des Lymphomtransfers (Tag 0 post injection = 100 %). Analog zum zeitlichen Gewichtsverlauf zeigt **B)** den prozentualen Anteil der Lymphomzellen an der Gesamtpopulation der Lymphozyten im Venenblut dieser beiden Wirttiere. Die Bestimmung erfolgte durchflusszytometrisch aus erythrolysiertem Schwanzvenenblut mittels Gating nach Abb. 3-2 und Abb. 3-3. Tage p.i.: Tage post injection, ┼: Tiere aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet.

Zur durchflusszytometrischen Detektion der Lymphomzellen im Venenblut der Wirte wurde zunächst die Subpopulation der T-Lymphozyten, unter der sich die Lymphomzellen befinden, anhand ihrer Größe und Granularität sowie der Expression des T-Zellrezeptors abgegrenzt (Abb. 3-2).

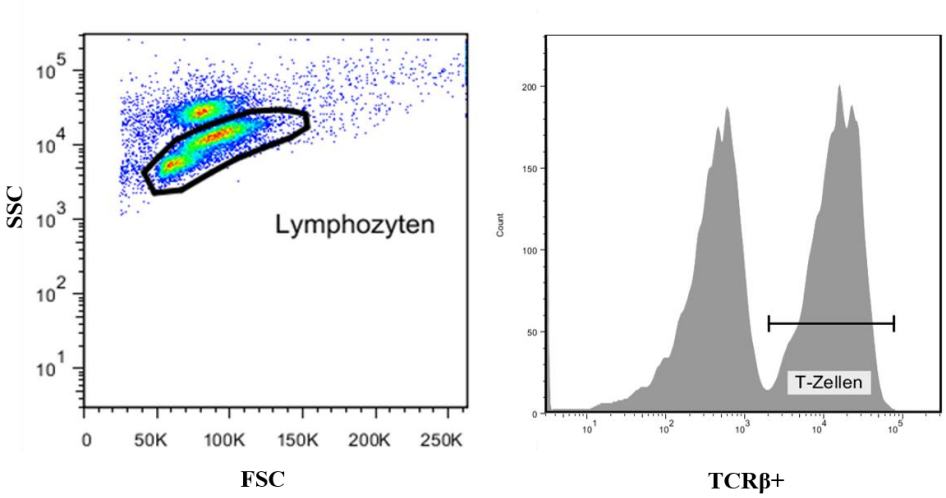

Abb. 3-2 Abgrenzung der T-Lymphozyten und Lymphomzellen in der Durchflusszytometrie. Gezeigt ist beispielhaft das Erstellen der Gates zur Eingrenzung der T-Lymphozyten, unter denen sich die Lymphomzellen befinden. Von den mittels Erythrolyse behandelten Leukozyten im Blut wurden zunächst die Lymphozyten und die Tumorzellen anhand ihrer Zellgröße und Granularität abgegrenzt (siehe Gating links). Nach Färbung der Zellen für die Beta-Kette des T-Zell-Rezeptors (TCRß) konnten anschließend die T-Lymphozyten innerhalb dieser Subpopulation identifiziert werden (siehe Gating rechts). Analyse von je 40.000 Zellen.

Die Subpopulation der T-Lymphozyten wurde anschließend anhand ihrer Expression der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8α aufgetrennt (Abb. 3-3). Aus der Literatur war bekannt, dass Notch1-abhängige Lymphomzellen in der Regel beide Oberflächenmoleküle exprimieren und damit doppeltpositiv ($CD4^+/CD8^+$) sind (Pear et al. 1996; van den Brandt et al. 2006), (vgl. Tabelle 11 in Kapitel 2.1.13). Dies bestätigte sich in der Auswertung dieser Versuchsreihe.

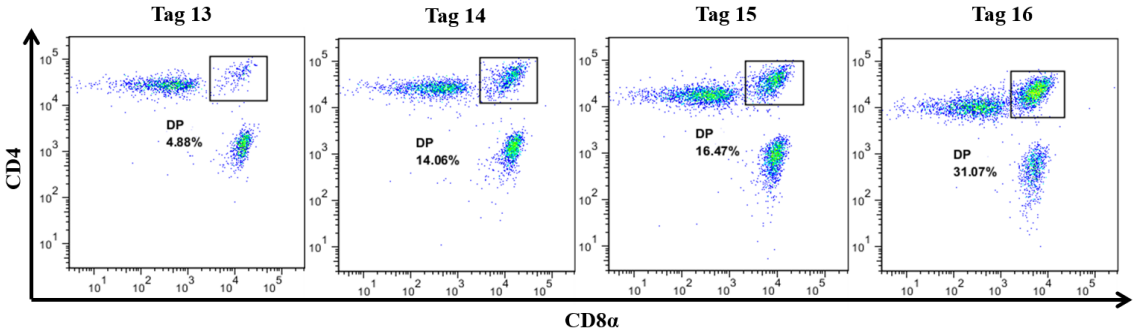

Abb. 3-3 Durchflusszytometrische Erfassung der prozentualen Infiltrationsrate der doppelt-positiven Lymphomzellen im Blut der Wirte. Gezeigt sind beispielhaft die Subpopulationen der T-Lymphozyten basierend auf der Expression von CD4 und CD8α an den Tagen 13 bis 16 nach Lymphomtransfer. Der Anstieg der Infiltrationsrate zeigt sich als prozentualer Anteil der doppelt-positiven T-Zellen bzw. Lymphomzellen in Relation zur Gesamtpopulation aller Lymphozyten im Blut. DP: doppeltpositiv ($CD4^+/CD8^+$).

Der Anteil doppelt-positiver Tumorzellen an den Lymphozyten im Blut stieg bei allen erfolgreich transplantierten Ratten innerhalb weniger Tage rasch an und erreichte im finalen Krankheitsstadium Werte von bis zu 60 % an allen Lymphozyten, bevor die Tiere gemäß tierschutzrechtlicher Bestimmung getötet wurden.

In einer früheren Forschungsarbeit der Arbeitsgruppe war es gelungen, NICA-Ratten mit syngenen eGFP-transgenen Ratten zu kreuzen (van den Brandt et al. 2004a, 2006). Hierdurch war es möglich geworden, die Tumorzelllinie in der Durchflusszytometrie allein anhand von eGFP nachzuverfolgen (Abb. 3-4). Auf diese Thematik wird in Kapitel 3.1.4 detaillierter eingegangen.

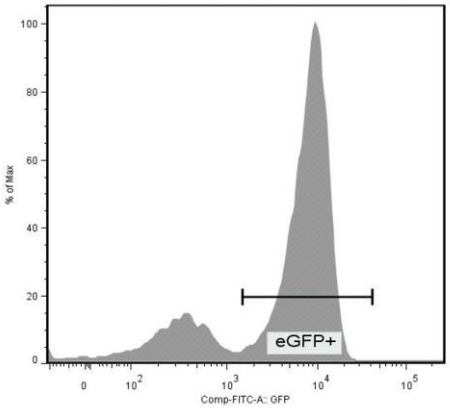

Abb. 3-4 Direkter Nachweis der Lymphomzellen mittels FACS anhand der Expression von eGFP. Alternativ zur bereits gezeigten Erfassung der Lymphomzellen im Blut als doppel-positive Subpopulation der T-Lymphozyten (Abb. 3-2 und 3-3) konnten die Tumorzellen im Blut durchflusszytometrisch auch auf Basis der grünen Fluoreszenz von eGFP detektiert werden. Die hier beispielhaft gezeigte FACS-Analyse der Lymphozyten/Lymphomzellen-Population erfolgte im finalen Krankheitsstadium aus erythrolysiertem Schwanzvenenblut eines Wirttieres.

Insgesamt wurden in den Versuchsreihen dieser Arbeit Lymphome von 16 unterschiedlichen Subklonen aus Notch1IC-transgenen-Ratten intravenös und in variierender Zellzahl von 10^5 bis 10^8 Zellen in insgesamt 122 syngene Lewis-Ratten transplantiert. Der initiale Lymphomtransfer einer Tumorzelllinie beinhaltete meist cryokonservierte thymische Lymphomzellen aus rückgekreuzten Notch1IC-transgenen Lewis-Inzuchtratten der sechsten bis dreizehnten Generation (vgl. Tabelle 11 in Kapitel 2.1.13). Wirte der folgenden Lymphomtransfers erhielten reisolierte Lymphomzellen aus Lymphknoten oder dem Knochenmark von unmittelbar zuvor getöteten Spendern im finalen Krankheitsstadium.

Einzelne Tumorzelllinien konnten auf diese Weise generationsübergreifend von einem Tier auf das nächste übertragen und beliebig oft *in vivo* etabliert werden. Abweichend davon wurden nach dem Lymphomtransfer zweier Tumorzelllinien (1529 und 1779) keine Lymphomzellen im Wirtsblut detektiert und eine Erkrankung der Wirte blieb aus (13 % aller Subklon-Transplantationen). Ob diese Lymphomzellen im Zuge der Cryokonservierung Schaden genommen hatten oder vom Wirt abgestoßen wurden, konnte abschließend nicht geklärt werden. Bei allen anderen Tumorzelllinien wurden frühestens nach fünf bis zehn Tagen Lymphomzellen durchflusszytometrisch im venösen Blut der Wirte festgestellt.

Die unterschiedlichen Zellzahlen der transplantierten Lymphomzellen von 10^5 bis 10^8 Zellen je Wirt hatten keinen Einfluss auf die Penetranz neuen Tumorwachstums im Empfängertier. Zu beobachten war allerdings, dass Wirte, denen eine geringere Tumorzelllast appliziert wurde, zu einem späteren Zeitpunkt Erkrankungssymptome und Lymphomzellen im Venenblut aufwiesen. Der weitere Krankheitsprogress unterschied sich im weiteren Verlauf

nicht von denjenigen Wirten, die mit einer höheren Dosis an Lymphomzellen transfiziert wurden und konsekutiv früher Erkrankungsanzeichen aufwiesen und getötet werden mussten. Die Wirttiere zeigten im Krankheitsverlauf als Zeichen des generationsübergreifend aggressiven Phänotyps der Lymphome neben dem raschen Körpergewichtsverlust progrediente Symptome der Erkrankungsmanifestation wie zum Beispiel Tachydyspnoe, Konjunktivitis und Diarrhoe. In diesem finalen Krankheitsstadium erfolgten Euthanasie und Aufarbeitung der Wirte.

3.1.2 Infiltration von lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen

In früheren Experimenten der Arbeitsgruppe wurde beobachtet, dass die thymischen Lymphome der NICA-Ratten zu einem fortgeschrittenen Krankheitszeitpunkt und im Anschluss an eine leukämische Phase sekundär-lymphatische und nicht-lymphatische Organe infiltrieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eruiert werden, ob und inwieweit diese Organinfiltration auch nach intravenösem Lymphomtransfer in einen syngenen Wirt erfolgt.

Bei der Aufarbeitung der Wirte im finalen Krankheitsstadium zeigten sich im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrolltieren neben einer ubiquitären und massiven Lymphadenomegalie -insbesondere zervikal, retroperitoneal, mediastinal und mesenterial- eine deutliche Spleno- und Thymomegalie. Die Milz imponierte hierbei verplumpt und mit weißlich entfärbtem sowie aufgelockertem Parenchym. In der Mehrzahl der Fälle fanden sich zudem ausgeprägte Lymphknotenkonglomerate im Mesenterium. Das Knochenmark der langen Röhrenknochen, welches sich in den Kontrolltieren makroskopisch rötlich darstellte, erschien in den Wirten weißlich und liquifiziert. Meist zeigte sich auch die Leber geschwollen und multifokal entfärbt. Abbildung 3-5 zeigt die unmittelbar nach Euthanasie gemessenen und in Relation zum gleichzeitigen Körpergewicht gesetzten Organgewichte der Wirte im Vergleich mit gleichaltrigen und -gewichtigen Kontrolltieren.

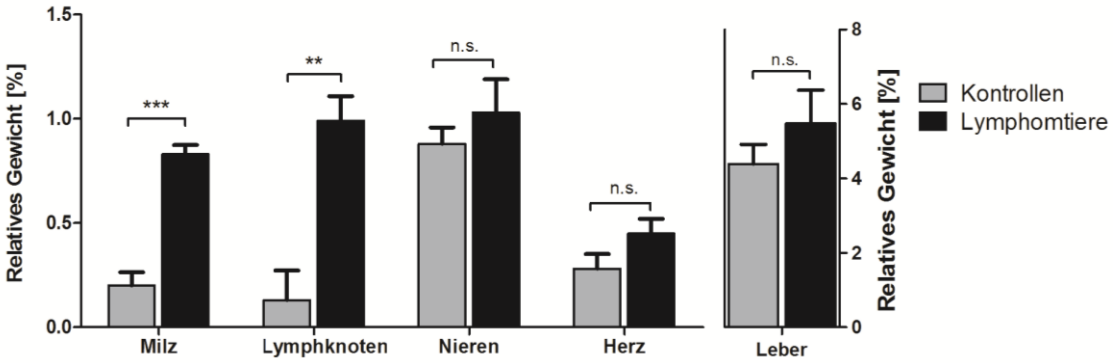

Abb. 3-5 Relative Gewichte ausgewählter lymphatischer und nicht-lymphatischer Organe von gleichaltrigen Kontrolltieren ohne Lymphom und Wirttieren im finalen Krankheitsstadium. Nach Euthanasie der Ratten wurden die Organe durch Kompression weitestgehend ausgeblutet und unmittelbar im Anschluss mittels Feinwaage gewogen. Gezeigt ist das relative Organgewicht bezogen auf das unmittelbar vor Aufarbeitung gemessene Körpergewicht der Ratten. N=6 je Gruppe (teilweise aus unterschiedlichen Versuchsreihen); n.s.: nicht signifikant; *:$p \leq 0{,}05$; **:$p \leq 0{,}01$; ***:$p \leq 0{,}001$.

Die relativen Organgewichte der lymphatischen Organe der Wirte waren signifikant höher als die der Kontrollen. Korrespondierend waren die nicht-lymphatischen Organe der Wirte

relativ schwerer, auch wenn hier kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen zu verzeichnen war. Der Vergleich der absoluten Gewichte der einzelnen Organe erbrachte konkordante Ergebnisse (nicht gezeigt).

Zur Analyse der Lymphominfiltration der sekundär-lymphatischen Organe wurden Lymphknoten, Milz und Knochenmark der Wirte durchflusszytometrisch auf doppelt-positive Lymphomzellen untersucht. Die Anzahl der detektierten Tumorzellen wurde zur Angabe der Infiltrationsrate in Bezug zur Gesamtanzahl der Lymphozyten gesetzt. Abbildung 3-6 zeigt beispielhaft die Auswertung einer solchen Analyse.

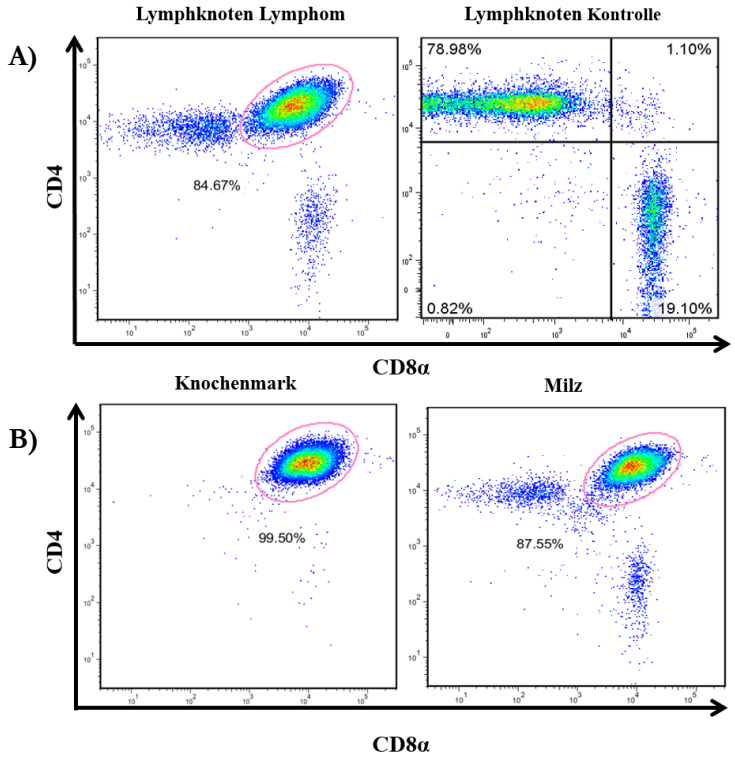

Abb. 3-6 Beispiel einer durchflusszytometrischen Analyse lymphatischer Organe zur Erfassung der Infiltrationsrate. Einzelsuspensionen aus den lymphatischen Organen wurden mittels FACS analysiert. **A)** Gezeigt ist beispielhaft die Analyse von infiltrierten Lymphknoten eines Wirttieres 20 Tage nach dem Lymphomtransfer im Vergleich zu einem gesunden Kontrolltier. Die Detektion der Lymphomzellen erfolgte anhand ihrer Koexpression der Oberflächenproteine CD4 und CD8α. **B)** Analyse der Infiltration von Knochenmark und Milz desselben Wirttieres wie in A) (Tag 20 p.i.). Die prozentuale Angabe der Infiltrationsrate ist jeweils bezogen auf die Gesamtpopulation der Lymphozyten.

Die im Knochenmark gemessene Infiltrationsrate aller Wirte im finalen Krankheitsstadium lag durchschnittlich bei 93 %, sodass die Klassifizierung dieser Neoplasie als T-ALL, bei der definitionsgemäß ein Blastenanteil im Knochenmark von mehr als 25 % postuliert wird (Cortelazzo et al. 2011), bestätigt werden konnte (van den Brandt et al. 2006). In den Lymphknoten und der Milz variierte die Rate an malignen Infiltraten zwischen den Wirten stark. So zeigten einzelne wenige Tumorzelllinien eine massive Knochenmarkinfiltration bei interessanterweise nur geringer Infiltrationsrate in Lymphknoten und Milz. Die durchschnittliche Infiltrationsrate in den Lymphknoten aller Wirte lag bei 47 %, in der Milz bei 43 %. Eine histologische HE-Standardfärbung der Milz bei hoher Infiltrationsrate ließ -bei grundsätzlich erschwerter Abgrenzung der malignen Zellen gegenüber reifen,

physiologischen T-Lymphozyten des Wirtes- eine diffuse Infiltration der weißen Milzpulpa vermuten.

In Anbetracht der riesigen mesenterialen Tumorkonglomerate einiger Wirte stellte sich die Frage, inwieweit die zentralen Anteile dieser massiv vergrößerten Lymphknoten bereits abgestorbene Tumorzellen aufweisen würden, wie es von schnell wachsenden Tumoren mit zunehmendem Perfusionsdefizit bekannt ist. Die durchflusszytometrische Analyse dieser einzelnen Lymphknotenkonglomerate auf nekrotische und apoptotische Zellen (siehe Kapitel 2.2.11) konstatierte eine Rate von 99 % vitaler Lymphomzellen und somit das Fehlen einer häufig bei großen soliden Malignomen beobachteten zentralen Nekrosezone.

Insgesamt bestätigte sich erwartungsgemäß eine aggressive Infiltration der lymphatischen Organe des Wirttieres durch die transplantierten Lymphome. Es verifizierte sich zudem die Beobachtung aus früheren Experimenten der Arbeitsgruppe zu NICA-Ratten, dass im Anschluss an eine leukämische Phase das Knochenmark am schnellsten und massivsten durch die Lymphomzellen infiltriert wird.

3.1.3 Lymphomzellen infiltrieren nicht-lymphatische Organe fokal von den Gefäßen ausgehend

In Kenntnis der aggressiven Infiltration der lymphatischen Organe stellte sich die Frage, ob die intravenös transplantierten Lymphomzellen auch nicht-lymphatische Organe infiltrieren würden.

Hierfür wurden Herz, Nieren, Lunge und Leber moribunder Wirte auf Lymphomzellen untersucht. Aufgrund der technischen Schwierigkeiten einer durchflusszytometrischen Analyse dieser Organe, erfolgte eine histologische Untersuchung mittels HE-Färbung.

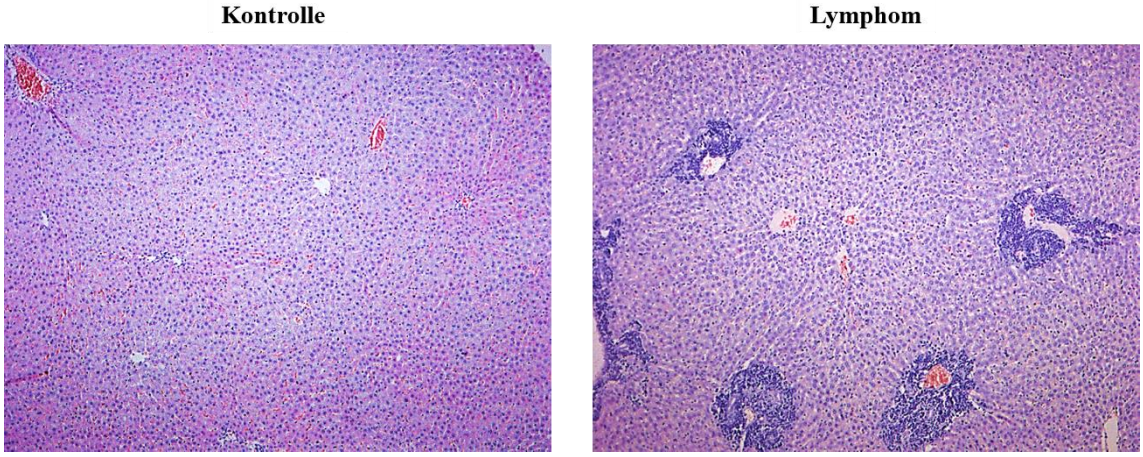

Abb. 3-7 Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Paraffinschnitte von der Leber eines gesunden Kontrolltieres und der eines moribunden Wirttieres im finalen Krankheitsstadium. Zu erkennen sind jeweils mehrere Leberläppchen mit ihren Zentralvenen und umliegenden Portalfeldern. Die von den Portalfeldern ausgehende Parenchym-Infiltration der Lymphomzellen ist anhand ihrer dunkelblauen Färbung gut zu erkennen. 3µm dünne Organquerschnitte, je 40-fache Vergrößerung.

Abbildung 3-7 zeigt exemplarisch die mikroskopische Vergrößerung der Leber eines Wirttieres nach HE-Färbung zum fortgeschrittenen Krankheitszeitpunkt im Vergleich zu der

eines lymphomfreien Kontrolltieres. Die anhand ihrer dunkelblauen Färbung identifizierbaren Lymphoblasten infiltrieren das Leberparenchym von den in Portalfeldern organisierten Blutgefäßen ausgehend. Entgegen der Erwartung einer diffusen Parenchymdurchsetzung erscheint das Infiltrationsmuster der NICA-Lymphome eher als Invasion im Zellverbund, auch wenn das Organ multifokal kleinherdig durchsetzt wird.

In der höhergradigen Vergrößerung der histologischen Schnitte zeigten sich die Lymphoblasten getreu ihrer T-lymphozytischen Abstammung als kleine Zellen mit hoher Kern-Zytoplasma-Relation sowie polymorphen, heterochromatischen und entrundeten Zellkernen (Abb. 3-8).

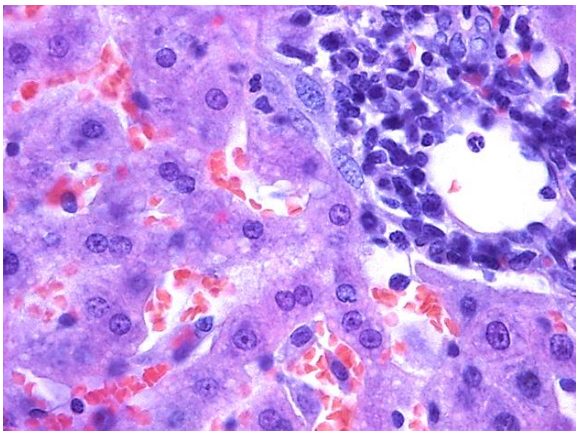

Abb. 3-8 Vierhundertfache Vergrößerung eines HE-gefärbten Paraffinschnittes der Leber von einem Wirttier im finalen Krankheitsstadium. Auf der linken Seite der Abbildung erkennt man reguläre vakuolenreiche Hepatozyten im typischen Verbund sowie intralobuläre Sinusoide mit zahlreichen Erythrozyten. Rechts im Bild zeigt sich ein Portalfeld mit einem von Endothel ausgekleidetem Blutgefäß (intraluminal ist ein segmentkerniger neutrophiler Granulozyt erkennbar), mit großkernigen Kupffer-Zellen (Makrophagen) und kleinen polymorphen Lymphomzellen (dunkelblau gefärbt).

Für das Hodgkin-Lymphom charakteristische Zellformen wie sogenannte einkernige Hodgkin-Zellen oder mehrkernige Sternberg-Reed-Zellen konnten erwartungsgemäß nicht identifiziert werden. Eine Klassifikation der Lymphomzellen anhand ihres histologischen Phänotyps erscheint allerdings in Anbetracht der großen morphologischen Heterogenität der verschiedenen T-Zell-Lymphome ungeeignet.

Die histologische Untersuchung von Nieren und Lunge der Wirte erbrachte vergleichbare Darstellungen der blutgefäßnahen Parenchyminfiltration. In der Makro- und insbesondere Mikroskopie des Myokards imponierten die linksventrikulären Herzmuskelzellen im Vergleich mit gleichgewichtigen Kontrolltieren deutlich hypertrophiert. Infiltrationsherde von Lymphomzellen konnten hier nicht eindeutig identifiziert werden. Die Ätiologie der Herzmuskelzellhypertrophie ist am ehesten als Folge der ausgeprägten Anämie zu deuten, welche im Zuge der massiven Knochenmarksinfiltration und der damit einhergehenden Verdrängung der Hämatopoese auftritt. Bei einigen wenigen Wirten zeigten sich im finalen Krankheitszustand progrediente Paralysen der unteren Extremitäten, sodass von sekundärer Metastasierung ins ZNS auszugehen ist, wie es bekanntermaßen bei der humanen Variante des lymphoblastischen Lymphoms vom T-Zell-Typ beobachtet wird.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass im Zuge der leukämischen Phase eine ubiqitäre Infiltration parenchymatöser und nicht-parenchymatöser Organe erfolgt, welche ihren Ausgang von den kleinen Blutgefäßen nimmt und die Leber initial am massivsten betrifft.

3.1.4 Einzelne Lymphomzellen regulieren im Wirt die Expression von eGFP herunter

Um die Lymphomzellen im Zuge der Transplantationen in neue Wirte besser weiterverfolgen zu können, wurden in einem früheren Projekt der Arbeitsgruppe NICA-Ratten mit syngenen eGFP-transgenen Ratten verpaart (van den Brandt et al. 2004a, 2006). Diese Strategie wird in der Immunologie vornehmlich in Studien eingesetzt, die eine effektive Verfolgung und Identifizierung von spezifischen Leukozyten-Subtypen anhand eines bestimmten zellulären oder genetischen Markers nach adoptivem Zelltransfer in einen syngenen Wirt erfordern (Flügel et al. 2001; Kohm et al. 2002).

Die zu Beginn dieser Arbeit ersttransplantierten Thymome der folgenden NICA-Generationen exprimierten dadurch neben Notch1IC, CD4 und CD8 auch das grün fluoreszierende Protein eGFP. Bei der durchflusszytometrischen Analyse der lymphatischen Organe der Wirttiere im Rahmen dieser Arbeit fiel zunächst auf, dass die Rate an eGFP$^+$ Lymphomzellen je nach Tumorzelllinie stark variierte. So fanden sich einerseits Tumorklone mit nahezu vollständig erhaltener Expression des eGFP sowie andererseits Zelllinien, welche nur noch zu einem geringen Anteil fluoreszierten oder konsistent nicht mehr (Beispiel siehe Abb.3-9).

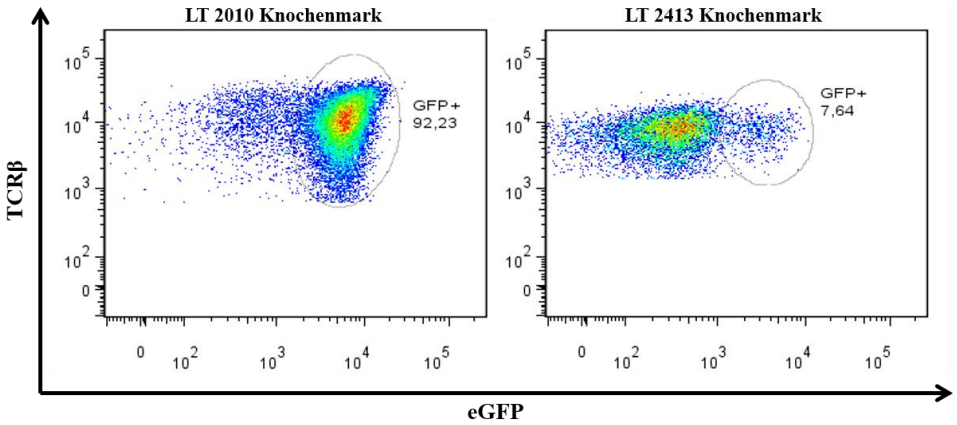

Abb. 3-9 Divergierende Rate an eGFP-exprimierenden Lymphomzellen zwischen verschiedenen Tumorzelllinien. Anhand der Tumorzelllinien 2010 und 2413 werden beispielhaft Divergenzen im Anteil der eGFP-exprimierenden Tumorzellen nach Infiltration des Knochenmarks im finalen Erkrankungsstadium zweier Wirttiere gezeigt. Leukozyten wurden aus dem Knochenmark extrahiert und wie beschrieben mittels Durchflusszytometrie analysiert. Bezugsgröße für die prozentuale Angabe war jeweils die Gesamtpopulation der βTCR-exprimierenden Lymphozyten bei vergleichbar hohen Infiltrationsraten beider Wirte (98 % bei LT 2010 und 97 % bei LT 2413).

Diese Unterschiede im eGFP-Expressionsniveau zeigten sich überraschenderweise auch in verschiedenen infiltrierten Organen innerhalb einzelner Tumorzelllinien. So variierte in einigen Tumorklonen die Rate an Lymphomzellen, welche eGFP exprimierten, in einer

Differenzspanne von bis zu 40 % je nach Organ (Abb. 3-10). Diese Inhomogenitäten bestanden insbesondere bei denjenigen Lymphomen, die bereits mehrfach in neue Empfängergenerationen transplantiert worden waren.

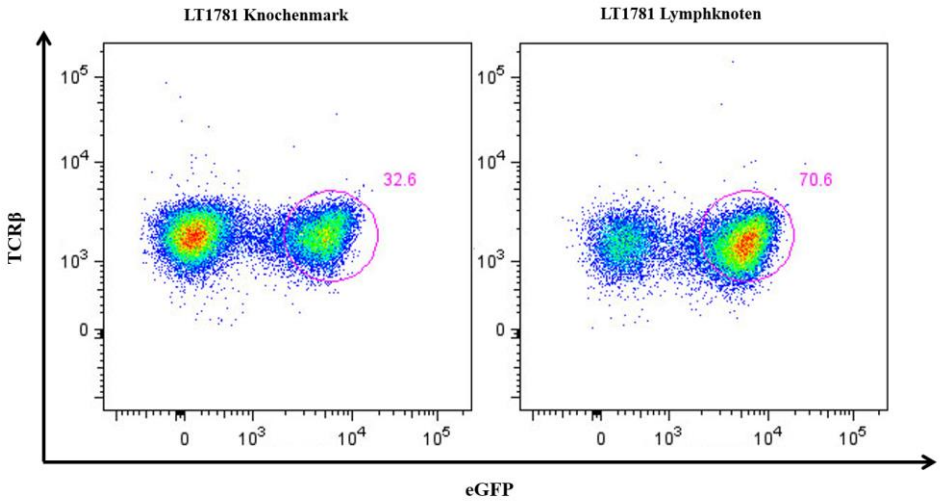

Abb. 3-10 Divergenz der Expression von eGFP je nach infiltriertem Organ innerhalb einer Tumorzelllinie eines Wirttieres. Gezeigt ist beispielhaft der prozentuale Anteil an Lymphomzellen mit Expression von eGFP in infiltriertem Knochenmark (links) und Lymphknoten (rechts) in Relation zu eGFP$^-$-Lymphomzellen nach Transfer der Tumorzelllinie 1781, extrahiert aus demselben Wirttier. Die durchflusszytometrische Analyse von isolierten Leukozyten erfolgte im finalen Stadium der Erkrankung.

Andererseits wurden auch Tumorklone beobachtet, welche unabhängig von der Anzahl der erfolgten Transplantationen und unabhängig vom infiltrierten Organ annähernd konstant hohe Raten an eGFP$^+$ Lymphomzellen aufwiesen. In einigen Fällen war die transferübergreifende Expression des eGFP vollends erhalten. Gleichwohl fanden sich im Rahmen des ersten Transfers auch Lymphome ohne jegliche grüne Fluoreszenz in allen Infiltrationsherden (siehe LT1507 in Abb. 3-11), obgleich die initiale eGFP-Expression in allen NICA-Ratten im Rahmen der früheren Forschungsarbeit der Arbeitsgruppe validiert worden ist (van den Brandt et al. 2006).

Bei denjenigen Tumorzelllinien, welche die Expression von eGFP herunterregulierten, zeigte sich hierfür weder eine selektive Organpräferenz für die Transgen-Expression noch eine kontinuierliche Abnahme der Expression in Bezug auf den repetitiven Transplantationsverlauf. Die Rate an eGFP$^+$ Tumorzellen in den infiltrierten Organen der Wirte ließ somit einen statistisch erfassbaren Trend vermissen.

In einigen Fällen wurden interessanterweise nach Transplantation von Lymphomzellen mit geringer eGFP-Expression im neuen Wirt sehr viel höhere Expressionsniveaus von eGFP in der Lymphomzellpopulation bei vergleichbaren Infiltrationsraten detektiert.

Um einzelne Tumorzelllinien miteinander vergleichen zu können, wurden die Lymphomzellen aus massiv infiltrierten Lymphknoten isoliert, ihre mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von eGFP durchflusszytometrisch ermittelt und in Relation zu der Subpopulation eGFP-negativer CD4$^+$-T-Zellen des Wirttieres gesetzt (Abb. 3-11).

Die MFI repräsentiert die Dichte der Proteinexpression in oder auf der Zelle und soll, wie kürzlich von Chan et al. (2013) publiziert, bei 100 %igem Wertzuwachs in der Durchflusszytometrie erwartungsgemäß einer zweifachen Dichtezunahme des betreffenden Proteins entsprechen. Die Expression eines Oberflächenmarkers (siehe Kapitel 3.2) würde hierdurch sensitiver abgebildet werden als die bisher gebräuchliche Ermittlung der positiv exprimierenden Zellen (%pos) in Relation zur negativen Kontrolle (Kamath et al. 1998; Leposavic et al. 2006).

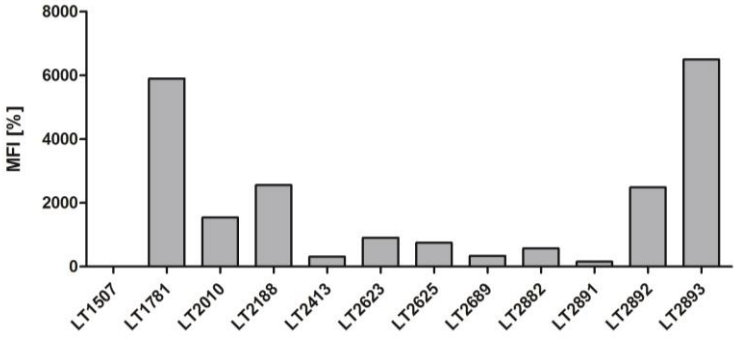

Abb. 3-11 Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von eGFP der unterschiedlichen Tumorzelllinien in Relation zu eGFP-negativen CD4$^+$-T-Zellen der Wirte. Gezeigt ist die Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse von aus infiltrierten Lymphknoten isolierten Lymphozyten bzw. Lymphomzellen im finalen Krankheitsstadium der Wirte. Die MFI von eGFP wurde mit der Software FlowJo ermittelt und in Relation zu den eGFP-negativen CD4$^+$-T-Zellen der jeweiligen Wirtlymphknoten gesetzt. Zeitpunkt der Aufarbeitung der Wirte im Mittel 18 Tage nach Lymphomtransfer. N=1 je Lymphomsubklon, Auswertung von je 40.000 Zellen.

In Anbetracht der großen Streuung der eGFP-Expression in den einzelnen Wirten soll Abbildung 3-11 verdeutlichen, wie im Mittel unterschiedlich stark die eGFP-Genexpression in den Lymphomzellen einzelner Tumorklone herunterreguliert wird. Inwieweit das eGFP der transplantierten Lymphomzellen als Antigen fungiert, als solches durch das wirtseigene Immunsystem detektiert und womöglich attackiert wird und ob daraus ein Überlebens-nachteil oder gar -vorteil der eGFP-exprimierenden Lymphomzellen resultiert, kann anhand dieser, wenn auch darauf hindeutenden Ergebnisse nicht endgültig aufgeklärt werden. Abschließend lässt sich sagen, dass -aufgrund der scheinbar zufälligen Herunterregulierung des Transgens in den Lymphomen- die Verwendung von eGFP zum Zweck einer effektiven und spezifischen Weiterverfolgung der Lymphomzellen nach Transfer in einen syngenen Wirt nicht den erhofften Nutzen erbrachte.

3.1.5 Die Abwesenheit zytotoxischer T-Zellen des Wirttieres hat keinen Einfluss auf die Lymphomprogression

Unter Berücksichtigung der Kenntnis, dass CTL aufgrund ihrer zytotoxischen Eigenschaften maßgeblich an der Identifizierung und Elimination entarteter Zellen beteiligt sind, stellte sich die Frage, ob die An- oder Abwesenheit dieser Zellen im Wirt Einfluss auf die Etablierung und den Progress der Lymphome haben würde.

Unter dieser Fragestellung erfolgten insgesamt 24 simultane Lymphomtransfers mit identischer Tumorzellzahl einerseits in Lewis-Inzuchtratten mit Wildtyp-Genom und

andererseits in CD8 knock-out-Ratten, welche als Folge einer artifiziellen missense-Mutation des CD8α-Gens keine CTL besitzen (Zan et al. 2003; Taurog et al. 2009).

Interessanterweise zeigten sich bei beiden Wirtgruppen sowohl im klinischen Krankheitsverlauf als auch in der durchflusszytometrischen Analyse der Infiltrationsraten von Blut und der lympatischen Organe im finalen Erkrankungsstadium keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3-12).

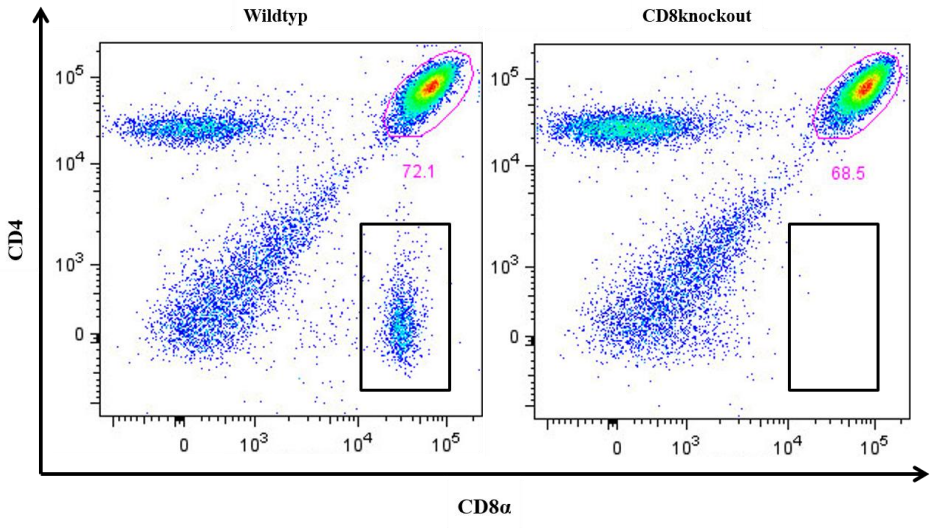

Abb. 3-12 Durchflusszytometrischer Vergleich von hochgradig infiltrierten Lymphknoten eines Wildtyp- und eines CD8 knock-out-Wirttieres am Tag 20 nach Lymphomtransfer. Die prozentuale Angabe der Infiltrationsrate ist bezogen auf die Gesamtpopulation der Lymphozyten. Die absolute Zellzahl der Lymphozyten war unabhängig vom Genotyp in allen untersuchten Tieren vergleichbar. Das Gate zur Erfassung der $CD8^+$ T-Zellen des Wirts ist zur Verdeutlichung des Genotyps bzw. der CTL-Existenz als schwarzer Kasten gekennzeichnet.

Zusammenfassend ließ sich in dieser Versuchsreihe feststellen, dass die An- oder Abwesenheit der CTL im Wirt keinen Einfluss auf Lymphometablierung und -progression hat (vgl. Abb.3-13). Inwieweit dieser Umstand im Zusammenhang mit der Expression von Antigen-präsentierenden Oberflächenmolekülen der Lymphomzellen (v. a. MHC-I) stehen könnte, wird in dem folgenden Abschnitt dieser Arbeit behandelt (Kapitel 3.2).

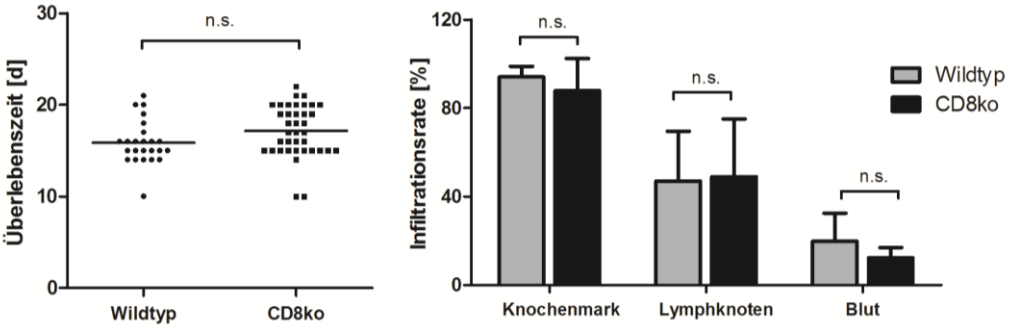

Abb. 3-13 Darstellung der Lymphomaggressivität in Wildtyp- und CD8ko-Wirttieren. Dargestellt sind links die Überlebenszeiten in Tagen nach Lymphomtransfer (je Wirt ein Zeichen) und rechts die Infiltrationsraten in Knochenmark, Lymphknoten und im venösen Blut. Die jeweiligen Infiltrationsraten wurden unmittelbar nach Euthanasie der moribunden Wirttiere im finalen Krankheitsstadium durchflusszytometrisch ermittelt und beziehen sich auf die Gesamtpopulation der organspezifischen Lymphozyten. N=24 für Wildtyp und n=38 für CD8ko. Mediane Überlebenszeit der Wildtyp-Wirttiere: 15,88 ± 0,49 Tage, mediane Überlebenszeit der CD8ko-Wirttiere: 17,16 ± 0,45 Tage.

3.2 Subklone der Lymphome aus NICA-Ratten differieren im zellulären Phänotyp

Seit der ersten publizierten Kultivierung einer T-ALL-Zelllinie im Jahr 1965 (Foley et al. 1965) werden inzwischen viele unterschiedliche Lymphomzelllinien für immunologische und molekulare Studien entweder als Modell für die T-Zell-Lymphome oder als Vertreter ihres vermeintlichen normalen Ursprungspendants verwendet (Griesinger et al. 1989; Drexler et al. 1994). Durch die Entwicklung spezifischer monoklonaler Antikörper ist es zudem möglich geworden, Phänotyp und gegebenenfalls zugehöriges Entwicklungsstadium einer malignen lymphoproliferativen Erkrankung genau zu charakterisieren (Foon und Todd 1986). In der Diagnostik und Einteilung der akuten Leukämien ist daher die multiparametrische Durchflusszytometrie nach wie vor die Methode der Wahl zur Erfassung des Blastentyps sowie zur Detektion veränderter Antigenprofile (Vardiman et al. 2009; van Dongen et al. 2012).

Bei Untersuchungen zu einzelnen der hier analysierten Thymome aus NICA-Ratten war in einer früheren Forschungsarbeit der Arbeitsgruppe aufgefallen, dass die thymischen Lymphomzellen unerwartete phänotypische Eigenschaften aufweisen (van den Brandt et al. 2006). So proliferieren sie trotz der Abwesenheit des NF-κB-Signals und der Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen aus der Bcl-2-Familie. Zudem exprimieren sie neben hohem Level an CD2 auch CD30, ein Marker für die anaplastisch großzelligen T-Zell- und Hodgkin-Lymphome.

Ziel dieser Arbeit war es nun, die NICA-Lymphome anhand ihrer Oberflächenmarker zu charakterisieren und gegebenenfalls Unterschiede im zellulären Phänotyp einzelner Subklone zu erfassen. Hierin bestand einerseits die Erwartung, dass in Annahme einer monoklonalen Genese der Lymphome ihrer potentiellen Ursprungszelle ein Stadium der Thymozyten-Entwicklung zugeordnet werden kann und dass andererseits bei hoher Expression des MHC-I-Komplexes tumorspezifische Angriffsstellen für den therapeutischen Einsatz von selektiv stimulierten CTL auszumachen sein könnten. In Kenntnis der T-Zell-Abstammung und der leukämischen Entfaltung der NICA-Lymphome mit konsekutiv aggressiver Infiltration in lymphatische und nicht-lymphatische Organe sowie mit Nachweis eines Lymphoblastenanteils im Knochenmark von deutlich mehr als 25 % konnten die NICA-Lymphome bereits definitionsgemäß und unstrittig als T-ALL klassifiziert werden (van den Brandt et al. 2006).

Um die Lymphomzellen genauer zu charakterisieren, erfolgte eine durchflusszytometrische Untersuchung bestimmter elementarer und spezifischer Oberflächenproteine, welche zum Teil im Zuge der physiologischen T-Zell-Entwicklung hoch- und herunterreguliert werden (Aspinall et al. 1991; Zúñiga-Pflücker und Lenardo 1996; Hünig et al. 2001). Hierbei handelte es sich im Einzelnen um die Marker CD2, CD4, CD5, CD8α, CD8β, CD11α(LFA-1), CD25, CD28, CD31, CD44H, CD45RC, CD49D(VLA-4), CD53, CD54, CD62L, CD90(Thy-I), CD134, βTCR, γδTCR, RT1-A, -B und -D sowie um die variablen αTCR-Ketten (Vα-Ketten) Vα4 und Vα8 und die variablen βTCR-Ketten (Vβ-Ketten) Vβ3.3, Vβ8.2,

Vβ8.5, Vβ10, Vβ13 und Vβ16. Tabelle 13 im Anhang zeigt einen Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten Oberflächenproteine der Rattenleukozyten, die jeweils exprimierenden physiologischen Zellarten von Relevanz sowie Auszüge ihrer bis dato angenommenen Funktion.

Für die durchflusszytometrische Charakterisierung der einzelnen NICA-Lymphomzelllinien anhand ihres Oberflächenprofils wurden die aus infiltrierten Lymphknoten isolierten Lymphomzellen auf Basis ihrer βTCR-Expression und Koexpression von CD4 und CD8 von den wirtseigenen Leukozyten abgegrenzt (vgl. Kapitel 3.1.1) und in Annahme ihrer Monoklonalität durch Ermittlung der MFI für das jeweilige Oberflächenprotein mit dem analogen Expressionsniveau reifer $CD4^+$ T-Zellen des Wirtes verglichen.

Beim Vergleich der Lymphomzelllinien aus den unterschiedlichen NICA-Ratten zeigten sich in dieser Arbeit prägnante Abweichungen im Expressionsprofil der untersuchten Oberflächenproteine. So exprimierten die meisten Lymphomzelllinien die β-Kette des T-Zell-Rezeptors in moderater bis hoher Intensität. Ein Subklon (2893) wies dagegen einen etwa zweifachen Dichtebesatz der β-Kette des T-Zell-Rezeptors auf und drei Subklone (2689, 2882 und 2891) exprimierten wenig bis gar kein βTCR (Abb. 3-14). Die alternative Expression von γδTCR konnte in keiner Lymphomzelllinie detektiert werden.

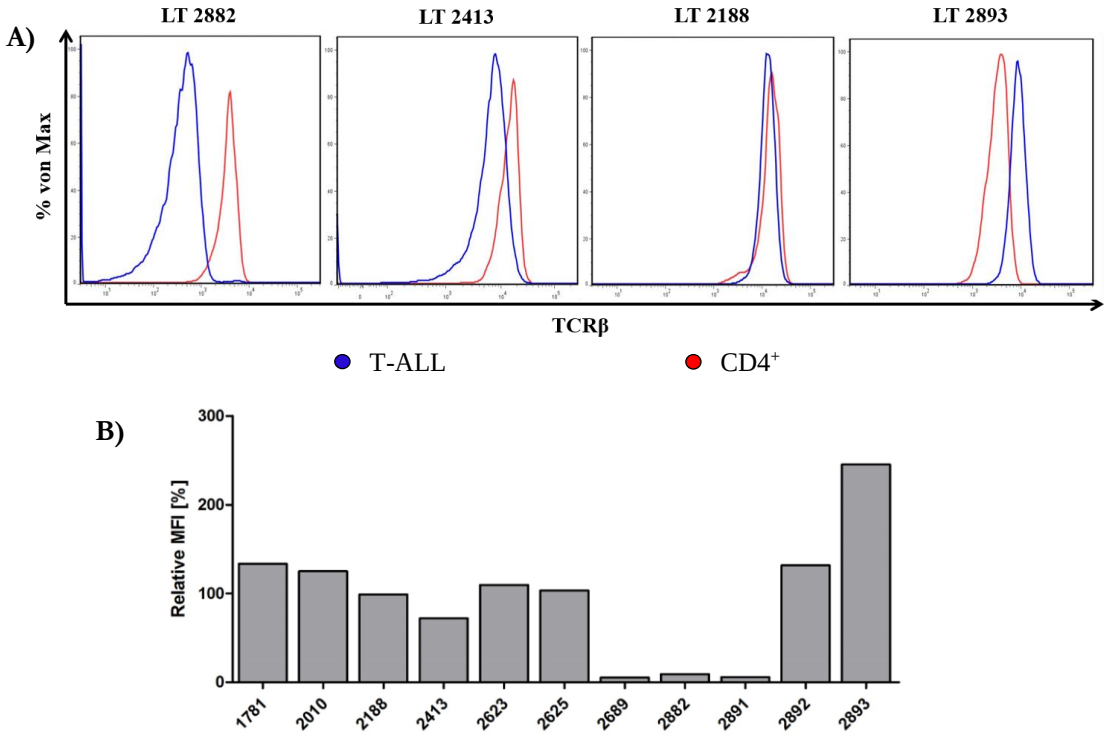

Abb. 3-14 Divergierende Expression der β-Kette des TCR im Vergleich der unterschiedlichen Tumorzellklone. Es wurden dieselben Zellproben wie in Abb. 3-11 verwendet. **A)** Gezeigt ist beispielhaft die FACS-Analyse (overlay) von reifen $CD4^+$ T-Zellen des Wirtes (rot) und den transferierten $CD4^+/CD8^+$-Lymphomzellen (T-ALL, blau). Die verwendeten Zellen wurden im finalen Erkrankungsstadium aus infiltrierten Lymphknoten des Wirttieres isoliert. Dargestellt ist jeweils das Expressionslevel der β-Kette des T-Zellrezeptors (LT=Lymphomtransfer). **B)** Unter der Prämisse, dass das durchschnittliche TCR-Expressionslevel auf reifen wirtseigenen $CD4^+$ T-Zellen annähernd konstant ist, zeigt dieses Balkendiagramm analog zur Abb. 3-11 die MFI der β-Kette des TCRs der transferierten Lymphome in Relation zu den reifen $CD4^+$ T-Zellen des Wirtes.

Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass die Thymozyten junger gesunder NICA-Ratten und einzelne NICA-Lymphomzelllinien hohe Level an prä-Tα exprimieren und konsekutiv die αTCR-Expression bei unveränderter βTCR-Expression vermindert ist (van den Brandt et al. 2005, 2006). Die prä-Tα- und βTCR-Expression dieser Lymphomzelllinien wurde als Hinweis darauf gedeutet, dass die Lymphome aus Thymozyten hervorgehen, welche die β-Selektion im Rahmen der TCR-Etablierung bereits durchlaufen, aber noch keinen vollständigen αβTCR ausgebildet hatten (van den Brandt et al. 2006).

Die weitere durchflusszytometrische Expressionsanalyse anderer Oberflächenmoleküle bestätigte die phänotypische Heterogenität der NICA-Lymphomsubklone. Abbildung 3-15 zeigt eine Auswahl der durchgeführten Expressionsanalysen zum Vergleich der Lymphomsubklone.

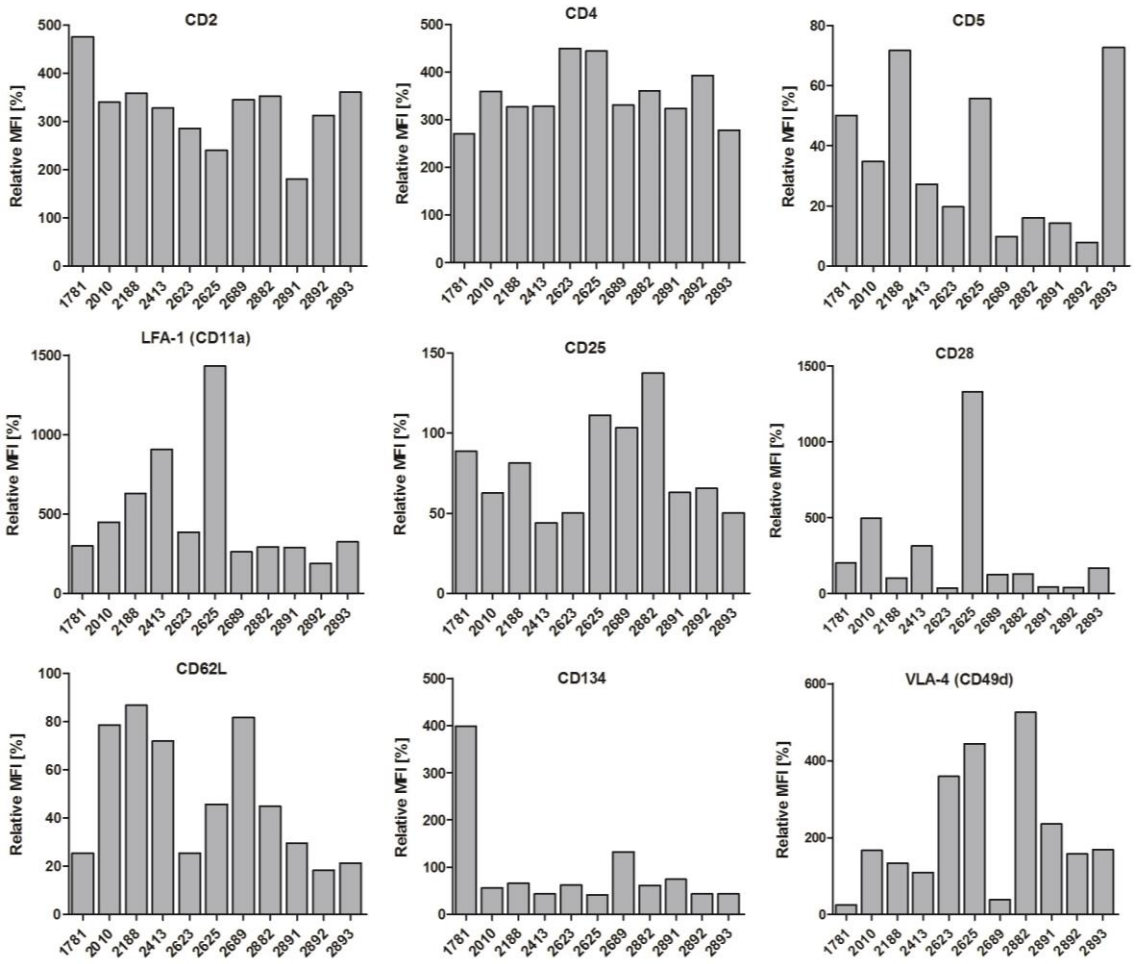

Abb. 3-15 MFI ausgewählter Oberflächenproteine auf den Lymphomzellen der Tumorzellsubklone. In Analogie zu Abbildung 3-11 und 3-14B sind hier die relativen Expressionslevels ausgewählter Oberflächenproteine der einzelnen Tumorzellklone dargestellt. Bezugsgröße zur Ermittlung der relativen Fluoreszenzintensitäten waren die wirtseigenen $CD4^+$ T-Zellen.

Ein nahezu einheitlich hohes Expressionslevel aller Zellklone zeigte sich demnach nur für die Marker CD2 und CD4. Die α-Kette des CD8-Korezeptors wurd mit Ausnahme eines Subklons (2893), bei welchem kein CD8-Molekül detektiert wurde, ebenfalls homogen auf hohem Niveau exprimiert (nicht gezeigt). LFA-1(CD11α) konnte gleichwohl auf allen

Lymphomzelllinien nachgewiesen werden, auch wenn hierbei die grundsätzlich hohe Expressionsdichte stark variierte. Dagegen waren auf den NICA-Lymphomzellen komparabel die Oberflächenmarker CD5, CD8β, CD31, CD45RC und CD53 teilweise stark herunterreguliert.

Die Auswertung der Expressionsdichte der übrigen untersuchten Oberflächenproteine (CD25, CD28, CD44H(nicht gezeigt), CD49d, CD54(nicht gezeigt), CD62L, CD90(nicht gezeigt) und CD134) ergab ein stark heterogenes Bild und erlaubt unter Berücksichtigung der Methodik und der Referenzpopulation der reifen $CD4^+$ T-Zellen, deren Expressionsprofil in Abhängigkeit von ihrem Aktivierungszustand zum Teil nicht eindeutig zu definieren ist, keine endgültige Aussage über die grundsätzliche Expression dieser Oberflächenproteine aller NICA-Zellklone und hat vielmehr die generelle Divergenz im Phänotyp der einzelnen Lymphomsubklone veranschaulicht.

Unter Berücksichtigung der beträchtlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Subklonen lässt sich somit kein einheitlicher Immunphänotyp für die Lymphome aus NICA-Ratten feststellen. Dennoch ermöglicht die Bestimmung des durchschnittlichen Expressionsniveaus aller Lymphomzelllinien für jeden Oberflächenmarker eine ungefähre Einschätzung von Abstammung und Entwicklungsstadium der neoplastisch veränderten Ursprungszellen dieser Notch1IC-abhängigen Lymphomgenese (Abb. 3-16).

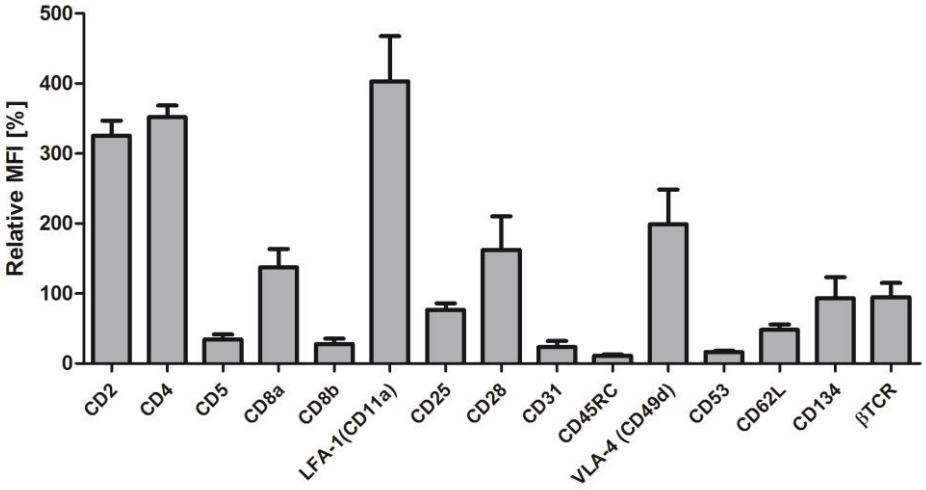

Abb. 3-16 Durchschnittliches Expressionsniveau ausgewählter Oberflächenproteine der Lymphome. Gezeigt ist jeweils der Durchschnitt der relativen MFIs der einzelnen Oberfächenproteine aller untersuchten Tumorzellklone (N= 11). Bezugsgröße zur Ermittlung der relativen Fluoreszenzintensitäten waren analog zu vorherigen Analysen die wirtseigenen reifen $CD4^+$ T-Zellen.

Zu Beginn dieser Arbeit bestand die Intention, eine *In-vivo*-Therapie der Lymphome durch Einsatz von spezifischen CTL zu etablieren, welche zuvor *in vitro* über die MHC-I-Präsentation tumorspezifischer Antigene generiert werden sollten. Grundsätzliche Voraussetzung hierfür sind eine hohe Expression des MHC-I-Komplexes auf den Lymphomzelle mit entsprechender Antigen-Präsentation und eine suffiziente *In-vitro*-Kultivierung der malignen Zellen. Die Lymphomzelllinien wurden daher durchflusszytometrisch auf die Expressionsdichte der MHC-I Moleküle der Ratte RT1A, RT1B und

RT1D untersucht. Hierbei zeigte sich für alle Zellklone eine niedrige oder gar fehlende Expression von RT1B, RT1D und insbesondere RT1A (nicht gezeigt).

In diesem Kontext ist bekannt, dass in neoplastisch transformierten Zellen häufig die MHC-Expression und -Präsentation herunter- oder dysreguliert wird, sodass ihre Erkennung durch CTLs oftmals unterbleibt (Festenstein und Schmidt 1981; Schmidt und Festenstein 1982; Bernards et al. 1983; Henseling et al. 1990). Dies bietet gleichfalls einen Erklärungsansatz für die fehlende Divergenz in Lymphometablierung und -progression zwischen Wildtyp- und CD8 knock-out-Wirten (Kapitel 3.1.5).

Um im Weiteren die Klonalität der Lymphome zu verifizieren, erfolgte eine durchfluss-zytometrische Analyse der Tumorzelllinien unter Verwendung monoklonaler Antikörper für verschiedene variable Gensegmente des TCR. Mithilfe dieser Methodik war es der Arbeitsgruppe vorab durch Nachweis einer singulären Expression eines unikalen Vβ-Segmentes in drei untersuchten NICA-Lymphomen gelungen, die Abstammung der neoplastischen Zellen von einer einzelnen Vorläufer-T-Zelle mit einheitlich umgelagertem TCR-Genlocus zu konstatieren (van den Brandt et al. 2006).

Diese Ergebnisse ließen sich im Rahmen dieser Arbeit nicht reproduzieren. So konnte unter Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper gegen die variablen Gensegmente der α-und β-TCR-Ketten Vα4, Vα8, Vβ3.3, Vβ8.2, Vβ8.5, Vβ10, Vβ13 und Vβ16 keine eindeutig uniforme Expression einer einzelnen dieser TCR-Ketten in den Lymphomzelllinien detektiert werden (nicht gezeigt).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Lymphome aus NICA-Ratten keinen einheitlichen Immunphänotyp aufweisen und in Anbetracht der niedrigen Expression der MHC-I Moleküle einer tumorspezifischen Behandlung mittels *in vitro* stimulierter T-Lymphozyten wahrscheinlich nicht zugänglich sind.

3.3 NICA-Lymphomzellen neigen zu Spontanapoptose *ex vivo*

In früheren Experimenten mit NICA-Ratten hatte sich gezeigt, dass unreife TCRβ^{high}-Thymozyten der Notch1IC-transgenen Jungtiere signifikant sensibler mit Spontanapoptose auf eine *In-vitro*-Kultivierung reagieren als Wildtyp-Thymozyten (van den Brandt et al. 2005). Interessanterweise wurde in dem gleichen Experiment ein solches Charakteristikum für die doppelt-positiven Thymozyten der NICA-Ratten nicht beobachtet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun die Anfälligkeit der NICA-Lymphomzellen zur Spontanapoptose *ex vivo* untersucht und geeignete Bedingungen für eine *In-vitro*-Kultivierung der Lymphome entwickelt werden.

Hierzu wurden mittels magnetischer Beads isolierte Lymphomzellen in unterschiedlichen Nährmedien kultiviert und die Rate an vitalen Zellen in regelmäßigen Intervallen durchflusszytometrisch ermittelt (Q4 in Abb. 3-17).

Dabei fiel auf, dass die doppelt-positiven Lymphomzellen überproportional zu spontanem Zelltod *in vitro* neigen und die erwartete Proliferation der neoplastischen Zellen unter den gängigen Kulturbedingungen ausbleibt. Innerhalb weniger Tage waren nur noch vereinzelt vitale Lymphomzellen in den Kulturen detektierbar. Gegenüber dem nekrotischen Zelluntergang überwog hierbei der apoptotische Mechanismus des programmierten Zelltodes (Abb. 3-17).

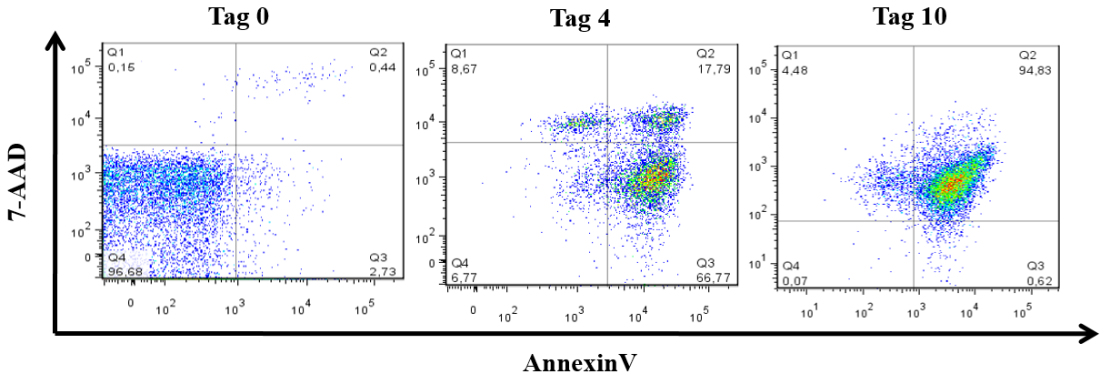

Abb. 3-17 FACS-Verlaufsanalyse zur Ermittlung der Überlebensrate von Lymphomzellen ex vivo. Die Lymphomzellen wurden im finalen Erkrankungsstadium aus dem stark infiltrierten Knochenmark eines CD8ko-Wirttieres extrahiert und auf Basis der Expression ihres CD8-Moleküls mittels magnetischer Zellseparation aufgereinigt. Intendierte Reinheitsgrade um 98 % wurden durchflusszytometrisch evaluiert (Tag 0). Die Kultivierung erfolgte unter den in Tabelle 12 aufgeführten Bedingungen in einem Brutschrank. Zur Ermittlung der Überlebensraten wurden an Tag 4 und 8 Aliquote entnommen, mittels Antikörpern gegen CD4 und CD8 sowie mit AnnexinV und 7-AAD gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nekrotische Zellen werden durch 7-AAD gefärbt, apoptotische durch AnnexinV. Vitale Zellen werden demnach im Sektor Q4 erfasst. Gezeigt sind hier beispielhaft die FACS-Auswertungen unter den Kulturbedingungen Nr. 13 (siehe Tabelle 12).

Durch umfangreiche Variation von Nährmedium, Zusätzen und Art der Kultivierungsplatte wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 24 unterschiedliche Kulturbedingungen für eine *In-vitro*-Etablierung der Lymphomzellen geprüft (siehe Tabelle 12 auf Seite 71).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter keiner der eingesetzten Konditionen eine entsprechende Überlebensrate beobachtet wurde oder gar eine Expansion der malignen Zellen aufgetreten ist. Selbst der adäquate Einsatz von GM-CSF und Interleukin-7 zeigte keinen limitierenden Effekt auf die rasch auftretende Spontanapoptose. Spätestens nach 10 Tagen konnte trotz engmaschigem Medienwechsel mit allen Zusätzen keine vitale Tumorzelle aus sämtlichen Kulturen mehr erfasst werden.

In Anbetracht dieser Ergebnisse erfolgte die sich anschließende Versuchsreihe zur differentiellen Pharmakotherapie der Lymphome ausschließlich im Tiermodell (Kapitel 3.4).

Tabelle 12 Kulturbedingungen und temporäre Überlebensraten der Lymphomzellen *ex vivo*

Nr.	Medium	Zusätze	Mikrotiterplatte	AnnexinV/ 7-AAD negative Zellen [%] Tag p.i. 0	4	8
1	**RPMI 1640** +1 % Penicillin/ Streptomycin	+ 10 % FCS	Gewebekultur	97	32	8
2			Suspensionskultur		18	
3		+ 30 % FCS	Gewebekultur	99	22	4
4			Suspensionskultur		14	
5		+ 10 % Rattenserum	Gewebekultur		9	<1
6			Suspensionskultur		10	
7		+ 30 % Rattenserum	Gewebekultur	96	12	<1
8			Suspensionskultur		8	
9	+ 10 % FCS	+ 10 ng/ml GM-CSF	Gewebekultur		34	7
10			Suspensionskultur	98	23	5
11		+ 10 ng/ml IL-7	Gewebekultur	99	14	1
12			Suspensionskultur		37	8
13	**D-MEM** +1 % Penicillin/ Streptomycin + Glutamax	+ 10 % FCS	Gewebekultur	97	7	<1
14			Suspensionskultur		9	
15		+ 30 % FCS	Gewebekultur		12	2
16			Suspensionskultur	97	8	
17		+ 10 % Rattenserum	Gewebekultur		5	<1
18			Suspensionskultur		6	
19		+ 30 % Rattenserum	Gewebekultur		6	<1
20			Suspensionskultur	99	7	
21	+ 10 % FCS	+ 10 ng/ml GM-CSF	Gewebekultur	98	7	
22			Suspensionskultur		9	4
23		+ 10 ng/ml IL-7	Gewebekultur	96	5	
24			Suspensionskultur		9	

3.4 Neue Therapieansätze zur Pharmakotherapie der Notch1IC-abhängigen T-ALL

Nachdem die kombinierte Polychemotherapie mit Verwendung von Zytostatika unterschiedlicher Wirkmechanismen Einzug in die klinischen Standardtherapieregime vieler Karzinomentitäten erhalten hatte, wurde bei den Patienten mit T-ALL trotz allem ein besonders hohes Rezidivrisiko registriert. So blieben trotz signifikanter Verlängerung des Gesamtüberlebens von Patienten mit B-ALL durch Anwendung der ersten Chemotherapie-Konzepte zunächst Prognose und Heilungsraten von Patienten mit T-ALL unverändert schlecht (Silverman und Sallan; Thomas et al. 1999; Tavernier et al. 2007). Dies unterstreichte jahrelang die Notwendigkeit neuer antileukämischer Medikamente mit verbessertem Wirkprofil (Dopfer et al. 1991; Forman et al. 1991; Biggs et al. 1992; Barrett et al. 1994; Schroeder et al. 1999; Larson und Stock 2008). Die genauen zellulären und molekularen Mechanismen, welche die Aggressivität und das schlechte Therapieansprechen der T-ALL bedingen, sind

trotz intensiver Forschung bis heute weitestgehend ungeklärt. In Studien zur Effizienz und Verträglichkeit der Polychemotherapie bei T-ALL zeigte sich zudem, dass die Verlängerung des rezidivfreien Überlebens durch eine intensivierte Chemotherapie auf Kosten einer hohen Inzidenzrate lebensbedrohlicher und einschränkender Toxizitäten erlangt wird (Ochs und Mulhern 1994).

Ziel dieser Arbeit war es, das Ansprechen der NICA-Lymphome auf neue Therapieansätze mittels pegyliertem Prednisolon (Liposomen) und Bortezomib im Vergleich zu freiem hochdosiertem Dex zu evaluieren.

3.4.1 Liposomen erbringen im Vergleich mit freiem Dex keine Lebensverlängerung

In dieser Arbeit sollte die Behandlung der T-Zell-Lymphome aus NICA-Ratten mittels pegyliertem Prednisolon (Liposomen) und mittels freiem hochdosiertem Dex im Tiermodell verglichen werden. In Anbetracht der bekannten Sensibilität normaler doppelt-positiver Thymozyten auf Glukokortikoide (Herold et al. 2006), bestand die Erwartung, dass die ebenfalls doppelt-positiven Lymphomzellen der NICA-Ratten auf eine entsprechende Therapie mit Dex oder Liposomen überaus effizient ansprechen müssten.

Zu Beginn dieser Versuchsreihe wurden zwei unterschiedliche Tumorzelllinien (1781 und 2623) in jeweils sechs männliche Geschwisterratten intravenös transplantiert. Die körpergewichtsgepaarte, randomisierte Pharmakotherapie erfolgte zu dem definierten Zeitpunkt, zu dem in der Durchflusszytometrie venöser Blutproben der Wirte zweifelsfrei doppelt-positive Lymphomzellen detektiert wurden. Sodann wurden mittels parenteraler Injektion die Liposomen oder Dex simultan appliziert.

Je Kohorte wurde die Hälfte der behandelten Tiere 72 Stunden später getötet, ihre lymphatischen Organe sowie erneut Venenblut durchflusszytometrisch und eine Auswahl an Organen histologisch analysiert. Bei der zweiten Hälfte der behandelten Wirte erfolgten im weiteren Verlauf engmaschige Blutuntersuchungen und weitere simultane Injektionen der entsprechenden Medikamente jeweils nach erneuter Erfassung von Lymphomzellen im Blut, jedoch frühestens sieben Tage nach vorhergehender Behandlung. Bei einem Körpergewichtsverlust von mehr als 20 Prozent des Ausgangsgewichts oder schwerer klinischer Symptomatik erfolgte aus tierschutzrechtlichen Gründen die Euthanasie der Wirttiere mit anschließender Aufarbeitung und Untersuchung ihrer Organe. Abbildung 3-18 zeigt den Verlauf der Infiltrationsraten im Blut der Wirte je Behandlungsgruppe und der Kontrollen sowie die Zeitpunkte der simultanen Arzneimittelapplikation. Der stetige Verlust des Körpergewichts nach Erreichen der leukämischen Phase ergab in den drei zu vergleichenden Gruppen der Wirte keine signifikanten Unterschiede und entsprach in etwa dem in Kapitel 3.1.1 gezeigten Verlauf.

Die Verlaufsanalyse der Infiltrationsrate im Blut zeigt im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen ein partielles bis gutes Ansprechen der Lymphome auf die steroidale Pharmako-

therapie. So konnte bei den mit Dex behandelten Wirten ein temporäres Absinken der Infiltrationsrate im Blut auf Werte unter 3 % sowie eine deutliche Verlängerung des Überlebens erreicht werden (im Mittel um 16 Tage gegenüber den Kontrollen). Im Falle des Lymphomtransfers 2623 wurden nach der ersten Behandlung mit Dex und nach konsekutiver Zurückbildung der leukämischen Phase gar für mehrere Tage keine Lymphomzellen im venösen Blut des Wirtes registriert. Nach erneutem Anstieg des leukämischen Infiltrats ab Tag 30 nach Lymphomtransfer erwies sich hier eine erneute Verabreichung von Dex jedoch nahezu wirkungslos bezüglich der Rate an malignen Zellen im Blut und den weiteren klinischen Verlauf. Diese unerwartet früh auftretende Dex-Resistenz zeigte sich auch in weiteren Experimenten zur Therapie der Lymphome und wird in Kapitel 3.5 ausführlich thematisiert.

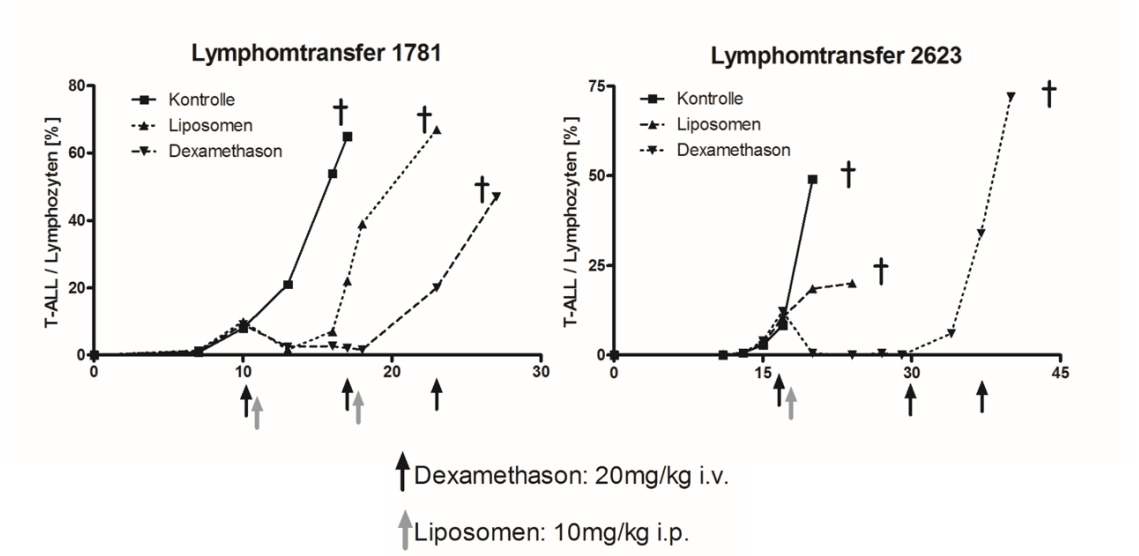

Abb. 3-18 Durchflusszytometrische Verlaufsanalyse der Infiltrationsrate im Blut von Wirttieren unter Pharmakotherapie mit Dex oder Liposomen im Vergleich mit Kontrollwirten ohne Behandlung. Nach Lymphomtransfer (Tag 0) der Tumorzelllinien 1781 und 2623 erfolgte jeweils die erste intraperitoneale oder -venöse Pharmakotherapie bei durchflusszytometrischer Detektion von T-ALL im venösen Blut der Wirttiere (Tag 10 bzw. Tag 17 p.i.). Bei Lymphomtransfer 1781 wurden die Pharmaka an den Tagen 10, 17 und 24, bei Lymphomtransfer 2623 an den Tagen 17, 30 und 37 appliziert. Die Bestimmung der Infiltrationsrate erfolgte durchflusszytometrisch und ihre Angabe jeweils in Bezug zur Gesamtpopulation der Lymphozyten im Blut. Die Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der Behandlung. X-Achse = Tage p.i., ┼: Tiere aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet, n = 3 je Lymphomtransfer.

Bei den Wirttieren der Liposomen-Gruppe kam es ebenfalls zu einer geringfügigen Verlängerung des Überlebens von im Mittel 4,5 Tagen gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren sowie im Falle der Lymphomzelllinie 1781 zu einem kurzfristigen Rückgang des Anteils leukämischer Zellen im Blut auf Werte unter 2 %. Im Vergleich mit der Dex-Gruppe zeigte sich allerdings ein deutlich früheres Wiederauftreten des 1781-Tumorklons im venösen Blut des Wirtes sowie bei der Zelllinie 2623 gar ein fehlendes Absinken der Infiltrationsrate.

Die Bioverfügbarkeit beider Pharmaka im Blut und ihre prinzipiell apoptotische Wirkung auf die Gesamtpopulation der zirkulierenden T-Lymphozyten inklusive der Lymphomzellen konnte daran verifiziert werden, dass im Verlauf beider Behandlungsserien der prozentuale

Anteil der reifen T-Lymphozyten an der summierten Gesamtpopulation aller Lympho- und Monozyten im Blut von im Mittel 45,16 % zu Beginn der Therapie kontinuierlich auf Werte unter 15 % sank. In diesem Kontext zeigt Abbildung 3-19 die durchschnittliche Rate an einzelpositiven TCR^+ Zellen in Bezug zur Gesamtpopulation der nicht-neoplastischen Lymphozyten und Monozyten in dem Zeitraum ab der ersten Behandlung bis zum Tod der Wirte. Beide glukokortikosteroidalen Therapieformen führten somit im Laufe der Behandlungszeit zu einer ausgeprägten T-Lymphopenie der Wirte.

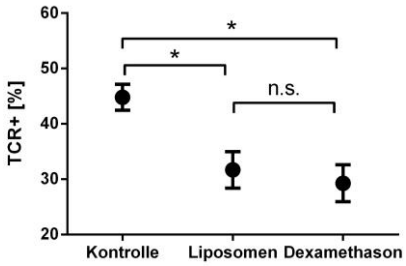

Abb. 3-19 Durchschnittliche Raten an reifen T-Lymphozyten(TCRβ⁺) in Relation zur zusammengefassten Population aller nicht-neoplastischen Lymphozyten und Monozyten im Blut der Wirte ab dem Zeitpunkt der ersten Pharmakotherapie. Die Generierung der Daten erfolgte mittels Durchflusszytometrie nach selektivem Gating der jeweiligen Leukozyten-Population. Mindestens sechs ermittelte Werte in dem Zeitraum ab erster Arzneimittel-Applikation bis zum Tod der Wirte sind je Tier eingeflossen. Die Rate an Monozyten in Bezug zur Gesamtpopulation aller erfassten Leukozyten im Blut divergierte bei den untersuchten Tieren um maximal 15 %. N=2 je Gruppe.

Vor dem Hintergund der Kenntnis, dass insbesondere CTL entartete Zellen identifizieren und eliminieren, kann diese früh eintretende T-Lymphopenie neben der beobachteten Glukokortikoid-Resistenz als eine weitere Ursache für den rapiden Lymphomprogress im späteren Verlauf unter Therapie in Betracht kommen.

Zunächst bleibt festzuhalten, dass eine Behandlung mit Liposomen generell eine Verzögerung der Lymphomprogression und damit eine Verlängerung des Überlebens bewirkt, einer Monotherapie mit hochdosiertem Dex aber hinsichtlich der Ansprechraten des leukämischen Infiltrats und der damit korrelierenden Überlebenszeitverlängerung deutlich unterlegen ist (siehe Kaplan-Meier-Kurve, Abb. 3-20).

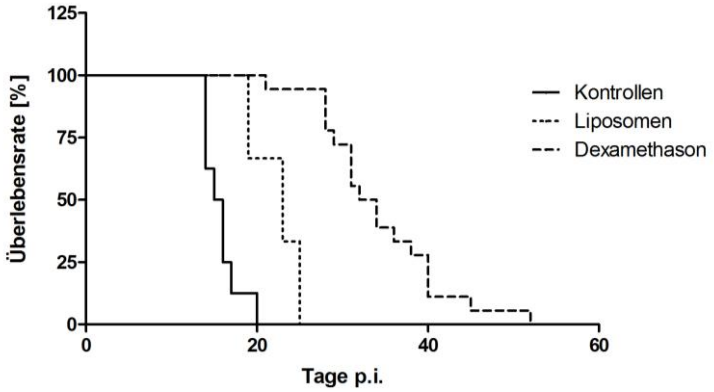

Abb. 3-20 Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Wirttiere unter Therapie mit Liposomen beziehungsweise Dex und ohne Behandlung (Kontrollen). Gezeigt ist der Verlauf der prozentualen Überlebensrate (survival) in Relation zur Ausgangstierzahl. Die ersten und die folgenden Behandlungen erfolgten jeweils bei Detektion von Lymphomzellen im venösen Blut der Wirttiere (siehe Abb. 3-17). Kontrolltiere und Tiere aus der Dex-Gruppe stammen zum Teil aus anderen Experimenten, Liposomentiere entsprachen weitestgehend den in den vorherigen Abbildungen gezeigten Wirttieren der beiden Lymphomtransfers 1781 und 2623; n = 8 (Kontrollen), n = 3 (Liposomen) und n = 18 (Dex).

Die Hälfte der behandelten Tiere wurde 72 Stunden nach der ersten Pharmakotherapie getötet und ihre lymphatischen Organe durchflusszytometrisch auf Lymphomzellen analysiert. In der Dex-Gruppe zeigten sich bei der Aufarbeitung dieser Wirte makroskopisch keine Hinweise auf eine Infiltration der lymphatischen Organe. So fehlte die bei den Kontrolltieren erwartungsgemäß aufgetretene Schwellung von Lymphknoten und Milz. Im Gegensatz dazu bestand bei den Wirten, welche mit Liposomen behandelt worden waren, eine ubiquitäre Lymphadenomegalie vergleichbar mit der der Kontrollen. Milz, Leber sowie Knochenmark erschienen mit bloßem Auge dagegen unverändert. Bei Erfassung und Auswertung der jeweiligen Organgewichte bestätigte sich der makroskopisch gewonnene Eindruck (Abb. 3-21).

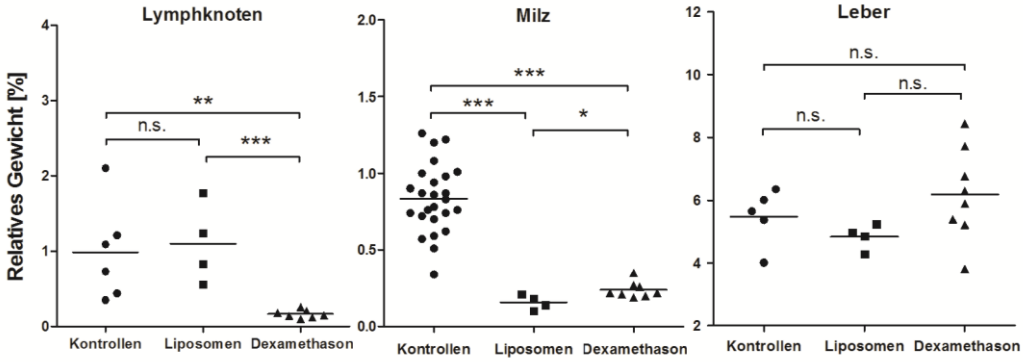

Abb. 3-21 Relative Gewichte der sekundären lymphatischen Organe und der Leber von Wirten der Kontroll-, Liposomen- und Dex-Gruppe 72 Stunden nach einmaliger Pharmakotherapie. Gezeigt ist das relative Organgewicht bezogen auf das unmittelbar vor Aufarbeitung gemessene Körpergewicht der Ratten. Jedes Zeichen entspricht einem Wirttier. Die Kontrollen und die Dex-Wirte stammen teilweise bei vergleichbarem Alter aus anderen Experimenten. N(Kontrollen)=6(Lymphknoten), =25(Milz), =5(Leber); N(Liposomen)=4, N(Dex)= 8 je Organ.

Die sekundären lymphatischen Organe der Kontrollen waren statistisch signifikant schwerer als die der Dex-Gruppe. In der Liposomen-Gruppe traf dies zwar auch für die relativen Gewichte der Milz zu, doch lagen die Werte der summierten Lymphknotengewichte der mit Liposomen behandelten Wirte im Niveau der Kontrolltiere und damit signifikant höher als die der Dex-Gruppe ($p<0{,}001$). Die absoluten Werte der genannten Organgewichte zeigten analoge signifikante Unterschiede zwischen den Kohorten (nicht gezeigt). Die relativen wie absoluten Gewichte von Leber, Nieren und Herz ergaben keine statistisch objektivierbaren Differenzen.

Die lymphatischen Organe der Wirte wurden anschließend wie beschrieben durchflusszytometrisch auf Lymphomzellen untersucht. Hierbei zeigten sich ausgeprägte Unterschiede der Infiltrationsraten (Abb. 3-22 A). Die Anteile der Lymphomzellen an der Gesamtpopulation der Lymphozyten waren in den mit Dex behandelten Wirten in Lymphknoten, Milz und Knochenmark kaum nachweisbar (Werte zwischen 1 % und 2 %). Dagegen lag die durchschnittliche Infiltrationsrate bei den Liposomen-Wirten in den Lymphknoten bei 93 % und im Knochenmark bei 57 %. Lediglich die Lymphomzellrate in der Milz war mit der Dex-Gruppe vergleichbar (5,15 %). In Anbetracht der allgemeinen Kenntnis, dass die hierbei herangezogene Referenzpopulation, nämlich die reifen

T- und B-Lymphozyten der Wirte, auf eine glukokortikoide Konfrontation ebenfalls mit Apoptose reagieren, wurden zur Bestätigung der Infiltrationsgrade die absoluten Zellzahlen der Lymphomzellen in den lymphatischen Organen bestimmt und miteinander verglichen (Abb. 3-22 C). Hier bestätigte sich, dass die Behandlung mit den Liposomen keinen Einfluss auf die Infiltration der Lymphknoten hat und nur partiell auf die des Knochenmarks. In der Milz zeigte sich dagegen bei beiden Therapieformen eine nahezu vollständige Reduktion der malignen Zellen. Eine vereinfachte Darstellung dieser Ergebnisse liefert Abbildung 3-22 B.

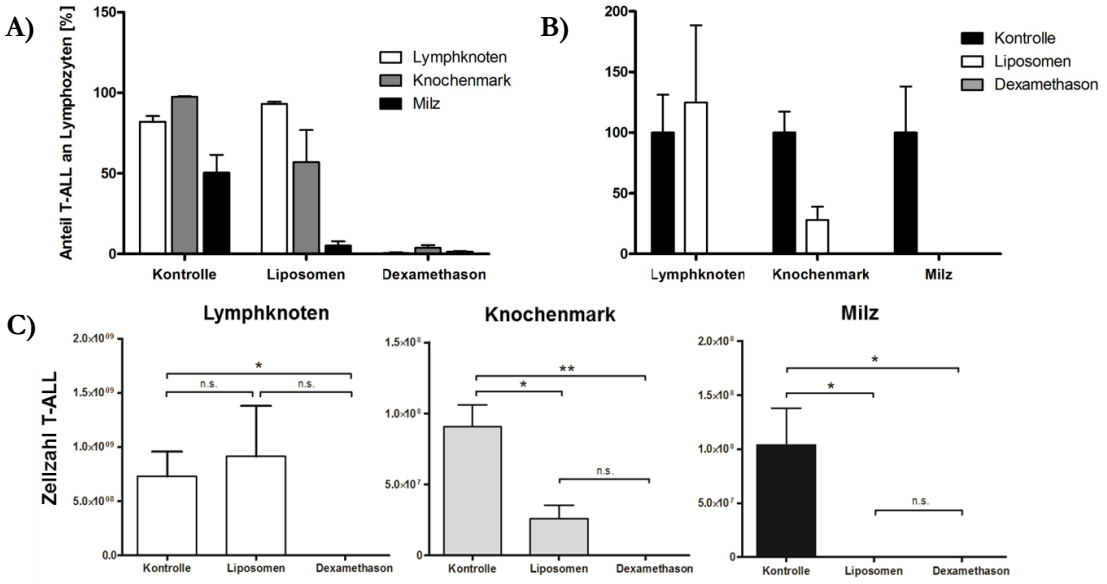

Abb. 3-22 Leukämische Infiltration von Lymphknoten, Knochenmark und Milz in der Kontroll-, Liposomen- und Dex-Gruppe. A) Gezeigt sind die Infiltrationsraten der Lymphomzellen in Relation zur Gesamtpopulation der Lymphozyten. Die Wirttiere wurden 72 Stunden nach der ersten Pharmakotherapie zusammen mit den Kontrollen getötet und die aus den Organen gewonnenen Einzelzellsuspensionen durchflusszytometrisch analysiert. **B)** Gezeigt ist das Verhältnis der absoluten Zellzahlen (siehe C)), welche mittels Neubauer-Zählkammer und FACS-Analyse ermittelt wurden. Als Referenzwert diente hierbei die absolute Zellzahl an T-ALL in den lymphatischen Organen der Kontrollwirte (=100 %). **C)** Darstellung der absoluten Lymphomzellzahlen je nach lymphatischem Organ, welche nach Auszählung eines Aliquots in der Neubauer-Zählkammer durch Hochrechnung auf das Gesamtvolumen der jeweiligen Einzelzellsuspension des zu analysierenden Organs ermittelt wurde. Für die Abbildungen A-C wurden dieselben Zellproben analysiert; n = 3 je Gruppe.

In Anbetracht der divergierenden Remissionsraten der Lymphome in den lymphatischen Organen der Kohorten, stellte sich die Frage, inwieweit sich diese unterschiedlichen Ansprechraten der jeweiligen Pharmakotherapie auch hinsichtlich der Infiltration nicht-lymphatischer Organe zeigen würden.

Unter dieser Fragestellung wurden Leber, Nieren, Herz und Lunge der Wirte histologisch auf eine Lymphomzellinfiltration untersucht. Exemplarisch zeigt Abbildung 3-23 die vergleichende Mikroskopie der Leber je eines Wirtes pro Gruppe 72 Stunden nach dem ersten Behandlungszeitpunkt.

Erwartungsgemäß stellen sich in der Kontrolle die infiltrierenden Lymphomzellen in den Portalfeldern nach standardisierter HE-Färbung dunkelblau dar. Bei den mit Liposomen oder Dex behandelten Wirten fand sich in der Leber wie auch in allen anderen, oben

genannten, nicht-lymphatischen Organen keine mikroskopisch erfassbare Lymphom-manifestation.

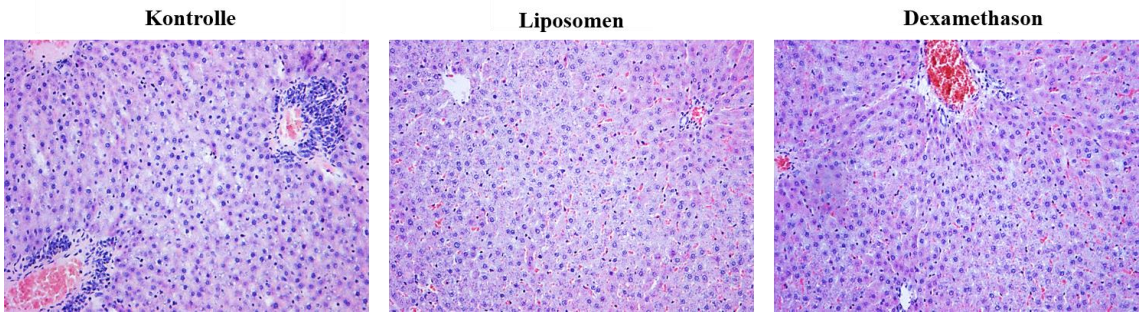

Abb. 3-23 Mikroskopische Vergrößerungen der Leberhistologie von Kontrolltier und je einem Wirt der mit Liposomen oder Dex behandelten Gruppe 72 Stunden nach der ersten Behandlung. Gezeigt sind jeweils HE-Färbungen von 3µm Paraffinschnitten zentraler Leberparenchymsegmente mit Portalfeldern und Zentralvenen in hundertfacher Vergrößerung. Die ausgehend von den Portalfeldern das Leberparenchym infiltrierenden Lymphomzellen in den Kontrollen sind anhand ihrer dunkelblauen Färbung zu identifizieren.

Zusammenfassend scheint auf der Grundlage der Ansprechrate der Lymphomzellen und des damit korrelierenden progressionsfreien Überlebens eine Liposomen-Therapie mit pegyliertem Prednisolon infolge ihrer fehlenden anti-neoplastischen Wirkung im lymphatischen System einer Monotherapie mit hochdosiertem Dex weit unterlegen zu sein.

3.4.2 Monotherapie der Notch1-abhängigen T-ALL mit Bortezomib führt im Vergleich mit Dex zu keinem Überlebensvorteil

Seit der Entdeckung des 26S-Proteasoms in den späten 1980er Jahren hat sich die spezifische Hemmung des Ubiquitin-Proteasom-Enzymkomplexes inzwischen zu einer effektiven Behandlungsstrategie in der heutigen Therapie des Multiplen Myeloms, des Morbus Waldenströms, des niedrig-differenzierten Non-Hodgkin-Lymphoms, hier insbesondere des Mantelzelllymphoms, und der primären Amyloidose entwickelt (Adams et al. 1999; Rajkumar et al. 2005). Bortezomib (VELCADE®, vormals PS-341) war die erste von der U.S. Food and Drug Administration im Jahr 2003 zugelassene Substanz dieser neuen Wirkstoffgruppe und zeigte in mehreren umfangreichen klinischen Studien zur Behandlung zunächst des rezidivierten oder refraktären (sog. „APEX"-Studie, 2005) und später des neu diagnostizierten Multiplen Myeloms („VISTA"-Studie, 2008) gute Ergebnisse hinsichtlich Wirkung, Zeit bis zum Wiederauftreten erneuter Krankheitsaktivität und Überlebenszeit (Richardson und Anderson 2003; Harousseau et al. 2010). Bemerkenswerterweise war Bortezomib hierbei hochdosiertem Dex überlegen (Richardson et al. 2005; Mateos et al. 2010). Inzwischen wird Bortezomib in der Behandlung zahlreicher Unterformen des Non-Hodgkin-Lymphoms als Einzelsubstanz oder in Kombination mit etablierten Chemotherapie-Schemata eingesetzt und intensiv beforscht (O'Connor et al. 2005; Strauss et al. 2006; Belch et al. 2006; Fisher et al. 2006; Goy et al. 2008; Gerecitano et al. 2009; O'Connor et al. 2010; Di Bella et al. 2010; Sehn et al. 2011). Auch wenn die offenbar vielfältigen Mechanismen seiner antineoplastischen Aktivität bisher nicht komplett erforscht sind, stellt Bortezomib eine neue Behandlungsoption auch für Patienten mit neudiagnostizierter, refraktärer oder

rezidivierter ALL insbesondere in Kombination mit konventionellen Chemotherapie-Regimen dar (Cortes et al. 2004; Sutheesophon et al. 2006; Pui und Jeha 2007; Messinger et al. 2010; Messinger et al. 2012; Du und Chen 2013).

In dieser Arbeit sollte eine Bortezomib-Monotherapie der T-Zell-Lymphome aus NICA-Ratten mit der etablierten Behandlung mittels hochdosiertem Dex im Tiermodell verglichen werden. In einer früheren Versuchsreihe der Arbeitsgruppe hatte sich unerwartet gezeigt, dass das NF-κB-Signal zur Tumorgenese und -proliferation der Notch1IC-abhängigen Lymphome nicht erforderlich ist (van den Brandt et al. 2006), obwohl dieser Signalweg als Charakteristikum in vielen humanen Formen der T-ALL beschrieben wird (Kordes et al. 2000). Da die medikamentöse Hemmung des Proteasom-Komplexes unter anderem in einer Blockierung des NF-κB-Signals resultiert (Almond und Cohen 2002), stellte sich die Frage, inwieweit Bortezomib seine apoptotische Wirkungsweise in den Lymphomzellen aus NICA-Ratten entfalten würde können.

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Versuchsreihen mit insgesamt 34 Ratten in drei randomisierten Kohorten (Kontroll-, Bortezomib- und Dex-Gruppe) nach selektiver Transplantation je einer der Lymphomzelllinien 1781, 2623 und 2625 pro Wirtstier umgesetzt. Zwischen den drei unterschiedlichen Tumorzellklonen wurden keine signifikante Unterschiede im klinischen Erkrankungsverlauf oder hinsichtlich der Organinfiltrationsraten in den Kontrollwirten registriert, sodass die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sich aus den gemittelten Daten aller Wirte dieser Versuchsreihen zusammensetzen. Hinsichtlich des Umstandes, dass im Rahmen dieser Arbeit die Medikation mit Liposomen aufgrund ihres hohen Applikationsvolumens ausschließlich intraperitoneal verabreicht werden konnte, stellte sich zu Beginn dieser Versuchsreihe die Frage, ob Modalität und Lokalisation der Verabreichung als intravenöse oder intraperitoneale Injektion objektivierbare Unterschiede in Ansprechrate und Krankheitsverlauf der Lymphome aufzeigen würden. Vor diesem Hintergrund erfolgte die jeweilige Arzneimitteltherapie von Bortezomib und Dex dosisunabhängig zu halben Anteilen entweder als intravenöse oder intraperitoneale Injektion. Erwartungsgemäß zeigten sich im Verlauf der Lymphomprogression und -therapie keine signifikanten Differenzen in Körpergewichtsverlauf, Organgewichten, Infiltrationsraten und Überlebenszeit der intravenös oder intraperitoneal behandelten Wirte, sodass die Auswertungen beider Applikationsarten in die gemittelten Werte der jeweiligen arzneimitteldefinierten Kohorte eingeflossen sind.

In Analogie zum Vorgehen beim Liposomen-Experiment (Kapitel 3.4.1) erfolgte die erste simultane Injektion der Pharmaka nach Detektion von malignen Zellen im venösen Blut der Wirte (Tag 12 nach Lymphomtransplantation). Die zweite Behandlung wurde sieben Tage später durchgeführt, da die zu diesem Zeitpunkt postulierte Voraussetzung registrierter Lymphoblasten im Blut bei allen Wirten der Behandlungsgruppen erfüllt wurde. Aufgrund eines im weiteren Verlauf beschleunigten Progresses der Infiltrationsraten im Blut wurde das Intervall bis zur nächsten Arzneimitteltherapie bei Vorliegen hoher leukämischer Belastung

auf bis zu fünf Tage reduziert. Bei einem Körpergewichtsverlust von mehr als 20 % des Ausgangsgewichts oder limitierender klinischer Symptomatik erfolgte aus tierschutzrechtlichen Gründen die Euthanasie der Wirttiere. Abbildung 3-24 zeigt im zeitlichen Verlauf die Entwicklung der gemittelten Körpergewichte und Blut-Infiltrationsraten je Kohorte.

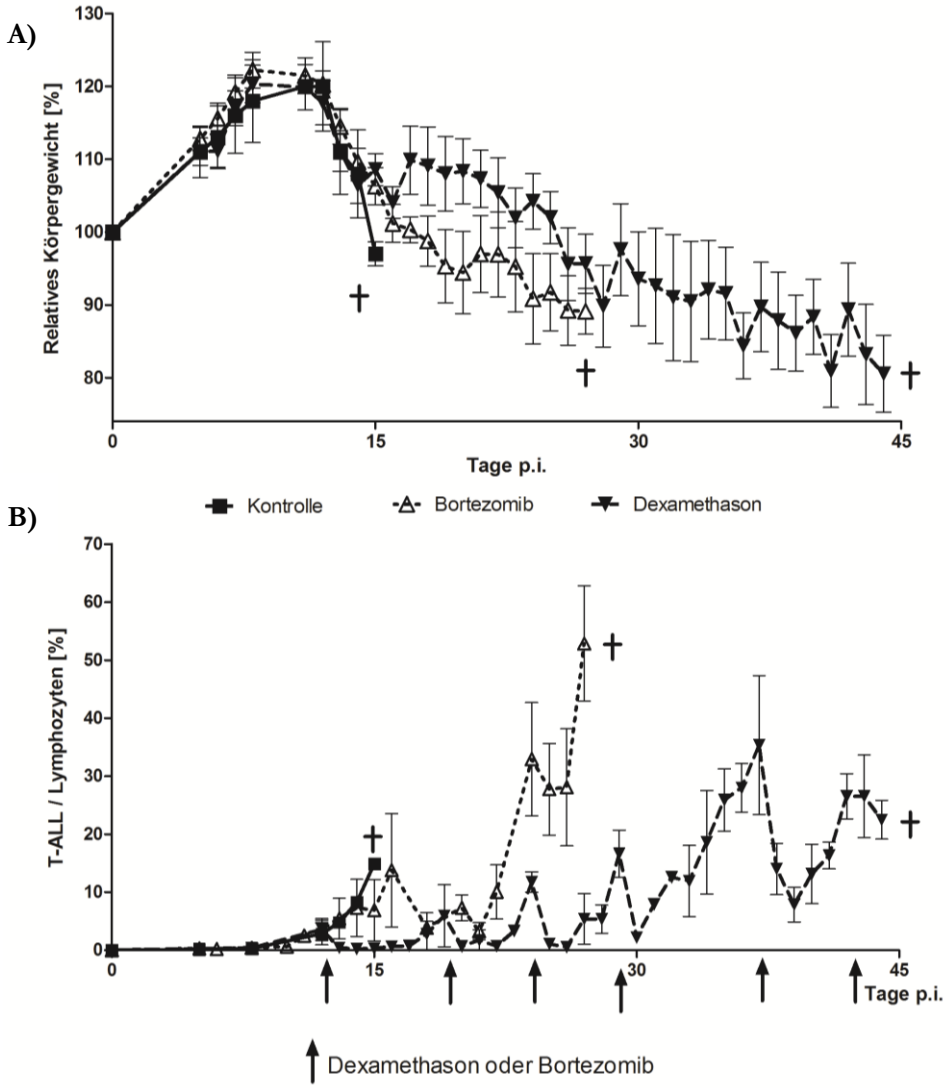

Abb. 3-24 Verlauf der relativen Körpergewichte und der Anteile von Lymphomzellen an allen Lymphozyten im Blut von mit Bortezomib oder mit Dex behandelten Wirttieren und von unbehandelten Kontrollen. A) Gezeigt ist der Verlauf des relativen Körpergewichts der Wirte nach Lymphomtransfer. Bezugsgröße ist das Initialgewicht zum Zeitpunkt des Lymphomtransfers (Tag 0 p.i. = 100 %). **B)** Gezeigt ist analog zu vorhergehenden Abbildungen und zeitlich konform zum Gewichtsverlauf in Abbildung A) die Rate an Lymphomzellen in Relation zu allen Lymphozyten im Venenblut der Wirttiere. Die Bestimmung erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der jeweiligen simultanen Arzneimittelapplikation. Die unter Berücksichtigung ihrer ausgeprägten klinischen Symptomatik aus tierschutzrechtlichen Gründen getöteten Tiere sind bis zu Ihrem Todeszeitpunkt berücksichtigt. Die Applikation von Bortezomib in der Dosis von 0,25 mg/kg erfolgte an den Tagen 12, 19 und 24 nach Lymphomtransfer, die Applikation von Dex in der Dosis von 20 mg/kg zusätzlich an den Tagen 29, 37 und 42. ┼: Letzte Tiere bzw. letztes Tier der Gruppe aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet. N(Dex, Bortezomib) = je 8 und n(Kontrolle) = 2.

Zunächst ist zu erkennen, dass in Anbetracht der jeweiligen Überlebenszeit eine Monotherapie mit Bortezomib einer Hochdosis-Behandlung mit Dex unterlegen ist. Statistisch gesehen verlängert Bortezomib die Überlebenszeit der Wirte im Vergleich mit den

unbehandelten Kontrollen um im Mittel vier Tage und liegt damit deutlich unter dem Mittelwert der Dex-Therapie (18 Tage). Im Vergleich zur Dex-Gruppe kam es bei den mit Bortezomib behandelten Wirten darüber hinaus zu einem insgesamt beschleunigtem Gewichtsverlust und insbesondere wenige Tage nach der zweiten Arzneimittelinjektion zu einem rapiden Wiederanstieg des leukämischen Infiltrats nach initial vergleichbarem Ansprechen der Lymphomzellrate auf Werte unter 8 % im venösen Blut (Tag 17 bis 21, Dex-Tiere in dieser Phase im Mittel unter 4 %). Eine weitere Applikation von Bortezomib in dieser Phase (Tag 24) führte im Gegensatz zu Dex nicht zu einer wesentlichen Reduktion der Tumorlast. Interessanterweise zeigten die Lymphomzelllinien in dieser Versuchsreihe demzufolge eine beständigere Sensitivität auf Dex als in der vorhergehenden Versuchsreihe zur Liposomen-Therapie. Allerdings blieb spätestens nach der sechsten Medikation von hochdosiertem Dex auch hier eine adäquate Remission der leukämischen Tumorlast aus, sodass eine erworbene Resistenz der Lymphomzellen angenommen werden konnte.

In der Kaplan-Meier-Kurve bestätigt sich zum einen der Überlebensvorteil der Dex-Gruppe, zum anderen fällt auf, dass bei mehr als der Hälfte der Wirte, die mit Bortezomib behandelt wurden, keine Verlängerung der Überlebenszeit erreicht werden konnte (Abb. 3-25).

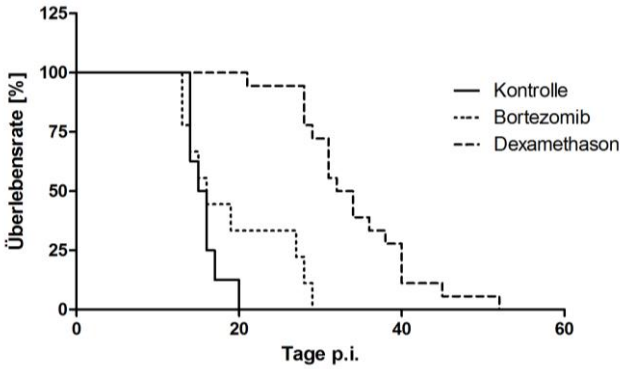

Abb. 3-25 Relative Überlebensraten der Wirttiere unter Therapie mit Bortezomib oder Dex und ohne Behandlung (Kontrolle). Gezeigt ist analog zu Abbildung 3-20 der Verlauf der prozentualen Überlebensrate in Relation zur Ausgangstierzahl (Kaplan-Meier-Kurve). Die Zeitpunkte der simultanen Behandlungen sind in Abbildung 3-24 dargestellt. Kontrolltiere und Tiere aus der Dex-Gruppe stammen zum Teil aus anderen Experimenten und entsprechen den bereits in Abbildung 3-19 gezeigten Kurven. N = 8(Kontrollen), n = 9(Bortezomib) und n = 18(Dex).

Analog zum Liposomen-Experiment wurde jeweils die Hälfte der Wirte der einzelnen Behandlungsgruppen 72 Stunden nach der ersten Verabreichung der Pharmazeutika getötet und ihre Organe zur durchflusszytometrischen Analyse aufgearbeitet.

Bei der Inspektion des Situs fanden sich in den Bortezomib-Wirten unwesentlich vergrößerte Lymphknoten und eine allenfalls geringgradige Hepatosplenomegalie. Interessanterweise zeigten die entnommenen Lymphknoten indes erhebliche Hämorrhagien. Das Knochenmark der langen Röhrenknochen präsentierte sich im Vergleich mit den Dex-Tieren unverändert in Farbe und Konsistenz.

Die Auswertung der relativen Organgewichte wies hingegen signifikante Unterschiede der Bortezomib-Wirte im Vergleich mit den Kontrollen oder den Dex-Wirten auf. So lag das

relative und auch absolute Durchschnittsgewicht der sekundären lymphatischen Organe der Bortezomib-Gruppe signifikant höher als das der Dex-Gruppe. Ihr relatives Milzgewicht war zudem signifikant niedriger als das der Kontrolltiere (Abb. 3-26), obgleich die absoluten Gewichte der Milz diesen Unterschied zwischen Bortezomib- und Kontrollgruppe allerdings nicht zeigten. Gleichwohl erbrachte das Wiegen von Nieren und Herz keine statistisch objektivierbaren Abweichungen zwischen den Kohorten. Interessanterweise war hingegen die Leber der Bortezomib-Tiere im Durchschnitt und in Relation zum Körpergewicht signifikant schwerer als die der Kontrollen.

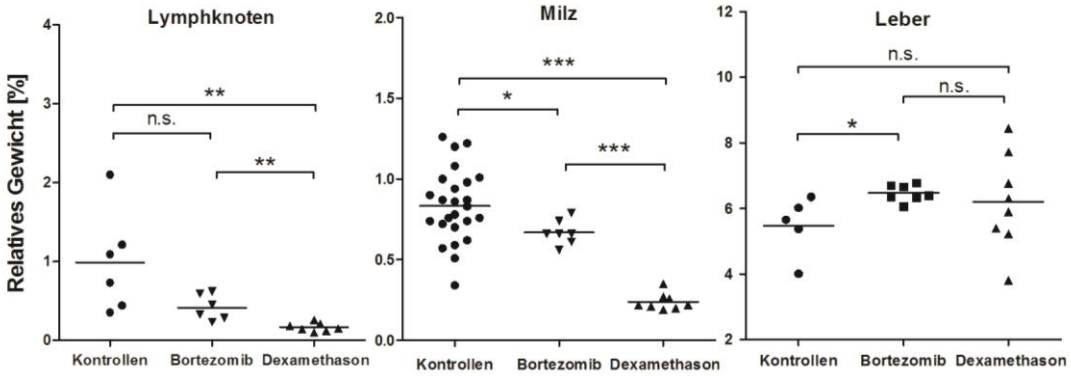

Abb. 3-26 Relative Gewichte der sekundären lymphatischen Organe und der Leber von Wirten der Kontroll-, Bortezomib- und Dex-Gruppe 72 Stunden nach einmaliger Pharmakotherapie. Jedes Zeichen entspricht einem Wirt. Gezeigt ist das jeweilige Organgewicht in Relation zu dem unmittelbar vor Aufarbeitung gemessenen Körpergewicht der Ratten. Die Kontroll- und Dex-Tiere stammen teilweise aus anderen Experimenten. N(Kontrollen)=6(Lymphknoten), =25(Milz), =5(Leber); n(Bortezomib)=6-8, n(Dex)= 7-8 je Organ.

In der durchflusszytometrischen Analyse der lymphatischen Organe der Wirte zeigten sich im Vergleich der Kohorten eindeutige Unterschiede (Abb. 3-27 A).

Demnach lagen die ermittelten Infiltrationsraten in den Bortezomib-Wirten einerseits wesentlich niedriger als die der Kontrollen, andererseits erheblich über denen der Dex-Kohorte. Dieses Ergebnis ergab sich für die Untersuchung von Lymphknoten, Milz und Knochenmark in nahezu entsprechender Ausprägung.

Die Auswertung der absoluten Zellzahlen in den lymphatischen Organen der Wirte entkräftete diese Beobachtung nicht, doch fand sich im Vergleich mit der Dex-Gruppe keine signifikante Mehrzahl maligner Zellen in den Lymphknoten der Bortezomib-Wirte. Auch war in der Milz eine statistisch signifikante Reduktion der Lymphomzellen in der Bortezomib-Kohorte gegenüber den Kontrollen nicht nachweisbar. Signifikante Unterschiede zwischen Bortezomib- und Kontrollkohorte ergaben hingegen die absoluten Zahlen der Lymphomzellen in Lymphknoten und Knochenmark sowie im Vergleich von Bortezomib- und Dex-Therapie in der Milz (s. Abb. 3-27 B).

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass Bortezomib in den Lymphknoten vergleichbare Ansprechraten wie Dex erreicht, in Milz und Knochenmark indessen ein signifikantes Wirkdefizit gegenüber der Dex-Therapie zu verzeichnen hat. Eine grundsätzliche

Zytotoxizität von Bortezomib gegenüber den NF-κB-defizitären NICA-Lymphomen kann allerdings mit den hier gewonnen Daten attestiert werden.

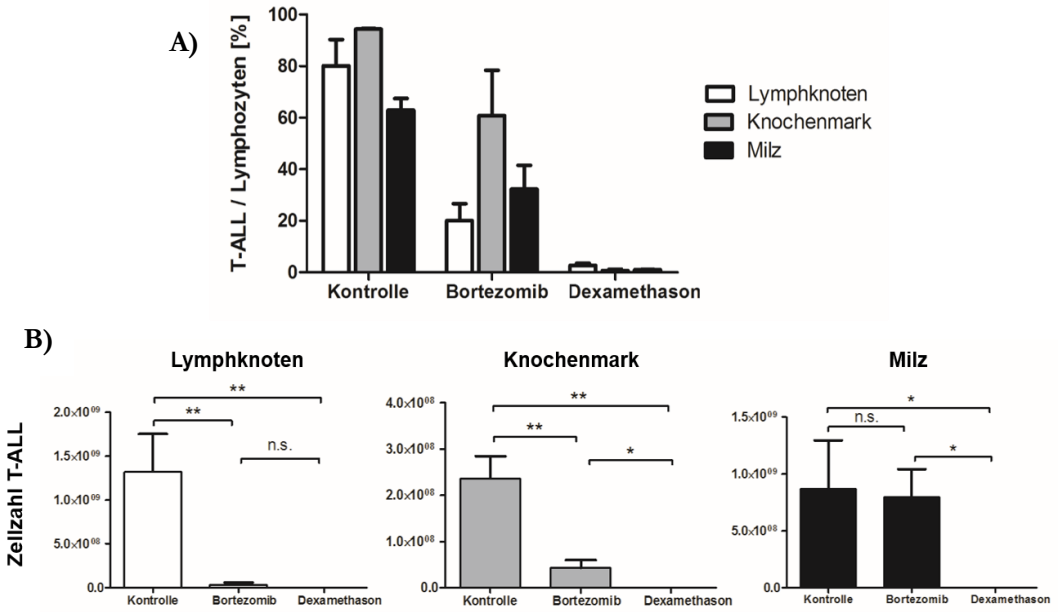

Abb. 3-27 Infiltration von Lymphknoten, Knochenmark und Milz in der Kontroll-, Bortezomib und Dex-Kohorte. A) Gezeigt sind die Infiltrationsraten der Lymphomzellen in Relation zur Gesamtpopulation der Lymphozyten. Die Wirttiere wurden 72 Stunden nach der ersten Pharmakotherapie zusammen mit den unbehandelten Kontrollen getötet und die aus den Organen gewonnenen Einzelzellsuspensionen durchflusszytometrisch analysiert. **B)** Darstellung der absoluten Lymphomzellzahlen aufgeteilt nach lymphatischem Organ. Für die Bestimmung der absoluten Zellzahlen wurden dieselben Zellproben wie in A verwendet. N = 4 (Dex, Bortezomib) und n = 2 (Kontrollen).

Im Therapieexperiment mit dem Einsatz der beiden Glukokortikoide Dex und pegyliertes Prednisolon (Liposomen) hatte sich als unerwünschter Nebeneffekt im Behandlungsverlauf rasch eine ausgeprägte T-Lymphopenie gezeigt (s. Abb. 3-19), welche möglicherweise die antineoplastische Effizienz der steroidalen Therapie zu konterkarieren vermag.

Es stellte sich daher die Frage, inwieweit auch Bortezomib das Immunsystem des Wirtes beeinträchtigen würde. In der Untersuchung der lymphatischen Organe der Wirte 72 Stunden nach der ersten Pharmakotherapie zeigten sich in der Bortezomib-Gruppe gegenüber den Kontrollen nur unwesentlich veränderte Zellzahlen der wirtseigenen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen und entsprechend signifkant höhere Zellzahlen im Vergleich zur Dex-Gruppe (Abb. 3-28A).

Demzufolge scheint Bortezomib zumindest kurzfristig das wirtseigene Immunsystem deutlich weniger zu beeinträchtigen als die Glukokortikoide. Allerdings liegt es nahe, dass dieser günstig erscheinende Effekt durch die, bereits für die Lymphomzellen gezeigte, schwächere apoptotische Wirkung des Bortezomibs bedingt ist.

Unter der Fragestellung, inwieweit Bortezomib im längerfristigen Verlauf das Immunsystem der Wirte schwächt, wurde exemplarisch der Anteil der $CD4^+$ T-Zellen an der Gesamtpopulation der Lymphozyten und Monozyten im Blut der Wirte im Zeitraum nach der ersten Arzneimittelapplikation bis zum Tod der Tiere wiederholt durchflusszytometrisch

ermittelt (Abb. 3-28 B). Die Auswertung dieser Daten zeigte, dass Bortezomib auf lange Sicht ebenfalls eine deutliche Suppression des wirtseigenen Immunsystems der behandelten Tiere verursacht.

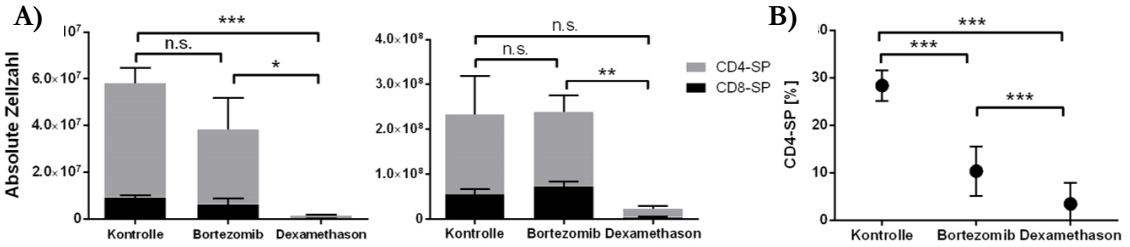

Abb. 3-28 Beeinträchtigung des wirtseigenen Immunsystems durch Bortezomib und Dex. A) Absolute Zahlen der CD4+ und CD8+ T-Zellen in Lymphknoten und Milz 72 Stunden nach erster Arzneimitteltherapie. Für die Bestimmung der absoluten Zellzahlen wurden dieselben Zellproben wie in Abbildung 3-27 verwendet. Die Angaben der Signifikanzen beziehen sich jeweils auf den Vergleich der Summe aller nichtneoplastischen T-Lymphozyten (CD4+ und CD8+ T-Zellen). N= 4 (Dex, Bortezomib) und n= 2 (Kontrollen). **B)** Durchschnittliche Anteile der CD4+ T-Zellen an der summierten Gesamtpopulation der Lymphozyten und Monozyten im Blut der be- und unbehandelten Wirte im Zeitraum zwischen der ersten Pharmakotherapie (Tag 12 nach Lymphomtransfer) und der Euthanasie der Tiere. Die Daten zur Bestimmung der Zellraten wurden durchflusszytometrisch aus erythrolysiertem Blut der Tiere generiert und umfassten mindestens sechs, zu unterschiedlichen Zeitpunkten ermittelte Werte je Tier.

Zur Untersuchung der nicht-lymphatischen Organe auf eine Infiltration der Lymphome wurde den Wirten Leber, Nieren, Herz und teilweise Lungen entnommen und zur histologisch-mikroskopischen Analyse aufgearbeitet. Exemplarisch zeigt Abbildung 3-29 die vergrößerte Darstellung der Leber je eines Wirtes pro Kohorte 72 Stunden nach der ersten Pharmakotherapie. Die Abbildung belegt, dass die bei den Kontrollen histologisch erfassbare Infiltration der Leber durch blau anfärbbare Lymphomzellen in den mit Bortezomib oder Dex behandelten Tieren nicht zu erkennen ist. Das gleiche Ergebnis erbrachten die Histologien von Nieren, Herz und Lungen der Wirte (nicht gezeigt).

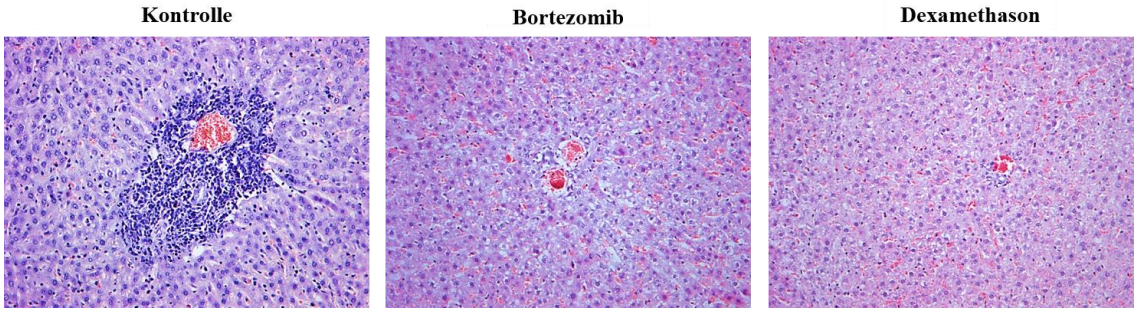

Abb. 3-29 Mikroskopische Analyse der Leber eines Kontrolltieres und je eines Wirts der mit Bortezomib oder Dex behandelten Kohorte 72 Stunden nach der ersten Pharmakotherapie. Es handelt sich um mit Hämatoxylin und Eosin gefärbte Paraffinschnitte zentraler Leberanteile mit je einem mittig positionierten Portalfeld in hundertfacher Vergrößerung. Die Lymphomzellen in der Kontrolle zeigen sich dunkelblau angefärbt.

Insgesamt belegen die Daten, dass eine Monotherapie der T-ALL mit Bortezomib, insbesondere als Folge der geringeren Ansprechrate der Tumorzellen in Blut, Milz und Knochenmark mit konsekutiv kaum beeinträchtigter Lymphomprogression, einer Therapie mit hochdosiertem Dex unterlegen ist.

3.4.3 Insuffiziente antineoplastische Wirkung von Bortezomib nach Auftreten einer Glukokortikoid-Resistenz

In vorhergehenden Experimenten zur Therapie der Lymphome mit hochdosiertem Dex (Kapitel 3.4.1 und 3.4.2) war aufgefallen, dass die Ansprechrate der neoplastischen Zellen auf die Therapie mit Glukokortikoiden ab einem bestimmten Zeitpunkt im längerfristigen Verlauf rapide abnimmt und es konsekutiv zu einer beschleunigten Lymphomprogression kommt.

In Anbetracht der unterschiedlichen molekularen Wirkungsweise von Bortezomib und seinem bekannten synergistischen Therapieeffekt mit Dex (Pui und Jeha 2007), wurde unter der Fragestellung, ob die Lymphomzellen nach Etablierung einer *de-novo*-Dex-Resistenz noch sensitiv auf eine zeitnahe Therapie mit Bortezomib reagieren würden, eine Kohorte lymphomtransferierter Wirte zunächst mehrmals simultan mit Dex behandelt. Sobald die Infiltrationsrate im Blut dieser Wirte trotz unmittelbar zuvor durchgeführter Therapie weiter anstieg und somit die Sensitivität der Lymphomzellen auf Dex gesunken war (in diesem Experiment nach der vierten Dex-Applikation), erfolgte eine sich unmittelbar anschließende Umstellung der Therapie auf intravenös verabreichtes Bortezomib in üblicher Dosierung.

Abbildung 3-30 zeigt den zeitlichen Verlauf der Infiltrationsraten im Blut der Kohorte und die Zeitpunkt der jeweiligen Pharmakotherapie.

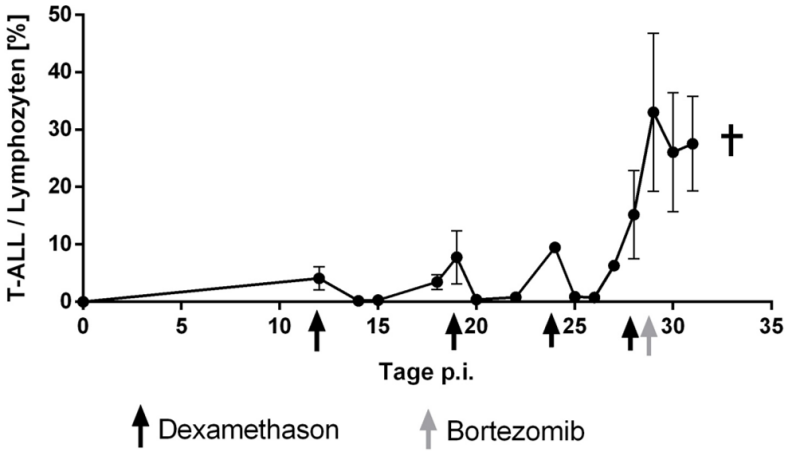

Abb. 3-30 Insuffiziente Wirkung von Bortezomib nach Abnahme der Glukokortikoid-Sensitivität. Gezeigt sind in Analogie zu vorherigen Darstellungen die gemittelten Blut-Infiltrationsraten unter der intermittierenden Pharmakotherapie sowie die Zeitpunkte der jeweiligen Arzneimittelapplikationen. Nach der vierten Verabreichung von Dex blieb der adäquate Effekt auf die durchschnittliche Infiltrationsrate im Blut aus, sodass 24 Stunden später Bortezomib injiziert wurde. Die Medikamente wurden in gleicher Dosis wie in den vorherigen Experimenten verabreicht. Die Rate an T-ALL-Zellen in Relation zur Gesamtpopulation der Lymphozyten wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Die Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der Behandlung; alle Werte sind als Durchschnittswerte mit Standardfehler angegeben; †: Tiere aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet, n = 4.

Die Kurve veranschaulicht, dass Bortezomib seine antineoplastische Wirkung auf Dex-refraktäre Lymphomzellen im Blut der Wirte kaum entfaltet. Trotz eines leichten Abfalls der durchschnittlichen Infiltrationsrate kurz nach der Bortezomib-Injektion mussten alle Wirte dieser Kohorte binnen 72 Stunden aus Gründen des Tierschutzes euthanasiert werden. Es zeigte sich lediglich eine geringfügige Verlängerung des Überlebens der mit

Bortezomib behandelten Wirte um etwa 48 Stunden gegenüber denjenigen Kontrollwirten, die nach Auftreten der Dex-Resistenz keinerlei Therapie mehr erhielten (nicht gezeigt). Darüber hinaus zeigte sich kein signifikanter Abfall der Organinfiltrationsraten in den zusätzlich mit Bortezomib behandelten Wirten im Vergleich mit den Dex-refraktären Kontrollen, die kein Bortezomib erhielten.

3.5 Dex-Apoptose-Assay verifiziert die dosisabhängige Resistenz-Entwicklung

In Anbetracht der frühzeitig auftretenden und sodann generalisiert erscheinenden Ineffizienz von Dex im Tierversuch, stellte sich die Frage, ob dieser stagnierende antiproliferative Effekt der Glukokortikoid-Therapie durch einen zellulären Resistenzmechanismus der Lymphomzellen oder die im fortgeschrittenen Krankheitsstadium nicht mehr suffizient reprimierbare Tumorlast bedingt ist.

In diesem Kontext wurden zur Durchführung eines *ex-vivo*-Dex-Apoptose-Assays Lymphomzellen aus Wirttieren extrahiert, sobald deren Blutinfiltration nach mehrfacher Dex-Behandlung keine adäquate Regredienz mehr gezeigt hatten. Abbildung 3-31 zeigt den prozentualen Überlebensanteil dieser im Dex-Tierversuch therapierefraktären Lymphomzellen in Abhängigkeit von steigenden Dex-Konzentrationen im Nährmedium und vergleicht sie mit Therapie-naiven Lymphomzellen (zum Teil desselben Tumorzellklons LT 2623) sowie mit Wildtyp-Thymozyten aus der Lewis-Ratte.

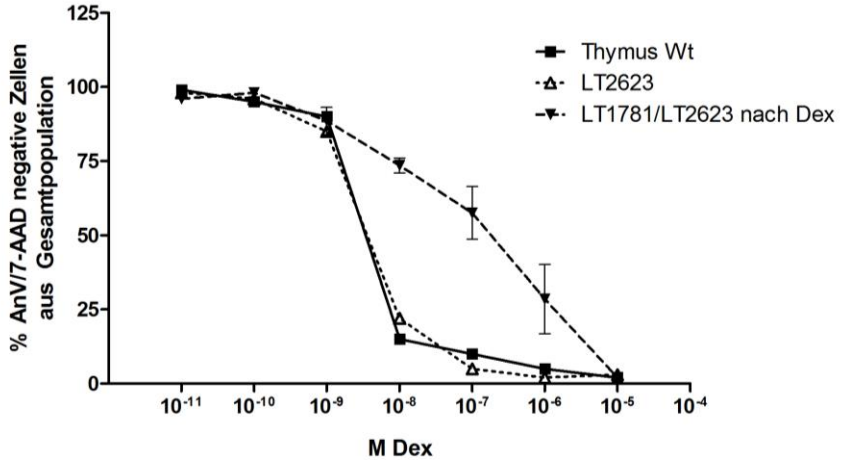

Abb. 3-31 Dex-Apoptose-Assay *in vitro* nach mehrmaliger *In-vivo*-Behandlung der Lymphomzellen mit Dex. Thymozyten aus gesunden Tieren, unbehandelte Lymphomzellen sowie Lymphomzellen zweier unterschiedlicher Lymphomtransfers nach mindestens dreimaliger *In-vivo*-Behandlung mit Dex im Abstand von mindestens sieben Tagen wurden in einer jeweiligen Gesamtzellzahl von $5x10^5$ mit Dex in Konzentrationen zwischen $1x10^{-11}$ und $1x10^{-4}$ für 10 Stunden inkubiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der AnV/7-AAD negativen Zellen aus der Gesamtpopulation nach FACS-Analyse.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Sensitivität der bereits *in vivo* mit dem Glukokortikoid konfrontierten Lymphomzellen gegenüber Dex dosisabhängig und insbesondere in Konzentrationen zwischen $1x10^{-8}$ und $1x10^{-6}$ im Kulturmedium vermindert ist. Da die Therapie-naiven Lymphomzellen dieses Verhalten nicht zeigen und zu vergleichbarem

Prozentanteil wie die Wildtyp-Thymozyten zu Glukokortikoid-induzierter Apoptose neigen, ist von einer im Zuge der repetitiven GC-Behandlung erworbenen sowie dosisabhängigen *de-novo*-Resistenz der im Tierversuch therapierten Lymphomzellen gegenüber Dex auszugehen. Angesichts der terminal beschleunigten Proliferationsrate mit raschem Wiederanstieg der leukämischen Infiltrate muss trotz alledem eine multifaktorielle Ursache der rapiden Lymphomprogression im späten, therapierefraktären Stadium der Notch1-abhängigen T-ALL in Betracht gezogen werden.

3.6 Die Herunterregulierung des Glukokortikoid-Rezeptors in therapierefraktären Lymphomzellen

Mit Nachweis der frühzeitig auftretenden Dex-Resistenz im Tierversuch stellte sich die Frage nach ihrer zellulären beziehungsweise molekularen Genese.

In diesem Zusammenhang wurden therapierefraktäre Lymphomzellen aus moribunden Wirten isoliert und deren relative Expressionslevel für GIMAP5 (*GTPase of the immunity-associated protein family 5*), Glukokortikoid-Rezeptor (GR) und Notch1 mittels quantitativer Real-Time-PCR analysiert. Hierbei wird jeweils die relative mRNA-Menge gemessen, die sich aus der Anzahl an Transkriptkopien des zu untersuchenden Gens und eines konstitutiv exprimierten „Haushaltsgens" (β-Aktin) ergibt. GIMAP5 gehört zur Familie der regulatorischen IAN-Proteine (*immuneassociated nucleotide gene*-Proteine, Krücken et al. 1999; Poirier et al. 1999; Dahéron et al. 2001; Cambot et al. 2002; Stamm et al. 2002), die das Überleben von T-Lymphozyten bei Entwicklung, Selektion und Homöostase beeinflussen und deren Expression durch das TCR-Signal gesteuert wird (Kupfer et al. 2007).

Die Genexpressionsanalyse der mindestens dreimal *in vivo* behandelten und letztendlich therapierefraktären Lymphomzellen erfolgte in Bezug auf unbehandelte Lymphomzellen desselben Tumorzellklons aus moribunden Wirten (Abb. 3-32).

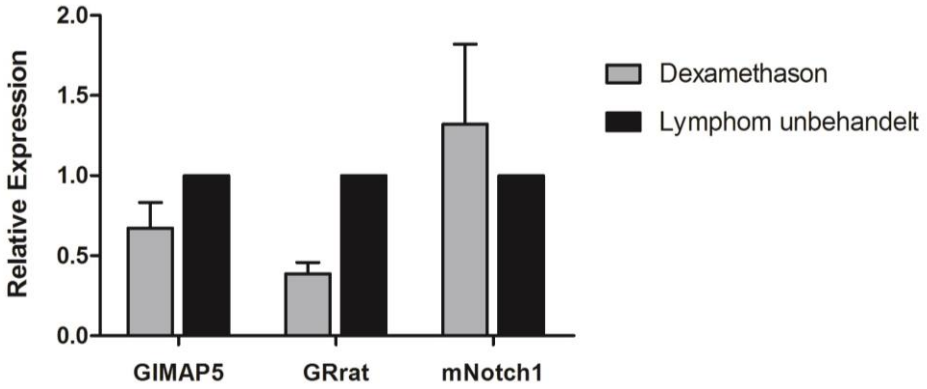

Abb. 3-32 Darstellung der relativen mRNA-Expression der Gene GIMAP5, GR und Notch1 mittels quantitativer Real-Time-PCR. Die Lymphomzellen der Dex-Gruppe wurden vor dieser Analyse mindestens dreimal *in vivo* mit Dex in einer Dosis von 20 mg/kg behandelt. Die quantitative Analyse der mRNA wurde in Relation zu der Expression von β-Aktin bestimmt und anschließend auf die durchschnittliche Expression in unbehandelten Lymphomzellen normiert, die willkürlich auf 1 gesetzt wurde. Die Reinheit und Konzentration der aus den Lymphomzellen isolierten RNA wurde vor der Analyse mittels PCR und Agarosegelelektrophorese evaluiert. N= 5 je Gruppe.

Die Analyse zeigt, dass im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle die GR mRNA in mehrfach mit hochdosiertem Dex konfrontierten und konsekutiv resistent gewordenen Lymphomzellen herunterreguliert wurde. Dies deutet auf einen möglichen Resistenzmechanismus gegenüber Dex hin und bietet eine Erklärung für die rapide Lymphomprogression in diesem Stadium. In der Expression von GIMAP5 und Notch1 zeigten sich hingegen kaum Unterschiede zwischen therapierefraktären und -naiven Lymphomzellen.

4 Diskussion

Es ist bekannt, dass Notch1 eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Progression von neoplastischen Transformationen in Lymphomen und anderen Malignomen spielt (Weng et al. 2004; Aifantis et al. 2008; Pancewicz und Nicot 2011; Blackburn et al. 2012). Durch Überexpression von intrazellulärem Notch1 in HSCs können humane T-Zell-Leukämien in einem Mausmodell etabliert werden (Izon et al. 2001; Aster et al. 2000; Pear et al. 1996), auch wenn diese Tiermodelle nahelegen, dass Notch1-Mutationen allein wohl insuffizient für eine maligne Transformation sind, aber in Verbindung mit anderen onkogenen Defekten die Entwicklung einer T-ALL beschleunigen können (Chiang et al. 2008; Lobry et al. 2014). Für systematische Analysen der Lymphomgenese sind Mäuse mit retroviral transduzierten HSCs allerdings ungeeignet, da die genetischen Veränderungen, die zur malignen Transformation führen, nicht vererbt werden (Pear et al. 1996). Die bislang publizierten Notch1IC-transgenen Mausmodelle wurden indes bezüglich des Phänotyps und neuer Therapieansätze der sich entwickelnden Lymphome bisher nicht detailliert untersucht (Robey et al. 1996; Deftos et al. 2000; Berquam-Vrieze et al. 2012; Ma et al. 2014).

4.1 Etablierung eines T-ALL-Rattenmodells aus NICA-Ratten

Tiermodelle haben einen unschätzbaren Wert bei den Bemühungen, die molekularen Mechanismen einer Leukämie zu verstehen und Patienten, die hieran erkrankt sind, besser zu behandeln (Cook und Pardee 2013). Eine der wirksamsten Methoden zur Analyse von Genfunktionen ist die Generierung transgener Tiere (Jaenisch 1988) und Dank der relativen Leichtigkeit, mit der in Mäusen eine gezielte Genmodifikation durch die Verfügbarkeit von embryonalen Stammzellen realisiert werden kann, ist die Mausspezies in Fragen der Genetik zum bevorzugten tierexperimentellen Modell der letzten Jahrzehnte avanciert.

Dessen ungeachtet stellt die Ratte für viele Forschungsgebiete insbesondere der Immunologie, Toxikologie und Herz-Kreislauf-Forschung ein attraktiveres Tiermodell dar (Bader und Ganten 1996; Hünig et al. 2001; Link und Xiao 2001; Smialowicz 2002; Swanborg 2001). Die Laborratte (Rattus norvegicus) war ferner die erste Tierspezies, die in wissenschaftlichen Studien eingesetzt wurde, und ist bis heute das weitverbreiteste Tiermodell in der biomedizinischen Forschung geblieben, was die enorme Anzahl an wissenschaftlichen Publikationen zu Arbeiten mit Ratten widerspiegelt (Dwinell 2010). Seit dem 19. Jahrhundert trägt die Verwendung von Ratten in experimentellen Studien wesentlich zu unserem grundlegenden Verständnis von Physiologie, Pathologie und Pharmakologie bei (Huang et al. 2014). Im Vergleich zur Maus stellt neben ihrer Körpergröße, die chirurgische Eingriffe, wiederholte Blutentnahmen und den Gewinn von ausreichendem Material auch kleiner Gewebebiopsien oder seltener Zellarten ermöglicht (Gill et al. 1989), insbesondere die anatomische Homologie der Ratte zum Menschen einen wichtigen Vorteil dar (Kacew und Festing 1996; Datson et al. 2001). Diese nahe Verwandtschaft und beifolgend physiologische Ähnlichkeit zum Menschen wird vor allem in vielen präklinischen Tests zur Erforschung

zahlreicher Volkskrankheiten wie Diabetes mellitus (Hornum et al. 2002; Lee et al. 2010), Multiple Sklerose (Stefferl et al. 1999; Rosenling et al. 2011) und Brustkrebs (Smits et al. 2007) sowie von chronisch entzündlichen (Holmdahl et al. 2001), kardiovaskulären (Aitman et al. 2008) und altersbedingten Erkrankungen (Buffenstein 2008) genutzt. Zudem ist von elementarer Bedeutung, dass fast jedes neu entwickelte Medikament während der Entwicklungsphase hinsichtlich Wirkung und Verträglickeit auch an Ratten getestet wird.

Im aktuellen Zeitalter der modernen Genetik waren die wissenschaftlichen Analysen an Ratten allerdings dadurch eingeschränkt, dass es bis vor kurzem sowohl an einer vollständigen Entschlüsselung als auch an Werkzeugen zur Manipulation des Rattengenoms mangelte (Iannaccone und Jacob 2009; Huang et al. 2014). So erwies sich in der Ratte zum Beispiel der klassische Ansatz zur Generierung transgener Zellen mittels pronukleärer Injektion von DNA als technisch äußerst anspruchsvoll (Mullins und Mullins 1996) und die Kultivierungsversuche embryonaler Ratten-Stammzellen mit erhaltener Pluripotenz bis vor wenigen Jahren als nahezu aussichtslos (Brenin et al. 1997).

Infolgedessen wurden als alternative Methoden neben der Verwendung von Zinkfingernukleasen (Rémy et al. 2010; Cui et al. 2011) und Mutagenen wie N-ethyl-N-nitroso-Harnstoff (siehe CD8 knock-out-Ratten in Kapitel 2.1.12) (Zan et al. 2003) vornehmlich lentivirale Vektoren zur RNA-Interferenz (siRNA) und Transgenese eingesetzt (Hamra et al. 2002; Lois et al. 2002; Rubinson et al. 2003; Cullen 2006; Smits und Cuppen 2006; Ryu et al. 2007; Herold et al. 2008; Reichardt und Fischer 2016).

Die auf diese Weise generierten Notch1IC-transgenen (NICA-) Ratten unserer eigenen Arbeitsgruppe, in denen Notch1IC unter der Kontrolle des Thymus-spezifischen proximalen Lck-Promoters exprimiert wird (van den Brandt et al. 2005), entwickeln mit hoher Penetranz und kurzer Latenz große thymische Lymphome, die -ähnlich der humanen Variante- im Zuge einer leukämischen Phase lymphatische und nicht-lymphatische Organe infiltrieren und innerhalb weniger Wochen zum Tod der Tiere führen (van den Brandt et al. 2006).

Durch die jüngsten Entwicklungen in der Genforschung an Ratten kommt ganz aktuell einem Rattenmodell wachsende Bedeutung zu. So gelang es erst im Jahr 2008, die erste pluripotente embryonale Stammzelllinie der Ratte erfolgreich zu kultivieren (Buehr et al. 2008; Li et al. 2008a; Blair et al. 2011; Chen et al. 2013; Zschemisch et al. 2014), was für effizientes Gentargeting (Tong et al. 2011; Yamamoto et al. 2012), transgene Tiergenerationen (Kawamata und Ochiya 2010, 2011) und *In-vitro*-Differenzierungsstudien (Wang et al. 2012; Peng et al. 2013) eine essentielle Voraussetzung darstellt (Iannaccone und Jacob 2009; Jacob et al. 2010). Durch diese Meilensteine der Genmanipulationen in der Ratte, ist in Anbetracht ihrer bereits genannten Vorzüge davon auszugehen, dass die Ratte kurzfristig wieder zum bevorzugten Tiermodell der Genforschung reavancieren wird.

Bis dato ist eine Notch1-abhängige T-ALL in Ratten oder ein Notch1IC-transgenes Rattenmodell außerhalb unserer eigenen Arbeitsgruppe in der Literatur nicht beschrieben worden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich NICA-Lymphome wiederholt in syngene Lewis-Ratten transferieren lassen und dass sie dort kurzfristig neues und aggressives Tumorwachstum induzieren. Es wird vermutet, dass für einen solchen Lymphomtransfer -wie beim Menschen- die Übertragung leukämischer Stammzellen (LSC) notwendig ist (Testa 2011; Risueño et al. 2011; Tremblay und Curtis 2014), da unter anderem auch der Transfer vieler unterschiedlicher Zelllinien, die immunphänotypisch normalen Stadien der frühen T-Zell-Entwicklung entsprechen, zur Übertragung humaner (Cox et al. 2007; Gerby et al. 2011) oder muriner (Kiel et al. 2005; Li et al. 2008b; Tatarek et al. 2011) T-ALL auf gesunde Mäuse führen kann. Die Pathophysiologie der im Wirt ausgelösten T-ALL unterscheidet sich kaum von der humanen Form, sodass beispielsweise die Stagnation der Gewichtszunahme junger heranwachsender Wirte nach Lymphomtransfer -wie in dieser Arbeit- als klinischer Verlaufsparameter genutzt werden kann. Mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen durch Verwendung spezifischer Antikörper lassen sich die doppeltpositiven Lymphomzellen zudem elegant in Blut und lymphatischen Organen des Wirtes verfolgen und hierdurch die Lymphometablierung und -progression rasch erfassen. Die intravenös transferierten Lymphomzellen infiltrieren demnach zunächst Lymphknoten und Knochenmark, bevor im Zuge der sich anschließenden leukämischen Phase auch nicht-lymphatische Organe, hier vorherrschend die Leber, kleinherdig durchsetzt werden. Dies entspricht dem prinzipiellen Verlauf einer primären T-ALL im Menschen. Die Erfassung von absoluter wie relativer Gewichtszunahme einiger ausgewählter Organe sowie deren histologische Untersuchungen mit einfacher mikroskopischer Abgrenzbarkeit der perivaskulär infiltrierenden Lymphomzellen decken Invasivität, Metastasierungsverhalten und Aggressivität der transferierten T-ALL im Wirt suffizient auf. In venösem Blut und lymphatischen Organen werden innerhalb weniger Tage Anteile der Lymphomzellen von bis zu 50 % an allen lymphozytären Zellen erreicht. Aus Knochenmark und mesenterialen Lymphknoten-konglomeraten lassen sich im kurzfristigen finalen Erkrankungsstadium annähernd aufgereinigte Lymphomzellpopulationen ohne relevanten Aufwand extrahieren. Daher stellt dieses Rattenmodell ein ideales Werkzeug dar, um den zugrundliegenden Mechanismus der Tumorprogression zu untersuchen, um potentielle Angriffspunkte für Medikamente zu identifizieren und neue therapeutische Strategien zu erproben.

Mit dem Ziel einer vereinfachten Verfolgung der Lymphomzellen nach Transplantation in einen Wirt (Flügel et al. 2001; Kohm et al. 2002) kreuzte unsere Arbeitsgruppe die NICA-Ratten zuvor mit syngenen eGFP-transgenen Lewis-Ratten (van den Brandt et al. 2004a, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit fiel überraschenderweise auf, dass die Lymphomzellen nach adoptivem Transfer in syngene Wildtyp-Ratten in der Expression des eGFP stark variierten. Neben diesen Unterschieden zwischen den einzelnen Lymphomzelllinien konnte gezeigt werden, dass auch innerhalb einer Lymphomzelllinie die Expression des eGFP differentiell reguliert wird. Dies legt nahe, dass sich die einzelnen Tumorzellen in der Expression bestimmter Gene unterscheiden, auch wenn für sie ein monoklonaler Ursprung anzunehmen ist (van den Brandt et al. 2006) und in einem vorherigen Experiment der Arbeitsgruppe

nachgewiesen werden konnte, dass die Expression von transgenem eGFP in allen Leukozyten-Subtypen auch nach mehrfachem adoptiven Transfer in gesunde Wildtyp-Ratten konstant und intensiv bleibt (van den Brandt et al. 2004a).

Demgegenüber stehen Berichte, dass erstens retroviral transduzierte T-Lymphozyten je nach Aktivierungsstatus die eGFP-Expression herunterregulieren (Flügel et al. 1999), zweitens transgene viral infizierte B-Zellen *in vivo* die Expression eines gelb fluoreszierenden Reporterproteins (engl.: yellow fluorescent protein reporter (YFP)) abschalten (Collins et al. 2009), und drittens, dass mesenchymale Vorläuferzellen der Ratte, die in Zellkultur mit einem rekombinanten Herpesvirus infiziert wurden, je nach Zellpassage und Proliferationsgrad das fluoreszente Reporterprotein stilllegen (Ellison und Kedes 2014). Letztere Autoren sahen das epigenetische *Gene-Silencing* (dtsch: Gen-Stilllegung) im Verlauf der experimentellen Zellverfolgung als ursächlich für den Expressionsverlust transgener, fluoreszierender Reporterproteine (Collins und Speck 2012).

Bezugnehmend auf die bereits genannte Annahme, dass zur Etablierung einer Leukämie nach adoptivem Transfer in einen gesunden Wildtyp-Wirt der Transfer leukämischer Stammzellen nötig ist (Testa 2011), haben Untersuchungen gezeigt, dass nur wenige Stammzelllinien eine stabile Expression von konstitutivem GFP persistent aufweisen (Costa et al. 2005; Liu et al. 2009a; Luo et al. 2014) und zur progressiven Stilllegung von exogenen Gensequenzen wie insbesondere ins Genom integrierte Transgene tendieren (Liew et al. 2007; Xia et al. 2007), auch wenn dies einer weiteren Differenzierung der Stammzellen zugrundegelegt wird (Ovchinnikov et al. 2012) und somit entgegen der Annahme einer monoklonalen entdifferenzierten Leukämiezellpopulation steht.

Wissenschaftliche Untersuchungen vor allem zu akuten myeloischen Leukämien haben in diesem Zusammenhang ferner gezeigt, dass sich die krebserzeugenden, selbst-erneuerbaren Stammzellen in unterschiedliche maligne Zelllinien differenzieren können, woraus eine äußerst heterogene, wenn auch hierarchisch aufgebaute Krebszellpopulation resultieren kann (Clevers 2011; Gerby et al. 2011; Saadatpour et al. 2014). So könnte die differentielle Expression des eGFP in den transferierten NICA-Lymphomzellen auch Ausdruck dafür sein, dass mehrere Leukämie-initiierende Stammzellen mit unterschiedlicher Genexpression beziehungsweise weiterer Differenzierung in den Wirt transplantiert wurden, auch wenn demgegenüber der monoklonale Ursprung der Lymphomzellen in den NICA-Ratten vorab postuliert wurde (van den Brandt et al. 2006).

Als weiterer Erklärungsansatz könnte auch die hohe Proliferationsrate der malignen Zellen im Wirt zu einer Herunterregulierung nicht überlebensnotwendiger Gene führen, was grundsätzlich die langfristige Zellverfolgung maligner Zellen durch transgene Fluoreszenzproteine nach adoptivem Zelltransfer infrage stellen oder aber die Detektion und klare Definition stabiler Promoterregionen zur Transgenese fluoreszierender Markerproteine auch für stark proliferierende Zelllinien und *In-vivo*-Studien erforderlich machen würde (Collins und Speck 2012). Nicht zuletzt könnte die Expression des eGFP der Lymphomzellen

zu einem Selektionsnachteil zum Beispiel aufgrund einer vermehrten Antigenizität im immunkompetenten, obgleich syngenen Wirt geführt haben (Beck-Engeser et al. 2001; Schreiber et al. 2002; Khong und Restifo 2002). Eine Differenz der Progressionsraten von GFP-positiven gegenüber -negativen Lymphomzellen im Wirt konnte in dieser Arbeit allerdings nicht detektiert werden. Darüber hinaus hatten sich in dieser Arbeit in später durchgeführten NICA-Lymphomtransfers in Einzelfällen sogar höhere Raten an GFP-exprimierenden Lymphomzellen gezeigt als in den Wirten, aus denen diese Zellen zuvor extrahiert worden waren. Dies spräche wiederum für den zufälligen Transfer von leukämischen Stammzellen mit differentiell regulierter GFP-Expression.

Im ähnlichen Zusammenhang zeigte sich bei der durchflusszytometrischen Charakterisierung der transplantierten NICA-Lymphome ein überraschend uneinheitlicher Phänotyp. Die Divergenz der Expression der β-Kette des TCR zwischen den Lymphomzelllinien offenbart zum Beispiel, dass einige wenn auch wenige Zelllinien die β-Selektion noch nicht durchlaufen hatten, während die meisten von β-selektionierten Thymozyten abstammten und den prä-TCR-Komplex exprimierten, wie es in den vereinzelten Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe zu NICA-Lymphomen bereits gezeigt worden war (van den Brandt et al. 2006). In der Literatur ist beschrieben, dass die TCR-Expression in T-ALL-Zelllinien stark variiert (Dos Santos et al. 2010). Demnach werden zwar in etwa der Hälfte der Fälle die vollständigen zytoplasmatischen TCR-Ketten ausgebildet (Asnafi et al. 2003; Burger et al. 1999), in vielen Fällen findet sich vergleichbar mit den hier erhobenen Ergebnissen allerdings nur das pTα-Protein im prä-TCR-Komplex an der Zelloberfläche (Asnafi et al. 2003). Es wird angenommen, dass das prä-TCR-Signal essentielle Voraussetzung für die Induktion Notch-induzierter Lymphome ist, da überexprimiertes Notch1IC in Mäusen ohne prä-TCR keine leukämische Transformation auszulösen vermag (Staal et al. 2007).

Bei der weiteren Charakterisierung der NICA-Lymphome zeigte sich ein nahezu einheitlich hohes Expressionslevel aller Zelllinien dagegen nur für die typischen T-Zell- und Lymphozyten-Marker (Thalhammer-Scherrer et al. 2002) CD2, CD4 und LFA-1(CD11α) sowie mit einer Ausnahme für die α-Kette des CD8, wohingegen die spezifischen Aktivierungs- und Entwicklungsmarker CD5, CD8β, CD31, CD45RC und CD53 auf allen Lymphomzelllinien fehlten. Unter Berücksichtigung der aktuell gültigen WHO- (Campo et al. 2011) und EGIL-Klassifikation (Bene et al. 1995) sowie TCR-basierender, immuno-phänotypischer Einteilungen (Asnafi et al. 2003), nach denen vier Untergruppen der T-ALL anhand der Oberflächenmarker voneinander abgegrenzt werden, lassen sich die meisten NICA-Lymphome jedoch allein anhand ihrer prä-TCR- und $CD4^+/CD8^+$-Expression einem weitestgehend spezifischen Entwicklungsstadium der T-Zell-Entwicklung, nämlich kortikalen thymischen Vorläuferzellen (Asnafi et al. 2003) zuordnen und als prä-αβ-T-ALL ($CyCD3^+$/Cy $TCR\beta F1^+$/SmTCR-) klassifizieren (van Dongen et al. 2012). Die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede in der Expression der β-Kette des TCR einzelner NICA-Lymphomzelllinien ließen sich demzufolge auch dadurch erklären, dass der

korrespondierende Entwicklungsarrest normaler Thymozyten sich zeitlich im Zuge der β-Selektion ereignet haben könnte und die maligne Transformation sich in unterschiedlichen Thymoblasten vor oder nach der β-Selektion vollzogen hat (Asnafi et al. 2003).

Bei der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Lymphomzelllinien in dieser Arbeit wurde in den überwiegenden Fällen ein relativ homogenes Expressionsniveau der Tumorzelllinien bezüglich einzelner Oberfächenmoleküle registriert, was wiederum eine mono- beziehungsweise oligoklonale Abstammung der transplantierten T-ALL-Zelllinien von einer oder wenigen Leukämie-initiierenden Stammzellen nahelegt. Diese unterscheiden sich allerdings nach den gewonnen Daten wahrscheinlich phänotypisch voneinander, auch wenn -der Methode geschuldet- nicht für alle untersuchten Oberflächenmoleküle aussagekräftige Daten generiert werden konnten. So war aufgrund der nicht weiter charakterisierten oder optimalerweise noch selektiv isolierten Referenzpopulation -die uneinheitliche Subpopulation der wirtseigenen reifen $CD4^+$ T-Zellen aus infiltrierten Lymphknoten- die eindeutige Expressionsanalyse bezüglich wesentlicher Aktierungssmarker eingeschränkt. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen der NICA-Lymphomzell-linien auf bestimmte Oberflächenproteine ergaben zum Teil ein heterogenes Expressionsmuster, was eine unzweifelhafte Interpretation über vorhandene oder fehlende Expression einzelner Marker verwehrt und die Monoklonalität der Zelllinie infrage stellt, auch wenn in den vorherigen Experimenten der eigenen Arbeitsgruppe zu NICA-Ratten die Analyse von drei unterschiedlichen Lymphomen bezüglich des Rekombinationsstatus des TCRB2-Genlokus die Annahme einer generellen Monoklonalität der primären NICA-Lymphome suggeriert hatte (van den Brandt et al. 2006). Dagegen ist bekannt, dass überexprimiertes Notch1 mit vielen unterschiedlichen Subtypen von T-ALL assoziiert ist, welche die Entwicklungsstadien von sehr unreifen frühen Thymozyten (DN) bis zu kortikalen doppeltpositiven Thymozyten repräsentieren (Pear et al. 1996; Weng et al. 2004). Da das in dieser Arbeit verwendete Notch1-Genkonstrukt unter der Kontrolle des proximalen Lck-Promoters, also ab den späten doppeltnegativen Stadien der Thymozytenentwicklung exprimiert wird, bietet dieser Umstand auch einen Lösungsansatz für die phänotypischen Unterschiede zwischen den NICA-Lymphomzelllinien. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass sich die periphere expansive T-ALL-Population, die im Rahmen der hier durchgeführten Charakterisierung analysiert wurde, je nach genetischem Hintergrund im Phänotyp von der Leukämie-initiierenden Stammzelle unterscheiden und äußerst heterogen sein kann (Kiel et al. 2005; Cullion et al. 2009; Saadatpour et al. 2014). In einem Mausmodell mit retroviral transduziertem Notch1IC in transplantierten Knochenmark-Vorläuferzellen wurde neben einer großen Bandbreite an unterschiedlichen T-ALL-Subklone unterschiedlicher Reifungsstadien auch Tumorverbände detektiert, die aus mehreren Subpopulationen maligner Thymoblasten mit unterschiedlichem Phänotyp bestehen (Pear et al. 1996). Eine mögliche Kausalität hierfür bietet die Annahme, dass es zur malignen Transformation Notch1IC-überexprimierender Thymozyten mindestens eines weiteren onkogenen Defekts bedarf, der gleichfalls den Phänotyp der malignen Zelllinie beeinflussen kann (Chiang et al.

2013; Lobry et al. 2014). Dies wäre ergänzend ein Lösungsansatz für die beobachtete Divergenz der GFP-Expression innerhalb einer Lymphomzelllinie, zumal beschrieben worden ist, dass fehlregulierte genetische und epigenetische Ereignisse in einer progressiv wachsenden Krebszelllinie zu einer enormen Variation von Phänotyp und Neo-Antigenen infolge zahlreicher weiterer Mutationen führen (Stoler et al. 1999; Segal et al. 2008), und dass diese genetische Instabilität neben der Heterogenität auch eine natürliche Selektion von immunresistenten Tumorzellen insbesondere nach adoptivem Zelltransfer zur Folge haben kann (Khong und Restifo 2002; Garcia-Lora et al. 2003; Vesely und Schreiber 2013).

Bei der Charakterisierung der NICA-Lymphome fiel als weitere unerwartete Eigenschaft der Zelllinien auf, dass sowohl der MHC-Klasse I- als auch der MHC-Klasse II-Komplex, in der Ratte RT1-A beziehungsweise RT1-B und -D genannt, auf allen NICA-Lymphomen nicht oder nur schwach exprimiert wird, was eine initial intendierte Generierung tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen anhand von speziellen Tumorantigenen zur Durchführung einer adoptiven Immuntherapie unrealisierbar erscheinen lies (Garcia-Lora et al. 2003). Eine Vielzahl von Mechanismen sind in diesem Zusammenhang beschrieben worden, mit denen sich Krebszellen vor Angriffen durch das Immunsystem des Wirtes schützen und dadurch erst klinisch apparent werden können (Khong und Restifo 2002; Ahmad et al. 2004; Olson und McNeel 2012). Neben tumorbedingten immunsupressiven Einflüssen (Wick et al. 1997; Ochsenbein et al. 1999; Jensen et al. 2012) und der Expressionsmodifikation spezifischer Tumorantigene (Uyttenhove et al. 1983; Bai et al. 2003; DuPage et al. 2012) stellt insbesondere die Herunterregulierung der Antigen-präsentierenden MHC-Moleküle eine effektive Strategie der Tumorzelle dar (Zheng et al. 1998; Seliger et al. 2002; Algarra et al. 2004), der Erkennung und Eliminierung durch die zytotoxischen T-Lymphozyten des wirtseigenen Immunsystems zu entgehen (Garrido et al. 1993, 1997; Hicklin et al. 1999; Garcia-Lora et al. 2003). Die genauen Hintergünde für die ausbleibende Detektion dieser MHC-armen oder -defizitären Tumorzellen durch wirtseigene NK- oder auch zytotoxische T-Zellen sind bis heute weitestgehend unbekannt (Porgador et al. 1997; Campoli und Ferrone 2011; Fruci et al. 2012).

Ein interessanter Zusammenhang hierbei ist, dass in humanen Melanomzellen die Überexpression des Oncogens c-Myc mit der selektiven Herunterregulierung von MHC-Molekülen korreliert (Versteeg et al. 1989; Peltenburg et al. 1993) und c-Myc in T-lymphoblastischen Leukämien mit konstitutiv aktivem Notch1-Signal als direktes Notch1-Zielgen regelhaft überexprimiert ist sowie als einer der Hauptmechanismen der leukämischen T-Zelltransformation angesehen wird (Weng et al. 2006; Klinakis et al. 2006; Sharma et al. 2006; Palomero et al. 2006b). Ergänzend werden in Mäusen mit einer qualitativen oder quantitativen Immunschwäche, beispielsweise durch Fehlen oder Fehlfunktion der Lymphozyten, signifikant höhere Raten an Karzinogen-induzierten oder sogar spontan auftretetenden Malignomen wie insbesondere auch Lymphome beobachtet (Shankaran et al. 2001; Street et al. 2002). Interessanterweise werden diese Lympomzellen nach adoptiver Transplantation in syngene Wildtyp-Mäuse aber direkt von wirtseigenen zytotoxischen

T-Lymphozyten eliminiert (Smyth et al. 2000). Gleichfalls ist eine interagierende Koexistenz von tumorspezifischen T-Zellen und den korrespondierenden Tumorzellen in Krebspatienten, hier unter anderem auch in drainierenden Lymphknoten (Romero et al. 1998), mehrfach belegt (Lee et al. 1999; Bai et al. 2003). Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Lymphomtransplantationen in syngene Lewis-Ratten blieb in zwei Wirttieren, denen unterschiedliche Tumorzelllinien aus NICA-Ratten injiziert wurden, die klinische und durchflusszytometrische Manifestation der T-ALL aus, was der raschen Elimination durch das wirtseigene Immunsystem zugrunde liegen könnte, sofern die Injektion vitaler Tumorzellen angenommen wird.

Die Charakterisierung der NICA-Lymphome erfolgte demzufolge nur anhand der erfolgreich transferierten und etablierten respektive immunselektierten Zelllinien, die nicht durch das Immunsystem des Wirttieres erkannt und bekämpft wurden, was das beobachtete Fehlen von MHC-Komplexen und spezifischen Tumorantigenen auf den analysierten Zellen bedingen und erklären könnte. Die ausgebliebene Divergenz in Lymphometablierung und -progression zwischen Wildtyp- und CD8 knock-out-Wirt würde diese Annahme weitestgehend festigen, auch wenn die Rolle der zytotoxischen $CD8^+$ T-Lymphozyten in der antineoplastischen Immunität insbesondere nach adoptivem Lymphomtransfer bis heute nicht eindeutig geklärt ist (Hegazy und Klein 2008; Noyan et al. 2014) und eine Immunselektion von MHC- und Tumorantigen-defizitären Zellklonen durch wirtseigene CTL (Kaklamanis und Hill 1992; Lehmann et al. 1995; Jager et al. 1997) eine merkliche Verzögerung der klinischen und objektivierbaren Erkrankungsmanifestation in den Wildtyp-Wirten im Vergleich mit den CD8ko-Wirten hätte erwarten lassen (Garcia-Lora et al. 2003). Die hohe Zellzahl simultan transplantierter Lymphomzellen mit bereits voll etabliertem aggressivem Phänotyp infolge der selektiven Etablierung und Progression in den NICA-Tieren könnte hingegen auch eine adäquate und klinisch sichtbare Immunreaktion beider Wirtsgruppen vermissen lassen (Cesano et al. 1996; Dunn et al. 2002; Khong und Restifo 2002; DuPage et al. 2012). Daneben gibt es Hinweise auf eine $CD8^+$-unabhängige Funktion von wirtseigenen $CD4^+$ T-Zellen in der Eliminierung von MHC-negativen Krebszellen (Haabeth et al. 2014), was die apparenten Unterschiede zwischen CD8ko- und Wildtyp-Wirt im Bezug auf die effektive Immunabwehr gegenüber den transplantierten Lymphomzellen ausgeglichen haben könnte.

Für Studien zu neuen Therapieansätzen sind neben gründlich charakterisierten Zelllinien insbesondere auch standardisierte experimentelle Modelle von essentieller Bedeutung (Bruserud et al. 2003), da unter anderem die biologische Heterogenität von verschiedenen leukämischen Zelllinien einheitliche und klar definierte (*In-vitro*-) Bedingungen für einen Vergleich der jeweiligen Studienergebnisse erforderlich macht (Bruserud et al. 2005). Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche einer *In-vitro*-Kultivierung der NICA-Lymphome zeigte sich eine ungeahnte Neigung der Lymphomzellen zur spontanen Apoptose. Trotz Verwendung zahlreicher gängiger Kombinationen von Nährmedien und Zusätzen, die bereits erfolgreich in Zellkulturversuchen anderer Zelllinien, hierunter auch T-ALL, etabliert wurden (Cesano et al. 1996; Chiaramonte et al. 2003), ergaben sich in dieser

Arbeit nur geringe anti-apoptotische und keine proliferativen Effekte auf die Lymphomzellen. Im Detail erzielte die üblich verwendete Zusammensetzung des Kulturmediums aus RPMI 1640 mit 10 % FCS und den Zusätzen L-Glutamine, Penicillin und Streptomycin (Karawajew et al. 2000; Barata et al. 2004) zwar Überlebensvorteile der Lymphomzellen gegenüber den alternativen Kompositionen, jedoch keinen Expansionseffekt oder auch nur adäquaten Schutz vor dem spontanen und rasch eintretenden Zelltod.

Es ist seit langem bekannt, dass leukämische Blasten gemeinhin zur Spontanapoptose *ex vivo* neigen (Bruserud et al. 2000). Ihre effiziente Kultivierung stellt komplexe Anforderungen an die Bedingungen (O'Connor et al. 1991; Shao et al. 2000; Bruserud et al. 2003; Ghamlouch et al. 2013) und scheint sogar prognostische Relevanz bezüglich des *In-vivo*-Ansprechens auf eine zystostatische Therapie zu haben (Maung et al. 1994; Wuchter et al. 1999), auch wenn hier widersprüchliche Daten publiziert worden sind (Coustan-Smith et al. 1996; Wuchter et al. 2000) und die genauen Hintergründe für die Spontanapoptose der Lymphomzellen *in vitro* nicht vollends aufgedeckt sind. Man nimmt jedoch an, dass Lymphomzellen der T-Zellreihe ähnlich den heranreifenden Thymozyten nicht nur konstitutive, zell-autonome Mechanismen sondern im Wesentlichen auch zelluläre und zytokingesteuerte Komponenten des umgebenden Mikromileus benötigen, um essentielle Schlüsselsignalwege für Überleben, Proliferation und Therapieresistenz vollständig aktivieren zu können (Qiuping et al. 2004; Ghia et al. 2008; Cardoso et al. 2009; Armstrong et al. 2009; Nwabo Kamdje und Krampera 2011). Im Fokus stehen hierbei diejenigen Zytokine, die physiologischerweise von Stromazellen in Knochenmark oder Thymus sezerniert werden und an der normalen T-Zell-Entwicklung sowie an der Pathogenese der T-Zell-Leukämie beteiligt zu sein scheinen (Kang und Der 2004). Die anti-leukämische Potenz der GCs *in vivo* könnte demnach auch zum Teil auf ihre anti-inflammatorische Wirkung mit Suppression von Genexpression und Produktion leukämischer Zytokine und Wachstumsfaktoren zurückzuführen sein (Wuchter et al. 2000; Tuckermann et al. 2005).

Neben Interleukin-4 (Cardoso et al. 2009) und IL-18 (Uzan et al. 2014) konnten von einer Vielzahl unterschiedlicher Arbeitsgruppen insbesondere für IL-7 entscheidende überlebenswichtige und vorallem proliferative Effekte auf Thymozyten wie auch Lymphomzellen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden (Touw et al. 1990; Karawajew et al. 2000; Barata et al. 2004; Laouar et al. 2004; Scupoli et al. 2007). Zum einen entwickeln IL-7-transgene Mäuse mit hoher Inzidenz B- und T-Zell-Lymphome (Rich et al. 1993), zum anderen sezernieren Knochenmark-Stromazellen und thymische Epithelzellen IL-7 und erzeugen hierdurch das Mikromileu, in dem sich leukämische Transformation und Proliferation abspielen (Scupoli et al. 2003), zumal T-ALL-Zellen gemeinhin den IL-7-Rezeptor exprimieren (Eder et al. 1990; Dibirdik et al. 1991; Touw et al. 1990; Drach et al. 1994) und der anti-apoptotische Effekt von IL-7 auf T-ALL (Digel et al. 1991) mit der Notch1-abhängigen Expressionsdichte des IL-7-Rezeptors auf den Lymphomzellen zu korrelieren scheint (Karawajew et al. 2000). Im Widerspruch hierzu konnte im Rahmen dieser Arbeit ein anti-apoptotischer oder gar proliferativer Effekt von IL-7 auf die NICA-Lymphome *ex vivo* nicht detektiert werden,

obgleich einige der gewählten Bedingungen und Kulturmedien denen der publizierten Literatur mit Nachweis einer effektiven Kultivierung der Lymphomzellen (z. B. Barata et al. 2004) entsprachen.

Kürzlich publizierte Arbeiten legen zudem nahe, dass die effiziente und langfristige Kultivierung von Thymozyten, leukämischen Blasten und insbesondere von Leukämie-initiierenden Stammzellen die unmittelbare Anwesenheit von Stromazellen entweder aus Knochenmark oder Thymus (engl. sog. *feeder cells*) (Manabe et al. 1992; Winter et al. 2001; Scupoli et al. 2003; Smedt et al. 2004; La Motte-Mohs et al. 2005) oder alternativ im Rahmen einer Fetalen Thymus Organ Kultur (FTOC) erforderlich macht (Uhmann et al. 2011; Nitta et al. 2013). Neben der bereits erwähnten Sekretion spezifischer Interleukine oder auch Wachstumsfaktoren (Medyouf et al. 2011) stellt hierbei der Notch1-Signalweg über direkte interzelluläre Ligand-Rezeptor-Interaktion eine essentielle Komponente des stromalen Einflusses auf Entwicklung, Überleben und Proliferation von leukämischen Blasten dar (Weng et al. 2003; Armstrong et al. 2009; Nwabo Kamdje und Krampera 2011; Yost et al. 2013). Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass erstens fehlregulierte Signaltransduktionswege in Leukämiezellen aus einer direkten Interaktion mit Stromazellen aus Knochemark oder Thymus resultieren können (Konopleva und Andreeff 2007; Lane et al. 2009), zweitens die Migration von T-ALL-Zellen in das Knochenmark notwendige Voraussetzung für die progressive Erkrankungsmanifestation ist (Makrynikola et al. 1994), und drittens die Co-Kultur von T-ALL-Zellen mit Knochenmark-Stromazellen eine Abschätzung von Therapie-ansprechen (Ito et al. 1998) und eine Quantifizierung der Effizienz anti-leukämischer Medikamente ermöglicht (Winter et al. 2000). Für andere Krebserkrankungen wie zum Beispiel das Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass der Zell-Zell-Kontakt zwischen Stroma- und Tumorzelle im Wesentlichen durch Notch reguliert wird (Wang et al. 2011). Das Überleben von T-ALL-Zellen im Knochenmarkstroma erfordert hierbei die Beteiligung von Adhäsionsmolekülen wie LFA-1 und ICAM-1 (Winter et al. 2001), deren Expression durch eine Notch-Aktivierung moduliert wird (Wang et al. 2011).

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Charakterisierung der NICA-Lymphome konnte gezeigt werden, dass LFA-1(CD11α) in den Lymphomzellen stark überexprimiert wird, was einen Erklärungsansatz für die hohe *ex vivo* Spontanapoptoseneigung der NICA-Lymphome in Abwesenheit von Stromazellen und trotz Zytokin-Zusatz wie IL-7 bietet. Weitere Kultivierungsversuche idealerweise mit Einsatz von Stromazellen oder löslichem ICAM-1, dem Ligand von LFA-1, sind notwendig, um diese Hypothese zu prüfen und geeignete Bedingungen für eine effiziente Kultivierung der NICA-Lymphome zu erfassen.

Viele wegweisende Erkenntnisse zu Erkrankungen wie der T-ALL und ihren Behandlungs-möglichkeiten sind der Verwendung von Tiermodellen zu verdanken (Cook und Pardee 2013). Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit beinhaltet die bis dato erstmalige Etablierung eines T-ALL-Rattenmodells aus Notch1IC transgenen Ratten. Im Hinblick auf die Erfassung zugrundeliegender Mechanismen der Krankheitsentstehung sowie auf die Entwicklung,

Erforschung und präklinischen Evaluation neuer Therapieansätze kommt der eleganten Möglichkeit des repetitiven Lymphomtransfers und der raschen Generierung von neuem aggressivem Wachstum im Wirt mit hoher Inzidenz und zentraler Analogie zur primären T-ALL im Menschen eine essentielle Bedeutung zu. Besonders adoptive Transfermodelle mit Etablierung von Notch1-abhängiger T-ALL in gesunden, immun-kompetenten Wirttieren verhindern eine potentielle Fehlinterpretation von Erscheinungen, die durch eine vorab durchgeführte Bestrahlung des Wirtes zur Immunkompromittierung mitbedingt sein könnten (Volanakis et al. 2009). Die Persistenz von schlechter Prognose aggressiver Leukämieformen wie der T-ALL aufgrund eines Mangels an effektiven Therapiestrategien unterstreicht ferner die Notwendigkeit geeigneter T-ALL-Tiermodelle.

4.2 Therapie der T-ALL mit in PEGylierte Liposomen verpacktem Prednisolon

Die akute lymphoblastische Leukämie ist die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter (Wood et al. 1998). Angesichts der therapielimitierenden Nebenwirkungen der konventionellen GC-Therapie und der anhaltend ungünstigen Prognose besonders der rezidivierten oder refraktären T-ALL stellen in PEGylierte Liposomen verpackte GCs eine vielversprechende Therapiealternative dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig in Liposomen verpacktes Prednisolon im Vergleich mit der freien Form von Dexamethason in der *In-vivo*-Behandlung von T-ALL nach adoptivem Lymphomtransfer getestet. Hierbei zeigten sich für die Liposomen zwar eine Verzögerung der Lymphomprogression und damit eine Verlängerung des Überlebens im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen, jedoch gegenüber hochdosiertem freiem Dex ein deutlich schlechteres Ansprechen der Lymphomzellen insbesondere in Lymphknoten und Knochenmark, was insgesamt mit einem auffallend schlechteren Gesamtüberleben korrelierte. Die relativ gute antineoplastische Wirkung der Liposomen in Milz und nicht-lymphatischen Organen legt folglich den Schluss nahe, dass vornehmlich das insuffiziente Ansprechen in Lymphknoten und Knochenmark das schlechtere Gesamtansprechen der Lymphome bedingt. So könnten das deutlich frühere Wiederauftreten des 1781-Tumorklons beziehungsweise das fehlende Absinken der Infiltrationsrate der Zelllinie 2623 im venösen Blut der Wirte nach Verabreichung der Liposomen den weiterhin proliferierenden und hämatogen speisenden Lymphomzellen oder Leukämie-initiierenden Stammzellen aus Lymphknoten und Knochenmark zugrunde liegen.

Im Hinblick auf die hier durchgeführte vergleichende Therapieeffizienz-Studie von liposomalem Prednisolon und freiem Dex ist bekannt, dass Dex in Kongruenz seiner anti-inflammatorischen Aktivität *in vitro* wesentlich zytotoxischer gegenüber Lymphomzellen ist als Prednisolon (Ito et al. 1996), auch wenn die Ursachen hierfür unklar sind und vergleichende Meta-Analysen der Literatur zur *In-vivo*-Therapieeffizienz von Dex und Prednisolon aufgrund heterogener Behandlungsprotokolle, Dosierungen und Studien-

populationen mitunter erschwert ist (Teuffel et al. 2011). Neben der fraglichen Annahme eines hochspezifischen GR in GC-sensitiven ALL-Zellen (Lippman et al. 1973) haben zahlreiche *In-vitro*-Studien gezeigt, dass Dex einen stabileren Komplex mit dem GR als Prednisolon eingeht (Ichii et al. 1984) und dass der GR in leukämischen Zellen eine größere Affinität zu Dex im Vergleich zu Prednisolon aufweist (Lippman et al. 1973; Iacobelli et al. 1981). Demgegenüber stehen Studien, die eine vergleichbare Affinität des GR gegenüber Dex und Prednisolon belegen (Ponec et al. 1986), zumal die *In-vitro*-Studien, die unter anderem für Dex eine höhere GR-Affinität in ALL-Zellen suggerieren, eine große Variabilität des Ansprechens auf die beiden GCs zwischen einzelnen ALL-Patientenproben offenbarten (Ito et al. 1996; Kaspers et al. 1996). Im Allgemeinen wird angenommen, dass Dex aufgrund seiner längeren biologischen Halbwertszeit und insbesondere seiner leichten ZNS-Gängigkeit das aktivere GC in der Behandlung der ALL zu sein scheint (Cantrill et al. 1975; Balis et al. 1987; Jones et al. 1991; Kaspers et al. 1996), da seine zunehmende Verwendung in der ALL-Therapie der letzten Jahre die Rezidivraten in Knochenmark und ZNS im Vergleich mit Prednisolon signifikant senken konnte (Bostrom et al. 2003; Mitchell et al. 2005; McNeer und Nachman 2010; Inaba und Pui 2010; Inaba et al. 2013; Domenech et al. 2014), auch wenn hierdurch bisweilen schwerere Nebenwirkungen als bei der Prednisolon-basierten Behandlung in Kauf genommen werden müssen (Igarashi et al. 2005; Teuffel et al. 2011; Mattano et al. 2012).

Neuere Daten, insbesondere auch einer großen Phase-III-Studie, haben allerdings aufgezeigt, dass bei einer höheren, mindestens siebenfachen Dosierung von Prednisolon im Vergleich mit Dex keine Differenzen in der therapeutischen Effizienz beider Substanzen festzustellen sind (Igarashi et al. 2005; Domenech et al. 2014). Trotz des herausragenden Stellenwertes von Prednisolon und Dexamethason in der Behandlung der ALL fehlen valide Daten zu ihrer Bioäquivalenz und optimalen Dosierung (Inaba und Pui 2010). Vor dem Hintergrund, dass jene Thymozyten mit doppelt-positiven Phänotyp -als physiologisches Pendant der NICA-Lymphomzellen- äußerst sensitiv mit Apoptose auf eine GC-Therapie reagieren, bestätigte sich erwartungsgemäß im Rahmen dieser Arbeit eine analog hohe GC-Sensitivität der gleichfalls doppelt-positiven NICA-Lymphome auf die Therapie mit Dex.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde in PEGylierte Liposomen verpacktes Prednisolon in einer intraperitoneal injizierten Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht im simultanen Vergleich mit freiem Dexamethason in einer intravenös injizierten Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht in der *In-vivo*-Behandlung der NICA-Lymphome nach adoptivem Zelltransfer getestet.

Zunächst kann angenommen werden, dass die unterschiedlichen Applikationsformen (intraperitoneal vs. intravenös) keinen Einfluss auf die systemische Bioverfügbarkeit der GCs zu haben scheint, da in beiden Versuchstiergruppen eine vergleichbare Lymphopenie im Verlauf der Behandlung im venösen Blut der Wirte detektiert wurde. Zudem ergaben sich im Rahmen der zweiten Versuchstierreihe (siehe Kapitel 3.4.2) keine objektivierbaren Unterschiede in Ansprechraten und Krankheitsverlauf der NICA-Lymphome bei den

intravenös oder intraperitoneal mit Dex behandelten Wirten. Dies steht in Einklang mit den Daten aus einer Arbeit zu experimenteller Arthritis in Ratten, in denen intravenöse und subcutane Verabreichungen der liposomal verpackten GCs äquivalente Therapieeffekte erzielten (Ulmansky et al. 2012).

In Ermangelung vergleichender Dosierungsstudien zu liposomal verpackten GCs im Vergleich mit freien Formen in der ALL-Therapie und aufgrund der technischen Herausforderung, repräsentative Konzentrationen von GCs im Liposom und anschließend freigesetzt im Zielgewebe beziehungsweise in der Zielzelle zu quantifizieren (Smits et al. 2013), lassen sich Korrelationen von Dosis und Therapieeffizienz zwischen liposomalen und freien GCs insbesondere in der Behandlung hämotologischer Neoplasien nur annäherungsweise bestimmen. Die Ergebnisse aus Arbeiten zur experimentellen Arthritis in Ratten lassen vermuten, dass liposomal verpackte GCs in ihrer anti-inflammatorischen Aktivität mindestens 10-fach effektiver als ihre freie Form zu sein scheinen (Hofkens et al. 2011; Ozbakir et al. 2014). Entsprechende statistische Daten zur antineoplastischen beziehungsweise zytotoxischen Effizienz von liposomal verpackten GCs im Vergleich mit den konventionellen Formen gegenüber Lymphomzellen *in vivo* sind bis dato nicht publiziert worden. So lässt die vorliegende Arbeit, auch in Erwartung einer annährend ähnlichen antineoplastischen Wirksamkeit der in dieser Arbeit verwendeten und konstant dosierten GC-Formen, einen wissenschaftlichen Vergleich der therapeutischen Effizienz beider Substanzen in ihrer jeweiligen Apllikationsform nicht zu und hat demnach nur orientierenden Charakter.

Dessen ungeachtet gelang in dieser Arbeit für das liposomal verpackte Prednisolon ein grundsätzliches Therapieansprechen der NICA-Lymphome nachzuweisen und ein bis dato erstmalig erfasstes Wirkdefizit dieser Therapieform im Lymphsystem zu demaskieren, dessen potentielle Genese weiterführender Untersuchungen bedarf. Zudem zeigten die Liposomen ewartungsgemäß eine deutlich verbesserte Verträglichkeit im Vergleich mit dem hochdosierten freien Dex, in dessen Behandlungskohorte trotz teilweise kompletter Remissionen der Lymphome zahlreiche Wirte aufgrund schwerer Nebenwirkungen oder rascher Verschlechterung des Allgemeinzustandes euthanasiert werden mussten.

Neben der bereits angesprochenen, potentiell denkbaren Unterdosierung der Liposomen im Vergleich mit freiem Dex bieten als weiterer Erklärungsansatz für das schlechtere Gesamtansprechen der T-Zell-Lymphome in der Liposomen-Kohorte beispielsweise Hinweise aus der EAE-Forschung, dass liposomale GCs im Gegensatz zu freiem Dex nur marginale Effekte auf T-Zellen zu haben scheinen, da sie in erster Linie mittels Phagozytose in die Zellen aufgenommen werden - ein Mechanismus zu dem T-Zellen nicht in der Lage sind (Schweingruber et al. 2011). Interessanterweise gibt es Beobachtungen, dass die inital langzirkulierenden PEGylierten Liposomen nach ihrer zweiten Verabreichung im selben Organismus auffällig schnell aus dem Blut aufgenommen werden (Dams et al. 2000). Dieses Phänomen tritt nach ausreichendem Intervall zwischen den Behandlungen von

mindestens 5 Tagen auf und wird als *accelerated blood clearance* (ABC) bezeichnet (Ishida und Kiwada 2008). Es führt bei wiederholter Applikation zu einer drastisch verkürzten Verweildauer der Liposomen im Blut zugunsten ihrer raschen Akkumulation in Leber und Milz (Laverman et al. 2001; Ishida et al. 2006). Auch wenn widersprüchliche Daten im Zusammenhang mit dem ABC-Phänomen publiziert wurden (Gabizon et al. 2008; Perche und Torchilin 2013), gilt letzlich die terminale Akkumulation der Liposomen in Leber, Milz und Knochenmark als gesichert (Gabizon et al. 1991; Bae und Park 2011). Diese Annahme deckt sich mit den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zur Behandlung der NICA-Lymphome mit in PEGylierte Liposomen verpacktes Prednisolon, etwa mit dem raschen Wiederanstieg der Infiltrationsrate im Blut der Wirte nach der zweiten Verabreichung sowie insbesondere mit den hohen Ansprechraten der NICA-Lymphomzellen in Milz, Leber und Knochenmark. Diese Schlussfolgerung setzt allerdings voraus, dass sich der zytotoxische Effekt eines intakten GCs auf angrenzende Lymphomzellen trotz vorheriger Endozytose durch Spleno- oder Hepatozyten ungehindert entfalten kann.

Die bessere Verträglichkeit der Liposomen beruht nicht zuletzt darauf, dass Liposomen in Geweben mit undurchlässigem Endothel (engl. *tight junctions*) wie zum Beispiel im Herzen kaum das Gefäßsystem verlassen und dort ihre Wirkung respektive Nebenwirkung nicht entfalten können (Berry et al. 1998; Batist et al. 2001; Perche und Torchilin 2013). Da in Lymphknoten hochendotheliale postkapilläre Venolen den Austritt größerer therapeutischer Moleküle aus dem Blutstrom mitunter verhindern (Moussion und Girard 2011; Singh et al. 2014; Thomas und Schudel 2015), könnte dies ein potentieller Erklärungsansatz einerseits für die fehlende Wirksamkeit des liposomal verpackten Prednisolons gegenüber den NICA-Lymphomzellen in den infiltrierten Lymphknoten der Wirte und andererseits für das gute Ansprechen in Milz und Knochenmark darstellen, auch wenn Liposomen dank ihrer Größe und Lipophilie prinzipiell passiv in Lymphknoten zu diffundieren vermögen (Zhang und Lu 2014). Außerdem beeinflussen sowohl die Lokalisation als auch die Art der Applikation von Liposomen ihre Absorption in die Lymphknoten (Oussoren et al. 1997; Oussoren und Storm 2001; Altin und Parish 2006), sodass grundätzlich auch die in dieser Arbeit durchgeführte intraperitoneale Injektion der Liposomen eine effektive Bioverfügbarkeit der Liposomen im Lymphsystem konterkariert haben könnte. Für die hier verwendeten PEGylierten Liposomen ist indes bekannt, dass der PEG-Anker die Aufnahme in Lymphknoten und die Phagozytose durch in Lymphknoten ansässige Makrophagen mit konsekutiver lokaler Akkumulation beeinträchtigen kann (Chandrasekaran und King 2014; Zhang und Lu 2014). In soliden Malignomen und Entzündungsherden spielen diese (sog. tumor-assoziierten) Makrophagen (TAM) eine entscheidende Rolle bei der Freisetzung der GCs aus dem Liposomen und der hierdurch erreichten Konzentrierung des GCs am Zielort (Schiffelers et al. 2005; Schäcke et al. 2007; Banciu et al. 2008). Eine Verdrängung der Makrophagen durch das leukämische Infiltrat in Blut, Lymphknoten und Knochenmark könnte demnach einen Wirkungsverlust der Liposomen in diesen Kompartimenten bedingen. Dies widerspräche in mancher Hinsicht der Hypothese von Mao et al. (2013), wonach hämatologische Neoplasien

durch ihre direkte Erreichbarkeit im Blutstrom effizienter auf eine Therapie mit liposomalem GC ansprechen müssten als solide Tumore. Hierdurch wäre allerdings auch die große Diskrepanz in der antileukämischen Wirksamkeit der in dieser Arbeit verwendeten Liposomen zwischen lymphatischem und hämatogenem System ableitbar. In eindeutigem Widerspruch hierzu steht wiederum der vielfach geführte Nachweis, dass liposomales Doxorubicin oder Vincristin in der Behandlung der ALL und anderer hämatologischer Neoplasien deutlich effizienter ist als die jeweilige freie From der Substanzen und es hierbei bisher keine Berichte über ein Therapieversagen im lymphatischen System gibt (Gabizon et al. 1994; Mayer et al. 1990, 1993; Boman et al. 1994; Pulini et al. 2007; Rodriguez et al. 2009; Barenholz 2012; O'Brien et al. 2013; Pathak et al. 2014).

Weitere vergleichende *In-vitro-* und *In-vivo*-Therapiestudien zur Wirksamkeit von in PEGylierte Liposomen verpackten GCs zur Behandlung von (T-)ALL sind nötig, um eine potentielle Überlegenheit der Liposomen in Therapieeffizienz und Verträglichkeit gegenüber freien GCs zu verifizieren. Optimalerweise sollten in den Folgeversuchen die verwendeten Liposomen das gleiche GC enthalten, welches die randomisierte Kontrollkohorte in freier Form und in gleicher Dosierung, Menge sowie Applikationsart erhält. Zur Detektion eines therapiekompromittierenden ABCs der Liposomen sollte ferner eine Verkürzung des Therapieintervalls erprobt werden. Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Rattenmodell einer aggressiven Notch1IC-initiierten T-ALL bietet für weitere Studien eine ideale Plattform.

4.3 GC-Resistenz in NICA-Lymphoblasten

Ein schwindenes Ansprechen hämatologischer Neoplasien auf eine GC-Therapie ist eine bedeutende klinische Herausforderung, die oft mit Resistenzen gegen andere zytostatische Medikamente und einer schlechten Gesamtprognose vergesellschaftet ist (Klumper et al. 1995; Bhadri et al. 2012; Shah und Kumar 2013; Miller et al. 2014).

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass sich im Zuge der glukokortikoiden Behandlung der NICA-Lymphome rasch eine sekundäre dosisabhängige GC-Resistenz ausbildet, die auf einer Herunterregulierung der GR-Expression zu basieren scheint. Dies deckt sich mit der Hypothese, dass die zelluläre Resonanz auf GCs von einer suffizenten GR-Expression abhängt (Geley et al. 1996; Ramdas et al. 1999; Greenstein et al. 2002; Zilberman et al. 2004; Sharma und Lichtenstein 2008; Sánchez-Vega und Gandhi 2009) und eine GC-Resistenz mit einem Verlust der GR-Expression in hämatologischen Neoplasien assoziiert ist (Gomi et al. 1990; Burnstein et al. 1990, 1994; Moalli et al. 1992; Schaaf und Cidlowski 2002). Indes zeigen die meisten primären ALL-Zellen unter einer Behandlung mit GC eine autoinduktive Hochregulierung der GR-Expression und abhängiger GR-Zielgene, für die auf der einen Seite einer kontrovers geführten Diskussion ein essentieller Einfluss auf die Sensitivität oder Resistenz gegenüber einer GC-induzierten Apoptose postuliert wird (Ashraf et al. 1991; Ramdas et al. 1999; Pedersen und Vedeckis 2003; Riml et al. 2004; Miller et al. 2007), welcher auf der anderen Seite von

mehreren Publikationen infrage gestellt wird (Haarman et al. 2004; Bachmann et al. 2005, 2007; Tissing et al. 2006). Ergänzend scheinen Mutationen des GR keinen essentiellen Resistenzmechanismus in primärer ALL darzustellen (Beesley et al. 2009).

Ein weiterer umstrittener Punkt beinhaltet die Frage, ob entweder das absolute Niveau an GR-Transkripten oder -Proteinen die GC-vermittelte Apoptose herbeiführt (Tissing et al. 2005; Gruber et al. 2009; Schwartz et al. 2010) oder aber die Sensitivität der Zelle keinesfalls beeinflusst (Gomi et al. 1990; Wiegers et al. 2001; Lauten et al. 2003; Kfir et al. 2007). Ferner vermag eine hochdosierte GC-Therapie mit zum Beispiel 10 bis 18 mg/m^2 Dexamethason täglich die relative Unempfindlichkeit und den Effekt einer niedrigen GR-Expression in T-ALL zu überwinden (Inaba und Pui 2010). Demnach scheint der schlichte Expressionsverlust des GR den überwiegenden Mechanismus der klinischen GC-Resistenzen trotz dessen zahlreichen Dokumentationen von Lymphoblasten aus hochresistenter ALL nicht überzeugend erklären zu können (Lippman 1982; Miller et al. 2002, 2014; Bhadri et al. 2012), zumal der GR in den meisten GC-resistenten ALL-Biopsaten in ausreichender Quantität und Qualität vorhanden ist (Gaynon und Carrel 1999; Smets et al. 1999; Frankfurt und Rosen 2004; Bachmann et al. 2010). Nichtsdestotrotz kann die retrovirale Expression des GR-Gens eine GC-Sensitivität in resistenten T-ALL-Zellen wiederherstellen (Geley et al. 1996; Renner et al. 2003; Schmidt et al. 2006; Real et al. 2008). Cantley et al. (2014) entdeckten zudem kürzlich eine niedermolekulare Substanz(J9), welche die GC-Sensitivität einer Dex-resistenten T-ALL über eine Hochregulation des GR ohne Einfluss auf die Notch1-Expression zu rehabilitieren vermag. Neuere Untersuchungen führen daher zu der Annahme, dass eine Herunterregulierung oder fehlende Hochregulierung des GR erst dann in eine GC-resistente Zelle resultiert, wenn hierdurch ein bestimmter absoluter Schwellenwert an GR-Transkripten weit unter dem initialen Basalwert unterschritten wird (Schwartz et al. 2012).

Dies würde im Einklang mit der in dieser Arbeit detektierten GC-Resistenz der NICA-Lymphome als Folge einer Herunterregulierung des GR stehen, auch wenn die postulierte Abnahme der GR-Expression zur Etablierung einer Resistenz, nämlich auf ein Viertel bis ein Fünftel der ursprünglichen Basalrate (Schwartz et al. 2010), in der vorliegenden Arbeit nicht gänzlich repoduziert werden konnte. Zur Analyse des exakten Beitrags der GR-Expression zur Etablierung einer GC-Resistenz in T-ALL bedarf es weiterer Studien, zumal der GR im Zentrum eines komplexen Systems aus interaktiven Netzwerken und Signalwegen wie zum Beispiel jene von c-Myc und NF-$\varkappa$B steht (Yuh und Thompson 1989; Kaspers et al. 1994; Tanaka et al. 1999; Medh et al. 2001; Cowan und Storey 2003; Thompson 2008; Garza et al. 2009; Spokoini et al. 2010).

Obgleich sich die in dieser Arbeit aufgetane GC-Resistenz der NICA-Lymphome wahrscheinlich erst im Zuge der repetitiven GC-Behandlung als sogenannte sekundäre Resistenz ausgebildet hat, stellte sich darüber hinaus die Frage, inwieweit das konstitutiv aktive Notch1-Signal die GC-Sensitivität der Lymphomzellen zu beeinträchtigen vermag, da bekannt ist, dass doppeltpositive Thymozyten durch ein aberrantes Notch1-Signal vor der

GC-induzierten Apoptose geschützt werden (Deftos et al. 1998) und die Notch1-induzierte Expression von HES-1 zu einer GR-Herunterregulierung führen kann (Real und Ferrando 2009). Analog kann eine CSI-vermittelte Hemmung des Notch1-Signals zu einer autogenen Hochregulierung des GR und damit zur Sensibilisierung von resistenten T-ALL-Zellen führen (Real et al. 2008; Real und Ferrando 2009). Cialfi et al. (2013) konnten ferner zeigen, dass für eine GC-Resistenz ein intaktes Notch1-Signal erforderlich ist und die anti-apoptotisch wirkende Notch1-Expression (Chadwick et al. 2010) in einigen T-ALL-Zelllinien durch eine dosisabhängige Behandlung mit Dex sensibilisierend supprimiert wird. In anderen T-ALL-Zelllinien bleibt die Notch1-Expression durch eine Therapie mit GCs jedoch unbeeinflusst (Cialfi et al. 2013), sodass die Rolle von Notch1 in der Etablierung einer Resistenz ungewiss bleibt.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigten die GC-therapierefraktären NICA-Lymphome keinen signifikanten Expressionsverlust des Notch1-Gens in der durchgeführten quantitativen Real-Time-PCR, was nach Cialfi et al. (2013) allerdings auch eine restituierte GC-Sensitivität der NICA-Lymphome hätte erwarten lassen. Ein anderer beschriebener Mechanismus, mit dem Notch1 in T-ALL vor GC-induzierter Apoptose schützen kann, beinhaltet die GR-unabhängige Hochregulierung von anti-apoptotischem GIMAP5 (Chadwick et al. 2009, 2010). Die therapierefraktären NICA-Lymphome zeigten in dieser Arbeit allerdings keine signifikante Expressionssteigerung von GIMAP5 im Vergleich mit den therapienaiven Lymphomzellen.

Neben weiteren Mechanismen wie zum Beispiel über eine Expressionsteigerung von c-Myc (Medh et al. 2001; Chan et al. 2007) begünstigt Notch1 die Resistenz insbesondere auch über eine Aktivierung von NF-$\varkappa$B (Bellavia et al. 2000; Shin et al. 2006; Vilimas et al. 2006). Ungeachtet der Kenntnis, dass sowohl Notch1, c-Myc als auch NF-$\varkappa$B Substrate des UPS sind (Flinn et al. 1998; Salghetti et al. 1999; Frankland-Searby und Bhaumik 2012), erbrachte eine gezielte Proteasomhemmung in GC-resistenten NICA-Lymphomzellen in der hier durchgeführten *In-vivo*-Therapiestudie allerdings keine therapeutische Wirksamkeit, obgleich synergistische Therapieeffekte von Bortezomib und Dexamethason beschrieben worden sind (Horton et al. 2006; Pui und Jeha 2007). Dies passt zu den unerwarteten Ergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe, nach denen die NICA-Lymphome die konstitutive Expression von NF-$\varkappa$B vermissen lassen (van den Brandt et al. 2006). Auf diesen Kontext wird im folgenden Kapitel noch ausführlich eingegangen.

Abschließend soll darauf hingewiesen werden, dass neuere Ergebnisse zur ALL darauf hinweisen, dass sich eine neu diagnostizierte ALL, wie bereits eingehend erläutert, aus zahlreichen Subklonen zusammensetzt, von denen gegebenenfalls nur einzelne Subpopulationen oder Stammzellen durch genetische Veränderungen eine GC-Resistenz etablieren können (Mullighan et al. 2008; Yang et al. 2008; Kawamata et al. 2009; Inaba et al. 2013). Demnach könnte es im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten hochdosierten GC-Therapie zu einer Selektion und anschließenden Progression von Subpopulationen der

NICA-Lymphome mit primärer Notch1-induzierten GC-Resistenz gekommen sein, zumal sich die Resistenzprofile einer ALL zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im späteren Verlauf, zum Beispiel im Falle eines Rezidivs, unterscheiden können (Klumper et al. 1995). Da eine langfristige Behandlung mit GCs eine Notch1-vermittelte Resistenz jedoch überwinden kann (Spokoini et al. 2010; Inaba und Pui 2010; Sionov 2013) und hieraus möglicherweise die günstigere Prognose der T-ALL mit aktivierter Notch1-Mutation resultiert (Breit et al. 2006), sprechen die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zusammenfassend allerdings für eine Resistenzentwicklung der NICA-Lymphome, die maßgeblich von der Notch1-unabhängigen GR-Expression abhängig zu sein scheint.

Weitere Untersuchungen zum Mechnismus der GC-Resistenz in NICA-Lymphomen sind nötig, um auf dem Weg zu einer individualisierten, risikostratifizierten und zielgerichteten Therapie diejenigen ALL-Zelllinien beziehungsweise -Patienten prätherapeutisch selektionieren zu können, die entweder von einer langdauernden hochdosierten GC-Therapie profitieren oder aber vor den entbehrlichen Nebenwirkungen einer ineffizienten oder überdosierten GC-Therapie bewahrt werden müssen (Schwartz et al. 2010). Dies ist insofern von elementarer Bedeutung, da eine GC-Resistenz ein wichtiges ungünstiges Prognosekriterium für den Behandlungsverlauf der ALL ist (Dördelmann et al. 1999) und der zugrundeliegende Mechanismus der GC-Resistenz auch eng mit der allgemeinen Apoptoseresistenz und konsekutiven Proliferationsneigung der Lymphomzellen verknüpft sein könnte. Dementsprechend kam es im Rahmen dieser Arbeit nach Auftreten der GC-Resistenz zu einer eskalierend aggressiven Progression der NICA-Lymphome.

4.4 Neuer Therapieansatz mit Bortezomib

Die T-ALL repräsentiert etwa 15 % der kindlichen und 25 % der adulten ALL-Fälle. Trotz des Einsatzes von Hochdosis-Polychemotherapien ist der Behandlungserfolg weiterhin unbefriedigend und die Prognose insbesondere der rückfälligen Patienten schlecht (Pui und Evans 2006). Angesichts klinischer Limitierungen neuer Therapieansätze (wie z. B. γ-Sekretase-Inhibitoren) ist die Entwicklung neuer Strategien auf Grundlage des wachsenden Verständnis zur Pathophysiologie der T-ALL von zentraler Bedeutung.

Die Proteasomhemmung wird ganz aktuell für eine spezifische und effektive Methode zur Eliminierung von Krebszellen gehalten, die mitunter konventioneller Chemotherapie widerstehen. Bortezomib ist der erste klinisch zugelassene Proteasomhemmer und bereits in breiter Anwendung insbesondere in der Behandlung des Multiplen Myeloms (Moreau et al. 2012b), in welcher es hochdosiertem Dex überlegen ist (Richardson et al. 2005; Mateos et al. 2010). Seine grundsätzliche zytotoxische Aktivität auch gegenüber ALL wurde mehrfach belegt (Tan und Waldmann 2002; Huang et al. 2012; Niewerth et al. 2013; Koyama et al. 2014) und wird vornehmlich auf eine Hemmung des Nf-κB-Signalweges zurückgeführt (Russo et al. 2001; Cusack et al. 2001; Vilimas et al. 2006), auch wenn die genauen Wirkmechanismen nachwievor nicht endgültig aufgeklärt sind (Hideshima et al. 2009; Du und Chen 2013). Die

bisherigen klinischen Studien mit Bortezomib als Einzelsubstanz in der Behandlung von Patienten mit refraktärer oder rezidivierter ALL hatten allerdings eine unbefriedigende antileukämische Aktivität offenbart (Orlowski et al. 2002; Cortes et al. 2004; Horton et al. 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Monotherapie mit Bortezomib in der *In-vivo*-Behandlung der transferierten NICA-Lymphome im Vergleich mit unbehandelten Kontrollen und mit hochdosiertem Dex getestet. Zunächst bleibt festzuhalten, dass sich für die intraperitoneale und intravenöse Injektion von Bortezomib vergleichbare Studienergebnisse ergaben, sodass eine äquivalente Bioverfügbarkeit beider Verabreichungs-formen angenommen werden kann. Neuere Daten aus humanen Studien legen allerdings nahe, dass die Inzidenz unerwünschter peripherer Neuropathien durch eine subkutane anstatt intravenöse Injektion von Bortezomib bei vergleichbarer therapeutischer Wirksamkeit signifikant gesenkt werden kann (Mateos und San Miguel 2012; Moreau et al. 2012a).

Im Vergleich mit Dex zeigten die Wirte der Bortezomib-Gruppe im Zuge der hier durchgeführten Therapiestudie einen rascheren Gewichtsverlust, was entweder auf eine schlechtere Verträglichkeit der Substanz oder aber in Korrelation mit den simultan detektierten Infiltrationsraten auf die schwächer supprimierte Lymphomlast beziehungsweise -progression zurückgeführt werden kann. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass Gewichtsverlust oder Anorexie als eine typische Nebenwirkung von Bortezomib auftreten (Horton et al. 2007) und die krebsbedingte Auszehrung verstärken kann, auch wenn laut dem Zulassungsbericht der FDA unerwünschte Nebenwirkungen von Bortezomib bei Ratten erst ab einer deutlich höheren Dosierung als in den hier durchgeführten Therapiestudien auftreten (Bross et al. 2004).

Von beträchtlicherer Relevanz konnte im Rahmen dieser Arbeit allerdings ein deutlicher Vorteil von Bortezomib gegenüber Dex hinsichtlich einer therapiebegleitenden Immunsupprimierung des behandelten Wirtes belegt werden. Solche Zytostatika-assoziierten Neutropenien bergen das Risiko von therapielimitierenden bis lebensbedrohlichen Begleitinfektionen, zumal dieser kompromittierende Effekt in konventionellen Kombinationstherapien durch weitere myelosuppressive Substanzen exorbitant gesteigert werden kann. So zeigt Bortezomib anhand des hier und in anderen Publikationen erhobenen Nebenwirkungsprofil im Gegensatz zu GCs unverkennbar günstigere Eigenschaften für eine Kombination mit konventionellen Polychemotherapien (Cortes et al. 2004; Pui und Jeha 2007; Messinger et al. 2010, 2012; Du und Chen 2013), obgleich die weiterführenden Daten dieser Arbeit ebenfalls auf lange Sicht eine deutliche Reduktion des wirtseigenen Immunsystems durch Bortezomib belegen. Auf der anderen Seite ist ungeklärt, ob eine Regredienz der wirtseigenen inflammatorischen Immunzellen, hier insbesondere regulatorische T-Zellen, mit konsekutivem Produktionsabfall proliferativer Zytokine und Wachstumsfaktoren, vergleichbar mit der GC-Wirkung (Wuchter et al. 2000; Tuckermann et al. 2005), einen wachstumshemmenden Einfluss auf die malignen Zellen und

gegebenfalls einen Verlust der anergen Toleranz zur Folge haben könnte (Wang et al. 2005; Zhou et al. 2009; Zhang et al. 2013; Curran et al. 2015).

Im Hinblick auf das Therapieansprechen der NICA-Lymphome war in dieser Arbeit eine Monotherapie mit Bortezomib hochdosiertem Dex deutlich unterlegen. Obgleich Bortezomib zu einer vergleichbar effektiven Reduktion der Lymphomlast in infiltrierten Lymphknoten und etwas schwächer auch im Knochenmark führte, zeigte sich im Blut und insbesondere in der Milz nur eine geringe bis fehlende *In-vivo*-Zytotoxizität von Bortezomib. Zudem fiel auf, dass die initiale Reduktion der im Blut zirkulierenden Lymphomzellen durch Bortezomib mit einer Latenz von mehreren Tagen auftrat und trotz erneuter Applikation des Bortezomibs im leukämischen Nadir kurzfristig von einem raschen Wiederanstieg der Infiltrationsrate gefolgt war. Mehr als die Hälfte der Wirte, die mit Bortezomib behandelt wurden, hatten gegenüber den Kontrollen keinen Überlebensvorteil.

Die in dieser Arbeit gewählte Dosierung von Bortezomib (0,25 mg/kg) orientierte sich an einer Arbeit zur tierexperimentellen EAE-Forschung, bei der sich eine gute systemische *In-vivo*-Wirksamkeit von Bortezomib mit Reduktion der proinflammatorischen T-Zellen in der behandelten Ratte gezeigt hatte (Fissolo et al. 2008). Eine kürzlich veröffentlichte Studie zur Behandlung von T-ALL in Mäusen hat zudem unter Verwendung einer vergleichbaren Dosierung von Bortezomib die Ergebnisse der hier erhobenen Daten bezüglich der begrenzten anti-leukämischen Potenz von Bortezomib als Einzelsubstanz im Vergleich mit unbehandelten Kontrollen und mit Dex weitestgehend reproduziert (Koyama et al. 2014). Demgegenüber erbrachte die *In-vivo*-Therapie mit Bortezomib in einer deutlich höheren Dosierung (1 mg/kg alle 3-4 Tage) in einem Mausmodell mit T-ALL ein auffallend besseres Therapieansprechen und dadurch ein signifikant längeres Überleben (Huang et al. 2012).

Allerdings liegen die etablierten Dosierungen von Bortezomib in der leitliniengerechten Behandlung des Multiplen Myeloms des Erwachsenen und in den ersten humanen Kombinationsstudien zu T-ALL deutlich niedriger (1,3 mg/m^2 (Messinger et al. 2010), entspricht etwa 0,12-0,19 mg/kg unter Berücksichtigung des Scaling-Faktors von 3,8 zur Interspeziesextrapolation Ratte/Mensch (Schneider et al. 2002; Löscher et al. 2006)). In der Phase-I-Studie zu singulärem Bortezomib hatte sich mit dieser tolerierbaren Maximaldosierung hingegen kein wesentlicher Therapieeffekt bei der Behandlung von Kindern mit rezidivierter T-ALL gezeigt (Horton et al. 2007). In Anbetracht dieser inkompatiblen Daten zur Dosis-Wirkungs-Beziehung sollte auch zur Validierung der hier erhobenen Ergebnisse bezüglich der therapeutischen Effektivität von Bortezomib in der *In-vivo*-Behandlung der NICA-Lymphome eine vergleichende Dosisfindungsstudie bei Ratten durchgeführt werden.

Aufgrund des in dieser Arbeit unerwartet heterogenen und auffallend organotropen Ansprechens der NICA-Lymphome auf Bortezomib bleiben Wirksamkeit und insbesondere Wirkmechanismus von Bortezomib gegenüber der Notch1IC-abhängigen T-ALL weiterhin undurchsichtig. Mehrheitlich wurde in diesem Zusammenhang bislang angenommen, dass Bortezomib seine Wirkung in hämatologischen Malignomen vornehmlich über den

NF-κB-Signalweg entfaltet (Hideshima et al. 2001a, b; Mitsiades et al. 2003; Almond und Cohen 2002; Baud und Karin 2009). Die postulierte Hemmung von konstitutiver NF-κB-Aktivität in Myelom-Zellen durch Bortezomib mit konsekutiver Apoptose-Einleitung konnte allerdings bisher in keiner präklinischen oder klinischen Studie eindeutig nachgewiesen werden (Hideshima et al. 2009). Die hier transferierten NICA-Lymphome proliferieren in vollständiger Abwesenheit des klassischen NF-κB-Signals (van den Brandt et al. 2006), obgleich eine enge Interaktion zwischen Notch1 und dem NF-κB-Signalweg in vielen T-ALL-Zelllinien aufgedeckt worden ist (Bellavia et al. 2000; Screpanti et al. 2003; Shin et al. 2006; Rosati et al. 2009; Song et al. 2008). In vielen Fällen von T-ALL wurde ferner eine prä-TCR-unabhängige Aktivierung des Nf-κB-Signalweges durch ein verstärktes Notch1-Signal detektiert und beifolgend die zytotoxische Wirksamkeit von Bortezomib gegenüber solcher T-ALL auf eine Hemmung von Nf-κB zurückgeführt (Kordes et al. 2000; Satou et al. 2004; Vilimas et al. 2006; Sanda et al. 2006; Saitoh et al. 2008; Espinosa et al. 2010; Huang et al. 2012). So wurde erst kürzlich gezeigt, dass Bortezomib in T-ALL die Expression der Nf-κB-Komponenten p65 und p50 herunterreguliert und hierdurch die Nf-κB-Aktivität herabsetzt (Koyama et al. 2014). In den NICA-Lymphomen wurde allerdings weder eine Expression des Homodimers p50 noch des Heterodimers p50:p65 detektiert (van den Brandt et al. 2006).

Interessanterweise konnte im Rahmen dieser Arbeit Bortezomib jedoch grundsätzlich eine zytotoxische Wirkung auf die NF-κB-defizitären NICA-Lymphome attestiert werden, was einen differentiellen, NF-κB-unabhängigen Wirkmechanismus von Bortezomib gegenüber den NICA-Lymphomen belegt. Dies wirft zugleich die Frage auf, ob dennoch das Fehlen des Nf-κB-Signalweges in den NICA-Lymphomen die Therapieeffizienz des Bortezomibs abgeschwächt haben könnte. Hierzu passend hatten sowohl Bortezomib als Einzelsubstanz als auch eine spezifische Hemmung von Nf-κB keinen Effekt auf das Tumorwachstum in zwei unterschiedlichen T-ALL-Mausmodellen (Tan und Waldmann 2002; O'Neil et al. 2003). In der im Rahmen dieser Arbeit mit Bortezomib behandelten Kohorte war gleichfalls in der Hälfte der Fälle keinerlei Therapieansprechen zu verzeichnen gewesen. Dies steht Studien mit nachgewiesener Wirksamkeit von Bortezomib gegenüber ALL entgegen, auch wenn in diesen Zelllinien meist ein konstitutives Nf-κB-Signal detektiert wurde (Tan und Waldmann 2002; Satou et al. 2004; Houghton et al. 2008; Huang et al. 2012; Koyama et al. 2014). Andererseits konnten Hideshima und Kollegen unerwartet zeigen, dass Bortezomib nicht zu einer Hemmung, sondern zu einer Wirksamkeits-unabhängigen Aktivierung von Nf-κB in den meisten Zelllinien des Multiplen Myeloms führt (Hideshima et al. 2009). Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer Studie zu Bortezomib in der experimentellen Therapie des Endometriumkarzinoms (Dolcet et al. 2006) und zu Berichten von Bortezomib-resistenter Nf-κB-Aktivität in primären MM-Zellen (Markovina et al. 2008), was einen Zellart-abhängigen Effekt von Bortezomib auf den Nf-κB-Signalweg annehmen lässt und das Modell von Bortezomib als grundsätzlichen Nf-κB-Inhibitor infrage stellt (Hideshima et al. 2009; Messinger et al. 2010). In T-ALL war diese Steigerung der Nf-κB-Aktivität durch Bortezomib jedoch zuletzt nicht reproduzierbar (Koyama et al. 2014). In den humanen Phase-I-Studien zu

Bortezomib in T-ALL verzeichneten Horton und Kollegen (2007) 6-12 Stunden nach Applikation von Bortezomib eine deutliche Expressionssteigerung von Nf-κB, gefolgt von einer starken Abnahme der Expression einen Tag nach der Gabe. Demgegenüber wurde von einer eindeutigen Reduktion der Nf-κB-Expression eine Stunde nach Bortezomib-Gabe in humaner AML berichtet (Attar et al. 2008). Diese und die eigenen Ergebnisse bestärken demnach einerseits eine ungewisse Rolle des Nf-κB-Signalweges im Zuge der antineoplatischen Proteasomhemmung und andererseits die Annahme von alternativen Wirkmechanismus zur Zytotoxizität von Bortezomib gegenüber den NICA-Lymphomen, zumal derer zahlreiche beschrieben worden sind (Frankland-Searby und Bhaumik 2012; Crawford und Irvine 2013; Du und Chen 2013).

Zur Verifizierung alternativer Wirkmechanismen wäre unter anderem eine Expressionsanalyse von Nf-κB beziehungsweise von p50, p65 und p105 in den NICA-Lymphomen und anderen ALL-Zelllinien nach Konfrontation mit Bortezomib denkbar. Gleichfalls könnte eruiert werden, inwieweit die Expression von konstitutivem Nf-κB das Therapieansprechen der ALL auf eine Proteasomhemmung beeinflusst, was unmittelbar klinische Relevanz für die Selektion geeigneter Patienten für diese Therapieoption beinhalten würde. Die Expression von konstitutivem Nf-κB sowie das Vorhandensein von alternativen gegebenenfalls Zelllinien-spezifischen Ansatzpunkten für eine effizientere Zytotoxizität von Bortezomib können demnach die Therapieeffizienz von unspezifischen Proteasomhemmern wie Bortezomib in den hämatologischen Neoplasien entscheidend bestimmen (Min et al. 2006; Messinger et al. 2010; Huang et al. 2012). Dies würde einen Erklärungsansatz für die stark divergierenden Ansprechraten der unterschiedlichen hämatoneoplastischen Zelllinien von Mensch und Versuchstieren auf Bortezomib erklären (Satou et al. 2004; O'Connor 2004; Hideshima et al. 2009; Szczepanek et al. 2010).

Dennoch bleibt die Genese der stark unterschiedlichen Ansprechraten der NICA-Lymphome in Knochenmark, Lymphknoten und Milz unklar. Nach unserem Wissen gibt es keine weiteren Berichte über organspezifische Divergenzen der Therapieeffizienz von Bortezomib als Einzelsubstanz in der Behandlung von ALL, da in den meisten präklinischen und insbesondere in den humanen Studien als Verlaufsparameter für das Therapieansprechen von Bortezomib nur die Erfassung des lokal induzierten Tumorvolumens, von Knochenmark-Biopsien oder Blutbildkontrollen durchgeführt wurden (Horton et al. 2007; Messinger et al. 2010) und Angaben zum Beispiel über die therapieinduzierte Regredienz einer prätherapeutischen Lymphadenomegalie oder einer objektiv erfassten Lymphknoteninfiltration fehlen.

Das relativ gute Therapieansprechen der NICA-Lymphome auf Bortezomib speziell im Knochenmark, und eventuell gleichfalls in den Lymphknoten, könnte jedoch einer Hypothese aus Studienergebnissen zur Therapie des Multiplen Myeloms entsprechen, wonach Bortezomib seine antineoplastische Aktivität nicht allein auf die malignen Zellen sondern insbesondere auch auf das umgebende und für die Lymphoblasten essentielle

Mikromileu des Knochenmarks entfaltet (Hideshima et al. 2001b; Edwards et al. 2009; Nawrocki et al. 2002; Wang et al. 2015). Auf die Annahme eines wesentlichen Beitrags des umgebenden Mikromileus für Überleben, Proliferation und Therapieresistenz von Lymphomzellen wurde bereits detailliert eingegangen. Man nimmt an, dass die Aktivität des Proteasoms in den malignen Zellen durch das Mikromileu angeregt wird (Edwards et al. 2009). So zeigte sich bei Edwards und Kollegen (2009) in Einklang mit den eigenen Daten zu den NICA-Lymphomen eine deutlich effizientere Zytotoxizität von Bortezomib gegenüber Myelom-Zellen im Knochenmark im Vergleich mit Myelom-Zellen in der Milz. Gleichfalls übt Bortezomib wichtige Hemmeffekte auf die Progression von Myelom-assoziierten Osteolysen aus, indem es die Aktivität von Osteoklasten zugunsten der von Osteoblasten unterdrückt (Terpos et al. 2006; Heider et al. 2006; Giuliani et al. 2007). Die im Gegensatz zur T-ALL deutlichen besseren Ansprechraten des Multiplen Myeloms auf eine Therapie mit Bortezomib insbesondere in den humanen Studien (Orlowski et al. 2002; Richardson et al. 2003, 2005; Cortes et al. 2004; Horton et al. 2007) könnten demnach nicht zuletzt darauf beruhen, dass sich die Plasmazellen des Multiplen Myeloms anders als die Lymphoblasten der T-ALL meist ausschließlich im Knochenmark befinden und obligat dessen Interaktion bedürfen (Mundy et al. 1974; Edwards et al. 2008).

Neben der diskutablen Rolle des Nf-κB-Signalweges während der antineoplastischen Proteasom-Hemmung stellt sich anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse ferner die Frage, inwieweit das konstitutive Notch1-Signal der NICA-Lymphome ihre Sensibilität auf die Proteasom-Hemmung beeinflusst. Verkomplizierend ist bekannt, dass -wie bereits erwähnt- onkogenes Notch1 in T-ALL mit der Aktivierung des Nf-κB-Signalweges in Verbindung gebracht wird (Kordes et al. 2000; Satou et al. 2004; Martinez-Delgado et al. 2005; Sanda et al. 2006; Osipo et al. 2008; Saitoh et al. 2008; Huang et al. 2012). So geht man mehrheitlich davon aus, dass die konstitutive Expression von Notch1 in T-All einerseits -neben direkten transkriptionellen Aktivierungsmechanismen- die Hemmung von NF-κB durch sein Inhibitorprotein IκB unterbindet, andererseits aber auch die unmittelbare Expression von zahlreichen NF-κB-Zielgenen induziert (Vilimas et al. 2006; Shin et al. 2006; Espinosa et al. 2010; Huang et al. 2012).

Da in den NICA-Lymphomen kein NF κB-Signal detektiert wurde (van den Brandt et al. 2006) ist in dieser T-ALL-Variante ein relevanter Einfluss des konstitutiven Notch1 auf das Bortezomib-Therapieansprechen über diesen Signalweg unwahrscheinlich. Allerdings wurde kürzlich gezeigt, dass Bortezomib zwar die Transkription und Aktivität von endogenem Notch1 inklusive seiner Zielgene (wie c-Myc und prä-Tα) sowie abhängiger onkogener Signalwege in T-ALL herunterreguliert (Huang et al. 2012; Yang et al. 2015), aber andererseits eine artifizielle beziehungsweise transgene Überexpression von Notch1 die T-ALL-Zellen vor Bortezomib-induzierter Apoptose schützen kann (Koyama et al. 2014). Dies bietet einen naheliegenden Erklärungsansatz für das vergleichsweise schlechte Ansprechen der NICA-Lymphome auf die Therapie mit Bortezomib, zumal Notch1 ergänzend auch ein Substrat des Ubiquitin-Proteasom-Komplexes ist (Gupta-Rossi et al. 2001; Oberg et al. 2001; Wu et al.

2001; Lai 2002; Mo et al. 2007). Zudem wurde erst kürzlich ein synergistischer Effekt von Bortezomib und einem γ-Sekretase-Hemmer in der Behandlung humaner T-ALL mit aktiviertem Notch1 berichtet (Yang et al. 2015). Allerdings korreliert die Überexpression von NICD auch mit einer konstitutiven Resistenz gegenüber GCs (Cialfi et al. 2013), was sich im Rahmen dieser vergleichenden Therapiestudie mit Dex und Bort zumindest in Anbetracht der initial guten Ansprechraten auf Dex nicht angedeutet hat.

Im Weiteren ist bekannt, dass Bortezomib die Wirkung konventioneller Zytostatika steigern und sogar restituieren kann, wenn diese nach wiederholtem Einsatz im Krankheitsverlauf unwirksam geworden sind (Hideshima et al. 2001b; Ma et al. 2003; Nikrad et al. 2005; Messinger et al. 2010). Die genauen Mechanismen, mit denen die Proteasom-Hemmung die Sensitiviät gegenüber anderen Chemotherapeutika erhöht, sind im Einzelnen noch unklar (Mitsiades et al. 2003). Die Hypothese von einem sensibilisierenden Effekt über eine Hemmung von NF-κB in AML (Romano et al. 2003), konnte in ALL bislang nicht bestätigt werden (Min et al. 2006).

Unter Berücksichtigung des fehlenden und somit hierfür irrelevanten NF-κB-Signals in den NICA-Lymphomen und von Berichten, dass der Proteasom-Komplex in der GC-induzierten Degradierung des GR involviert ist (Schaaf und Cidlowski 2002), stellte sich in dieser Arbeit die Frage, ob eine Proteasom-Hemmung -wie berichtet- zu einer erhöhten Aktivität des GR führen und die Therapieeffizienz des Dex steigern oder im resistenten Stadium wiederherstellen würde können (Wallace und Cidlowski 2001; Horton et al. 2006; Niewerth et al. 2013). Entgegen den Erwartungen vermochte Bortezomib, die Wirksamkeit von Dex in den NICA-Lymphomen nicht wesentlich zu verstärken. Allerdings erfolgte die nahezu gleichzeitige Applikation von Bortezomib und Dex in dieser Arbeit erst im GC-resistenten und weit progredienten Stadium, was den Therapieeffekt gegebenenfalls reduziert haben könnte. Demgegenüber wurde berichtet, dass die GC-Sensitivität keinen relevanten Faktor für die anti-proliferative und pro-apoptotische Wirksamkeit des Bortezomibs darstellt (Horton et al. 2006). Es bedarf weiterer Studien zur simultanen Kombinationstherapie der NF-κB-defizitären NICA-Lymphome mit Dex und Bortezomib, um einen potentiellen GC-sensibilisierenden Effekt durch eine gesteigerte oder wiederhergestellte GR-Aktivität infolge einer Proteasom-Hemmung evaluieren zu können.

Gleichfalls zeigte sich in Studien zur Kombination eines γ-Sekretase-Inhibitors (GSI) sowohl mit einem GC (Real et al. 2008) als in einer anderen Arbeit auch mit Bortezomib (Yang et al. 2015) eine vielversprechende Synergie dieser Substanzen in der Behandlung der ALL. Inzwischen laufen aktuell Phase I- und II-Studien zur Kombinationstherapie mit einem GSI und Dex in jungen Patienten mit rezidivierter oder refraktärer T-ALL (Papayannidis et al. 2015; NCT00100152, NCT01088763, detaillierte Informationen unter https://clinicaltrials.gov).

Letzlich besteht in diesem Kontext die Hoffnung, durch weiterführende Erkenntnisse zu den spezifischen Signalwegen, über die unter anderem Bortezomib maßgeblich die Wirksamkeit anderer Medikamente potenzieren kann, zielgerichtetere und noch effizienter

synergistisch agierende Therapeutika zu entwickeln, welche einige der konventionellen, nebenwirkungsreichen Zytostatika der aktuellen Therapieregime niedriger dosierbar oder gar obsolet machen könnten (Pui 2009; Messinger et al. 2010).

4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Neben der Etablierung eines neuen Notch1IC-transgenen T-ALL-Rattenmodells durch erfolgreichen repetitiven Lymphomtransfer in syngene Wildtyp- und CD8 knock-out-Wirte konnten in dieser Arbeit zudem weitreichende Erkenntnisse zu Lymphomprogression, heterogenem Phänotyp, Metastasierungsverhalten und GC-Resistenzentwicklung der NICA-Lymphome gesammelt sowie limitierte Therapieeffizienzen neuartiger Behandlungsansätze mit PEGyliertem Prednisolon und Bortezomib im Vergleich mit Dex *in vivo* aufgedeckt werden. Dieses neue Tiermodell zeichnet sich unter anderem dadurch aus, dass mit geringem technischen und materiellen Aufwand rasch eine T-ALL mit hoher Penetranz in leicht verfügbaren Wirten induziert und nach kurzem Intervall einfach detektier- und isolierbare Lymphomzellen in hoher Quantität und Konzentration aus diesen wieder extrahiert und anschließend mühelos transferiert oder konserviert werden können. Daher stellt dieses Rattenmodell ein ideales Werkzeug dar, um weiterführende Studien zu den NICA-Lymphomen und deren Eigenschaften sowie potentiellen Angriffspunkte für neue Leukämie-Medikamente durchzuführen, zumal die Ergebnisse dieser Arbeit weiterer differenzierter Nachforschung und Validierung bedürfen.

So bleibt unter anderem die Genese des differentiellen GFP-Verlustes in den transferierten Lymphomzellen unklar. In Anbetracht der elementaren Bedeutung für sämtliche Studien, bei denen eine *In-vivo*-Zellverfolgung durch transgene Fluoreszenzproteine Verwendung findet, stellt sich die Frage, welchen Einfluss Wahl und Region des Promoters auf eine stabile Expression des fluoreszierenden transgenen Markerproteins in stark proliferierenden Zelllinien nach adoptivem Zelltransfer in syngene Wirte haben. Letzlich ist anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Daten gewissermaßen zu befürchten, dass etwa durch epigenetisches Gen-Silencing der Fluoreszenzproteine eine Vielzahl von Studienergebnissen mit obligatem, langfristigem Zelltracking verfälscht würden könnten.

Eine Schwäche der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten durchflusszytometrischen Charakterisierung der NICA-Lymphomzelllinien stellt sicherlich die Erhebung des MFI in Bezug zu einer relativ ungenau definierten Referenzpopulation dar. Auch wenn durch die gewonnen Daten ein heterogener Phänotyp der Zelllinien anzunehmen ist (was gleichfalls die Annahme eines monoklonalen Ursprungs infrage stellt), lassen sich nur wenige Aussagen zu spezifischen Oberflächen- oder Aktivierungsmarker auf den Lymphomzellen treffen. Geht man davon aus, dass es zur malignen Transformation Notch1IC-überexprimierender Thymozyten mindestens einer weiteren Mutation mit unmittelbarer Auswirkung auf den Phänotyp bedarf (Chiang et al. 2013; Lobry et al. 2014), ergeben sich durch Detektion derselben womöglich neue Angriffsstellen für eine zielgerichtete Therapie insbesondere zur

spezifischen Eradikation der leukämischen Stammzell-Population einer ALL (Annesley und Brown 2015).

In dieser Arbeit gestalteten sich die Versuche einer effizienten *In-vitro*-Kultivierung der NICA Lymphome aufgrund einer starken Neigung der Lymphomzellen zur Spontanapoptose *ex vivo* fruchtlos. In Kenntnis des bedeutenden Einflusses des umgebenden Mikromileus auf neoplastische Zellen und der in dieser Arbeit nachgewiesenen hohen Expressionsdichte von LFA-1 auf den Lymphomzellen ergibt sich auf Grundlage der hier erhobenen Daten folglich ein neuer Ansatz zur *In-vitro*-Kultivierung mit Einsatz von Stromazellen oder löslichem ICAM-1. Die Vorzüge einer effizienten Kultivierung sind insbesondere für molekular-genetische und pharmazeutische Studien von hämatologischen Neoplasien wie den NICA-Lymphomen offensichtlich.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass bei der *In-vivo*-Behandlung der T ALL aus NICA-Ratten in PEGylierte Liposomen verpacktes Prednisolon zu einem Überlebensvorteil gegenüber unbehandelten Kontrollen führt. Das unerwartet beobachtete Wirkungsdefizit im lymphatischen System sollte jedoch reevaluiert werden, um wichtige Erkenntnisse zum grundsätzlichen Einsatz liposomaler GCs in der Behandlung von Lymphomen zu erlangen. Für vergleichende *In-vivo*-Therapiestudien bedarf es vorab titrierender Dosisäquivalenz- beziehungsweise Dosisfindungs-Studien mit liposomalen und freien GCs der gleichen Art in derselben Spezies. Hierdurch ließe sich eruieren, ob die erhoffte Dosisreduzierung des liposomal verpackten GCs in der Therapie der ALL ohne Wirkungsverlust realisierbar ist.

In Anbetracht der klinischen Relevanz ist davon auszugehen, dass die komplexen Zusammenhänge zwischen den Signalwegen von Notch1, c-Myc, NF-κB und des GR in ALL, unter anderem in Bezug auf die Entwicklung einer Resistenz gegenüber GCs und konventionellen Zytostatika und auf zielgerichtete Therapiestrategien, zentrales Thema zahlreicher Forschungsbemühungen der nächsten Jahre sein werden. Ferner bleibt die Rolle des NF-κB- und des Notch1-Signalweges bei dem therapeutischen Einsatzes eines Proteasom-Inhibitors wie Bortezomib in ALL umstritten. Weitreichende Erkenntnisse zum genauen Wirkmechanismus von Bortezomib in hämotologischen Neoplasien würde eine Selektion geeigneter Patienten für diese Therapieoption ermöglichen (Dos Santos et al. 2010; Niewerth et al. 2013). Aufgrund der prinzipiellen Zytotoxizität der Proteasomhemmung bei allerdings fehlendem NF-κB-Signalweg stellen die NICA-Lymphome einen idealen Ausgangspunkt zur Detektion und Erforschung alternativer Wirkmechanismen von Bortezomib dar und können hierdurch möglicherweise neue Angriffspunkte einer zielgerichteten synergistischen Kombinationstherapie aufdecken. Eine simultane Kombinationstherapie therapie-naiver NICA-Lymphome mit Dex und Bortezomib könnte zudem die Hypothese eines GC-sensibilisierenden Effektes durch eine gesteigerte GR-Aktivität infolge einer Proteasom-Hemmung validieren (Wallace und Cidlowski 2001; Horton et al. 2006).

Obgleich Notch1-transgene Tiermodelle maßgeblich zu unserem Verständnis der Notch1-Funktion in hämatologischen Neoplasien beitragen können, wurde von einigen Autoren kürzlichst die Sorge geäußert, dass diese Tierstämme den *In-vivo*-Gesamtkontext von Notch1-Mutationen in Malignomen nicht exakt reflektieren könnten (Berquam-Vrieze et al. 2012). Zum einen begründet sich diese Annahme auf die obligate Gegenwart eines geklonten Promoters, welcher die Überexpression des Proteins bedingt, und unter Umständen die normale Regulation der Notch1-Expression sowie seine antegrade Autoregulation beeinträchtigt, für die mutmaßlich der endogene Promoter verantwortlich ist (Del Monte et al. 2007). Zum anderen wird in den Notch1-transgenen Stämmen -wie die NICA-Ratten- regelhaft nur die intrazelluläre Domäne von Notch1 exprimiert, sodass die aktivierende Abspaltung durch die γ-Sekretase hinfällig ist, was diese Tiermodelle für die präklinischen Therapiestudien mit Fokus auf die vielversprechende Unterbindung der Rezeptorabspaltung (wie unter anderem durch γ-Sekretase-Hemmer) limitiert (Wu et al. 2010).

Insgesamt stellt das hier etablierte T-ALL-Rattenmodell mit dysreguliertem Notch1-Signal durch adoptiven Transfer von Lymphomzellen aus NICA-Ratten ein neues Werkzeug dar, die Pathologie dieser Erkrankung besser zu verstehen. Die Lymphome dieser Ratten zeigen gewisse Ähnlichkeiten zu den humanen Varianten, obgleich in dieser Arbeit auch bisher nicht beobachtete Merkmale aufgefallen sind. Die Bedeutung dieses Tiermodells wird nicht zuletzt dadurch gewahr, dass eine der klinischen Herausforderung die Behandlung von Patienten mit rezidivierter oder refraktärer T-ALL beinhaltet und dieses vergleichsweise seltene und typischerweise rasch progrediente Krankheitsstadium den Erkenntnisgewinn in den entsprechenden klinischen Studien mäßigt. Der zentrale Mechanismus und die molekularen Verknüpfungen, mit denen Notch1 die Transformation in eine T-ALL zu beeinflussen vermag, bedürfen weiterer intensiver Erforschung, um durch Errungenschaften auf diesem Gebiet wesentliche Hilfestellung bei der Therapieentscheidung zu leisten und den Weg für eine rationalere Therapie der T-ALL mit verbessertem Behandlungserfolg zu ebnen.

5 Zusammenfassung

Die T-Zell akute lymphoblastische Leukämie (T-ALL) ist eine aggressive Krebserkrankung mit hoher Rezidivwahrscheinlichkeit und insgesamt schlechter Prognose, die häufig durch ein fehlreguliertes, meist konstitutiv aktives Notch1 gekennzeichnet ist. Ungeachtet der wichtigen Rolle von Notch1 in der T-Zell-Entwicklung sind die genauen Mechanismen, mit denen ein fehlreguliertes Notch1-Signal zur Karzinogenese führt, bislang unverstanden. Diese Fragen können mithilfe eines Rattenmodells (NICA-Ratten), das durch die transgene Expression von konstitutiv aktivem Notch1IC in Thymozyten charakterisiert ist, untersucht werden. Diese Tiere entwickeln mit hoher Inzidenz thymische Lymphome, welche sich durch unerwartete phänotypische Eigenschaften und eine rasche leukämische Aussaat auszeichnen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Rattenmodell der T-ALL verwendet, beim dem es durch adoptiven Transfer von Lymphomzellen aus NICA-Ratten in syngene Wirte kurzfristig zu neuem und aggressivem Tumorwachstum ähnlich der humanen Variante kommt. Histologische und durchflusszytometrische Analysen offenbarten die initiale Infiltration in Lymphknoten und Knochenmark, bevor im Zuge der anschließenden leukämischen Phase nicht-lymphatische Organe kleinherdig durchsetzt wurden. Die aus den Wirten extrahierten Lymphomzelllinien zeigten einen heterogenen Phänotyp und eine ausgeprägte Neigung zur Spontanapoptose *ex vivo*. Die Abwesenheit zytotoxischer T-Zellen im Wirt hatte keinen Einfluss auf die Lymphometablierung und -progression, was möglicherweise auf die geringe Expression von MHC-I Molekülen zurückzuführen ist.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden neue Therapieansätze in der Behandlung der Notch1-abhängigen T-ALL getestet. Da der routinemäßige Einsatz von Glukokortikoiden (GC) durch das Auftreten schwerer Nebenwirkungen und Resistenzen gekennzeichnet ist, wurde als Ansatz zur ihrer Optimierung liposomal verpacktes Prednisolon mit freiem Dexamethason in der Therapie von T-ALL *in vivo* im Tiermodell verglichen. Die alternative Darreichungsfom war durch ein auffallendes Wirkdefizit im lymphatischen System und ein schlechteres Gesamtüberleben gekennzeichnet. Als potentielle Ursache der rasch einsetzenden GC-Resistenz im Zuge der repetitiven Dex-Behandlung konnte eine Herunterregulierung des GC-Rezeptors nachgewiesen werden. Weiterhin wurde die Frage adressiert, inwieweit eine medikamentöse Hemmung von NF-$\varkappa$B durch die Verwendung des Proteasomen-Inhibitors Bortezomib eine therapeutische Wirkung auf die T-ALL im Rattenmodell entfalten würde. Hierzu wurde Bortezomib im direkten Vergleich mit Dexamethason *in vivo* evaluiert. Die Monotherapie mit Bortezomib zeigte eine dem Dexamethason vergleichbare Wirkung in den Lymphknoten, andererseits korrelierte ein signifikantes Wirkdefizit in Milz, Knochenmark und Blut mit einem insgesamt schlechteren Gesamtansprechen. Ferner legten die gewonnenen Daten nahe, dass Bortezomib eine GC-Resistenz der T-ALL mit konstitutiv aktivem Notch1 *in vivo* nicht zu überwinden vermag.

Zusammengefasst wurden im Rahmen dieser Arbeit neue Erkenntnisse zur Pathogenese der Notch1-abhängigen T-ALL gewonnen und darüber hinaus limitierte Therapieeffizienzen neuartiger Behandlungsansätze mit liposomalem Prednisolon und dem Proteasominhibitor Bortezomib im Vergleich zu freiem Dex *in vivo* aufgedeckt. Im Hinblick auf die Erfassung der Pathomechanismen sowie auf die Entwicklung neuer Therapieansätze bietet die Möglichkeit des adoptiven Lymphomtransfers und der Generierung von neuem aggressivem Wachstum im Wirt mit hoher Analogie zur humanen Erkrankung ideale Voraussetzungen, um die Rolle von Notch1 in der der T-ALL zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten somit zu einer Verbesserung von spezifischer Risikostratifizierung, Behandlungsmöglichkeit und Prognose der an T-ALL erkrankten Patienten beitragen.

6 Anhang

6.1 Analysierte Oberflächenproteine der Ratte

Tabelle 13 Analysierte Oberflächenproteine der Ratte

Name	Zellen	Funktion
CD2 (LFA-2)	Thymozyten, NK-Zellen, reife T-Lymphozyten, Dendritische Zellen, splenische Makrophagen (Jefferies et al. 1985; Williams et al. 1987)	Rezeptor für LFA-3, Assoziation mit TCR; Adhäsion, T-Zell-Aktivierung/Costimulation
CD4	T-Helferzellen, NK-Zellen, Thymozyten, tlw. Macrophagen (Brostoff und White 1986; May et al. 2003)	MHC-II-Ligand, Signaltransduktion, Rezeptor/Corezeptor des TCR, T-Zell-Aktivierung
CD5	Thymozyten (DP>SP>DN), reife αβTCR-Lymphozyten(v.a. $CD4^+$), Dendritische Zellen (Vermeer et al. 1994; Mitnacht et al. 1995)	Ligand CD72, Adhäsion, reguliert T-B-Lymphozyten-Interaktion, T-Zell-Entwicklung (Azzam et al. 1998)
CD8α	Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL, $CD8^+$), Thymozyten, NK-Zellen, tlw. aktivierte $CD4^+$, intestinale intraepitheliale Lymphozyten(IEL), Makrophagen (Johnson et al. 1985; Thomas und Green 1983)	MHC-I-Ligand, Rezeptor/Corezeptor, Signaltransduktion, T-Zell-Aktivierung; bildet Heterodimer mit CD8β-Kette in Thymozyten-Entwicklung, assoziiert mit TCR-Komplex und Tyrosinkinase lck (p56lck)
CD8β	CTL ($CD8^+$), Thymozyten, tlw. TRegs, Makrophagen (Torres-Nagel et al. 1992; Hirji et al. 1997)	MHC-I-Ligand, Signaltransduktion, Rezeptor/Corezeptor, CD8αβ-Heterodimer
CD11α (LFA-1)	Lymphozyten, Dendritische Zellen, Granulozyten, Monozyten/Makrophagen (Tamatani et al. 1991a; Mitnacht et al. 1995)	$\alpha_L\beta_2$ Integrin, CD 11a/CD 18, Adhäsion an ICAM-1(CD54), Interaktion von T-,B-Zelle und DC, Differenzierung/Entwicklung (Tamatani et al. 1991b; Reichardt et al. 2013)
CD25	Aktivierte T-Lymphozyten(v.a. regulatorische T-Zellen), Thymozyten (DN2) (Takács et al. 1988; Godfrey et al. 1993; Dose et al. 2006)	Interleukin-2 Rezeptor(alpha-Kette), Aktivierungsmarker reifer T-Zellen (Stephens and Mason 2000)
CD28	T-Lymphozyten, NK-Zellen (Tacke et al. 1995, 1997; Mitnacht et al. 1995)	T-Zell-Kostimulation und -Aktivierung (Riley et al. 2002; Luhder et al. 2003; Hünig und Dennehy 2005), Notch-Zielgen (Chadwick et al. 2009)
CD31	Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten, Thrombozyten, Endothelzellen (Favaloro et al. 1989)	= *platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM-1), Zelladhäsion, -aktivierung und -migration (DeLisser et al. 1997; Newman 1997, 2003)
CD44H	(Aktivierte) Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten, Erythrozyten, Endothel/Epithel, diverse Neoplasien (Stamenkovic et al. 1991; Arch et al. 1992; Mackay et al. 1994; Mitnacht et al. 1995; Nandi et al. 2004)	Rezeptor für Hyaluronsäure (*H-CAM*), Kollagen, Fibronectin, Laminin, Osteopontin; Zelladhäsion und -migration, Metastasierung, Invasion, Extravasation, Lymphozyen-Aktivierung und -„Homing“ (Zheng et al. 1995; Westermann et al. 1994; Rudzki und Jothy 1997; Naor et al. 1997)
CD45RC	Frühe Thymozyten (DN), reife T-Lymphozyten ($CD8^+$>$CD4^+$), B-Lymphozyten (Law et al. 1989; Spickett et al. 1983; Woollett et al. 1985)	*Rat leukocyte-common antigen* (L-CA) =Variante der Tyrosin-Phosphatase CD45; Lymphozyten-Aktivierung
CD49d (VLA4)	(Aktivierte) Lymphozyten, Granulozyten, Dendritische Zellen, Monozyten, Endothel (Leone et al. 2003; Lobb und Hemler 1994)	=$\alpha_4\beta_1$-Integrin, Ligand:VCAM-1; Zelladhäsion und -migration, Lymphozyen-„Homing“ (Issekutz 1991; Issekutz und Wykretowicz 1991; Clark und Brugge 1995; Nandi et al. 2004)

CD53 (Ox-44)	Reife Leukozyten, Thymozyten(10 %, DN) (Paterson et al. 1987a; Bell et al. 1992b; Bosca und Lazo 1994; Mitnacht et al. 1995)	Liganden: VLA-4, Integrine; Zelladhäsion, Aktivierung, Proliferation und Migration, Entwicklungsmarker früher Thymozyten (Hünig und Mitnacht 1991; Bell et al. 1992a; Lazo et al. 1997)
CD54	T-/B-Lymphozyten, Makrophagen, Endothel (Tamatani und Miyasaka 1990; Tamatani et al. 1991a; Lawson und Wolf 2009)	=*intercellular adhesion molecule 1*(ICAM-1), Ligand:LFA-1, Zelladhäsion und -Aktivierung, Signaltransduktion (Turunen et al. 1993; Sarantos et al. 2005)
CD62L	V.a. naive T-und B-Lymphozyten, Granulozyten, tlw. Thymozyten und NK-Zellen (Li et al. 2006)	= L-Selectin; Ligand: CD34, Zelladhäsion, -Interaktion, -Migration, Lymphozyen-„Homing“, Aktivierungsmarker (Rosen 2004)
CD90 (Thy-I)	v.a. Stammzellen der Hämato- und Lymphopoese, Thymozyten(DP>DN), (Hunt 1979; Ritter et al. 1978; Hosseinzadeh und Goldschneider 1993; Hozumi et al. 1994; Leposavic et al. 2006)	Signaltransduktion, TCR-Signalregulation , Aktivierung/Costimulation, Adhäsion, Differenzierung/Entwicklung/Proliferation (Killeen 1997; Hueber et al. 1997)
CD134 (Ox-40)	Aktivierte T-Lymphozyten (v.a. $CD4^+CD25^+$-Tregs), tlw. B-Lymphozyten, Dendritische Zellen, Endothel (al-Shamkhani et al. 1996; Paterson et al. 1987b; Yuan et al. 2003)	Ligand: OX-40; CD28-unabhängige Costimulation, Aktivierungsmarker reifer T-Zellen (v.a. $CD25^+$Tregs) (Nolte-'t Hoen et al. 2007)
βTCR	Periphere T-Lymphozyten, Thymozyten(ab DN4), Intestinale epitheliale Lymphozyten (IEL) (Hünig et al. 1989; Mitnacht et al. 1995; Pieters et al. 1995)	Komponente des CD3/TCR-Komplexes, Antigenerkennung via MHC-I und -II, Signaltransduktion, T-Zell-Aktivierung (Bommhardt et al. 2004)
γδTCR	$\gamma\delta$-TCR^+ in Thymus, Darmepithel, Haut, Leber, peripherem Lymphgewebe und Peritoneum (Hünig et al. 1989; Bluestone et al. 1991; Bommhardt et al. 2004)	Antigenerkennung direkt oder via MHC-I (Allison et al. 2001; Chien et al. 1996; Hiromatsu et al. 1992)
RT1A	kernhaltige Zellen (außer Neurone und Gliazellen) und Erythrozyten (Howard 1983; Palmer et al. 1983)	=Humanes MHC-Klasse I, Antigenpräsentation v.a. für T-Effektorzellen ($CD8^+$)
RT1B	APCs (B-Lymphozyten, epidermale Langerhans-Zellen, Dendritische Zellen), tlw. Makrophagen, Mastzellen und Thymozyten (Goss et al. 1993; Dlaske et al. 2009)	=Humanes MHC-Klasse II, Äquivalent zu HLA-DQ; Ligand: CD3/TCR, CD4; Antigenpräsentation v.a. für T-Helferzellen
RT1D	Antigenpräsentierende Zellen, B-Lymphozyten, aktivierte T-Lymphozyten (Catchpole et al. 2002)	=Humanes MHC-Klasse II, Äquivalent zu HLA-DR; Ligand: CD3/TCR, CD4; Antigenpräsentation v.a. für T-Helferzellen
Vα-Ketten	~95 % aller T-Lymphozyten, Thymozyten (Kubo et al. 1989; Pircher et al. 1992)	Immunglobulin-Superfamilie, Variable Region der α-Kette des TCR; in Kombination mit TCR-β-Kette Bildung des αβTCRs, Antigenerkennung via MHC-Peptid-Komplex, Signaltransduktion, T-Zell-Aktivierung
Vβ-Ketten	~95 % aller T-Lymphozyten, Intestinale epitheliale Lymphozyten, Thymozyten (Asmuss et al. 1996; Gold et al. 1994; Imrich et al. 1995)	Immunglobulin-Superfamilie, Variable Region der β-Kette des TCR; mit TCR-α-Kette Bildung des αβTCRs, Antigenerkennung via MHC-Peptid-Komplex, Signaltransduktion, T-Zell-Aktivierung

7 Literaturverzeichnis

Abrams MT, Robertson NM, Yoon K, Wickstrom E (2004): Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by targeting the major splice variants of BIM mRNA with small interfering RNA and short hairpin RNA. J Biol Chem 279, 55809–55817

Adams J (2002): The proteasome as a novel target for the treatment of breast cancer. Breast Dis 15, 61–70

Adams J (2003): The proteasome: structure, function, and role in the cell. Cancer Treat Rev 29, 3–9

Adams J (2004a): The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. Cancer Cell 5, 417–421

Adams J (2004b): The proteasome: a suitable antineoplastic target. Nat Rev Cancer 4, 349–360

Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ (1999): Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. Cancer Res 59, 2615–2622

Adcock IM, Lane SJ (2003): Corticosteroid-insensitive asthma: molecular mechanisms. J Endocrinol 178, 347–355

Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge O, Thoren, L. A. M. (2005): Identification of Flt3^{+} lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. Cell 121, 295–306

Aggarwal BB (2004): Nuclear factor-kappaB: the enemy within. Cancer Cell 6, 203–208

Aghajanian C, Soignet S, Dizon DS, Pien CS, Adams J, Elliott PJ, Sabbatini P, Miller V, Hensley ML, Pezzulli S (2002): A phase I trial of the novel proteasome inhibitor PS341 in advanced solid tumor malignancies. Clin Cancer Res 8, 2505–2511

Ahmad M, Rees RC, Ali SA (2004): Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. Cancer Immunol Immunother 53, 844–854

Ahmad N, Kumar R (2011): Steroid hormone receptors in cancer development: a target for cancer therapeutics. Cancer Lett 300, 1–9

Aifantis I, Raetz E, Buonamici S (2008): Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. Nat Rev Immunol 8, 380–390

Aitman TJ, Critser JK, Cuppen E, Dominiczak A, Fernandez-Suarez XM, Flint J, Gauguier D, Geurts AM, Gould M, Harris PC (2008): Progress and prospects in rat genetics: a community view. Nature genetics 40, 516–522

Aldoss I, Pullarkat V, Patel R, Watkins K, Mohrbacher A, Levine AM, Douer D (2013): An effective reinduction regimen for first relapse of adult acute lymphoblastic leukemia. Med Oncol 30, 744

Algarra I, Garcia-Lora A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F (2004): The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. Cancer Immunol Immunother 53, 904–910

Allen TM (2002): Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. Nat Rev Cancer 2, 750–763

Allen TM, Hansen C (1991): Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. Biochim Biophys Acta 1068, 133–141

Allen TM, Cullis PR (2013): Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. Adv. Drug Deliv Rev 65, 36–48

Allen TM, Mumbengegwi DR, Charrois, Gregory J R (2005): Anti-CD19-targeted liposomal doxorubicin improves the therapeutic efficacy in murine B-cell lymphoma and ameliorates the toxicity of liposomes with varying drug release rates. Clin Cancer Res 11, 3567–3573

Allison TJ, Winter CC, Fournié J, Bonneville M, Garboczi DN (2001): Structure of a human γδ T-cell antigen receptor. Nature 411, 820–824

Allman D, Karnell FG, Punt JA, Bakkour S, Xu L, Myung P, Koretzky GA, Pui JC, Aster JC, Pear WS (2001): Separation of Notch1 promoted lineage commitment and expansion/transformation in developing T cells. J Exp Med. 194, 99–106

Allman D, Sambandam A, Kim S, Miller JP, Pagan A, Well D, Meraz A, Bhandoola A (2003): Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. Nat Immunol 4, 168–174

Almawi WY, Beyhum HN, Rahme AA, Rieder MJ (1996): Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. J Leukoc Biol 60, 563–572

Almond JB, Cohen GM (2002): The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. Leukemia 16, 433–443

Al-Shamkhani A (2004): The role of CD30 in the pathogenesis of haematopoietic malignancies. Curr Opin Pharmacol 4, 355–359

Al-Shamkhani A, Birkeland ML, Puklavec M, Brown MH, James W, Barclay AN (1996): OX40 is differentially expressed on activated rat and mouse T cells and is the sole receptor for the OX40 ligand. Eur J Immunol 26, 1695–1699

Altin JG, Parish CR (2006): Liposomal vaccines--targeting the delivery of antigen. Methods 40, 39–52

Alves NL, Richard-Le Goff O, Huntington ND, Sousa AP, Ribeiro, Vera S G, Bordack A, Vives FL, Peduto L, Chidgey A, Cumano A et al. (2009): Characterization of the thymic IL-7 niche in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 1512–1517

Amsen D, Blander J, Lee GR, Tanigaki K, Honjo T, Flavell RA (2004): Instruction of Distinct CD4 T Helper Cell Fates by Different Notch Ligands on Antigen-Presenting Cells. Cell 117, 515–526

Amsen D, Antov A, Flavell RA (2009): The different faces of Notch in T-helper-cell differentiation. Nat Rev Immunol 9, 116–124

Anderson G, Takahama Y (2012): Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. Trends in Immunology 33, 256–263

Anderson G, Harman BC, Hare KJ, Jenkinson EJ (2000): Microenvironmental regulation of T cell development in the thymus. Semin Immunol 12, 457–464

Anderson KC (2011): Oncogenomics to target myeloma in the bone marrow microenvironment. Clin Cancer Res 17, 1225–1233

Annesley CE, Brown P (2015): Novel agents for the treatment of childhood acute leukemia. Ther Adv Hematol 6, 61–79

Arch R, Wirth K, Hofmann M, Ponta H, Matzku S, Herrlich P, Zöller M (1992): Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. Science 257, 682–685

Aricò M, Valsecchi MG, Camitta B, Schrappe M, Chessells J, Baruchel A, Gaynon P, Silverman L, Janka-Schaub G, Kamps W et al. (2000): Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 342, 998–1006

Armstrong F, La Grange PB de, Gerby B, Rouyez M, Calvo J, Fontenay M, Boissel N, Dombret H, Baruchel A, Landman-Parker J et al. (2009): NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity. Blood 113, 1730–1740

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999): Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. Science 284, 770–776

Arya SK, Wong-Staal F, Gallo RC (1984): Dexamethasone-mediated inhibition of human T cell growth factor and gamma-interferon messenger RNA. J Immunol 133, 273–276

Asgeirsdóttir SA, Zwiers PJ, Morselt HW, Moorlag HE, Bakker HI, Heeringa P, Kok JW, Kallenberg CG, Molema G, Kamps JA (2008): Inhibition of proinflammatory genes in anti-GBM glomerulonephritis by targeted dexamethasone-loaded AbEsel liposomes. Am J Physiol Renal Physiol 294, F554-61

Ashraf J, Kunapuli S, Chilton D, Thompson EB (1991): Cortivazol mediated induction of glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid in wild-type and dexamethasone-resistant human leukemic (CEM) cells. J Steroid Biochem Mol Biol 38, 561–568

Asmuss A, Hofmann K, Hochgrebe T, Giegerich G, Hünig T, Herrmann T (1996): Alleles of highly homologous rat T cell receptor beta-chain variable segments 8.2 and 8.4: strain-specific expression, reactivity to superantigens, and binding of the mAb R78. J Immunol 157, 4436–4441

Asnafi V, Beldjord K, Boulanger E, Comba B, Le Tutour P, Estienne M, Davi F, Landman-Parker J, Quartier P, Buzyn A et al. (2003): Analysis of TCR, pT alpha, and RAG-1 in T-acute lymphoblastic leukemias improves understanding of early human T-lymphoid lineage commitment. Blood 101, 2693–2703

Asnafi V, Buzyn A, Le Noir S, Baleydier F, Simon A, Beldjord K, Reman O, Witz F, Fagot T, Tavernier E et al. (2009): NOTCH1/FBXW7 mutation identifies a large subgroup with favorable outcome in adult

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): a Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL) study. Blood 113, 3918–3924

Aspinall R, Kampinga J, van den Bogaerde J (1991): T-cell development in the fetus and the invariant series hypothesis. Immunol Today 12, 7–10

Aster JC, Xu L, Karnell FG, Patriub V, Pui JC, Pear WS (2000): Essential roles for ankyrin repeat and transactivation domains in induction of T-cell leukemia by notch1. Mol Cell Biol 20, 7505–7515

Attar EC, De Angelo DJ, Supko JG, D'Amato F, Zahrieh D, Sirulnik A, Wadleigh M, Ballen KK, McAfee S, Miller KB et al. (2008): Phase I and pharmacokinetic study of bortezomib in combination with idarubicin and cytarabine in patients with acute myelogenous leukemia. Clin Cancer Res 14, 1446–1454

Ausserlechner MJ, Obexer P, Böck G, Geley S, Kofler R (2004): Cyclin D3 and c-MYC control glucocorticoid-induced cell cycle arrest but not apoptosis in lymphoblastic leukemia cells. Cell Death Differ 11, 165–174

Avnir Y, Ulmansky R, Wasserman V, Even-Chen S, Broyer M, Barenholz Y, Naparstek Y (2008): Amphipathic weak acid glucocorticoid prodrugs remote-loaded into sterically stabilized nanoliposomes evaluated in arthritic rats and in a Beagle dog: a novel approach to treating autoimmune arthritis. Arthritis Rheum 58, 119–129

Avramis VI, Sencer S, Periclou AP, Sather H, Bostrom BC, Cohen LJ, Ettinger AG, Ettinger LJ, Franklin J, Gaynon PS et al. (2002): A randomized comparison of native Escherichia coli asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. Blood 99, 1986–1994

Azzam HS, Grinberg A, Lui K, Shen H, Shores EW, Love PE (1998): CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. J Exp Med 188, 2301–2311

Bachmann PS, Gorman R, Mackenzie KL, Lutze-Mann L, Lock RB (2005): Dexamethasone resistance in B-cell precursor childhood acute lymphoblastic leukemia occurs downstream of ligand-induced nuclear translocation of the glucocorticoid receptor. Blood 105, 2519–2526

Bachmann PS, Gorman R, Papa RA, Bardell JE, Ford J, Kees UR, Marshall GM, Lock RB (2007): Divergent mechanisms of glucocorticoid resistance in experimental models of pediatric acute lymphoblastic leukemia. Cancer Res 67, 4482–4490

Bachmann PS, Piazza RG, Janes ME, Wong NC, Davies C, Mogavero A, Bhadri VA, Szymanska B, Geninson G, Magistroni V et al. (2010): Epigenetic silencing of BIM in glucocorticoid poor-responsive pediatric acute lymphoblastic leukemia, and its reversal by histone deacetylase inhibition. Blood 116, 3013–3022

Bader M, Ganten D (1996): Transgenic rats: tools to study the function of the renin-angiotensin system. Clin Exp Pharmacol Physiol 23 Suppl 3, S81-7

Bae YH, Park K (2011): Targeted drug delivery to tumors: myths, reality and possibility. J Control Release 153, 198–205

Bai X, Liu J, Li O, Zheng P, Liu Y (2003): Antigenic drift as a mechanism for tumor evasion of destruction by cytolytic T lymphocytes. J Clin Invest 111, 1487–1496

Bain G, Engel I, Robanus Maandag EC, te Riele HP, Voland JR, Sharp LL, Chun J, Huey B, Pinkel D, Murre C (1997): E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. Mol Cell Biol 17, 4782–4791

Baldwin AS Jr. (1996): The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. Annu Rev Immunol 14, 649–683

Balint K, Xiao M, Pinnix CC, Soma A, Veres I, Juhasz I, Brown EJ, Capobianco AJ, Herlyn M, Liu ZJ (2005): Activation of Notch1 signaling is required for beta-catenin-mediated human primary melanoma progression. J Clin Invest 115, 3166–3176

Balis FM, Lester CM, Chrousos GP, Heideman RL, Poplack DG (1987): Differences in cerebrospinal fluid penetration of corticosteroids: possible relationship to the prevention of meningeal leukemia. J Clin Oncol 5, 202–207

Ballard PL, Carter JP, Graham BS, Baxter JD (1975): A radioreceptor assay for evaluation of the plasma glucocorticoid activity of natural and synthetic steroids in man. J Clin Endocrinol Metab 41, 290–304

Banciu M, Metselaar JM, Schiffelers RM, Storm G (2008): Antitumor Activity of Liposomal Prednisolone Phosphate Depends on the Presence of Functional Tumor-Associated Macrophages in Tumor Tissue. Neoplasia 10, 108–117

Bangham AD, Horne RW (1964): Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. J Mol Biol 8, 660–IN10

Barata JT, Keenan TD, Silva A, Nadler LM, Boussiotis VA, Cardoso AA (2004): Common gamma chain-signaling cytokines promote proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia. Haematologica 89, 1459–1467

Barenholz Y (2012): Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. J Control Release 160, 117–134

Barnes PJ, Karin M (1997): Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. N Engl J Med 336, 1066–1071

Barrett AJ, Horowitz MM, Pollock BH, Zhang M, Bortin MM, Buchanan GR, Camitta BM, Ochs J, Graham-Pole J, Rowlings PA et al. (1994): Bone Marrow Transplants from HLA-Identical Siblings as Compared with Chemotherapy for Children with Acute Lymphoblastic Leukemia in a Second Remission. N Engl J Med 331, 1253–1258

Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, Bienert M, Radbruch A, Burmester G, Lauster R et al. (2004): Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. FASEB J 18, 70–80

Bartneck M, Peters FM, Warzecha KT, Bienert M, van Bloois L, Trautwein C, Lammers T, Tacke F (2014): Liposomal encapsulation of dexamethasone modulates cytotoxicity, inflammatory cytokine response, and migratory properties of primary human macrophages. Nanomedicine 10, 1209–1220

Bassères DS, Baldwin AS (2006): Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. Oncogene 25, 6817–6830

Batist G, Ramakrishnan G, Rao CS, Chandrasekharan A, Gutheil J, Guthrie T, Shah P, Khojasteh A, Nair MK, Hoelzer K et al. (2001): Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer. J Clin Oncol 19, 1444–1454

Baud V, Karin M (2009): Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. Nat Rev Drug Discov 8, 33–40

Beato M, Herrlich P, Schütz G (1995): Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. Cell 83, 851–857

Beck-Engeser GB, Monach PA, Mumberg D, Yang F, Wanderling S, Schreiber K, Espinosa R, Le Beau MM, Meredith SC, Schreiber H (2001): Point Mutation in Essential Genes with Loss or Mutation of the Second Allele: Relevance to the Retention of Tumor-Specific Antigens. J Exp Med 194, 285–300

Beesley AH, Weller RE, Senanayake S, Welch M, Kees UR (2009): Receptor mutation is not a common mechanism of naturally occurring glucocorticoid resistance in leukaemia cell lines. Leuk Res 33, 321–325

Belch A, Kouroukis C, Crump M, Sehn L, Gascoyne R, Klasa R, Powers J, Wright J, Eisenhauer E (2006): A phase II study of bortezomib in mantle cell lymphoma: the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trial IND.150. Ann Oncol 18, 116–121

Belgaumi AF, Al-Bakrah M, Al-Mahr M, Al-Jefri A, Al-Musa A, Saleh M, Salim MF, Osman M, Osman L, El-Solh H (2003): Dexamethasone-associated toxicity during induction chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia is augmented by concurrent use of daunomycin. Cancer 97, 2898–2903

Bell GM, Bolen JB, Imboden JB (1992a): Association of Src-like protein tyrosine kinases with the CD2 cell surface molecule in rat T lymphocytes and natural killer cells. Mol Cell Biol 12, 5548–5554

Bell GM, Seaman WE, Niemi EC, Imboden JB (1992b): The OX-44 molecule couples to signaling pathways and is associated with CD2 on rat T lymphocytes and a natural killer cell line. J Exp Med 175, 527–536

Bellavia D, Campese AF, Alesse E, Vacca A, Felli MP, Balestri A, Stoppacciaro A, Tiveron C, Tatangelo L, Giovarelli M et al. (2000): Constitutive activation of NF-kappaB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice. EMBO J 19, 3337–3348

Bellavia D, Campese AF, Checquolo S, Balestri A, Biondi A, Cazzaniga G, Lendahl U, Fehling HJ, Hayday AC, Frati L et al. (2002): Combined expression of pTalpha and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 3788–3793

Bellavia D, Mecarozzi M, Campese AF, Grazioli P, Talora C, Frati L, Gulino A, Screpanti I (2007): Notch3 and the Notch3-upregulated RNA-binding protein HuD regulate Ikaros alternative splicing. EMBO J 26, 1670–1680

Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB (1995): Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia 9, 1783–1786

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1985): Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. Ann Intern Med 103, 620–625

Benz C, Martins VC, Radtke F, Bleul CC (2008): The stream of precursors that colonizes the thymus proceeds selectively through the early T lineage precursor stage of T cell development. J Exp Med 205, 1187–1199

Bernards R, Schrier PI, Houweling A, Bos JL, van der Eb AJ, Zijlstra M, Melief CJ (1983): Tumorigenicity of cells transformed by adenovirus type 12 by evasion of T-cell immunity. Nature 305, 776–779

Berquam-Vrieze KE, Swing DA, Tessarollo L, Dupuy AJ (2012): Characterization of transgenic mice expressing cancer-associated variants of human NOTCH1. Genesis 50, 112–118

Berry G, Billingham M, Alderman E, Richardson P, Torti F, Lum B, Patek A, Martin FJ (1998): The use of cardiac biopsy to demonstrate reduced cardiotoxicity in AIDS Kaposi's sarcoma patients treated with pegylated liposomal doxorubicin. Ann Oncol 9, 711–716

Besseyrias V, Fiorini E, Strobl LJ, Zimber-Strobl U, Dumortier A, Koch U, Arcangeli M, Ezine S, MacDonald HR, Radtke F (2007): Hierarchy of Notch-Delta interactions promoting T cell lineage commitment and maturation. J Exp Med 204, 331–343

Bhadri VA, Trahair TN, Lock RB (2012): Glucocorticoid resistance in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. J Paediatr Child Health 48, 634–640

Bhandoola A, Boehmer H von, Petrie HT, Zúñiga-Pflücker JC (2007): Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from. Immunity 26, 678–689

Bhaumik SR, Malik S (2008): Diverse regulatory mechanisms of eukaryotic transcriptional activation by the proteasome complex. Crit Rev Biochem Mol Biol 43, 419–433

Bheeshmachar G, Purushotaman D, Sade H, Gunasekharan V, Rangarajan A, Sarin A (2006): Evidence for a role for notch signaling in the cytokine-dependent survival of activated T cells. J Immunol 177, 5041–5050

Biddison WE, Rao PE, Talle MA, Goldstein G, Shaw S (1982): Possible involvement of the OKT4 molecule in T cell recognition of class II HLA antigens. Evidence from studies of cytotoxic T lymphocytes specific for SB antigens. J Exp Med 156, 1065–1076

Biggs JC, Horowitz MM, Gale RP, Ash RC, Atkinson K, Helbig W, Jacobsen N, Phillips GL, Rimm AA, Ringdén O (1992): Bone marrow transplants may cure patients with acute leukemia never achieving remission with chemotherapy. Blood 80, 1090–1093

Biondi A, Valsecchi MG, Seriu T, D'Aniello E, Willemse MJ, Fasching K, Pannunzio A, Gadner H, Schrappe M, Kamps WA et al. (2000): Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group. Leukemia 14, 1939–1943

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC (1987): Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. Nature 329, 506–512

Blackburn JS, Liu S, Raiser DM, Martinez SA, Feng H, Meeker ND, Gentry J, Neuberg D, Look AT, Ramaswamy S et al. (2012): Notch signaling expands a pre-malignant pool of T-cell acute

lymphoblastic leukemia clones without affecting leukemia-propagating cell frequency. Leukemia 26, 2069–2078

Blair K, Wray J, Smith A (2011): The liberation of embryonic stem cells. PLoS Genet 7, e1002019

Blom B, Spits H (2006): Development of human lymphoid cells. Annu Rev Immunol 24, 287–320

Bluestone JA, Cron RQ, Barrett TA, Houlden B, Sperling AI, Dent A, Hedrick S, Rellahan B, Matis LA (1991): Repertoire development and ligand specificity of murine TCR gamma delta cells. Immunol Rev 120, 5–33

Boehmer H von (1990): Developmental Biology of T Cells in T Cell-Receptor Transgenic Mice. Annu Rev Immunol 8, 531–556

Boehmer H von, Fehling HJ (1997): Structure and function of the pre-T cell receptor. Annu Rev Immunol 15, 433–452

Boehmer H von, Aifantis I, Feinberg J, Lechner O, Saint-Ruf C, Walter U, Buer J, Azogui O (1999): Pleiotropic changes controlled by the pre-T-cell receptor. Curr Opin Immunol 11, 135–142

Boldizsar F, Talaber G, Szabo M, Bartis D, Palinkas L, Nemeth P, Berki T (2010): Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. Immunobiology 215, 521–526

Boman NL, Masin D, Mayer LD, Cullis PR, Bally MB (1994): Liposomal vincristine which exhibits increased drug retention and increased circulation longevity cures mice bearing P388 tumors. Cancer Res 54, 2830–2833

Bommhardt U, Beyer M, Hunig T, Reichardt HM (2004): Molecular and cellular mechanisms of T cell development. Cell Mol Life Sci 61, 263–280

Bosca L, Lazo PA (1994): Induction of nitric oxide release by MRC OX-44 (anti-CD53) through a protein kinase C-dependent pathway in rat macrophages. J Exp Med 179, 1119–1126

Bosselut R (2004): CD4/CD8-lineage differentiation in the thymus: from nuclear effectors to membrane signals. Nat Rev Immunol 4, 529–540

Bostrom BC, Sensel MR, Sather HN, Gaynon PS, La MK, Johnston K, Erdmann GR, Gold S, Heerema NA, Hutchinson RJ et al. (2003): Dexamethasone versus prednisone and daily oral versus weekly intravenous mercaptopurine for patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. Blood 101, 3809–3817

Bray SJ (2006): Notch signalling: a simple pathway becomes complex. Nat Rev Mol Cell Biol 7, 678–689

Breit S, Stanulla M, Flohr T, Schrappe M, Ludwig W, Tolle G, Happich M, Muckenthaler MU, Kulozik AE (2006): Activating NOTCH1 mutations predict favorable early treatment response and long-term outcome in childhood precursor T-cell lymphoblastic leukemia. Blood 108, 1151–1157

Brenin D, Look J, Bader M, Hübner N, Levan G, Iannaccone P (1997): Rat embryonic stem cells: A progress report. Transplant Proc 29, 1761–1765

Brewer JA, Kanagawa O, Sleckman BP, Muglia LJ (2002): Thymocyte apoptosis induced by T cell activation is mediated by glucocorticoids in vivo. J Immunol 169, 1837–1843

Bross PF, Kane R, Farrell AT, Abraham S, Benson K, Brower ME, Bradley S, Gobburu JV, Goheer A, Lee S et al. (2004): Approval summary for bortezomib for injection in the treatment of multiple myeloma. Clin Cancer Res 10, 3954–3964

Brostoff SW, White TM (1986): Treatment of clinical experimental allergic encephalomyelitis in the rat with monoclonal antibodies. J Neuroimmunol 13, 233–240

Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israël A (2000): A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. Mol Cell 5, 207–216

Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, Pfeifer H, Dworzak M, Ottmann OG, Asnafi V, Baruchel A, Bassan R, Benoit Y et al. (2010): Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. Leukemia 24, 521–535

Bruserud O, Gjertsen BT, von Volkman HL (2000): In vitro culture of human acute myelogenous leukemia (AML) cells in serum-free media: studies of native AML blasts and AML cell lines. J Hematother Stem Cell Res 9, 923–932

Bruserud O, Glenjen N, Ryningen A, Ulvestad E (2003): In vitro culture of human acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells in serum-free media; a comparison of native ALL blasts, ALL cell lines and virus-transformed B cell lines. Leuk Res 27, 455–464

Bruserud O, Tronstad KJ, Berge R (2005): In vitro culture of human osteosarcoma cell lines: a comparison of functional characteristics for cell lines cultured in medium without and with fetal calf serum. J Cancer Res Clin Oncol 131, 377–384

Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, McLay R, Hall J, Ying Q, Smith A (2008): Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. Cell 135, 1287–1298

Buffenstein R (2008): Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat: insights from a successfully aging species. J Comp Physiol B 178, 439–445

Burger R, Hansen-Hagge TE, Drexler HG, Gramatzki M (1999): Heterogeneity of T-acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cell lines: suggestion for classification by immunophenotype and T-cell receptor studies. Leuk Res 23, 19–27

Burnett RC, Thirman MJ, Rowley JD, Diaz MO (1994): Molecular analysis of the T-cell acute lymphoblastic leukemia-associated t(1;7)(p34;q34) that fuses LCK and TCRB. Blood 84, 1232–1236

Burnstein KL, Jewell CM, Cidlowski JA (1990): Human glucocorticoid receptor cDNA contains sequences sufficient for receptor down-regulation. J Biol Chem 265, 7284–7291

Burnstein KL, Jewell CM, Sar M, Cidlowski JA (1994): Intragenic sequences of the human glucocorticoid receptor complementary DNA mediate hormone-inducible receptor messenger RNA down-regulation through multiple mechanisms. Mol Endocrinol 8, 1764–1773

Buttgereit F, Scheffold A (2002): Rapid glucocorticoid effects on immune cells. Steroids 67, 529–534

Buttgereit F, Straub RH, Wehling M, Burmester G (2004): Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. Arthritis Rheum 50, 3408–3417

Buttgereit F, Saag KG, Cutolo M, da Silva JA, Bijlsma JW (2005): The molecular basis for the effectiveness, toxicity, and resistance to glucocorticoids: focus on the treatment of rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol 34, 14–21

Cambot M, Aresta S, Kahn-Perlès B, Gunzburg J de, Roméo P (2002): Human immune associated nucleotide 1: a member of a new guanosine triphosphatase family expressed in resting T and B cells. Blood 99, 3293–3301

Campese AF, Garbe AI, Zhang F, Grassi F, Screpanti I, von Boehmer H (2006): Notch1-dependent lymphomagenesis is assisted by but does not essentially require pre-TCR signaling. Blood 108, 305–310

Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES (2011): The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. Blood 117, 5019–5032

Campoli M, Ferrone S (2011): HLA antigen and NK cell activating ligand expression in malignant cells: a story of loss or acquisition. Semin Immunopathol 33, 321–334

Cantley AM, Welsch M, Ambesi-Impiombato A, Sanchez-Martin M, Kim MY, Bauer A, Ferrando A, Stockwell BR (2014): Small Molecule that Reverses Dexamethasone Resistance in T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL). ACS Med Chem Lett 5, 754-9

Cantrill HL, Waltman SR, Palmberg PF, Zink HA, Becker B (1975): In vitro determination of relative corticosteroid potency. J Clin Endocrinol Metab 40, 1073–1077

Capobianco AJ, Zagouras P, Blaumueller CM, Artavanis-Tsakonas S, Bishop JM (1997): Neoplastic transformation by truncated alleles of human NOTCH1/TAN1 and NOTCH2. Mol Cell Biol 17, 6265–6273

Cardoso BA, Martins LR, Santos CI, Nadler LM, Boussiotis VA, Cardoso AA, Barata JT (2009): Interleukin-4 stimulates proliferation and growth of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by activating mTOR signaling. Leukemia 23, 206–208

Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M (1999): SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. Nat Cell Biol 1, 193–199

Catchpole B, Ward FJ, Hamblin AS, Staines NA (2002): Autoreactivity in Collagen-induced Arthritis of Rats: a Potential Role for T Cell Responses to Self MHC Peptides. J Autoimmun 18, 271–280

Cattel L, Ceruti M, Dosio F (2004): From conventional to stealth liposomes: a new Frontier in cancer chemotherapy. J Chemother 16 Suppl 4, 94–97

Ceredig R, Rolink T (2002): Opinion: A positive look at double-negative thymocytes. Nat Rev Immunol 2, 888–897

Cesano A, Visonneau S, Pasquini S, Rovera G, Santoli D (1996): Antitumor efficacy of a human major histocompatibility complex nonrestricted cytotoxic T-cell line (TALL-104) in immunocompetent mice bearing syngeneic leukemia. Cancer Res 56, 4444–4452

Chadwick N, Zeef L, Portillo V, Fennessy C, Warrander F, Hoyle S, Buckle AM (2009): Identification of novel Notch target genes in T cell leukaemia. Mol Cancer 8, 35

Chadwick N, Zeef L, Portillo V, Boros J, Hoyle S, van Doesburg JC, Buckle AM (2010): Notch protection against apoptosis in T-ALL cells mediated by GIMAP5. Blood Cells Mol Dis 45, 201–209

Chan LY, Yim EK, Choo AB (2013): Normalized Median Fluorescence: An Alternative Flow Cytometry Analysis Method for Tracking Human Embryonic Stem Cell States During Differentiation. Tissue Eng Part C Methods 19, 156–165

Chan SM, Weng AP, Tibshirani R, Aster JC, Utz PJ (2007): Notch signals positively regulate activity of the mTOR pathway in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 110, 278–286

Chandrasekaran S, King MR (2014): Microenvironment of tumor-draining lymph nodes: opportunities for liposome-based targeted therapy. Int J Mol Sci 15, 20209–20239

Chao DT, Korsmeyer SJ (1998): BCL-2 family: regulators of cell death. Annu Rev Immunol 16, 395–419

Chen F, Hasegawa H, Schmitt-Ulms G, Kawarai T, Bohm C, Katayama T, Gu Y, Sanjo N, Glista M, Rogaeva E et al. (2006): TMP21 is a presenilin complex component that modulates gamma-secretase but not epsilon-secretase activity. Nature 440, 1208–1212

Chen J, Jette C, Kanki JP, Aster JC, Look AT, Griffin JD (2007): NOTCH1-induced T-cell leukemia in transgenic zebrafish. Leukemia 21, 462–471

Chen W, Hu X, Shi Q, Zhang F, He C (2009): Knockdown of the novel proteasome subunit Adrm1 located on the 20q13 amplicon inhibits colorectal cancer cell migration, survival and tumorigenicity. Oncol Rep 21, 531–537

Chen Y, Blair K, Smith A (2013): Robust self-renewal of rat embryonic stem cells requires fine-tuning of glycogen synthase kinase-3 inhibition. Stem cell reports 1, 209–217

Chen YZ, Qiu J (1999): Pleiotropic signaling pathways in rapid, nongenomic action of glucocorticoid. Mol Cell Biol Res Commun 2, 145–149

Cheng P, Zlobin A, Volgina V, Gottipati S, Osborne B, Simel EJ, Miele L, Gabrilovich DI (2001): Notch-1 Regulates NF- B Activity in Hemopoietic Progenitor Cells. J Immunol 167, 4458–4467

Chiang MY, Xu ML, Histen G, Shestova O, Roy M, Nam Y, Blacklow SC, Sacks DB, Pear WS, Aster JC (2006): Identification of a Conserved Negative Regulatory Sequence That Influences the Leukemogenic Activity of NOTCH1. Mol Cell Biol 26, 6261–6271

Chiang MY, Xu L, Shestova O, Histen G, L'Heureux S, Romany C, Childs ME, Gimotty PA, Aster JC, Pear WS (2008): Leukemia-associated NOTCH1 alleles are weak tumor initiators but accelerate K-ras–initiated leukemia. J Clin Invest 118, 3181–3194

Chiang MY, Shestova O, Xu L, Aster JC, Pear WS (2013): Divergent effects of supraphysiologic Notch signals on leukemia stem cells and hematopoietic stem cells. Blood 121, 905–917

Chiaramonte R, Calzavara E, Balordi F, Sabbadini M, Capello D, Gaidano G, Serra A, Comi P, Sherbet GV (2003): Differential regulation of Notch signal transduction in leukaemia and lymphoma cells in culture. J Cell Biochem 88, 569–577

Chiarle R, Podda A, Prolla G, Gong J, Thorbecke GJ, Inghirami G (1999): CD30 in normal and neoplastic cells. Clin Immunol 90, 157–164

Chien YH, Jores R, Crowley MP (1996): Recognition by gamma/delta T cells. Annu Rev Immunol 14, 511–532

Chitra S, Nalini G, Rajasekhar G (2012): The ubiquitin proteasome system and efficacy of proteasome inhibitors in diseases. Int J Rheum Dis 15, 249–260

Chono S, Tauchi Y, Deguchi Y, Morimoto K (2005): Efficient drug delivery to atherosclerotic lesions and the antiatherosclerotic effect by dexamethasone incorporated into liposomes in atherogenic mice. J Drug Target 13, 267–276

Chuang K, Wang H, Chen F, Tzou S, Cheng C, Chang Y, Tseng W, Shiea J, Lin S, Wang J et al. (2010): Endocytosis of PEGylated agents enhances cancer imaging and anticancer efficacy. Mol Cancer Ther 9, 1903–1912

Cialfi S, Palermo R, Manca S, Checquolo S, Bellavia D, Pelullo M, Quaranta R, Dominici C, Gulino A, Screpanti I et al. (2013): Glucocorticoid sensitivity of T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma is associated with glucocorticoid receptor-mediated inhibition of Notch1 expression. Leukemia 27, 485–488

Ciechanover A, Schwartz AL (1998): The ubiquitin-proteasome pathway: The complexity and myriad functions of proteins death. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 2727–2730

Ciofani M, Zúñiga-Pflücker JC (2010): Determining γδ versus αβ T cell development. Nat Rev Immunol 10, 657-63

Ciofani M, Schmitt TM, Ciofani A, Michie AM, Cuburu N, Aublin A, Maryanski JL, Zúñiga-Pflücker JC (2004): Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation. J Immunol 172, 5230–5239

Ciofani M, Zúñiga-Pflücker JC (2005): Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism. Nat Immunol 6, 881–888

Ciofani M, Knowles GC, Wiest DL, Boehmer H von, Zúñiga-Pflücker JC (2006): Stage-Specific and Differential Notch Dependency at the αβ and γδ T Lineage Bifurcation. Immunity 25, 105–116

Ciofani M, Zúñiga-Pflücker JC (2007): The Thymus as an Inductive Site for T Lymphopoiesis. Annu Rev Cell Dev Biol 23, 463–493

Clark EA, Brugge JS (1995): Integrins and signal transduction pathways: the road taken. Science 268, 233–239

Clevers H (2011): The cancer stem cell: premises, promises and challenges. Nat med 17, 313–319

Cohen JJ (1992): Glucocorticoid-induced apoptosis in the thymus. Semin Immunol 4, 363–369

Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS (1992): Apoptosis and programmed cell death in immunity. Annu Rev Immunol 10, 267–293

Cole TG, Wilcox HG, Heimberg M (1982): Effects of adrenalectomy and dexamethasone on hepatic lipid metabolism. J Lipid Res 23, 81–91

Collins CM, Speck SH (2012): Tracking murine gammaherpesvirus 68 infection of germinal center B cells in vivo. PLoS One 7, e33230

Collins CM, Boss JM, Speck SH (2009): Identification of infected B-cell populations by using a recombinant murine gammaherpesvirus 68 expressing a fluorescent protein. J Virol 83, 6484–6493

Cook GJ, Pardee TS (2013): Animal models of leukemia: any closer to the real thing? Cancer Metastasis Rev 32, 63–76

Cools J, Vandenberghe P (2009): New flow cytometry in hematologic malignancies. Haematologica 94, 1639–1641

Cortelazzo S, Ponzoni M, Ferreri AJ, Hoelzer D (2011): Lymphoblastic lymphoma. Crit Rev Oncol Hematol 79, 330–343

Cortes J, Thomas D, Koller C, Giles F, Estey E, Faderl S, Garcia-Manero G, McConkey D, Ruiz SL, Guerciolini R (2004): Phase I Study of Bortezomib in Refractory or Relapsed Acute Leukemias. Clin Cancer Res 10, 3371–3376

Costa M, Dottori M, Ng E, Hawes SM, Sourris K, Jamshidi P, Pera MF, Elefanty AG, Stanley EG (2005): The hESC line Envy expresses high levels of GFP in all differentiated progeny. Nature methods 2, 259–260

Coustan-Smith E, Kitanaka A, Pui CH, McNinch L, Evans WE, Raimondi SC, Behm FG, Arico M, Campana D (1996): Clinical relevance of BCL-2 overexpression in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 87, 1140–1146

Cowan KJ, Storey KB (2003): Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. J Exp Biol 206, 1107–1115

Cox CV, Martin HM, Kearns PR, Virgo P, Evely RS, Blair A (2007): Characterization of a progenitor cell population in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 109, 674–682

Crawford LJ, Irvine AE (2013): Targeting the ubiquitin proteasome system in haematological malignancies. Blood Rev 27, 297–304

Crist WM, Shuster JJ, Falletta J, Pullen DJ, Berard CW, Vietti TJ, Alvarado CS, Roper MA, Prasthofer E, Grossi CE (1988): Clinical features and outcome in childhood T-cell leukemia-lymphoma according to stage of thymocyte differentiation: a Pediatric Oncology Group Study. Blood 72, 1891–1897

Crompton T, Outram SV, Hager-Theodorides AL (2007): Sonic hedgehog signalling in T-cell development and activation. Nat Rev Immunol 7, 726–735

Cui X, Ji D, Fisher DA, Wu Y, Briner DM, Weinstein EJ (2011): Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. Nat Biotechnol 29, 64–67

Cullen BR (2006): Induction of stable RNA interference in mammalian cells. Gene Ther 13, 503–508

Cullion K, Draheim KM, Hermance N, Tammam J, Sharma VM, Ware C, Nikov G, Krishnamoorthy V, Majumder PK, Kelliher MA (2009): Targeting the Notch1 and mTOR pathways in a mouse T-ALL model. Blood 113, 6172–6181

Curran MP, McKeage K (2009): Bortezomib: a review of its use in patients with multiple myeloma. Drugs 69, 859–888

Curran E, Corrales L, Kline J (2015): Targeting the innate immune system as immunotherapy for acute myeloid leukemia. Front Oncol 5, 83

Cusack JC, Liu R, Houston M, Abendroth K, Elliott PJ, Adams J, Baldwin AS (2001): Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor-kappaB inhibition. Cancer Res 61, 3535–3540

Cvek B (2012): Proteasome inhibitors. Prog Mol Biol Transl Sci 109, 161–226

Daar AS, Fuggle SV, Fabre JW, Ting A, Morris PJ (1984): The detailed distribution of MHC Class II antigens in normal human organs. Transplantation 38, 293–298

Dahéron L, Zenz T, Siracusa LD, Brenner C, Calabretta B (2001): Molecular cloning of Ian4: a BCR/ABL-induced gene that encodes an outer membrane mitochondrial protein with GTP-binding activity. Nucleic Acids Res 29, 1308–1316

Dahlmann B (2007): Role of proteasomes in disease. BMC Biochem 8 Suppl 1, S3

Dai RM, Chen E, Longo DL, Gorbea CM, Li CC (1998): Involvement of Valosin-containing Protein, an ATPase Co-purified with IkappaBalpha and 26 S Proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated Degradation of IkappaBalpha. J Biol Chem 273, 3562–3573

Dams ET, Laverman P, Oyen WJ, Storm G, Scherphof GL, van Der Meer, J W, Corstens FH, Boerman OC (2000): Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes. J Pharmacol Exp Ther 292, 1071–1079

Datson NA, van der Perk J, de Kloet ER, Vreugdenhil E (2001): Expression profile of 30,000 genes in rat hippocampus using SAGE. Hippocampus 11, 430–444

Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM (2001): Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. J Exp Med 194, 1861–1874

Deangelo DJ, Stone RM, Silverman LB, Stock W, Attar EC, Fearen I (2006): A phase I clinical trial of the notch inhibitor MK-0752 in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma (T-ALL) and other leukemias. J Clin Oncol 24, 65-85

Deftos ML, He YW, Ojala EW, Bevan MJ (1998): Correlating notch signaling with thymocyte maturation. Immunity 9, 777–786

Deftos ML, Huang E, Ojala EW, Forbush KA, Bevan MJ (2000): Notch1 Signaling Promotes the Maturation of CD4 and CD8 SP Thymocytes. Immunity 13, 73–84

Del Monte G, Grego-Bessa J, González-Rajal A, Bolós V, De La Pompa JL (2007): Monitoring Notch1 activity in development: evidence for a feedback regulatory loop. Dev Dyn 236, 2594–2614

DeLisser HM, Baldwin H, Albelda SM (1997): Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1/CD31): A Multifunctional Vascular Cell Adhesion Molecule. Trends Cardiovasc Med 7, 203–210

den Boer ML, Harms DO, Pieters R, Kazemier KM, Gobel U, Korholz D, Graubner U, Haas RJ, Jorch N, Spaar HJ et al. (2003): Patient stratification based on prednisolone-vincristine-asparaginase resistance profiles in children with acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 21, 3262–3268

Dervović D, Zúñiga-Pflücker JC (2010): Positive selection of T cells, an in vitro view. Sem Immunol 22, 276–286

Di Bella N, Taetle R, Kolibaba K, Boyd T, Raju R, Barrera D, Cochran EW, Dien PY, Lyons R, Schlegel PJ et al. (2010): Results of a phase 2 study of bortezomib in patients with relapsed or refractory indolent lymphoma. Blood 115, 475–480

Dibirdik I, Langlie MC, Ledbetter JA, Tuel-Ahlgren L, Obuz V, Waddick KG, Gajl-Peczalska K, Schieven GL, Uckun FM (1991): Engagement of interleukin-7 receptor stimulates tyrosine phosphorylation, phosphoinositide turnover, and clonal proliferation of human T-lineage acute lymphoblastic leukemia cells. Blood 78, 564–570

Digel W, Schmid M, Heil G, Conrad P, Gillis S, Porzsolt F (1991): Human interleukin-7 induces proliferation of neoplastic cells from chronic lymphocytic leukemia and acute leukemias. Blood 78, 753–759

Distelhorst CW (2002): Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. Cell Death Differ 9, 6–19

Ditsworth D, Zong W (2004): NF-kappaB: key mediator of inflammation-associated cancer. Cancer Biol Ther 3, 1214–1216

Dlaske H, Karaüzüm H, Monzon-Casanova E, Rudolf R, Starick L, Müller I, Wildner G, Diedrichs-Möhring M, Koch N, Miyoshi-Akiyama T et al. (2009): Superantigen-presentation by rat major histocompatibility complex class II molecules RT1.B l and RT1.D l. Immunology 128, e572

Doggrell SA (2005): The nitrosterols – a step forward from the steroid anti-inflammatory drugs? Expert Opin Investig Drugs 14, 823–828

Dolcet X, Llobet D, Encinas M, Pallares J, Cabero A, Schoenenberger JA, Comella JX, Matias-Guiu X (2006): Proteasome inhibitors induce death but activate NF-kappaB on endometrial carcinoma cell lines and primary culture explants. Journal Biol Chem 281, 22118–22130

Domenech C, Suciu S, Moerloose B de, Mazingue F, Plat G, Ferster A, Uyttebroeck A, Sirvent N, Lutz P, Yakouben K et al. (2014): Dexamethasone (6 mg/m2/day) and prednisolone (60 mg/m2/day) were equally effective as induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia in the EORTC CLG 58951 randomized trial. Haematologica 99, 1220–1227

Donskoy E, Goldschneider I (1992): Thymocytopoiesis is maintained by blood-borne precursors throughout postnatal life. A study in parabiotic mice. J Immunol 148, 1604–1612

Dopfer R, Henze G, Bender-Götze C, Ebell W, Ehninger G, Friedrich W, Gadner H, Klingebiel T, Peters C, Riehm H (1991): Allogeneic bone marrow transplantation for childhood acute lymphoblastic leukemia in second remission after intensive primary and relapse therapy according to the BFM- and CoALL-protocols: results of the German Cooperative Study. Blood 78, 2780–2784

Dördelmann M, Reiter A, Borkhardt A, Ludwig WD, Götz N, Viehmann S, Gadner H, Riehm H, Schrappe M (1999): Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. Blood 94, 1209–1217

Dores GM, Devesa SS, Curtis RE, Linet MS, Morton LM (2012): Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. Blood 119, 34–43

Dorsch M, Zheng G, Yowe D, Rao P, Wang Y, Shen Q, Murphy C, Xiong X, Shi Q, Gutierrez-Ramos J et al. (2002): Ectopic expression of Delta4 impairs hematopoietic development and leads to lymphoproliferative disease. Blood 100, 2046–2055

Dos Santos NR, Ghezzo MN, da Silva RC, Fernandes MT (2010): NF-κB in T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Oncogenic Functions in Leukemic and in Microenvironmental Cells. Cancers (Basel) 2, 1838–1860

Dose M, Khan I, Guo Z, Kovalovsky D, Krueger A, Boehmer H von, Khazaie K, Gounari F (2006): c-Myc mediates pre-TCR-induced proliferation but not developmental progression. Blood 108, 2669–2677

Dou S, Zeng X, Cortes P, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Honjo T, Vales LD (1994): The recombination signal sequence-binding protein RBP-2N functions as a transcriptional repressor. Mol Cell Biol 14, 3310–3319

Drach D, Estrov Z, Zhao S, Drach J, Cork A, Collins D, Kantarjian H, Andreeff M (1994): Granulocyte-colony stimulating factor, granulocyte-macrophage colony stimulating factor, PIXY-321, stem cell factor, interleukin-3, and interleukin-7: receptor binding and effects on clonogenic proliferation in acute lymphoblastic leukemia. Leuk Lymphoma 16, 79–88

Drexler HG, Gignac SM, Minowada J: Hematopoietic cell lines; in: Atlas of Human Tumor Cell Lines; hrsg. v. Hay RJ; Academic Press, New York, 1994:213

Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D (1999): Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. Pharmacol Rev 51, 691–743

Drummond DC, Noble CO, Hayes ME, Park JW, Kirpotin DB (2008): Pharmacokinetics and in vivo drug release rates in liposomal nanocarrier development. J Pharm Sci 97, 4696–4740

D'Souza B, Miyamoto A, Weinmaster G (2008): The many facets of Notch ligands. Oncogene 27, 5148–5167

Du X, Chen Q (2013): Recent Advancements of Bortezomib in Acute Lymphocytic Leukemia Treatment. Acta Haematol 129, 207–214

Dudley DD, Wang H, Sun X (2009): Hes1 potentiates T cell lymphomagenesis by up-regulating a subset of notch target genes. PLoS One 4, e6678

Dudley EC, Petrie HT, Shah LM, Owen MJ, Hayday AC (1994): T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. Immunity 1, 83–93

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002): Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol 3, 991–998

DuPage M, Mazumdar C, Schmidt LM, Cheung AF, Jacks T (2012): Expression of tumour-specific antigens underlies cancer immunoediting. Nature 482, 405–409

Dürkop H, Foss H, Stein H (2011): 2008-WHO-Klassifikation der malignen Lymphome im Jahr 2011. Onkologe 17, 769–788

Dwinell MR (2010): Online tools for understanding rat physiology. Brief Bioinform 11, 431–439

Eagar TN, Tang Q, Wolfe M, He Y, Pear WS, Bluestone JA (2004): Notch 1 Signaling Regulates Peripheral T Cell Activation. Immunity 20, 407–415

Eder M, Ottmann OG, Hansen-Hagge TE, Bartram CR, Gillis S, Hoelzer D, Ganser A (1990): Effects of recombinant human IL-7 on blast cell proliferation in acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 4, 533–540

Edwards CM, Zhuang J, Mundy GR (2008): The pathogenesis of the bone disease of multiple myeloma. Bone 42, 1007–1013

Edwards CM, Lwin ST, Fowler JA, Oyajobi BO, Zhuang J, Bates AL, Mundy GR (2009): Myeloma cells exhibit an increase in proteasome activity and an enhanced response to proteasome inhibition in the bone marrow microenvironment in vivo. Am J Hematol 84, 268–272

Egan SE, St-Pierre B, Leow CC (1998): Notch receptors, partners and regulators: from conserved domains to powerful functions. Curr Top Microbiol Immunol 228, 273–324

Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Kempski H, Greaves M (2007): NOTCH1 mutation can be an early, prenatal genetic event in T-ALL. Blood 111, 376–378

Ehebauer M, Hayward P, Arias AM (2006): Notch, a universal arbiter of cell fate decisions. Science 314, 1414–1415

Eisen LP, Elsasser MS, Harmon JM (1988): Positive regulation of the glucocorticoid receptor in human T-cells sensitive to the cytolytic effects of glucocorticoids. J Biol Chem 263, 12044–12048

ElBayoumi TA, Torchilin VP (2009): Tumor-targeted nanomedicines: enhanced antitumor efficacy in vivo of doxorubicin-loaded, long-circulating liposomes modified with cancer-specific monoclonal antibody. Clin Cancer Res 15, 1973–1980

Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J (1991): TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. Cell 66, 649–661

Ellison TJ, Kedes DH (2014): Variable episomal silencing of a recombinant herpesvirus renders its encoded GFP an unreliable marker of infection in primary cells. PLoS One 9, e111502

Ellmeier W, Sawada S, Littman DR (1999): The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during t cell development. Annu Rev Immunol 17, 523–554

Espinosa L, Cathelin S, D'Altri T, Trimarchi T, Statnikov A, Guiu J, Rodilla V, Inglés-Esteve J, Nomdedeu J, Bellosillo B et al. (2010): The Notch/Hes1 pathway sustains NF-κB activation through CYLD repression in T cell leukemia. Cancer Cell 18, 268–281

Fan Y, Lin N, Luo L, Fang L, Huang Z, Yu H, Wu F (2011): Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of pegylated liposomal doxorubicin combination (CCOP) chemotherapy in patients with peripheral T-cell lymphomas. Acta Pharmacol Sin 32, 408–414

Fang J, Nakamura H, Maeda H (2011): The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. Adv Drug Deliv Rev 63, 136–151

Favaloro EJ, Moraitis N, Koutts J, Exner T, Bradstock KF (1989): Endothelial cells and normal circulating haemopoietic cells share a number of surface antigens. Thromb Haemost 61, 217–224

Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC, Behm FG, Pui CH, Downing JR, Gilliland DG et al. (2002): Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. Cancer Cell 1, 75–87

Festenstein H, Schmidt W (1981): Variation in MHC antigenic profiles of tumor cells and its biological effects. Immunol Rev 60, 85–127

Fielding AK, Richards SM, Chopra R, Lazarus HM, Litzow MR, Buck G, Durrant IJ, Luger SM, Marks DI, Franklin IM et al. (2006): Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. Blood 109, 944–950

Fiorini E, Merck E, Wilson A, Ferrero I, Jiang W, Koch U, Auderset F, Laurenti E, Tacchini-Cottier F, Pierres M et al. (2009): Dynamic Regulation of Notch 1 and Notch 2 Surface Expression during T Cell Development and Activation Revealed by Novel Monoclonal Antibodies. J Immunol 183, 7212–7222

Fisher RI, Bernstein SH, Kahl BS, Djulbegovic B, Robertson MJ, Vos S de, Epner E, Krishnan A, Leonard JP, Lonial S et al. (2006): Multicenter Phase II Study of Bortezomib in Patients With Relapsed or Refractory Mantle Cell Lymphoma. J Clin Oncol 24, 4867–4874

Fissolo N, Kraus M, Reich M, Ayturan M, Overkleeft H, Driessen C, Weissert R (2008): Dual inhibition of proteasomal and lysosomal proteolysis ameliorates autoimmune central nervous system inflammation. Eur J Immunol 38, 2401–2411

Flinn EM, Busch CM, Wright AP (1998): myc boxes, which are conserved in myc family proteins, are signals for protein degradation via the proteasome. Mol Cell Biol 18, 5961–5969

Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grümayer R, van der Velden V, Fischer S, Stanulla M, Basso G, Niggli FK, Schäfer BW et al. (2008): Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 22, 771–782

Flügel A, Willem M, Berkowicz T, Wekerle H (1999): Gene transfer into $CD4^+$ T lymphocytes: green fluorescent protein-engineered, encephalitogenic T cells illuminate brain autoimmune responses. Nat Med 5, 843–847

Flügel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, Ellwart JW, Willem M, Lassmann H, Wekerle H (2001): Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. Immunity 14, 547–560

Foley GE, Lazarus H, Farber S, Uzman BG, Boone BA, McCarthy RE (1965): Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. Cancer 18, 522–529

Fonseca C, Moreira J, Ciudad C, Pedrosodelima M, Simoes S (2005): Targeting of sterically stabilised pH-sensitive liposomes to human T-leukaemia cells. Eur J Pharm Biopharm 59, 359–366

Foon KA, Todd RF 3rd. (1986): Immunologic classification of leukemia and lymphoma. Blood 68, 1–31

Ford AM, Pombo-de-Oliveira MS, McCarthy KP, MacLean JM, Carrico KC, Vincent RF, Greaves M (1997): Monoclonal origin of concordant T-cell malignancy in identical twins. Blood 89, 281–285

Forestier E, Johansson B, Borgström G, Kerndrup G, Johansson J, Heim S (2000): Cytogenetic findings in a population-based series of 787 childhood acute lymphoblastic leukemias from the Nordic countries. The NOPHO Leukemia Cytogenetic Study Group. Eur J Haematol 64, 194–200

Forman SJ, Schmidt GM, Nademanee AP, Amylon MD, Chao NJ, Fahey JL, Konrad PN, Margolin KA, Niland JC, O'Donnell MR (1991): Allogeneic bone marrow transplantation as therapy for primary induction failure for patients with acute leukemia. J Clin Oncol 9, 1570–1574

Forsthoefel AM, Thompson EA (1987): Glucocorticoid regulation of transcription of the c-myc cellular protooncogene in P1798 cells. Mol Endocrinol 1, 899–907

Fortini ME (2002): Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 3, 673–684

Foss DL, Donskoy E, Goldschneider I (2001): The Importation of Hematogenous Precursors by the Thymus Is a Gated Phenomenon in Normal Adult Mice. J Exp Med 193, 365–374

Fowlkes BJ, Ramsdell F (1993): T-cell tolerance. Curr Opin Immunol 5, 873–879

Fowlkes BJ, Robey EA (2002): A reassessment of the effect of activated Notch1 on CD4 and CD8 T cell development. J Immunol 169, 1817–1821

Frankfurt O, Rosen ST (2004): Mechanisms of glucocorticoid-induced apoptosis in hematologic malignancies: updates. Curr Opin Oncol 16, 553–563

Frankland-Searby S, Bhaumik SR (2012): The 26S proteasome complex: An attractive target for cancer therapy. Biochim Biophys Acta 1825, 64–76

French MB, Koch U, Shaye RE, McGill MA, Dho SE, Guidos CJ, McGlade CJ (2002): Transgenic expression of numb inhibits notch signaling in immature thymocytes but does not alter T cell fate specification. J Immunol 168, 3173–3180

Fruci D, Benevolo M, Cifaldi L, Lorenzi S, Lo Monaco E, Tremante E, Giacomini P (2012): Major histocompatibility complex class i and tumour immuno-evasion: how to fool T cells and natural killer cells at one time. Curr Oncol 19, 39–41

Fryer CJ, White JB, Jones KA (2004): Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. Mol Cell 16, 509–520

Fu W, Wang K, Zhao J, Yu H, Li S, Lin Y, Liang L, Huang S, Liang Y, Han H et al. (2014): FHL1C induces apoptosis in Notch1-dependent T-ALL cells through an interaction with RBP-J. BMC Cancer 14, 463

Gabizon A, Peretz T, Sulkes A, Amselem S, Ben-Yosef R, Ben-Baruch N, Catane R, Biran S, Barenholz Y (1989): Systemic administration of doxorubicin-containing liposomes in cancer patients: a phase I study. Eur J Cancer Clin Oncol 25, 1795–1803

Gabizon A, Chisin R, Amselem S, Druckmann S, Cohen R, Goren D, Fromer I, Peretz T, Sulkes A, Barenholz Y (1991): Pharmacokinetic and imaging studies in patients receiving a formulation of liposome-associated adriamycin. Br J Cancer 64, 1125–1132

Gabizon A, Catane R, Uziely B, Kaufman B, Safra T, Cohen R, Martin F, Huang A, Barenholz Y (1994): Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. Cancer Res 54, 987–992

Gabizon A, Isacson R, Rosengarten O, Tzemach D, Shmeeda H, Sapir R (2008): An open-label study to evaluate dose and cycle dependence of the pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin. Cancer Chemother Pharmacol 61, 695–702

Gametchu B, Watson CS, Wu S (1993): Use of receptor antibodies to demonstrate membrane glucocorticoid receptor in cells from human leukemic patients. FASEB J 7, 1283–1292

Garbe AI, Krueger A, Gounari F, Zúñiga-Pflücker JC, von Boehmer H (2006): Differential synergy of Notch and T cell receptor signaling determines alphabeta versus gammadelta lineage fate. J Exp Med 203, 1579–1590

Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F (2003): MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. J Cell Physiol 195, 346–355

Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F, Stern PL (1993): Natural history of HLA expression during tumour development. Immunol Today 14, 491–499

Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL (1997): Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. Immunol Today 18, 89–95

Garza AS, Miller AL, Johnson BH, Thompson EB (2009): Converting cell lines representing hematological malignancies from glucocorticoid-resistant to glucocorticoid-sensitive: signaling pathway interactions. Leuk Res 33, 717–727

Gaynon PS, Carrel AL (1999): Glucocorticosteroid therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. Adv Exp Med Biol 457, 593–605

Gaynon PS, Trigg ME, Heerema NA, Sensel MG, Sather HN, Hammond GD, Bleyer WA (2000): Children's Cancer Group trials in childhood acute lymphoblastic leukemia: 1983-1995. Leukemia 14, 2223–2233

Geley S, Hartmann BL, Hala M, Strasser-Wozak EM, Kapelari K, Kofler R (1996): Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in human T-cell acute lymphoblastic leukemia CEM-C1 cells is due to insufficient glucocorticoid receptor expression. Cancer Res 56, 5033–5038

Gerby B, Clappier E, Armstrong F, Deswarte C, Calvo J, Poglio S, Soulier J, Boissel N, Leblanc T, Baruchel A et al. (2011): Expression of CD34 and CD7 on human T-cell acute lymphoblastic leukemia discriminates functionally heterogeneous cell populations. Leukemia 25, 1249–1258

Gerecitano J, Portlock C, Moskowitz C, Hamlin P, Straus D, Zelenetz AD, Zhang Z, Dumitrescu O, Sarasohn D, Lin D et al. (2009): Phase 2 study of weekly bortezomib in mantle cell and follicular lymphoma. Br J Haematol 146, 652–655

Germain RN (1994): MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. Cell 76, 287–299

Germain RN (2002): T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. Nat Rev Immunol 2, 309–322

Ghamlouch H, Ouled-Haddou H, Damaj G, Royer B, Gubler B, Marolleau J (2013): A combination of cytokines rescues highly purified leukemic CLL B-cells from spontaneous apoptosis in vitro. PLoS One 8, e60370

Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K (2008): Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. J Intern Med 264, 549–562

Ghosh S, Karin M (2002): Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. Cell 109 Suppl, S81-96

Gill TJ 3rd, Smith GJ, Wissler RW, Kunz HW (1989): The rat as an experimental animal. Science 245, 269–276

Giuliani N, Morandi F, Tagliaferri S, Lazzaretti M, Bonomini S, Crugnola M, Mancini C, Martella E, Ferrari L, Tabilio A et al. (2007): The proteasome inhibitor bortezomib affects osteoblast differentiation in vitro and in vivo in multiple myeloma patients. Blood 110, 334–338

Godfrey DI, Kennedy J, Suda T, Zlotnik A (1993): A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. J Immunol 150, 4244–4252

Gökbuget N, Kneba M, Raff T, Trautmann H, Bartram C, Arnold R, Fietkau R, Freund M, Ganser A, Ludwig W et al. (2012): Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. Blood 120, 1868–1876

Gold DP, Surh CD, Sellins KS, Schroder K, Sprent J, Wilson DB (1994): Rat T cell responses to superantigens. II. Allelic differences in V beta 8.2 and V beta 8.5 beta chains determine responsiveness to staphylococcal enterotoxin B and mouse mammary tumor virus-encoded products. J Exp Med 179, 63–69

Gómez-del Arco P, Kashiwagi M, Jackson AF, Naito T, Zhang J, Liu F, Kee B, Vooijs M, Radtke F, Redondo JM et al. (2010): Alternative promoter usage at the Notch1 locus supports ligand-independent signaling in T cell development and leukemogenesis. Immunity 33, 685–698

Gomi M, Moriwaki K, Katagiri S, Kurata Y, Thompson EB (1990): Glucocorticoid effects on myeloma cells in culture: correlation of growth inhibition with induction of glucocorticoid receptor messenger RNA. Cancer Res 50, 1873–1878

Gordon WR, Arnett KL, Blacklow SC (2008): The molecular logic of Notch signaling--a structural and biochemical perspective. J Cell Sci 121, 3109–3119

Goss JA, Nakafusa Y, Flye MW (1993): MHC class II presenting cells are necessary for the induction of intrathymic tolerance. Ann Surg 217, 492-9; discussion 499-501

Goy A, Bernstein SH, Kahl BS, Djulbegovic B, Robertson MJ, Vos S de, Epner E, Krishnan A, Leonard JP, Lonial S et al. (2008): Bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma:

updated time-to-event analyses of the multicenter phase 2 PINNACLE study. Ann Oncol 20, 520–525

Grabher C, Boehmer H von, Look AT (2006): Notch 1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. Nat Rev Cancer 6, 347–359

Graux C, Cools J, Michaux L, Vandenberghe P, Hagemeijer A (2006): Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. Leukemia 20, 1496–1510

Greaves M (2002): Childhood leukaemia. BMJ 324, 283–287

Greaves M (2005): In utero origins of childhood leukaemia. Early Hum Dev 81, 123–129

Greaves MF (1986): Differentiation-linked leukemogenesis in lymphocytes. Science 234, 697–704

Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM (2003): Leukemia in twins: lessons in natural history. Blood 102, 2321–2333

Greenstein S, Ghias K, Krett NL, Rosen ST (2002): Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. Clin Cancer Res 8, 1681–1694

Greenwald I (1994): Structure/function studies of lin-12/Notch proteins. Curr Opin Genet Dev 4, 556–562

Gregoriadis G, Ryman BE (1971): Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. Biochem J 124, 58P

Gregoriadis G, Leathwood PD, Ryman BE (1971): Enzyme entrapment in liposomes. FEBS Lett 14, 95–99

Gregoriadis G, Wills EJ, Swain CP, Tavill AS (1974): Drug-carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy. Lancet 1, 1313–1316

Griesinger F, Greenberg JM, Kersey JH (1989): T cell receptor gamma and delta rearrangements in hematologic malignancies. Relationship to lymphoid differentiation. J Clin Invest 84, 506–516

Groettrup M, Ungewiss K, Azogui O, Palacios R, Owen MJ, Hayday AC, Boehmer H von (1993): A novel disulfide-linked heterodimer on pre-T cells consists of the T cell receptor β chain and a 33 kd glycoprotein. Cell 75, 283–294

Gruber G, Carlet M, Türtscher E, Meister B, Irving, J A E, Ploner C, Kofler R (2009): Levels of glucocorticoid receptor and its ligand determine sensitivity and kinetics of glucocorticoid-induced leukemia apoptosis. Leukemia 23, 820–823

Gupta-Rossi N, Le Bail O, Gonen H, Brou C, Logeat F, Six E, Ciechanover A, Israël A (2001): Functional interaction between SEL-10, an F-box protein, and the nuclear form of activated Notch1 receptor. J Biol Chem 276, 34371–34378

Gutierrez A, Kentsis A, Sanda T, Holmfeldt L, Chen S, Zhang J, Protopopov A, Chin L, Dahlberg SE, Neuberg DS et al. (2011): The BCL11B tumor suppressor is mutated across the major molecular subtypes of T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 118, 4169–4173

Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, Grimes B, Howard DS, Rizzieri DA, Luger SM, Jordan CT (2001): Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. Blood 98, 2301–2307

Guzman ML, Swiderski CF, Howard DS, Grimes BA, Rossi RM, Szilvassy SJ, Jordan CT (2002): Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 16220–16225

Haabeth OA, Tveita AA, Fauskanger M, Schjesvold F, Lorvik KB, Hofgaard PO, Omholt H, Munthe LA, Dembic Z, Corthay A et al. (2014): How Do CD4(+) T Cells Detect and Eliminate Tumor Cells That Either Lack or Express MHC Class II Molecules? Front Immunol 5, 174

Haarman EG, Kaspers GJL, Pieters R, Rottier MM, Veerman AJ (2004): Glucocorticoid receptor alpha, beta and gamma expression vs in vitro glucocorticod resistance in childhood leukemia. Leukemia 18, 530–537

Hagemeijer A, Graux C (2010): ABL1 rearrangements in T-Cell acute lymphoblastic leukemia. Genes Chromosomes Cancer 49, 299-308

Hahn T, Wall D, Camitta B, Davies S, Dillon H, Gaynon P, Larson RA, Parsons S, Seidenfeld J, Weisdorf D et al. (2005): The Role of Cytotoxic Therapy with Hematopoietic Stem Cell Transplantation in the Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children: An Evidence-Based Review. Biol Blood Marrow Transplant 11, 823–861

Hales EC, Taub JW, Matherly LH (2014): New insights into Notch1 regulation of the PI3K-AKT-mTOR1 signaling axis: targeted therapy of γ-secretase inhibitor resistant T-cell acute lymphoblastic leukemia. Cell Signal 26, 149–161

Hamidi H, Gustafason D, Pellegrini M, Gasson J (2011): Identification of novel targets of CSL-dependent Notch signaling in hematopoiesis. PLoS One 6, e20022

Hamra FK, Gatlin J, Chapman KM, Grellhesl DM, Garcia JV, Hammer RE, Garbers DL (2002): Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germ-line stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 14931–14936

Han H, Tanigaki K, Yamamoto N, Kuroda K, Yoshimoto M, Nakahata T, Ikuta K, Honjo T (2002): Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. Int Immunol 14, 637–645

Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. Cell 100, 57–70

Hanlon L, Avila JL, Demarest RM, Troutman S, Allen M, Ratti F, Rustgi AK, Stanger BZ, Radtke F, Adsay V et al. (2010): Notch1 functions as a tumor suppressor in a model of K-ras-induced pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancer Res 70, 4280–4286

Harmon JM, Norman MR, Fowlkes BJ, Thompson EB (1979): Dexamethasone induces irreversible G1 arrest and death of a human lymphoid cell line. J Cell Physiol 98, 267–278

Harousseau J, Palumbo A, Richardson PG, Schlag R, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, Kentos A, Cavo M, Golenkov A et al. (2010): Superior outcomes associated with complete response in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with nonintensive therapy: analysis of the phase 3 VISTA study of bortezomib plus melphalan-prednisone versus melphalan-prednisone. Blood 116, 3743–3750

Harrington KJ, Mohammadtaghi S, Uster PS, Glass D, Peters AM, Vile RG, Stewart JS (2001): Effective targeting of solid tumors in patients with locally advanced cancers by radiolabeled pegylated liposomes. Clin Cancer Res 7, 243–254

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, Wolf-Peeters C de, Falini B, Gatter KC (1994): A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood 84, 1361–1392

Hawkins DS, Park JR, Thomson BG, Felgenhauer JL, Holcenberg JS, Panosyan EH, Avramis VI (2004): Asparaginase pharmacokinetics after intensive polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase therapy for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. Clin Cancer Res 10, 5335–5341

Hayday AC, Pennington DJ (2007): Key factors in the organized chaos of early T cell development. Nat Immunol 8, 137–144

Hayday AC, Saito H, Gillies SD, Kranz DM, Tanigawa G, Eisen HN, Tonegawa S (1985): Structure, organization, and somatic rearrangement of T cell gamma genes. Cell 40, 259–269

Heck S, Kullmann M, Gast A, Ponta H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P, Cato AC (1994): A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. EMBO J 13, 4087–4095

Heck S, Bender K, Kullmann M, Göttlicher M, Herrlich P, Cato AC (1997): I kappaB alpha -independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoid receptor. EMBO J 16, 4698–4707

Hegazy AN, Klein C (2008): Ex vivo priming of CD4 T cells converts immunological tolerance into effective antitumor immunity in a murine model of acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 22, 2070–2079

Hegeman MA, Cobelens PM, Kamps J, Hennus MP, Jansen, N J G, Schultz MJ, van Vught, A J, Molema G, Heijnen CJ (2011): Liposome-encapsulated dexamethasone attenuates ventilator-induced lung inflammation. Br J Pharmacol 163, 1048–1058

Heider U, Kaiser M, Müller C, Jakob C, Zavrski I, Schulz C, Fleissner C, Hecht M, Sezer O (2006): Bortezomib increases osteoblast activity in myeloma patients irrespective of response to treatment. Eur J Haematol 77, 233–238

Heinzel K, Benz C, Martins VC, Haidl ID, Bleul CC (2007): Bone marrow-derived hemopoietic precursors commit to the T cell lineage only after arrival in the thymic microenvironment. J Immunol 178, 858–868

Helbron D, Brittinger G, Lennert K (1979): T-zone lymphoma--clinical symptoms, therapy, and prognosis (author's transl). Blut 39, 117–131

Henseling U, Schmidt W, Scholer HR, Gruss P, Hatzopoulos AK (1990): A transcription factor interacting with the class I gene enhancer is inactive in tumorigenic cell lines which suppress major histocompatibility complex class I genes. Mol Cell Biol 10, 4100–4109

Henze G, Langermann HJ, Fengler R, Brandeis M, Evers KG, Gadner H, Hinderfeld L, Jobke A, Kornhuber B, Lampert F et al. (1982): Therapiestudie BFM 79/81 zur Behandlung der akuten lymphoblastischen Leukämie bei Kindern und Jugendlichen: intensivierte Reinduktionstherapie für Patientengruppen mit unterschiedlichem Rezidivrisiko. Klin Padiatr 194, 195–203

Henze G, Fengler R, Reiter A, Ritter J, Riehm H (1990): Impact of early intensive reinduction therapy on event-free survival in children with low-risk acute lymphoblastic leukemia. Haematol Blood Transfus 33, 483–488

Hernandez Tejada FN, Galvez Silva JR, Zweidler-McKay PA (2014): The challenge of targeting notch in hematologic malignancies. Front Pediatr 2, 54

Herold MJ, McPherson KG, Reichardt HM (2006): Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. Cell Mol Life Sci 63, 60–72

Herold MJ, van den Brandt J, Seibler J, Reichardt HM (2008): Inducible and reversible gene silencing by stable integration of an shRNA-encoding lentivirus in transgenic rats. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 18507–18512

Hershko A, Ciechanover A (1992): The ubiquitin system for protein degradation. Annu Rev Biochem 61, 761–807

Hicklin DJ, Marincola FM, Ferrone S (1999): HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. Mol Med Today 5, 178–186

Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Anderson KC (2001a): The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. Oncogene 20, 4519–4527

Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, Anderson KC (2001b): The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. Cancer Res 61, 3071–3076

Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, Hayashi T, Chauhan D, Richardson P, Schlossman R, Podar K, Munshi NC, Mitsiades N et al. (2003): Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. Blood 101, 1530–1534

Hideshima T, Ikeda H, Chauhan D, Okawa Y, Raje N, Podar K, Mitsiades C, Munshi NC, Richardson PG, Carrasco RD et al. (2009): Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. Blood 114, 1046–1052

Hillmann AG, Ramdas J, Multanen K, Norman MR, Harmon JM (2000): Glucocorticoid receptor gene mutations in leukemic cells acquired in vitro and in vivo. Cancer Res 60, 2056–2062

Hirji N, Lin TJ, Befus AD (1997): A novel CD8 molecule expressed by alveolar and peritoneal macrophages stimulates nitric oxide production. J Immunol 158, 1833–1840

Hiromatsu K, Yoshikai Y, Matsuzaki G, Ohga S, Muramori K, Matsumoto K, Bluestone JA, Nomoto K (1992): A protective role of gamma/delta T cells in primary infection with Listeria monocytogenes in mice. J Exp Med 175, 49–56

Hoelzer D, Gökbuget N (2002): Treatment of lymphoblastic lymphoma in adults. Best Pract Res Clin Haematol 15, 713–728

Hoelzer D, Gökbuget N (2009): T-Cell Lymphoblastic Lymphoma and T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Separate Entity? Clin Lymphoma Myeloma 9, S214

Hoffman ES, Passoni L, Crompton T, Leu TM, Schatz DG, Koff A, Owen MJ, Hayday AC (1996): Productive T-cell receptor beta-chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development in vivo. Genes Dev 10, 948–962

Hofkens W, van den Hoven JM, Pesman GJ, Nabbe KC, Sweep FC, Storm G, van den Berg WB, van Lent PL (2011): Safety of glucocorticoids can be improved by lower yet still effective dosages of liposomal steroid formulations in murine antigen-induced arthritis: Comparison of prednisolone with budesonide. Int J Pharm 416, 493–498

Holleman A, Cheok MH, Den Boer ML, Yang W, Veerman AJ, Kazemier KM, Pei D, Cheng C, Pui C, Relling MV et al. (2004): Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. N Engl J Med 351, 533–542

Holmdahl R, Lorentzen JC, Lu S, Olofsson P, Wester L, Holmberg J, Pettersson U (2001): Arthritis induced in rats with nonimmunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis. Immunol Rev 184, 184–202

Hongo T, Fujii Y (1991): In vitro chemosensitivity of lymphoblasts at relapse in childhood leukemia using the MTT assay. Int J Hematol 54, 219–230

Hongo T, Yajima S, Sakurai M, Horikoshi Y, Hanada R (1997): In vitro drug sensitivity testing can predict induction failure and early relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 89, 2959–2965

Horie R, Watanabe T, Morishita Y, Ito K, Ishida T, Kanegae Y, Saito I, Higashihara M, Mori S, Kadin ME et al. (2002): Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF-kappaB activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells. Oncogene 21, 2493–2503

Hornum L, Romer J, Markholst H (2002): The Diabetes-Prone BB Rat Carries a Frameshift Mutation in Ian4, a Positional Candidate of Iddm1. Diabetes 51, 1972–1979

Horton TM, Gannavarapu A, Blaney SM, D'Argenio DZ, Plon SE, Berg SL (2006): Bortezomib interactions with chemotherapy agents in acute leukemia in vitro. Cancer Chemother Pharmacol 58, 13–23

Horton TM, Pati D, Plon SE, Thompson PA, Bomgaars LR, Adamson PC, Ingle AM, Wright J, Brockman AH, Paton M et al. (2007): A phase 1 study of the proteasome inhibitor bortezomib in pediatric patients with refractory leukemia: a Children's Oncology Group study. Clin Cancer Res 13, 1516–1522

Hosseinzadeh H, Goldschneider I (1993): Recent thymic emigrants in the rat express a unique antigenic phenotype and undergo post-thymic maturation in peripheral lymphoid tissues. J Immunol 150, 1670–1679

Houghton PJ, Morton CL, Kolb EA, Lock R, Carol H, Reynolds CP, Keshelava N, Maris JM, Keir ST, Wu J et al. (2008): Initial testing (stage 1) of the proteasome inhibitor bortezomib by the pediatric preclinical testing program. Pediatr Blood Cancer 50, 37–45

Howard JC (1983): The major histocompatibility complex of the rat: a partial review. Metabolism 32, 41–50

Hozumi K, Masuko T, Hashimoto Y (1994): Expression of Thy-1 on rat T cells and its relevance as a maturation marker of T cells in rats. Immunol Lett 39, 179–185

Hozumi K, Mailhos C, Negishi N, Hirano K, Yahata T, Ando K, Zuklys S, Holländer GA, Shima DT, Habu S (2008): Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. J Exp Med 205, 2507–2513

Hsieh JJ, Henkel T, Salmon P, Robey E, Peterson MG, Hayward SD (1996): Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. Mol Cell Biol 16, 952–959

Hsieh JJ, Zhou S, Chen L, Young DB, Hayward SD (1999): CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 23–28

Huang C, Hu X, Wang L, Lü S, Cheng H, Song X, Wang J, Yang J (2012): Bortezomib suppresses the growth of leukemia cells with Notch1 overexpression in vivo and in vitro. Cancer Chemother Pharmacol 70, 801–809

Huang EY, Gallegos AM, Richards SM, Lehar SM, Bevan MJ (2003): Surface expression of Notch1 on thymocytes: correlation with the double-negative to double-positive transition. J Immunol 171, 2296–2304

Huang G, Tong C, Kumbhani DS, Ashton C, Yan H, Ying Q (2014): Beyond knockout rats. Cell Cycle 10, 1059–1066

Huang SK, Lee KD, Hong K, Friend DS, Papahadjopoulos D (1992): Microscopic localization of sterically stabilized liposomes in colon carcinoma-bearing mice. Cancer Res 52, 5135–5143

Huang SK, Martin FJ, Jay G, Vogel J, Papahadjopoulos D, Friend DS (1993): Extravasation and transcytosis of liposomes in Kaposi's sarcoma-like dermal lesions of transgenic mice bearing the HIV tat gene. Am J Pathol 143, 10–14

Hueber A, Bernard A, Battari C, Marguet D, Massol P, Foa C, Brun N, Garcia S, Stewart C, Pierres M et al. (1997): Thymocytes in Thy-1-/- mice show augmented TCR signaling and impaired differentiation. Curr Biol 7, 705–708

Hulleman E, Kazemier KM, Holleman A, VanderWeele DJ, Rudin CM, Broekhuis, Mathilde J C, Evans WE, Pieters R, Den Boer ML (2009): Inhibition of glycolysis modulates prednisolone resistance in acute lymphoblastic leukemia cells. Blood 113, 2014–2021

Hunault M, Harousseau JL, Delain M, Truchan-Graczyk M, Cahn JY, Witz F, Lamy T, Pignon B, Jouet JP, Garidi R et al. (2004): Better outcome of adult acute lymphoblastic leukemia after early genoidentical allogeneic bone marrow transplantation (BMT) than after late high-dose therapy and autologous BMT: a GOELAMS trial. Blood 104, 3028–3037

Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, Reaman GH, Carroll WL (2012): Improved Survival for Children and Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia Between 1990 and 2005: A Report From the Children's Oncology Group. J Clin Oncol 30, 1663–1669

Hünig T, Mitnacht R (1991): T cell receptor-mediated selection of functional rat CD8 T cells from defined immature thymocyte precursors in short-term suspension culture. J Exp Med 173, 561–568

Hünig T, Dennehy K (2005): CD28 superagonists: Mode of action and therapeutic potential. Immunol Lett 100, 21–28

Hünig T, Wallny HJ, Hartley JK, Lawetzky A, Tiefenthaler G (1989): A monoclonal antibody to a constant determinant of the rat T cell antigen receptor that induces T cell activation. Differential reactivity with subsets of immature and mature T lymphocytes. J Exp Med 169, 73–86

Hünig T, Torres-Nagel N, Mehling B, Park H, Herrmann T (2001): Thymic development and repertoire selection: the rat perspective. Immunol Rev 184, 7–19

Hunt SV (1979): The presence of Thy-1 on the surface of rat lymphoid stem cells and colony-forming units. Eur J Immunol 9, 853–859

Hyun E, Bolla M, Steinhoff M, Wallace JL, Soldato PD, Vergnolle N (2004): Anti-inflammatory effects of nitric oxide-releasing hydrocortisone NCX 1022, in a murine model of contact dermatitis. Br J Pharmacol 143, 618–625

Iacobelli S, Natoli V, Longo P, Ranelletti FO, Rossi G de, Pasqualetti D, Mandelli F, Mastrangelo R (1981): Glucocorticoid receptor determinations in leukemia patients using cytosol and whole-cell assays. Cancer Res 41, 3979–3984

Iannaccone PM, Jacob HJ (2009): Rats! Dis Model Mech 2, 206–210

Ichii S, Satoh Y, Izawa M, Iwasaki K (1984): Stability of receptor complexes in the rat liver bound to glucocorticoids of different biopotencies. Endocrinol Jpn 31, 583–594

Igarashi S, Manabe A, Ohara A, Kumagai M, Saito T, Okimoto Y, Kamijo T, Isoyama K, Kajiwara M, Sotomatsu M et al. (2005): No advantage of dexamethasone over prednisolone for the outcome of standard- and intermediate-risk childhood acute lymphoblastic leukemia in the Tokyo Children's Cancer Study Group L95-14 protocol. J Clin Oncol 23, 6489–6498

Immordino ML, Dosio F, Cattel L (2006): Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. Int J Nanomedicine 1, 297–315

Imrich H, Kugler C, Torres-Nagel N, Dörries R, Hünig T (1995): Prevention and treatment of Lewis rat experimental allergic encephalomyelitis with a monoclonal antibody to the T cell receptor V beta 8.2 segment. Eur J Immunol 25, 1960–1964

Inaba H, Pui C (2010): Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia. Lancet Oncol 11, 1096–1106

Inaba H, Greaves M, Mullighan CG (2013): Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet 381, 1943–1955

Inoue T, Geyer RK, Howard D, Yu ZK, Maki CG (2001): MDM2 can promote the ubiquitination, nuclear export, and degradation of p53 in the absence of direct binding. J Biol Chem 276, 45255–45260

Ishida T, Kiwada H (2008): Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes. Int J Pharm 354, 56–62

Ishida T, Ichihara M, Wang X, Kiwada H (2006): Spleen plays an important role in the induction of accelerated blood clearance of PEGylated liposomes. J Control Release 115, 243–250

Iso T, Kedes L, Hamamori Y (2003): HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. J Cell Physiol 194, 237–255

Issekutz TB (1991): Inhibition of in vivo lymphocyte migration to inflammation and homing to lymphoid tissues by the TA-2 monoclonal antibody. A likely role for VLA-4 in vivo. J Immunol 147, 4178–4184

Issekutz TB, Wykretowicz A (1991): Effect of a new monoclonal antibody, TA-2, that inhibits lymphocyte adherence to cytokine stimulated endothelium in the rat. J Immunol 147, 109–116

Ito C, Evans WE, McNinch L, Coustan-Smith E, Mahmoud H, Pui CH, Campana D (1996): Comparative cytotoxicity of dexamethasone and prednisolone in childhood acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 14, 2370–2376

Ito C, Ribeiro RC, Behm FG, Raimondi SC, Pui CH, Campana D (1998): Cyclosporin A induces apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia cells. Blood 91, 1001–1007

Izon DJ, Punt JA, Xu L, Karnell FG, Allman D, Myung PS, Boerth NJ, Pui JC, Koretzky GA, Pear WS (2001): Notch1 Regulates Maturation of $CD4^+$ and $CD8^+$ Thymocytes by Modulating TCR Signal Strength. Immunity 14, 253–264

Izon DJ, Aster JC, He Y, Weng A, Karnell FG, Patriub V, Xu L, Bakkour S, Rodriguez C, Allman D et al. (2002): Deltex1 redirects lymphoid progenitors to the B cell lineage by antagonizing Notch1. Immunity 16, 231–243

Jacob HJ, Lazar J, Dwinell MR, Moreno C, Geurts AM (2010): Gene targeting in the rat: advances and opportunities. Trends Genet 26, 510–518

Jaenisch R (1988): Transgenic animals. Science 240, 1468–1474

Jager E, Ringhoffer M, Altmannsberger M, Arand M, Karbach J, Jager D, Oesch F, Knuth A (1997): Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. Int J Cancer 71, 142–147

Jain AK, Chalasani KB, Khar RK, Ahmed FJ, Diwan PV (2007): Muco-adhesive multivesicular liposomes as an effective carrier for transmucosal insulin delivery. J Drug Target 15, 417–427

Jaleco AC, Neves H, Hooijberg E, Gameiro P, Clode N, Haury M, Henrique D, Parreira L (2001): Differential Effects of Notch Ligands Delta-1 and Jagged-1 in Human Lymphoid Differentiation. J Exp Med 194, 991–1002

Janeway CA Jr. (1992): The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. Annu Rev Immunol 10, 645–674

Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A (1995): Signalling downstream of activated mammalian Notch. Nature 377, 355–358

Jeannet R, Mastio J, Macias-Garcia A, Oravecz A, Ashworth T, Geimer Le Lay, Anne-Solen, Jost B, Le Gras S, Ghysdael J, Gridley T et al. (2010): Oncogenic activation of the Notch1 gene by deletion of its promoter in Ikaros-deficient T-ALL. Blood 116, 5443–5454

Jefferies WA, Green JR, Williams AF (1985): Authentic T helper CD4 (W3/25) antigen on rat peritoneal macrophages. J Exp Med 162, 117–127

Jeffries S, Robbins DJ, Capobianco AJ (2002): Characterization of a High-Molecular-Weight Notch Complex in the Nucleus of Notchic-Transformed RKE Cells and in a Human T-Cell Leukemia Cell Line. Mol Cell Biol 22, 3927–3941

Jenkins BD, Pullen CB, Darimont BD (2001): Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms. Trends Endocrinol Metab 12, 122–126

Jensen SM, Twitty CG, Maston LD, Antony PA, Lim M, Hu H, Petrausch U, Restifo NP, Fox BA (2012): Increased frequency of suppressive regulatory T cells and T cell-mediated antigen loss results in murine melanoma recurrence. J Immunol 189, 767–776

Jiang N, Koh GS, Lim JY, Kham SK, Ariffin H, Chew FT, Yeoh AE (2011): BIM is a prognostic biomarker for early prednisolone response in pediatric acute lymphoblastic leukemia. Exp Hematol 39, 321-9, 329.e1-3

Johnson P, Gagnon J, Barclay AN, Williams AF (1985): Purification, chain separation and sequence of the MRC OX-8 antigen, a marker of rat cytotoxic T lymphocytes. EMBO J 4, 2539–2545

Jones B, Freeman AI, Shuster JJ, Jacquillat C, Weil M, Pochedly C, Sinks L, Chevalier L, Maurer HM, Koch K (1991): Lower incidence of meningeal leukemia when prednisone is replaced by dexamethasone in the treatment of acute lymphocytic leukemia. Med Pediatr Oncol 19, 269–275

Jundt F, Schwarzer R, Dorken B (2008): Notch signaling in leukemias and lymphomas. Curr Mol Med 8, 51–59

Kaatsch P, Spix C: Jahresbericht 2012 des Deutschen Kinderkrebsregisters; Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI), Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2013

Kaatsch P, Spix C, Schulze-Rath R, Schmiedel S, Blettner M (2008): Leukaemia in young children living in the vicinity of German nuclear power plants. Int J Cancer 122, 721–726

Kacew S, Festing MF (1996): Role of rat strain in the differential sensitivity to pharmaceutical agents and naturally occurring substances. J Toxicol Environ Health 47, 1–30

Kager L, Cheok M, Yang W, Zaza G, Cheng Q, Panetta JC, Pui C, Downing JR, Relling MV, Evans WE (2005): Folate pathway gene expression differs in subtypes of acute lymphoblastic leukemia and influences methotrexate pharmacodynamics. J Clin Invest 115, 110–117

Kaklamanis L, Hill A (1992): MHC loss in colorectal tumours: evidence for immunoselection? Cancer Surv 13, 155–171

Kamaly N, Xiao Z, Valencia PM, Radovic-Moreno AF, Farokhzad OC (2012): Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. Chem Soc Rev 41, 2971–3010

Kamath AB, Nagarkatti PS, Nagarkatti M (1998): Characterization of Phenotypic Alterations Induced by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin on Thymocytesin Vivoand Its Effect on Apoptosis. Toxicol Appl Pharmacol 150, 117–124

Kamps WA, Bökkerink JP, Hählen K, Hermans J, Riehm H, Gadner H, Schrappe M, Slater R, van den Berg-de Ruiter, E, Smets LA et al. (1999): Intensive treatment of children with acute lymphoblastic leukemia according to ALL-BFM-86 without cranial radiotherapy: results of Dutch Childhood Leukemia Study Group Protocol ALL-7 (1988-1991). Blood 94, 1226–1236

Kane RC, Farrell AT, Sridhara R, Pazdur R (2006): United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. Clin Cancer Res 12, 2955–2960

Kane RC, Dagher R, Farrell A, Ko C, Sridhara R, Justice R, Pazdur R (2007): Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. Clin Cancer Res 13, 5291–5294

Kang J, Der SD (2004): Cytokine functions in the formative stages of a lymphocyte's life. Curr Opin Immunol 16, 180–190

Kang J, Coles M, Cado D, Raulet DH (1998): The Developmental Fate of T Cells Is Critically Influenced by TCRγδ Expression. Immunity 8, 427–438

Kannan S, Fang W, Song G, Mullighan CG, Hammitt R, McMurray J, Zweidler-McKay PA (2011): Notch/HES1-mediated PARP1 activation: a cell type-specific mechanism for tumor suppression. Blood 117, 2891–2900

Kapoor B, Singh SK, Gulati M, Gupta R, Vaidya Y (2014): Application of liposomes in treatment of rheumatoid arthritis: quo vadis. ScientificWorldJournal 2014, 978351

Kappes DJ, He X, He X (2005): CD4-CD8 lineage commitment: an inside view. Nat Immunol 6, 761–766

Karawajew L, Ruppert V, Wuchter C, Kosser A, Schrappe M, Dorken B, Ludwig WD (2000): Inhibition of in vitro spontaneous apoptosis by IL-7 correlates with bcl-2 up-regulation, cortical/mature immunophenotype, and better early cytoreduction of childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 96, 297–306

Karin M (2006): Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. Nature 441, 431–436

Karin M, Ben-Neriah Y (2000): Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. Annu Rev Immunol 18, 621–663

Karin M, Cao Y, Greten FR, Li Z (2002): NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. Nat Rev Cancer 2, 301–310

Kaspers GJ, Pieters R, Klumper E, De Waal FC, Veerman AJ (1994): Glucocorticoid resistance in childhood leukemia. Leuk. Lymphoma 13, 187–201

Kaspers GJ, Veerman AJ, Popp-Snijders C, Lomecky M, Van Zantwijk CH, Swinkels LM, van Wering ER, Pieters R (1996): Comparison of the antileukemic activity in vitro of dexamethasone and prednisolone in childhood acute lymphoblastic leukemia. Med Pediatr Oncol 27, 114–121

Kaspers GJ, Pieters R, Van Zantwijk CH, van Wering ER, Van Der Does-Van Den Berg A, Veerman AJ (1998): Prednisolone resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia: vitro-vivo correlations and cross-resistance to other drugs. Blood 92, 259–266

Kaspers GJ, Wijnands JJ, Hartmann R, Huismans L, Loonen AH, Stackelberg A, Henze G, Pieters R, Hählen K, Van Wering ER et al. (2005): Immunophenotypic cell lineage and in vitro cellular drug resistance in childhood relapsed acute lymphoblastic leukaemia. Eur J Cancer 41, 1300–1303

Kato GJ, Quddus FF, Shuster JJ, Boyett J, Pullen JD, Borowitz MJ, Whitehead VM, Crist WM, Leventhal BG (1993): High glucocorticoid receptor content of leukemic blasts is a favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 82, 2304–2309

Kawamata M, Ochiya T (2010): Generation of genetically modified rats from embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 14223–14228

Kawamata M, Ochiya T (2011): Gene-manipulated embryonic stem cells for rat transgenesis. Cell Mol Life Sci 68, 1911–1915

Kawamata N, Ogawa S, Seeger K, Kirschner-Schwabe R, Huynh T, Chen J, Megrabian N, Harbott J, Zimmermann M, Henze G et al. (2009): Molecular allelokaryotyping of relapsed pediatric acute lymphoblastic leukemia. Int J Oncol 34, 1603–1612

Kellendonk C, Tronche F, Reichardt HM, Schütz G (1999): Mutagenesis of the glucocorticoid receptor in mice. J Steroid Biochem Mol Biol 69, 253–259

Kfir S, Sionov RV, Zafrir E, Zilberman Y, Yefenof E (2007): Staurosporine sensitizes T lymphoma cells to glucocorticoid-induced apoptosis: role of Nur77 and Bcl-2. Cell Cycle 6, 3086–3096

Khong HT, Restifo NP (2002): Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. Nat Immunol 3, 999–1005

Kidd S, Kelley MR, Young MW (1986): Sequence of the notch locus of Drosophila melanogaster: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. Mol Cell Biol 6, 3094–3108

Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ (2005): SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. Cell 121, 1109–1121

Killeen N (1997): T-cell regulation: Thy-1 - hiding in full view. Curr Biol 7, R774-7

Kimble J, Simpson P (1997): The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation. Annu Rev Cell Dev Biol 13, 333–361

King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW (1996): How proteolysis drives the cell cycle. Science 274, 1652–1659

Kirpotin DB, Drummond DC, Shao Y, Shalaby MR, Hong K, Nielsen UB, Marks JD, Benz CC, Park JW (2006): Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. Cancer Res 66, 6732–6740

Kisselev AF, Goldberg AL (2001): Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. Chem Biol 8, 739–758

Kleiman A, Tuckermann JP (2007): Glucocorticoid receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: Lessons from conditional knockout mice. Mol Cell Endocrin 275, 98–108

Kleinmann E, Geimer Le Lay, Anne-Solen, Sellars M, Kastner P, Chan S (2008): Ikaros represses the transcriptional response to Notch signaling in T-cell development. Mol Cell Biol 28, 7465–7475

Klinakis A, Szabolcs M, Politi K, Kiaris H, Artavanis-Tsakonas S, Efstratiadis A (2006): Myc is a Notch1 transcriptional target and a requisite for Notch1-induced mammary tumorigenesis in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 9262–9267

Klinakis A, Lobry C, Abdel-Wahab O, Oh P, Haeno H, Buonamici S, van De Walle, Inge, Cathelin S, Trimarchi T, Araldi E et al. (2011): A novel tumour-suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia. Nature 473, 230–233

Klumper E, Pieters R, Veerman AJ, Huismans DR, Loonen AH, Hählen K, Kaspers GJ, van Wering, E R, Hartmann R, Henze G (1995): In vitro cellular drug resistance in children with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. Blood 86, 3861–3868

Kluza E, Yeo SY, Schmid S, van der Schaft DW, Boekhoven RW, Schiffelers RM, Storm G, Strijkers GJ, Nicolay K (2011): Anti-tumor activity of liposomal glucocorticoids: The relevance of liposome-mediated drug delivery, intratumoral localization and systemic activity. J Control Release 151, 10–17

Kobayashi T, Tsukagoshi S, Sakurai Y (1975): Enhancement of the cancer chemotherapeutic effect of cytosine arabinoside entrapped in liposomes on mouse leukemia L-1210. Gann 66, 719–720

Koch U, Radtke F (2011a): Mechanisms of T Cell Development and Transformation. Annu Rev Cell Dev Biol 27, 539–562

Koch U, Radtke F (2011b): Notch in T-ALL: new players in a complex disease. Trends Immunol 32, 434–442

Koch U, Lacombe TA, Holland D, Bowman JL, Cohen BL, Egan SE, Guidos CJ (2001): Subversion of the T/B lineage decision in the thymus by lunatic fringe-mediated inhibition of Notch-1. Immunity 15, 225–236

Koch U, Fiorini E, Benedito R, Besseyrias V, Schuster-Gossler K, Pierres M, Manley NR, Duarte A, MacDonald HR, Radtke F (2008): Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. J Exp Med 205, 2515–2523

Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD (2002): Cutting edge: $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 169, 4712–4716

Kojika S, Griffin JD (2001): Notch receptors and hematopoiesis. Exp Hematol 29, 1041–1052

Kondo M, Weissman IL, Akashi K (1997): Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. Cell 91, 661–672

Konopleva M, Andreeff M (2007): Targeting the leukemia microenvironment. Curr Drug Targets 8, 685–701

Kopan R, Schroeter EH, Weintraub H, Nye JS (1996): Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 1683–1688

Kopan R, Ilagan, Maria Xenia G (2009): The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. Cell 137, 216–233

Kordes U, Krappmann D, Heissmeyer V, Ludwig WD, Scheidereit C (2000): Transcription factor NF-kappaB is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells. Leukemia 14, 399–402

Kovall RA, Blacklow SC: Mechanistic Insights into Notch Receptor Signaling from Structural and Biochemical Studies; In: Notch Signaling. (Current Topics in Developmental Biology): Elsevier 2010, 31–71

Kox C, Zimmermann M, Stanulla M, Leible S, Schrappe M, Ludwig W, Koehler R, Tolle G, Bandapalli OR, Breit S et al. (2010): The favorable effect of activating NOTCH1 receptor mutations on long-term outcome in T-ALL patients treated on the ALL-BFM 2000 protocol can be separated from FBXW7 loss of function. Leukemia 24, 2005–2013

Koyama D, Kikuchi J, Hiraoka N, Wada T, Kurosawa H, Chiba S, Furukawa Y (2014): Proteasome inhibitors exert cytotoxicity and increase chemosensitivity via transcriptional repression of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 28, 1216–1226

Kraszewska MD, Dawidowska M, Szczepański T, Witt M (2012): T-cell acute lymphoblastic leukaemia: recent molecular biology findings. Br J Haematol 156, 303–315

Krücken J, Stamm O, Schmitt-Wrede HP, Mincheva A, Lichter P, Wunderlich F (1999): Spleen-specific Expression of the Malaria-inducible Intronless Mouse Gene imap38. J Biol Chem 274, 24383–24391

Krueger A, Boehmer H von (2007): Identification of a T Lineage-Committed Progenitor in Adult Blood. Immunity 26, 105–116

Kubo RT, Born W, Kappler JW, Marrack P, Pigeon M (1989): Characterization of a monoclonal antibody which detects all murine alpha beta T cell receptors. J Immunol 142, 2736–2742

Kumatori A, Tanaka K, Inamura N, Sone S, Ogura T, Matsumoto T, Tachikawa T, Shin S, Ichihara A (1990): Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells. Proc Natl Acad Sci U S A 87, 7071–7075

Kupfer R, Lang J, Williams-Skipp C, Nelson M, Bellgrau D, Scheinman RI (2007): Loss of a gimap/ian gene leads to activation of NF-kappaB through a MAPK-dependent pathway. Mol Immunol 44, 479–487

Kurooka H, Honjo T (2000): Functional interaction between the mouse notch1 intracellular region and histone acetyltransferases PCAF and GCN5. J Biol Chem 275, 17211–17220

La Motte-Mohs RN, Herer E, Zúñiga-Pflücker JC (2005): Induction of T-cell development from human cord blood hematopoietic stem cells by Delta-like 1 in vitro. Blood 105, 1431–1439

Lacorazza HD, Porritt HE, Nikolich-Zugich J (2001): Dysregulated expression of pre-Talpha reveals the opposite effects of pre-TCR at successive stages of T cell development. J Immunol 167, 5689–5696

Ladenstein R, Peters C, Gadner H (1997): The present role of bone marrow and stem cell transplantation in the therapy of children with acute leukemia. Ann NY Acad Sci 824, 38–64

Lafiura KM, Bielawski DM, Posecion, Norberto C Jr, Ostrea, Enrique M Jr, Matherly LH, Taub JW, Ge Y (2007): Association between prenatal pesticide exposures and the generation of leukemia-associated T(8;21). Pediatr Blood Cancer 49, 624–628

Laginha KM, Moase EH, Yu N, Huang A, Allen TM (2008): Bioavailability and therapeutic efficacy of HER2 scFv-targeted liposomal doxorubicin in a murine model of HER2-overexpressing breast cancer. J Drug Target 16, 605–610

Lai AY, Kondo M (2007): Identification of a bone marrow precursor of the earliest thymocytes in adult mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 6311–6316

Lai EC (2002): Protein Degradation: Four E3s For The Notch Pathway. Curr Biol 12, R74

Lai EC (2004): Notch signaling: control of cell communication and cell fate. Development 131, 965–973

Laky K, Fowlkes B (2007): Presenilins regulate T cell development by modulating TCR signaling. J Exp Med 204, 2115–2129

Laky K, Fowlkes B (2008): Notch signaling in CD4 and CD8 T cell development. Curr Opin Immunol 20, 197–202

Lancet JE, Duong VH, Winton EF, Stuart RK, Burton M, Zhang S, Cubitt C, Blaskovich MA, Wright JJ, Sebti S et al. (2011): A phase I clinical-pharmacodynamic study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in combination with the proteasome inhibitor bortezomib in advanced acute leukemias. Clin Cancer Res 17, 1140–1146

Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG (2009): The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. Blood 114, 1150–1157

Laouar Y, Crispe IN, Flavell RA (2004): Overexpression of IL-7R alpha provides a competitive advantage during early T-cell development. Blood 103, 1985–1994

Laport GF, Larson RA (1997): Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. Semin Oncol 24, 70–82

Larson S, Stock W (2008): Progress in the treatment of adults with acute lymphoblastic leukemia. Curr Opin Hematol 15, 400–407

Larson Gedman A, Chen Q, Kugel Desmoulin S, Ge Y, LaFiura K, Haska CL, Cherian C, Devidas M, Linda SB, Taub JW et al. (2009): The impact of NOTCH1, FBW7 and PTEN mutations on prognosis and downstream signaling in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. Leukemia 23, 1417–1425

Lasic DD, Martin FJ, Gabizon A, Huang SK, Papahadjopoulos D (1991): Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. Biochim Biophys Acta 1070, 187–192

Lauritsen JP, Wong GW, Lee S, Lefebvre JM, Ciofani M, Rhodes M, Kappes DJ, Zúñiga-Pflücker JC, Wiest DL (2009): Marked induction of the helix-loop-helix protein Id3 promotes the gammadelta T cell fate and renders their functional maturation Notch independent. Immunity 31, 565–575

Lauten M, Cario G, Asgedom G, Welte K, Schrappe M (2003): Protein expression of the glucocorticoid receptor in childhood acute lymphoblastic leukemia. Haematologica 88, 1253–1258

Laverman P, Carstens MG, Boerman OC, Dams ET, Oyen WJ, van Rooijen N, Corstens FH, Storm G (2001): Factors affecting the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-liposomes upon repeated injection. J Pharmacol Exp Ther 298, 607–612

Law DA, Spruyt LL, Paterson DJ, Williams AF (1989): Subsets of thymopoietic rat thymocytes defined by expression of the CD2 antigen and the MRC OX-22 determinant of the leukocyte-common an. Eur J Immunol 19, 2289–2295

Lawson C, Wolf S (2009): ICAM-1 signaling in endothelial cells. Pharmacol Rep 61, 22–32

Lazo PA, Cuevas L, Gutierrez del Arroyo A, Orúe E (1997): Ligation of CD53/OX44, a tetraspan antigen, induces homotypic adhesion mediated by specific cell-cell interactions. Cell Immunol 178, 132–140

Lecourtois M, Schweisguth F (1995): The neurogenic suppressor of hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the enhancer of split complex genes triggered by Notch signaling. Genes Dev 9, 2598–2608

Lee JH, Yang SH, Oh JM, Lee MG (2010): Pharmacokinetics of drugs in rats with diabetes mellitus induced by alloxan or streptozocin: comparison with those in patients with type I diabetes mellitus. J Pharm Pharmacol 62, 1–23

Lee PP, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, Johnson D, Swetter S, Thompson J, Greenberg PD et al. (1999): Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. Nat Med 5, 677–685

Lee SH, Jeong EG, Yoo NJ, Lee SH (2007): Mutational analysis of NOTCH1, 2, 3 and 4 genes in common solid cancers and acute leukemias. APMIS 115, 1357–1363

Lehmann F, Marchand M, Hainaut P, Pouillart P, Sastre X, Ikeda H, Boon T, Coulie PG (1995): Differences in the antigens recognized by cytolytic T cells on two successive metastases of a melanoma patient are consistent with immune selection. Europ J Immunol 25, 340–347

Leone DR, Giza K, Gill A, Dolinski BM, Yang W, Perper S, Scott DM, Lee W, Cornebise M, Wortham K et al. (2003): An assessment of the mechanistic differences between two integrin alpha 4 beta 1 inhibitors, the monoclonal antibody TA-2 and the small molecule BIO5192, in rat experimental autoimmune encephalomyelitis. J Pharmacol Exp Ther 305, 1150–1162

Leposavic G, Arsenovic-Ranin N, Radojevic K, Kosec D, Pesic V, Vidic-Dankovic B, Plecas-Solarovic B, Pilipovic I (2006): Characterization of thymocyte phenotypic alterations induced by long-lasting beta-adrenoceptor blockade in vivo and its effects on thymocyte proliferation and apoptosis. Mol Cell Biochem 285, 87–99

Leussink VI, Jung S, Merschdorf U, Toyka KV, Gold R (2001): High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes. Arch Neurol 58, 91–97

Leventhal BG (1981): Glucocorticoid receptors in lymphoid tumors. Cancer Res 41, 4861–4862

Levine EG, Peterson BA, Smith KA, Hurd DD, Bloomfield CD (1985): Glucocorticoid receptors in chronic lymphocytic leukemia. Leuk Res 9, 993–999

Lewis HD, Leveridge M, Strack PR, Haldon CD, O'Neil J, Kim H, Madin A, Hannam JC, Look AT, Kohl N et al. (2007): Apoptosis in T cell acute lymphoblastic leukemia cells after cell cycle arrest induced by pharmacological inhibition of notch signaling. Chem Biol 14, 209–219

Li O, Liu J, Zhang H, Zheng P, Liu Y, Bai X (2006): CD62L is required for the priming of encephalitogenic T cells but does not play a major role in the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. Scand J Immunol 64, 117–124

Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, Maxson RE, Schulze EN, Song H, Hsieh C et al. (2008a): Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. Cell 135, 1299–1310

Li X, Boehmer H von (2011): Notch Signaling in T-Cell Development and T-ALL. ISRN Hematol 2011, 1–9

Li X, Gounari F, Protopopov A, Khazaie K, Boehmer H von (2008b): Oncogenesis of T-ALL and nonmalignant consequences of overexpressing intracellular NOTCH1. J Exp Med 205, 2851–2861

Liew C, Draper JS, Walsh J, Moore H, Andrews PW (2007): Transient and stable transgene expression in human embryonic stem cells. Stem cells 25, 1521–1528

Limbourg FP, Huang Z, Plumier J, Simoncini T, Fujioka M, Tuckermann J, Schütz G, Moskowitz MA, Liao JK (2002): Rapid nontranscriptional activation of endothelial nitric oxide synthase mediates increased cerebral blood flow and stroke protection by corticosteroids. J Clin Invest 110, 1729–1738

Lin CW, Nakane M, Stashko M, Falls D, Kuk J, Miller L, Huang R, Tyree C, Miner JN, Rosen J et al. (2002): trans-Activation and repression properties of the novel nonsteroid glucocorticoid receptor ligand 2,5-dihydro-9-hydroxy-10-methoxy-2,2,4-trimethyl-5-(1-methylcyclohexen-3-y1)-1H-[1]benzopyrano[3,4-f]quinoline (A276575) and its four stereoisomers. Mol Pharmacol 62, 297–303

Lin L, DeMartino GN, Greene WC (1998): Cotranslational Biogenesis of NF-κB p50 by the 26S Proteasome. Cell 92, 819–828

Lin YW, Nichols RA, Letterio JJ, Aplan PD (2006): Notch1 mutations are important for leukemic transformation in murine models of precursor-T leukemia/lymphoma. Blood 107, 2540–2543

Linette GP, Hess JL, Sentman CL, Korsmeyer SJ (1995): Peripheral T-cell lymphoma in lckpr-bcl-2 transgenic mice. Blood 86, 1255–1260

Link H, Xiao B (2001): Rat models as tool to develop new immunotherapies. Immunol Rev 184, 117–128

Linker RA, Weller C, Lühder F, Mohr A, Schmidt J, Knauth M, Metselaar JM, Gold R (2008): Liposomal glucocorticosteroids in treatment of chronic autoimmune demyelination: Long-term protective effects and enhanced efficacy of methylprednisolone formulations. Exp Neurol 211, 397–406

Lino MM, Merlo A, Boulay J (2010): Notch signaling in glioblastoma: a developmental drug target? BMC Med 8, 72

Lippman M (1982): Clinical implications of glucocorticoid receptors in human leukemia. Am J Physiol 243, E103-8

Lippman ME, Halterman RH, Leventhal BG, Perry S, Thompson EB (1973): Glucocorticoid-binding proteins in human acute lymphoblastic leukemic blast cells. J Clin Invest 52, 1715–1725

Littman DR (1987): The structure of the CD4 and CD8 genes. Annu Rev Immunol 5, 561–584

Liu J, Jones KL, Sumer H, Verma PJ (2009a): Stable transgene expression in human embryonic stem cells after simple chemical transfection. Mol Reprod Dev 76, 580–586

Liu S, Breit S, Danckwardt S, Muckenthaler MU, Kulozik AE (2009b): Downregulation of Notch signaling by γ-secretase inhibition can abrogate chemotherapy-induced apoptosis in T-ALL cell lines. Ann Hematol 88, 613–621

Livák F, Tourigny M, Schatz DG, Petrie HT (1999): Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development. J Immunol 162, 2575–2580

Lobb RR, Hemler ME (1994): The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo. J Clin Invest 94, 1722–1728

Lobry C, Oh P, Mansour MR, Look AT, Aifantis I (2014): Notch signaling: switching an oncogene to a tumor suppressor. Blood 123, 2451-9

Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D (2002): Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. Science 295, 868–872

Lopez-Berestein G, Fainstein V, Hopfer R, Mehta K, Sullivan MP, Keating M, Rosenblum MG, Mehta R, Luna M, Hersh EM (1985): Liposomal amphotericin B for the treatment of systemic fungal infections in patients with cancer: a preliminary study. J Infect Dis 151, 704–710

Löscher W, Ungemach FR, Kroker R: Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren, 7. Auflage, Stuttgart: Parey Buchverlag im MVS Medizinverlage, 2006

Lösel R, Wehling M (2003): Nongenomic actions of steroid hormones. Nat Rev Mol Cell Biol 4, 46–56

Love WG, Amos N, Kellaway IW, Williams BD (1990): Specific accumulation of cholesterol-rich liposomes in the inflammatory tissue of rats with adjuvant arthritis. Ann Rheum Dis 49, 611–614

Löwenberg M, Tuynman J, Bilderbeek J, Gaber T, Buttgereit F, van Deventer S, Peppelenbosch M, Hommes D (2005): Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn. Blood 106, 1703–1710

Löwenberg M, Verhaar AP, van den Brink GR, Hommes DW (2007): Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. Trends Mol Med 13, 158–163

Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B (2012): $CD4^+$T Cells: Differentiation and Functions. Clin Dev Immunol 2012, 1–12

Ludwig WD, Harbott J, Bartram CR, Komischke B, Sperling C, Teichmann JV, Seibt-Jung H, Notter M, Odenwald E, Nehmer A (1993): Incidence and prognostic significance of immunophenotypic subgroups in childhood acute lymphoblastic leukemia: experience of the BFM study 86. Recent Results Cancer Res 131, 269–282

Luhder F, Huang Y, Dennehy KM, Guntermann C, Muller I, Winkler E, Kerkau T, Ikemizu S, Davis SJ, Hanke T et al. (2003): Topological Requirements and Signaling Properties of T Cell-activating, Anti-CD28 Antibody Superagonists. J Exp Med 197, 955–966

Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Sigler PB (1991): Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. Nature 352, 497–505

Luo Y, Liu C, Cerbini T, San H, Lin Y, Chen G, Rao MS, Zou J (2014): Stable enhanced green fluorescent protein expression after differentiation and transplantation of reporter human induced pluripotent stem cells generated by AAVS1 transcription activator-like effector nucleases. Stem Cells Transl Med 3, 821–835

Luqman S, Pezzuto JM (2010): NFkappaB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. Phytother Res 24, 949–963

Ma MH, Yang HH, Parker K, Manyak S, Friedman JM, Altamirano C, Wu Z, Borad MJ, Frantzen M, Roussos E et al. (2003): The proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma tumor cells to chemotherapeutic agents. Clin Cancer Res 9, 1136–1144

Ma S, Shi Y, Pang Y, Dong F, Cheng H, Hao S, Xu J, Zhu X, Yuan W, Cheng T et al. (2014): Notch1-induced T cell leukemia can be potentiated by microenvironmental cues in the spleen. J Hematol Oncol 7, 71

Mackay CR, Terpe HJ, Stauder R, Marston WL, Stark H, Günthert U (1994): Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. J Cell Biol 124, 71–82

Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K (2000): Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. J Control Release 65, 271–284

Maillard I, Weng AP, Carpenter AC, Rodriguez CG, Sai H, Xu L, Allman D, Aster JC, Pear WS (2004): Mastermind critically regulates Notch-mediated lymphoid cell fate decisions. Blood 104, 1696–1702

Maillard I, Tu L, Sambandam A, Yashiro-Ohtani Y, Millholland J, Keeshan K, Shestova O, Xu L, Bhandoola A, Pear WS (2006): The requirement for Notch signaling at the beta-selection checkpoint in vivo is absolute and independent of the pre-T cell receptor. J Exp Med 203, 2239–2245

Maitani Y, Nakamura A, Tanaka T, Aso Y (2012): Hydration of surfactant-modified and PEGylated cationic cholesterol-based liposomes and corresponding lipoplexes by monitoring a fluorescent probe and the dielectric relaxation time. Int J Pharm 427, 372–378

Makrynikola V, Bianchi A, Bradstock K, Gottlieb D, Hewson J (1994): Migration of acute lymphoblastic leukemia cells into human bone marrow stroma. Leukemia 8, 1734–1743

Malecki MJ, Sanchez-Irizarry C, Mitchell JL, Histen G, Xu ML, Aster JC, Blacklow SC (2006): Leukemia-Associated Mutations within the NOTCH1 Heterodimerization Domain Fall into at Least Two Distinct Mechanistic Classes. Mol Cell Biol 26, 4642–4651

Mallick CA, Dudley EC, Viney JL, Owen MJ, Hayday AC (1993): Rearrangement and diversity of T cell receptor β chain genes in thymocytes: A critical role for the β chain in development. Cell 73, 513–519

Malyukova A, Dohda T, Lehr N von der, Akhondi S, Corcoran M, Heyman M, Spruck C, Grander D, Lendahl U, Sangfelt O (2007): The Tumor Suppressor Gene hCDC4 Is Frequently Mutated in Human T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia with Functional Consequences for Notch Signaling. Cancer Res 67, 5611–5616

Manabe A, Coustan-Smith E, Behm FG, Raimondi SC, Campana D (1992): Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. Blood 79, 2370–2377

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P et al. (1995): The nuclear receptor superfamily: The second decade. Cell 83, 835–839

Mansour MR, Duke V, Foroni L, Patel B, Allen CG, Ancliff PJ, Gale RE, Linch DC (2007): Notch-1 Mutations Are Secondary Events in Some Patients with T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Clin Cancer Res 13, 6964–6969

Mansour MR, Linch DC, Foroni L, Goldstone AH, Gale RE (2006): High incidence of Notch-1 mutations in adult patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 20, 537–539

Mao Y, Triantafillou G, Hertlein E, Towns W, Stefanovski M, Mo X, Jarjoura D, Phelps M, Marcucci G, Lee LJ et al. (2013): Milatuzumab-conjugated liposomes as targeted dexamethasone carriers for therapeutic delivery in $CD74^+$ B-cell malignancies. Clin Cancer Res 19, 347–356

Markovina S, Callander NS, O'Connor SL, Kim J, Werndli JE, Raschko M, Leith CP, Kahl BS, Kim K, Miyamoto S (2008): Bortezomib-resistant nuclear factor-kappaB activity in multiple myeloma cells. Mol Cancer Res 6, 1356–1364

Marks DI, Paietta EM, Moorman AV, Richards SM, Buck G, DeWald G, Ferrando A, Fielding AK, Goldstone AH, Ketterling RP et al. (2009): T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults: clinical features, immunophenotype, cytogenetics, and outcome from the large randomized prospective trial (UKALL XII/ECOG 2993). Blood 114, 5136–5145

Martinez-Delgado B, Cuadros M, Honrado E, Ruiz de la Parte, A, Roncador G, Alves J, Castrillo JM, Rivas C, Benitez J (2005): Differential expression of NF-kappaB pathway genes among peripheral T-cell lymphomas. Leukemia 19, 2254–2263

Masdehors P, Omura S, Merle-Beral H, Mentz F, Cosset J, Dumont J, Magdelenat H, Delic J (1999): Increased sensitivity of CLL-derived lymphocytes to apoptotic death activation by the proteasome-specific inhibitor lactacystin. Br J Haematol 105, 752–757

Maser RS, Choudhury B, Campbell PJ, Feng B, Wong K, Protopopov A, O'Neil J, Gutierrez A, Ivanova E, Perna I et al. (2007): Chromosomally unstable mouse tumours have genomic alterations similar to diverse human cancers. Nature 447, 966–971

Mateos M, San Miguel JF (2012): Safety and efficacy of subcutaneous formulation of bortezomib versus the conventional intravenous formulation in multiple myeloma. Ther Adv Hematol 3, 117–124

Mateos MV, Richardson PG, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, Spicka I, Petrucci MT, Palumbo A et al. (2010): Bortezomib Plus Melphalan and Prednisone Compared With Melphalan and Prednisone in Previously Untreated Multiple Myeloma: Updated Follow-Up and Impact of Subsequent Therapy in the Phase III VISTA Trial. J Clin Oncol 28, 2259–2266

Matsumura Y, Maeda H (1986): A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. Cancer Res 46, 6387–6392

Mattano LA, Devidas M, Nachman JB, Sather HN, Hunger SP, Steinherz PG, Gaynon PS, Seibel NL (2012): Effect of alternate-week versus continuous dexamethasone scheduling on the risk of osteonecrosis in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia: results from the CCG-1961 randomised cohort trial. Lancet Oncol 13, 906–915

Maung ZT, MacLean FR, Reid MM, Pearson AD, Proctor SJ, Hamilton PJ, Hall AG (1994): The relationship between bcl-2 expression and response to chemotherapy in acute leukaemia. Br J Haematol 88, 105–109

May E, Dorris ML, Satumtira N, Iqbal I, Rehman MI, Lightfoot E, Taurog JD (2003): CD8 alpha beta T cells are not essential to the pathogenesis of arthritis or colitis in HLA-B27 transgenic rats. J Immunol 170, 1099–1105

Mayer LD, Bally MB, Loughrey H, Masin D, Cullis PR (1990): Liposomal vincristine preparations which exhibit decreased drug toxicity and increased activity against murine L1210 and P388 tumors. Cancer Res 50, 575–579

Mayer LD, Nayar R, Thies RL, Boman NL, Cullis PR, Bally MB (1993): Identification of vesicle properties that enhance the antitumour activity of liposomal vincristine against murine L1210 leukemia. Cancer Chemother Pharmacol 33, 17–24

Mayhew E, Papahadjopoulos D, Rustum YM, Dave C (1976): Inhibition of tumor cell growth in vitro and in vivo by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine entrapped within phospholipid vesicles. Cancer Res 36, 4406–4411

Mazur PK, Einwächter H, Lee M, Sipos B, Nakhai H, Rad R, Zimber-Strobl U, Strobl LJ, Radtke F, Klöppel G et al. (2010): Notch2 is required for progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 13438–13443

McDonough AK, Curtis JR, Saag KG (2008): The epidemiology of glucocorticoid-associated adverse events. Curr Opin Rheumatol 20, 131–137

McNeer JL, Nachman JB (2010): The optimal use of steroids in paediatric acute lymphoblastic leukaemia: no easy answers. Br J Haematol 149, 638–652

Medh RD, Saeed MF, Johnson BH, Thompson EB (1998): Resistance of human leukemic CEM-C1 cells is overcome by synergism between glucocorticoid and protein kinase A pathways: correlation with c-Myc suppression. Cancer Res 58, 3684–3693

Medh RD, Wang A, Zhou F, Thompson EB (2001): Constitutive expression of ectopic c-Myc delays glucocorticoid-evoked apoptosis of human leukemic CEM-C7 cells. Oncogene 20, 4629–4639

Medyouf H, Gusscott S, Wang H, Tseng J, Wai C, Nemirovsky O, Trumpp A, Pflumio F, Carboni J, Gottardis M et al. (2011): High-level IGF1R expression is required for leukemia-initiating cell activity in T-ALL and is supported by Notch signaling. J Exp Med 208, 1809–1822

Meijerink JP (2010): Genetic rearrangements in relation to immunophenotype and outcome in T-cell acute lymphoblastic leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol 23, 307–318

Meikle AW, Tyler FH (1977): Potency and duration of action of glucocorticoids. Effects of hydrocortisone, prednisone and dexamethasone on human pituitary-adrenal function. Am J Med 63, 200–207

Messinger Y, Gaynon P, Raetz E, Hutchinson R, DuBois S, Glade-Bender J, Sposto R, van der Giessen J, Eckroth E, Bostrom BC (2010): Phase I study of bortezomib combined with chemotherapy in children with relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL): A report from the therapeutic advances in childhood leukemia (TACL) consortium. Pediatr Blood Cancer 55, 254–259

Messinger YH, Gaynon PS, Sposto R, van der Giessen J, Eckroth E, Malvar J, Bostrom BC (2012): Bortezomib with chemotherapy is highly active in advanced B-precursor acute lymphoblastic leukemia: Therapeutic Advances in Childhood Leukemia & Lymphoma (TACL) Study. Blood 120, 285–290

Metselaar JM, Wauben MHM, Wagenaar-Hilbers JPA, Boerman OC, Storm G (2003): Complete remission of experimental arthritis by joint targeting of glucocorticoids with long-circulating liposomes. Arthritis Rheum 48, 2059–2066

Metselaar JM, van den Berg WB, Holthuysen AEM, Wauben MHM, Storm G, van Lent PLEM (2004): Liposomal targeting of glucocorticoids to synovial lining cells strongly increases therapeutic benefit in collagen type II arthritis. Ann Rheum Dis 63, 348–353

Michie AM, Zúñiga-Pflücker JC (2002): Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and β-selection. Sem Immunol 14, 311–323

Miele L, Miao H, Nickoloff BJ (2006): NOTCH signaling as a novel cancer therapeutic target. Curr Cancer Drug Targets 6, 313–323

Milano A, Perri F, Caponigro F (2009): The ubiquitin-proteasome system as a molecular target in solid tumors: an update on bortezomib. Onco Targets Ther 2, 171–178

Milano J, McKay J, Dagenais C, Foster-Brown L, Pognan F, Gadient R, Jacobs RT, Zacco A, Greenberg B, Ciaccio PJ (2004): Modulation of notch processing by gamma-secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. Toxicol Sci 82, 341–358

Miller AL, Johnson BH, Medh RD, Townsend CM, Thompson EB (2002): Glucocorticoids and polyamine inhibitors synergize to kill human leukemic CEM cells. Neoplasia 4, 68–81

Miller AL, Garza AS, Johnson BH, Thompson EB (2007): Pathway interactions between MAPKs, mTOR, PKA, and the glucocorticoid receptor in lymphoid cells. Cancer Cell Int 7, 3

Miller AL, Geng C, Golovko G, Sharma M, Schwartz JR, Yan J, Sowers L, Widger WR, Fofanov Y, Vedeckis WV et al. (2014): Epigenetic alteration by DNA-demethylating treatment restores apoptotic response to glucocorticoids in dexamethasone-resistant human malignant lymphoid cells. Cancer Cell Int 14, 35

Miller SE, Neilson JM (1964): Clinical features of the diabetic syndrome appearing after steroid therapy. Postgrad Med J 40, 660–669

Min D, Moskowitz NP, Brownstein C, Lee H, Horton TM, Carroll WL (2006): Diverse pathways mediate chemotherapy-induced cell death in acute lymphoblastic leukemia cell lines. Apoptosis 11, 1977–1986

Minowada J, Koshiba H, Sagawa K, Kubonishi I, Lok MS, Tatsumi E, Han T, Srivastava BI, Ohnuma T (1981): Marker profiles of human leukemia and lymphoma cell lines. J Cancer Res Clin Oncol 101, 91–100

Mitchell CD, Richards SM, Kinsey SE, Lilleyman J, Vora A, Eden TO (2005): Benefit of dexamethasone compared with prednisolone for childhood acute lymphoblastic leukaemia: results of the UK Medical Research Council ALL97 randomized trial. Br J Haematol 129, 734–745

Mitnacht R, Tacke M, Hünig T (1995): Expression of cell interaction molecules by immature rat thymocytes during passage through the $CD4^+8^+$ compartment: developmental regulation and induction by T cell receptor engagement of CD2, CD5, CD28, CD11a, CD44 and CD53. Eur J Immunol 25, 328–332

Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Treon SP et al. (2002): Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 14374–14379

Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, Poulaki V, Tai Y, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, Bailey C, Joseph M et al. (2003): The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. Blood 101, 2377–2380

Mo J, Kim M, Han S, Kim I, Ann E, Lee KS, Seo M, Kim J, Lee S, Park J et al. (2007): Integrin-linked kinase controls Notch1 signaling by down-regulation of protein stability through Fbw7 ubiquitin ligase. Mol Cell Biol 27, 5565–5574

Moalli PA, Pillay S, Weiner D, Leikin R, Rosen ST (1992): A mechanism of resistance to glucocorticoids in multiple myeloma: transient expression of a truncated glucocorticoid receptor mRNA. Blood 79, 213–222

Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC (2001): Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. Pharmacol Rev 53, 283–318

Monks NR, Biswas DK, Pardee AB (2004): Blocking anti-apoptosis as a strategy for cancer chemotherapy: NF-kappaB as a target. J Cell Biochem 92, 646–650

Montagut C, Rovira A, Albanell J (2006): The proteasome: a novel target for anticancer therapy. Clin Transl Oncol 8, 313–317

Moran AE, Hogquist KA (2012): T-cell receptor affinity in thymic development. Immunology 135, 261–267

Moreau P, Karamanesht II, Domnikova N, Kyselyova MY, Vilchevska KV, Doronin VA, Schmidt A, Hulin C, Leleu X, Esseltine D et al. (2012a): Pharmacokinetic, pharmacodynamic and covariate analysis of subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma. Clin Pharmacokinet 51, 823–829

Moreau P, Richardson PG, Cavo M, Orlowski RZ, San Miguel JF, Palumbo A, Harousseau J (2012b): Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. Blood 120, 947–959

Moreira JN, Hansen CB, Gaspar R, Allen TM (2001): A growth factor antagonist as a targeting agent for sterically stabilized liposomes in human small cell lung cancer. Biochim Biophys Acta 1514, 303–317

Morgan TH (1917): The theory of the gene. Am Nat, 513–544

Mori H, Colman SM, Xiao Z, Ford AM, Healy LE, Donaldson C, Hows JM, Navarrete C, Greaves M (2002): Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 8242–8247

Möricke A, Reiter A, Zimmermann M, Gadner H, Stanulla M, Dördelmann M, Löning L, Beier R, Ludwig W, Ratei R et al. (2008): Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. Blood 111, 4477–4489

Möricke A, Zimmermann M, Reiter A, Henze G, Schrauder A, Gadner H, Ludwig WD, Ritter J, Harbott J, Mann G 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, 265–284

Möröy T, Karsunky H (2000): Regulation of pre-T-cell development. Cell Mol Life Sci 57, 957–975

Moussion C, Girard J (2011): Dendritic cells control lymphocyte entry to lymph nodes through high endothelial venules. Nature 479, 542–546

Muller N, Fischer HJ, Tischner D, van den Brandt J, Reichardt HM (2013): Glucocorticoids Induce Effector T Cell Depolarization via ERM Proteins, Thereby Impeding Migration and APC Conjugation. J Immunol 190, 4360-70

Mullighan CG, Downing JR (2009): Genome-wide profiling of genetic alterations in acute lymphoblastic leukemia: recent insights and future directions. Leukemia 23, 1209–1218

Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Shurtleff SA, Downing JR (2008): Genomic Analysis of the Clonal Origins of Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia. Science 322, 1377–1380

Mullins LJ, Mullins JJ (1996): Transgenesis in the rat and larger mammals. J Clin Invest 97, 1557–1560

Mumm JS, Kopan R (2000): Notch signaling: from the outside in. Dev Biol 228, 151–165

Munck A (2005): Glucocorticoid receptors and physiology: a personal history. Steroids 70, 335–344

Mundy GR, Raisz LG, Cooper RA, Schechter GP, Salmon SE (1974): Evidence for the secretion of an osteoclast stimulating factor in myeloma. N Engl J Med 291, 1041–1046

Murre C (2000): Intertwining proteins in Intertwining proteins inthymocyte development and cancer. Nat Immunol 1, 97–98

Nachman JB, Sather HN, Sensel MG, Trigg ME, Cherlow JM, Lukens JN, Wolff L, Uckun FM, Gaynon PS (1998): Augmented post-induction therapy for children with high-risk acute lymphoblastic leukemia and a slow response to initial therapy. N Engl J Med 338, 1663–1671

Nagayasu A, Uchiyama K, Kiwada H (1999): The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. Adv Drug Deliv Rev 40, 75–87

Nam Y, Weng AP, Aster JC, Blacklow SC (2003): Structural requirements for assembly of the CSL.intracellular Notch1.Mastermind-like 1 transcriptional activation complex. J Biol Chem 278, 21232–21239

Nandi A, Estess P, Siegelman M (2004): Bimolecular Complex between Rolling and Firm Adhesion Receptors Required for Cell Arrest. Immunity 20, 455–465

Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D (1997): CD44: structure, function, and association with the malignant process. Adv Cancer Res 71, 241–319

Naujokat C, Hoffmann S (2002): Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. Lab Invest 82, 965–980

Nawrocki ST, Bruns CJ, Harbison MT, Bold RJ, Gotsch BS, Abbruzzese JL, Elliott P, Adams J, McConkey DJ (2002): Effects of the proteasome inhibitor PS-341 on apoptosis and angiogenesis in orthotopic human pancreatic tumor xenografts. Mol Cancer Ther 1, 1243–1253

Neumann M, Heesch S, Gokbuget N, Schwartz S, Schlee C, Benlasfer O, Farhadi-Sartangi N, Thibaut J, Burmeister T, Hoelzer D et al. (2012): Clinical and molecular characterization of early T-cell precursor leukemia: a high-risk subgroup in adult T-ALL with a high frequency of FLT3 mutations. Blood Cancer J 2, e55

Newman MS, Colbern GT, Working PK, Engbers C, Amantea MA (1999): Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice. Cancer Chemother Pharmacol 43, 1–7

Newman PJ (1997): The biology of PECAM-1. J Clin Invest 99, 3–8

Newman PJ, Newman DK (2003): Signal Transduction Pathways Mediated by PECAM-1: New Roles for an Old Molecule in Platelet and Vascular Cell Biology. Arterioscler Thromb Vasc Biol 23, 953–964

Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, Hui C, Clevers H, Dotto GP, Radtke F (2003): Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. Nat Genet 33, 416–421

Niewerth D, Franke NE, Jansen G, Assaraf YG, van Meerloo J, Kirk CJ, Degenhardt J, Anderl J, Schimmer AD, Zweegman S et al. (2013): Higher ratio immune versus constitutive proteasome level as novel indicator of sensitivity of pediatric acute leukemia cells to proteasome inhibitors. Haematologica 98, 1896–1904

Nikrad M, Johnson T, Puthalalath H, Coultas L, Adams J, Kraft AS (2005): The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes cells to killing by death receptor ligand TRAIL via BH3-only proteins Bik and Bim. Mol Cancer Ther 4, 443–449

Nitta T, Ohigashi I, Takahama Y (2013): The development of T lymphocytes in fetal thymus organ culture. Methods Mol Biol 946, 85–102

Nolte-'t Hoen EN, Boot EP, Wagenaar-Hilbers JP, van Bilsen JH, Arkesteijn GJ, Storm G, Everse LA, van Eden W, Wauben MH (2007): Identification and monitoring of effector and regulatory T cells during experimental arthritis based on differential expression of CD25 and CD134. J Leuk Biol 83, 112–121

Norment AM, Salter RD, Parham P, Engelhard VH, Littman DR (1988): Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. Nature 336, 79–81

Noyan F, Lieke T, Taubert R, Sievers M, Dywicki J, Hapke M, Falk CS, Manns MP, Jaeckel E, Hardtke-Wolenski M (2014): Naive tumour-specific $CD4^+$ T cells were efficiently primed in acute lymphoblastic leukaemia. Scand J Immunol 80, 161–168

Nussbaum AK, Dick TP, Keilholz W, Schirle M, Stevanovic S, Dietz K, Heinemeyer W, Groll M, Wolf DH, Huber R et al. (1998): Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 12504–12509

Nwabo Kamdje AH, Krampera M (2011): Notch signaling in acute lymphoblastic leukemia: any role for stromal microenvironment? Blood 118, 6506–6514

Oberg C, Li J, Pauley A, Wolf E, Gurney M, Lendahl U (2001): The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. J Biol Chem 276, 35847–35853

O'Brien ME (2008): Single-agent treatment with pegylated liposomal doxorubicin for metastatic breast cancer. Anticancer Drugs 19, 1–7

O'Brien S, Schiller G, Lister J, Damon L, Goldberg S, Aulitzky W, Ben-Yehuda D, Stock W, Coutre S, Douer D et al. (2013): High-Dose Vincristine Sulfate Liposome Injection for Advanced, Relapsed, and Refractory Adult Philadelphia Chromosome-Negative Acute Lymphoblastic Leukemia. J Clin Oncol 31, 676–683

Ochs J, Mulhern R (1994): Long-term sequelae of therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia. Baillieres Clin Haematol 7, 365–376

Ochsenbein AF, Klenerman P, Karrer U, Ludewig B, Pericin M, Hengartner H, Zinkernagel RM (1999): Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 2233–2238

O'Connor OA (2004): The emerging role of bortezomib in the treatment of indolent non-Hodgkin's and mantle cell lymphomas. Curr Treat Options Oncol 5, 269–281

O'Connor OA, Wright J, Moskowitz C, Muzzy J, MacGregor-Cortelli B, Stubblefield M, Straus D, Portlock C, Hamlin P, Choi E (2005): Phase II Clinical Experience With the Novel Proteasome Inhibitor Bortezomib in Patients With Indolent Non-Hodgkin's Lymphoma and Mantle Cell Lymphoma. J Clin Oncol 23, 676–684

O'Connor OA, Portlock C, Moskowitz C, Hamlin P, Straus D, Gerecitano J, Gonen M, Dumitrescu O, Sarasohn D, Butos J et al. (2010): Time to Treatment Response in Patients with Follicular Lymphoma Treated with Bortezomib Is Longer Compared with Other Histologic Subtypes. Clin Cancer Res 16, 719–726

O'Connor R, Cesano A, Lange B, Finan J, Nowell PC, Clark SC, Raimondi SC, Rovera G, Santoli D (1991): Growth factor requirements of childhood acute T-lymphoblastic leukemia: correlation between presence of chromosomal abnormalities and ability to grow permanently in vitro. Blood 77, 1534–1545

Oku N, Namba Y (1994): Long-circulating liposomes. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 11, 231–270

Olson BM, McNeel DG (2012): Antigen loss and tumor-mediated immunosuppression facilitate tumor recurrence. Expert Rev Vaccines 11, 1315–1317

O'Neil J, Calvo J, McKenna K, Krishnamoorthy V, Aster JC, Bassing CH, Alt FW, Kelliher M, Look AT (2006): Activating Notch1 mutations in mouse models of T-ALL. Blood 107, 781–785

O'Neil J, Grim J, Strack P, Rao S, Tibbitts D, Winter C, Hardwick J, Welcker M, Meijerink JP, Pieters R et al. (2007): FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. J Exp Med 204, 1813–1824

O'Neil J, Ventura J, Cusson N, Kelliher M (2003): NF-kappaB activation in premalignant mouse tal-1/scl thymocytes and tumors. Blood 102, 2593–2596

Onoyama I, Tsunematsu R, Matsumoto A, Kimura T, de Alborán, Ignacio Moreno, Nakayama K, Nakayama KI (2007): Conditional inactivation of Fbxw7 impairs cell-cycle exit during T cell differentiation and results in lymphomatogenesis. J Exp Med 204, 2875–2888

Orian A, Gonen H, Bercovich B, Fajerman I, Eytan E, Israël A, Mercurio F, Iwai K, Schwartz AL, Ciechanover A (2000): SCF(beta)(-TrCP) ubiquitin ligase-mediated processing of NF-kappaB p105 requires phosphorylation of its C-terminus by IkappaB kinase. EMBO J 19, 2580–2591

Orlowski RZ, Dees EC (2003): The role of the ubiquitination-proteasome pathway in breast cancer: Applying drugs that affect the ubiquitin-proteasome pathway to the therapy of breast cancer. Breast Cancer Res 5, 1–7

Orlowski RZ, Kuhn DJ (2008): Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. Clin Cancer Res 14, 1649–1657

Orlowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS, Shea TC, Baldwin AS, Stahl S, Adams J, Esseltine D, Elliott PJ, Pien CS et al. (2002): Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. J Clin Oncol 20, 4420–4427

Osipo C, Golde TE, Osborne BA, Miele LA (2008): Off the beaten pathway: the complex cross talk between Notch and NF-kappaB. Lab Invest 88, 11–17

Oswald F, Liptay S, Adler G, Schmid RM (1998): NF-kappaB2 is a putative target gene of activated Notch-1 via RBP-Jkappa. Mol Cell Biol 18, 2077–2088

Oswald F, Kostezka U, Astrahantseff K, Bourteele S, Dillinger K, Zechner U, Ludwig L, Wilda M, Hameister H, Knöchel W et al. (2002): SHARP is a novel component of the Notch/RBP-Jkappa signalling pathway. EMBO J 21, 5417–5426

Oudot C, Auclerc M, Levy V, Porcher R, Piguet C, Perel Y, Gandemer V, Debre M, Vermylen C, Pautard B et al. (2008): Prognostic factors for leukemic induction failure in children with acute lymphoblastic leukemia and outcome after salvage therapy: the FRALLE 93 study. J Clin Oncol 26, 1496–1503

Oussoren C, Storm G (1999): Role of macrophages in the localisation of liposomes in lymph nodes after subcutaneous administration. Int J Pharm 183, 37–41

Oussoren C, Storm G (2001): Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration. Adv Drug Deliv Rev 50, 143–156

Oussoren C, Zuidema J, Crommelin DJ, Storm G (1997): Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. II. Influence of liposomal size, lipid compostion and lipid dose. Biochim Biophys Acta 1328, 261–272

Ovchinnikov DA, Turner JP, Titmarsh DM, Thakar NY, Sin DC, Cooper-White JJ, Wolvetang EJ (2012): Generation of a human embryonic stem cell line stably expressing high levels of the fluorescent protein mCherry. World J Stem Cells 4, 71–79

Ozbakir B, Crielaard BJ, Metselaar JM, Storm G, Lammers T (2014): Liposomal corticosteroids for the treatment of inflammatory disorders and cancer. J Control Release 190, 624-36.

Pagano G, Cavallo-Perin P, Cassader M, Bruno A, Ozzello A, Masciola P, Dall'omo AM, Imbimbo B (1983): An in vivo and in vitro study of the mechanism of prednisone-induced insulin resistance in healthy subjects. J Clin Invest 72, 1814–1820

Pagano M, Tam S, Theodoras A, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew P, Draetta G, Rolfe M (1995): Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. Science 269, 682–685

Palmer M, Wettstein PJ, Frelinger JA (1983): Evidence for extensive polymorphism of class I genes in the rat major histocompatibility complex (RT1). Proc Natl Acad Sci U S A 80, 7616–7620

Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T (1994): The ubiquitinproteasome pathway is required for processing the NF-κB1 precursor protein and the activation of NF-κB. Cell 78, 773–785

Palomero T, Barnes KC, Real PJ, Glade Bender, J L, Sulis ML, Murty VV, Colovai AI, Balbin M, Ferrando AA (2006a): CUTLL1, a novel human T-cell lymphoma cell line with t(7;9) rearrangement, aberrant NOTCH1 activation and high sensitivity to gamma-secretase inhibitors. Leukemia 20, 1279–1287

Palomero T, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A, Barnes KC, O'Neil J, Neuberg D, Weng AP et al. (2006b): NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 18261–18266

Palomero T, McKenna K, O-Neil J, Galinsky I, Stone R, Suzukawa K, Stiakaki E, Kalmanti M, Fox EA, Caligiuri MA et al. (2006c): Activating mutations in NOTCH1 in acute myeloid leukemia and lineage switch leukemias. Leukemia 20, 1963–1966

Pancewicz J, Nicot C (2011): Current views on the role of Notch signaling and the pathogenesis of human leukemia. BMC Cancer 11, 502

Papahadjopoulos D, Allen TM, Gabizon A, Mayhew E, Matthay K, Huang SK, Lee KD, Woodle MC, Lasic DD, Redemann C (1991): Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. Proc Natl Acad Sci U S A 88, 11460–11464

Papandreou CN, Daliani DD, Nix D, Yang H, Madden T, Wang X, Pien CS, Millikan RE, Tu S, Pagliaro L et al. (2004): Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with advanced solid tumors with observations in androgen-independent prostate cancer. J Clin Oncol 22, 2108–2121

Papayannidis C, DeAngelo DJ, Stock W, Huang B, Shaik MN, Cesari R, Zheng X, Reynolds JM, English PA, Ozeck M et al. (2015): A Phase 1 study of the novel gamma-secretase inhibitor PF-03084014 in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia and T-cell lymphoblastic lymphoma. Blood Cancer J 5, e350

Pardoll DM, Fowlkes BJ, Bluestone JA, Kruisbeek A, Maloy WL, Coligan JE, Schwartz RH (1987): Differential expression of two distinct T-cell receptors during thymocyte development. Nature 326, 79–81

Park J, Adoro S, Guinter T, Erman B, Alag AS, Catalfamo M, Kimura MY, Cui Y, Lucas PJ, Gress RE et al. (2010): Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells. Nat Immunol 11, 257–264

Passoni L, Hoffman ES, Kim S, Crompton T, Pao W, Dong M, Owen MJ, Hayday AC (1997): Intrathymic δ Selection Events in γδ Cell Development. Immunity 7, 83–95

Patel HM (1992): Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 9, 39–90

Paterson DJ, Green JR, Jefferies WA, Puklavec M, Williams AF (1987a): The MRC OX-44 antigen marks a functionally relevant subset among rat thymocytes. J Exp Med 165, 1–13

Paterson DJ, Jefferies WA, Green JR, Brandon MR, Corthesy P, Puklavec M, Williams AF (1987b): Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts. Mol Immunol 24, 1281–1290

Pathak P, Hess R, Weiss MA (2014): Liposomal vincristine for relapsed or refractory Ph-negative acute lymphoblastic leukemia: a review of literature. Ther Adv Hematol 5, 18–24

Pear WS, Aster JC, Scott ML, Hasserjian RP, Soffer B, Sklar J, Baltimore D (1996): Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. J Exp Med 183, 2283–2291

Pearson OH, Eliel LP (1950): Use of pituitary adrenocorticotropic hormone (ACTH) and cortisone in lymphomas and leukemias. J Am Med Assoc 144, 1349–1353

Pedersen KB, Vedeckis WV (2003): Quantification and glucocorticoid regulation of glucocorticoid receptor transcripts in two human leukemic cell lines. Biochemistry 42, 10978–10990

Pedersen KB, Geng C, Vedeckis WV (2004): Three mechanisms are involved in glucocorticoid receptor autoregulation in a human T-lymphoblast cell line. Biochemistry 43, 10851–10858

Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R (2007): Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. Nat Nanotechnol 2, 751–760

Peltenburg LT, Dee R, Schrier PI (1993): Downregulation of HLA class I expression by c-myc in human melanoma is independent of enhancer A. Nucleic Acids Res 21, 1179–1185

Peng X, Gao H, Wang Y, Yang B, Liu T, Sun Y, Jin H, Jiang L, Li L, Wu M et al. (2013): Conversion of rat embryonic stem cells into neural precursors in chemical-defined medium. Biochem Biophys Res Commun 431, 783–787

Perche F, Torchilin VP (2013): Recent trends in multifunctional liposomal nanocarriers for enhanced tumor targeting. J Drug Deliv 2013, 705265

Pérez-Galán P, Roué G, Villamor N, Montserrat E, Campo E, Colomer D (2006): The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. Blood 107, 257–264

Perretti M, Paul-Clark MJ, Mancini L, Flower RJ (2003): Generation of innovative anti-inflammatory and anti-arthritic glucocorticoid derivatives that release NO: the nitro-steroids. Dig Liver Dis 35 Suppl 2, S41-8

Pession A, Valsecchi MG, Masera G, Kamps WA, Magyarosy E, Rizzari C, Van Wering, Elisabeth R, Lo Nigro L, van der Does, Anna, Locatelli F et al. (2005): Long-term results of a randomized trial on extended use of high dose L-asparaginase for standard risk childhood acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 23, 7161–7167

Peters JM, Ansari MQ (2011): Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. Arch Pathol Lab Med 135, 44–54

Peters JM, Franke WW, Kleinschmidt JA (1994): Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. J Biol Chem 269, 7709–7718

Petrie HT, Zúñiga-Pflücker JC (2007): Zoned Out: Functional Mapping of Stromal Signaling Microenvironments in the Thymus. Annu Rev Immunol 25, 649–679

Pieters R, den Boer ML, Durian M, Janka G, Schmiegelow K, Kaspers GJ, van Wering ER, Veerman AJ (1998): Relation between age, immunophenotype and in vitro drug resistance in 395 children with acute lymphoblastic leukemia-- implications for treatment of infants. Leukemia 12, 1344–1348

Pieters RH, Punt P, Bol M, van Dijken JM, Seinen W, Penninks AH (1995): The thymus atrophy inducing organotin compound DBTC stimulates TcR alpha beta-CD3 signalling in immature rat thymocytes. Biochem Biophys Res Commun 214, 552–558

Pircher H, Rebai N, Groettrup M, Grégoire C, Speiser DE, Happ MP, Palmer E, Zinkernagel RM, Hengartner H, Malissen B (1992): Preferential positive selection of $V\alpha2^+CD8^+$ T cells in mouse strains expressing both H-2k and T cell receptor Vαa haplotypes: determination with a Vα2-specific monoclonal antibody. Eur J Immunol 22, 399–404

Ploner C, Schmidt S, Presul E, Renner K, Schröcksnadel K, Rainer J, Riml S, Kofler R (2005): Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia. J Steroid Biochem Mol Biol 93, 153–160

Ploner C, Rainer J, Lobenwein S, Geley S, Kofler R (2009): Repression of the BH3-only molecule PMAIP1/Noxa impairs glucocorticoid sensitivity of acute lymphoblastic leukemia cells. Apoptosis 14, 821–828

Poirier GM, Anderson G, Huvar A, Wagaman PC, Shuttleworth J, Jenkinson E, Jackson MR, Peterson PA, Erlander MG (1999): Immune-associated nucleotide-1 (IAN-1) is a thymic selection marker and defines a novel gene family conserved in plants. J Immunol 163, 4960–4969

Pollard JW (2004): Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. Nat Rev Cancer 4, 71–78

Ponec M, Kempenaar J, Shroot B, Caron JC (1986): Glucocorticoids: binding affinity and lipophilicity. J Pharm Sci 75, 973–975

Porgador A, Mandelboim O, Restifo NP, Strominger JL (1997): Natural killer cell lines kill autologous beta2-microglobulin-deficient melanoma cells: implications for cancer immunotherapy. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 13140–13145

Porritt HE, Rumfelt LL, Tabrizifard S, Schmitt TM, Zúñiga-Pflücker JC, Petrie HT (2004): Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. Immunity 20, 735–745

Portnow J, Frankel P, Koehler S, Twardowski P, Shibata S, Martel C, Morgan R, Cristea M, Chow W, Lim D et al. (2012): A phase I study of bortezomib and temozolomide in patients with advanced solid tumors. Cancer Chemother Pharmacol 69, 505–514

Pozzilli C, Marinelli F, Romano S, Bagnato F (2004): Corticosteroids treatment. J Neurol Sci 223, 47–51

Pratt WB, Gehring U, Toft DO (1996): Molecular chaperoning of steroid hormone receptors. EXS 77, 79–95

Prockop SE, Petrie HT (2004): Regulation of thymus size by competition for stromal niches among early T cell progenitors. J Immunol 173, 1604–1611

Pucci M, Lotti T, Tuci F, Brunetti L, Rindi L, Fibbi G, Pasquali F, Chiarugi VP (1988): Modulation of growth of melanoma. Int J Dermatol 27, 167–169

Pui CH (2009): T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: NOTCHing the Way toward a Better Treatment Outcome. Cancer Cell 15, 85–87

Pui CH, Evans WE (2006): Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. N Engl J Med 354, 166–178

Pui CH, Jeha S (2007): New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. Nat Rev Drug Discov 6, 149–165

Pui CH, Howard SC (2008): Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. Lancet Oncol 9, 257–268

Pui CH, Crist WM, Look AT (1990): Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 76, 1449–1463

Pui CH, Sallan S, Relling MV, Masera G, Evans WE (2001): International Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Workshop: Sausalito, CA, 30 November-1 December 2000. Leukemia 15, 707–715

Pui CH, Relling MV, Downing JR (2004a): Acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 350, 1535–1548

Pui CH, Sandlund JT, Pei D, Campana D, Rivera GK, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Razzouk BI, Howard SC, Hudson MM et al. (2004b): Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIIIB at St Jude Children's Research Hospital. Blood 104, 2690–2696

Pui CH, Robison LL, Look AT (2008): Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet 371, 1030–1043

Pui CH, Campana D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Raimondi SC, Onciu M et al. (2009): Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. N Engl J Med 360, 2730–2741

Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling MV (2012): Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? Blood 120, 1165–1174

Pui JC, Allman D, Xu L, DeRocco S, Karnell FG, Bakkour S, Lee JY, Kadesch T, Hardy RR, Aster JC et al. (1999): Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. Immunity 11, 299–308

Pulini S, Rupoli S, Goteri G, Pimpinelli N, Alterini R, Tassetti A, Scortechini AR, Offidani M, Mulattieri S, Stronati A et al. (2007): Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of primary cutaneous T-cell lymphomas. Haematologica 92, 686–689

Pulte D, Redaniel MT, Jansen L, Brenner H, Jeffreys M (2013): Recent trends in survival of adult patients with acute leukemia: overall improvements, but persistent and partly increasing disparity in survival of patients from minority groups. Haematologica 98, 222–229

Qin J, Ziffra J, Stennett L, Bodner B, Bonish BK, Chaturvedi V, Bennett F, Pollock PM, Trent JM, Hendrix, Mary J C et al. (2005): Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. Cancer Res 65, 6282–6293

Qiuping Z, Jei X, Youxin J, Wei J, Chun L, Jin W, Qun W, Yan L, Chunsong H, Mingzhen Y et al. (2004): CC chemokine ligand 25 enhances resistance to apoptosis in $CD4^+$ T cells from patients with T-cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia by means of livin activation. Cancer Res 64, 7579–7587

Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald HR, Aguet M (1999): Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. Immunity 10, 547–558

Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, MacDonald HR (2004): Notch regulation of lymphocyte development and function. Nat Immunol 5, 247–253

Radtke F, Fasnacht N, MacDonald HR (2010): Notch Signaling in the Immune System. Immunity 32, 14–27

Raetz EA, Perkins SL, Bhojwani D, Smock K, Philip M, Carroll WL, Min D (2006): Gene expression profiling reveals intrinsic differences between T-cell acute lymphoblastic leukemia and T-cell lymphoblastic lymphoma. Pediatr Blood Cancer 47, 130–140

Rahman YE, Rosenthal MW, Cerny EA, Moretti ES (1974): Preparation and prolonged tissue retention of liposome-encapsulated chelating agents. J Lab Clin Med 83, 640–647

Rajkumar SV, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC (2005): Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. J Clin Oncol 23, 630–639

Ramachandra L, Noss E, Boom WH, Harding CV (1999): Phagocytic processing of antigens for presentation by class II major histocompatibility complex molecules. Cell Microbiol 1, 205–214

Ramdas J, Liu W, Harmon JM (1999): Glucocorticoid-induced cell death requires autoinduction of glucocorticoid receptor expression in human leukemic T cells. Cancer Res 59, 1378–1385

Ramsdell F, Fowlkes BJ (1990): Clonal deletion versus clonal anergy: the role of the thymus in inducing self tolerance. Science 248, 1342–1348

Rauchhaus U, Kinne RW, Pohlers D, Wiegand S, Wölfert A, Gajda M, Bräuer R, Panzner S (2009): Targeted delivery of liposomal dexamethasone phosphate to the spleen provides a persistent therapeutic effect in rat antigen-induced arthritis. Ann Rheum Dis 68, 1933–1934

Ravindranath Y (2003): Recent advances in pediatric acute lymphoblastic and myeloid leukemia. Curr Opin Oncol 15, 23–35

Ray A, Prefontaine KE (1994): Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 752–756

Rayet B, Gélinas C (1999): Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. Oncogene 18, 6938–6947

Real PJ, Ferrando AA (2009): NOTCH inhibition and glucocorticoid therapy in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 23, 1374–1377

Real PJ, Tosello V, Palomero T, Castillo M, Hernando E, Stanchina E de, Sulis ML, Barnes K, Sawai C, Homminga I et al. (2008): γ-secretase inhibitors reverse glucocorticoid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia. Nat Med 15, 50–58

Rechsteiner M (1988): Regulation of enzyme levels by proteolysis: the role of pest regions. Adv Enzyme Regul 27, 135–151

Reddy GP, Barrack ER, Dou QP, Menon M, Pelley R, Sarkar FH, Sheng S (2006): Regulatory processes affecting androgen receptor expression, stability, and function: potential targets to treat hormone-refractory prostate cancer. J Cell Biochem 98, 1408–1423

Reichardt HM (2004): Immunomodulatory activities of glucocorticoids: insights from transgenesis and gene targeting. Curr Pharm Des 10, 2797–2805

Reichardt HM, Schütz G (1998): Glucocorticoid signalling--multiple variations of a common theme. Mol Cell Endocrinol 146, 1–6

Reichardt HM, Fischer HJ (2016): Generation of Transgenic Rats Using Lentiviral Vectors. Methods Mol Biol 1304, 25–37

Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P et al. (1998): DNA Binding of the Glucocorticoid Receptor Is Not Essential for Survival. Cell 93, 531–541

Reichardt HM, Tronche F, Berger S, Kellendonk C, Schütz G (2000): New insights into glucocorticoid and mineralocorticoid signaling: lessons from gene targeting. Adv Pharmacol 47, 1–21

Reichardt P, Patzak I, Jones K, Etemire E, Gunzer M, Hogg N (2013): A role for LFA-1 in delaying T-lymphocyte egress from lymph nodes. EMBO J 32, 829-43

Reinherz EL, Schlossman SF (1980): The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell 19, 821–827

Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Levey RH, Schlossman SF (1980): Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. Proc Natl Acad Sci U S A 77, 1588–1592

Reiter A, Schrappe M, Ludwig WD, Hiddemann W, Sauter S, Henze G, Zimmermann M, Lampert F, Havers W, Niethammer D (1994): Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. Blood 84, 3122–3133

Reiter A, Schrappe M, Ludwig WD, Tiemann M, Parwaresch R, Zimmermann M, Schirg E, Henze G, Schellong G, Gadner H et al. (2000): Intensive ALL-type therapy without local radiotherapy provides a 90% event-free survival for children with T-cell lymphoblastic lymphoma: a BFM group report. Blood 95, 416–421

Reizis B, Leder P (2002): Direct induction of T lymphocyte-specific gene expression by the mammalian Notch signaling pathway. Genes Dev 16, 295–300

Rémy S, Tesson L, Ménoret S, Usal C, Scharenberg AM, Anegon I (2010): Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals. Transgenic Res 19, 363–371

Renner K, Ausserlechner MJ, Kofler R (2003): A conceptual view on glucocorticoid-lnduced apoptosis, cell cycle arrest and glucocorticoid resistance in lymphoblastic leukemia. Curr Mol Med 3, 707–717

Reynolds TC, Smith SD, Sklar J (1987): Analysis of DNA surrounding the breakpoints of chromosomal translocations involving the beta T cell receptor gene in human lymphoblastic neoplasms. Cell 50, 107–117

Riccio O, van Gijn ME, Bezdek AC, Pellegrinet L, van Es JH, Zimber-Strobl U, Strobl LJ, Honjo T, Clevers H, Radtke F (2008): Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. EMBO Rep 9, 377–383

Rich BE, Campos-Torres J, Tepper RI, Moreadith RW, Leder P (1993): Cutaneous lymphoproliferation and lymphomas in interleukin 7 transgenic mice. J Exp Med 177, 305–316

Richardson PG, Anderson KC (2003): Bortezomib: a novel therapy approved for multiple myeloma. Clin Adv Hematol Oncol 1, 596–600

Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, Rajkumar SV, Srkalovic G, Alsina M, Alexanian R et al. (2003): A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. N Engl J Med 348, 2609–2617

Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, Harousseau J, Ben-Yehuda D, Lonial S, Goldschmidt H et al. (2005): Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. N Engl J Med 352, 2487–2498

Riehm H, Gadner H, Henze G, Kornhuber B, Lampert F, Niethammer D, Reiter A, Schellong G (1990): Results and significance of six randomized trials in four consecutive ALL-BFM studies. Haematol Blood Transfus 33, 439–450

Riehm H, Gadner H, Welte K (1977): Die West-Berliner Studie zur Behandlung der akuten lymphoblastischen Leukämie des Kindes- Erfahrungsbericht nach 6 Jahren. Klin Padiatr 189, 89–102

Riehm H, Reiter A, Schrappe M, Berthold F, Dopfer R, Gerein V, Ludwig R, Ritter J, Stollmann B, Henze G (1987): Die Corticosteroid-abhängige Dezimierung der Leukämiezellzahl im Blut als Prognosefaktor bei der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter (Therapiestudie ALL-BFM 83). Klin Padiatr 199, 151–160

Riley JL, Mao M, Kobayashi S, Biery M, Burchard J, Cavet G, Gregson BP, June CH, Linsley PS (2002): Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS, and CTLA-4 receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 11790–11795

Riml S, Schmidt S, Ausserlechner MJ, Geley S, Kofler R (2004): Glucocorticoid receptor heterozygosity combined with lack of receptor auto-induction causes glucocorticoid resistance in Jurkat acute lymphoblastic leukemia cells. Cell Death Differ 11 Suppl 1, S65-72

Risueño RM, Campbell CJ, Dingwall S, Levadoux-Martin M, Leber B, Xenocostas A, Bhatia M (2011): Identification of T-lymphocytic leukemia-initiating stem cells residing in a small subset of patients with acute myeloid leukemic disease. Blood 117, 7112–7120

Ritter MA, Gordon LK, Goldschneider I (1978): Distribution of identity of Thy-1-bearing cells during ontogeny in rat hemopoietic and lymphoid tissues. J Immunol 121, 2463–2471

Rivera GK, Raimondi SC, Hancock ML, Behm FG, Pui CH, Abromowitch M, Mirro J, Ochs JS, Look AT, Williams DL (1991): Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia with reinforced early treatment and rotational combination chemotherapy. Lancet 337, 61–66

Robbins PF, Kawakami Y (1996): Human tumor antigens recognized by T cells. Curr Opin Immunol 8, 628–636

Robey E, Fowlkes BJ (1994): Selective Events in T Cell Development. Annu Rev Immunol 12, 675–705

Robey E, Chang D, Itano A, Cado D, Alexander H, Lans D, Weinmaster G, Salmon P (1996): An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. Cell 87, 483–492

Robey EA, Bluestone JA (2004): Notch signaling in lymphocyte development and function. Curr Opin Immunol 16, 360–366

Rodewald HR, Fehling HJ (1998): Molecular and cellular events in early thymocyte development. Adv Immunol 69, 1–112

Rodriguez MA, Pytlik R, Kozak T, Chhanabhai M, Gascoyne R, Lu B, Deitcher SR, Winter JN (2009): Vincristine sulfate liposomes injection (Marqibo) in heavily pretreated patients with refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma: report of the pivotal phase 2 study. Cancer 115, 3475–3482

Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986): Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. Science 234, 364–368

Romano MF, Petrella A, Bisogni R, Turco MC, Venuta S (2003): Effect of NF-kappaB/Rel inhibition on spontaneous vs chemotherapy-induced apoptosis in AML and normal cord blood $CD34^+$ cells. Leukemia 17, 1190–1192

Romero P, Rod Dunbar P, Valmori D, Pittet M, Ogg GS, Rimoldi D, Chen J, Lienard D, Cerottini J, Cerundolo V (1998): Ex Vivo Staining of Metastatic Lymph Nodes by Class I Major Histocompatibility Complex Tetramers Reveals High Numbers of Antigen-experienced Tumor-specific Cytolytic T Lymphocytes. J Exp Med 188, 1641–1650

Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, Di Ianni M, Fettucciari K, Bartoli A, Coaccioli S, Screpanti I, Marconi P (2009): Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. Blood 113, 856–865

Rose AJ, Vegiopoulos A, Herzig S (2010): Role of glucocorticoids and the glucocorticoid receptor in metabolism: insights from genetic manipulations. J Steroid Biochem Mol Biol 122, 10–20

Rose LI, Saccar C (1978): Choosing corticosteroid preparations. Am Fam Physician 17, 198–204

Rosen O, Müller HJ, Gökbuget N, Langer W, Peter N, Schwartz S, Hähling D, Hartmann F, Ittel TH, Mück R et al. (2003): Pegylated asparaginase in combination with high-dose methotrexate for consolidation in adult acute lymphoblastic leukaemia in first remission: a pilot study. Br J Haematol 123, 836–841

Rosen SD (2004): Ligands for L-Selectin: Homing, Inflammation, and Beyond. Annu Rev Immunol 22, 129–156

Rosenling T, Attali A, Luider TM, Bischoff R (2011): The experimental autoimmune encephalomyelitis model for proteomic biomarker studies: from rat to human. Clin Chim Acta 412, 812–822

Rothbard JB, Gefter ML (1991): Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins. Annu Rev Immunol 9, 527–565

Rothenberg EV, Moore JE, Yui MA (2008): Launching the T-cell-lineage developmental programme. Nat Rev Immunol 8, 9–21

Rothenberg EV, Champhekar A, Damle S, Del Real, Marissa Morales, Kueh HY, Li L, Yui MA (2013): Transcriptional Establishment of Cell-Type Identity: Dynamics and Causal Mechanisms of T-Cell Lineage Commitment. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 78, 31-41

Rötzschke O, Falk K, Deres K, Schild H, Norda M, Metzger J, Jung G, Rammensee H (1990): Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. Nature 348, 252–254

Rowe JM, Buck G, Burnett AK, Chopra R, Wiernik PH, Richards SM, Lazarus HM, Franklin IM, Litzow MR, Ciobanu N et al. (2005): Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. Blood 106, 3760–3767

Roy M, Pear WS, Aster JC (2007): The multifaceted role of Notch in cancer Curr Opin Genet Dev 17, 52–59

Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Zhang M, Ihrig MM, McManus MT et al. (2003): A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. Nat Genet 33, 401–406

Rudzki Z, Jothy S (1997): CD44 and the adhesion of neoplastic cells. Mol Pathol 50, 57–71

Russo SM, Tepper JE, Baldwin AS Jr, Liu R, Adams J, Elliott P, Cusack JC Jr (2001): Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: implications for a role of NF-kappaB. Int J Radiat Oncol Biol Phys 50, 183–193

Ryu B, Orwig KE, Oatley JM, Lin C, Chang L, Avarbock MR, Brinster RL (2007): Efficient generation of transgenic rats through the male germline using lentiviral transduction and transplantation of spermatogonial stem cells. J Androl 28, 353–360

Saadatpour A, Guo G, Orkin SH, Yuan G (2014): Characterizing heterogeneity in leukemic cells using single-cell gene expression analysis. Genome Biol 15, 525

Sade H, Krishna S, Sarin A (2004): The anti-apoptotic effect of Notch-1 requires p56lck-dependent, Akt/PKB-mediated signaling in T cells. J Biol Chem 279, 2937–2944

Saint-Ruf C, Ungewiss K, Groettrup M, Bruno L, Fehling HJ, Boehmer H von (1994): Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. Science 266, 1208–1212

Saitoh Y, Yamamoto N, Dewan MZ, Sugimoto H, Martinez Bruyn, Vicente J, Iwasaki Y, Matsubara K, Qi X, Saitoh T, Imoto I et al. (2008): Overexpressed NF-kappaB-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells. Blood 111, 5118–5129

Salghetti SE, Kim SY, Tansey WP (1999): Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. EMBO J 18, 717–726

Sambandam A, Maillard I, Zediak VP, Xu L, Gerstein RM, Aster JC, Pear WS, Bhandoola A (2005): Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. Nat Immunol 6, 663–670

Samon JB, Castillo-Martin M, Hadler M, Ambesi-Impiobato A, Paietta E, Racevskis J, Wiernik PH, Rowe JM, Jakubczak J, Randolph S et al. (2012): Preclinical analysis of the γ-secretase inhibitor PF-03084014 in combination with glucocorticoids in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Mol Cancer Ther 11, 1565–1575

San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, Spicka I, Petrucci MT, Palumbo A, Samoilova OS et al. (2008): Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. N Engl J Med 359, 906–917

Sanchez-Irizarry C, Carpenter AC, Weng AP, Pear WS, Aster JC, Blacklow SC (2004): Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats. Mol Cell Biol 24, 9265–9273

Sánchez-Vega B, Gandhi V (2009): Glucocorticoid resistance in a multiple myeloma cell line is regulated by a transcription elongation block in the glucocorticoid receptor gene (NR3C1). Br J Haematol 144, 856–864

Sanda T, Asamitsu K, Ogura H, Iida S, Utsunomiya A, Ueda R, Okamoto T (2006): Induction of cell death in adult T-cell leukemia cells by a novel IkappaB kinase inhibitor. Leukemia 20, 590–598

Sanda T, Li X, Gutierrez A, Ahn Y, Neuberg DS, O'Neil J, Strack PR, Winter CG, Winter SS, Larson RS et al. (2010): Interconnecting molecular pathways in the pathogenesis and drug sensitivity of T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 115, 1735–1745

Saran N, Lyszkiewicz M, Pommerencke J, Witzlau K, Vakilzadeh R, Ballmaier M, Boehmer H von, Krueger A (2010): Multiple extrathymic precursors contribute to T-cell development with different kinetics. Blood 115, 1137–1144

Sarantos MR, Raychaudhuri S, Lum AF, Staunton DE, Simon SI (2005): Leukocyte Function-associated Antigen 1-mediated Adhesion Stability Is Dynamically Regulated through Affinity and Valency during Bond Formation with Intercellular Adhesion Molecule-1. J Biol Chem 280, 28290–28298

Satou Y, Nosaka K, Koya Y, Yasunaga J, Toyokuni S, Matsuoka M (2004): Proteasome inhibitor, bortezomib, potently inhibits the growth of adult T-cell leukemia cells both in vivo and in vitro. Leukemia 18, 1357–1363

Scagliotti G (2006): Proteasome inhibitors in lung cancer. Crit Rev Oncol Hematol 58, 177–189

Schaaf MJ, Cidlowski JA (2002): Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. J Steroid Biochem Mol Biol 83, 37–48

Schäcke H, Döcke WD, Asadullah K (2002): Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. Pharmacol Ther 96, 23–43

Schäcke H, Schottelius A, Döcke W, Strehlke P, Jaroch S, Schmees N, Rehwinkel H, Hennekes H, Asadullah K (2004): Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 227–232

Schäcke H, Berger M, Rehwinkel H, Asadullah K (2007): Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): novel ligands with an improved therapeutic index. Mol Cell Endocrinol 275, 109–117

Schiffelers RM, Metselaar JM, Fens MH, Janssen AP, Molema G, Storm G (2005): Liposome-encapsulated prednisolone phosphate inhibits growth of established tumors in mice. Neoplasia 7, 118–127

Schmid I, Albert MH, Graubner UB, Jeremias I, Klein B, Walther JU: Besonderheiten der akuten Leukämien im Kindesalter: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge; In: Hiddemann W, Haferlach T (Hrsg) Manual Leukämien, myeloproliferative und myelodysplastische Syndrome, 3. Aufl., Zuckschwerdt, München, 101–114 (2009)

Schmidt J, Metselaar JM, Wauben MHM, Toyka KV, Storm G, Gold R (2003): Drug targeting by long-circulating liposomal glucocorticosteroids increases therapeutic efficacy in a model of multiple sclerosis. Brain 126, 1895–1904

Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R (2004): Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. Cell Death Differ 11 Suppl 1, S45-55

Schmidt S, Irving, Julie A E, Minto L, Matheson E, Nicholson L, Ploner A, Parson W, Kofler A, Amort M, Erdel M et al. (2006): Glucocorticoid resistance in two key models of acute lymphoblastic leukemia occurs at the level of the glucocorticoid receptor. FASEB J 20, 2600–2602

Schmidt W, Festenstein H (1982): Resistance to cell-mediated cytotoxicity is correlated with reduction of H-2K gene products in AKR leukemia. Immunogenetics 16, 257–264

Schmitt TM, Zúñiga-Pflücker JC (2002): Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. Immunity 17, 749–756

Schneider K, Hassauer M, Oltmanns J: Überprüfung der maßgerechten Übertragung (Scaling) von Schadstoffdosen aus Tierversuchen auf den Menschen (Interspeziesextrapolation), Forschungs- und Beratungsinstitut Gefahrstoffe (FoBiG) GmbH, Freiburg, 2002

Schrappe M (2004): Evolution of BFM trials for childhood ALL. Ann Hematol 83 Suppl 1, S121-3

Schrappe M, Beck J, Brandeis WE, Feickert HJ, Gadner H, Graf N, Havers W, Henze G, Jobke A, Kornhuber B (1987): Die Behandlung der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindes- und Jugendalter: Ergebnisse der multizentrischen Therapiestudie ALL-BFM 81. Klin Padiatr 199, 133–150

Schrappe M, Aricò M, Harbott J, Biondi A, Zimmermann M, Conter V, Reiter A, Valsecchi MG, Gadner H, Basso G et al. (1998): Philadelphia chromosome-positive (Ph^+) childhood acute lymphoblastic leukemia: good initial steroid response allows early prediction of a favorable treatment outcome. Blood 92, 2730–2741

Schrappe M, Camitta B, Pui CH, Eden T, Gaynon P, Gustafsson G, Janka-Schaub GE, Kamps W, Masera G, Sallan S et al. (2000a): Long-term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 14, 2193–2194

Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, Harbott J, Zimmermann M, Hiddemann W, Niemeyer C, Henze G, Feldges A, Zintl F et al. (2000b): Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. Blood 95, 3310–3322

Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, Harbott J, Ludwig WD, Henze G, Gadner H, Odenwald E, Riehm H (2000c): Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Münster. Leukemia 14, 2205–2222

Schreiber H, Wu TH, Nachman J, Kast WM (2002): Immunodominance and tumor escape. Semin Cancer Biol 12, 25–31

Schroeder H, Gustafsson G, Saarinen-Pihkala UM, Glomstein A, Jonmundsson G, Nysom K, Ringdén O, Mellander L (1999): Allogeneic bone marrow transplantation in second remission of childhood acute lymphoblastic leukemia: a population-based case control study from the Nordic countries. Bone Marrow Transplant 23, 555–560

Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R (1998): Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. Nature 393, 382–386

Schuchard M, Landers JP, Sandhu NP, Spelsberg TC (1993): Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. Endocr Rev 14, 659–669

Schwartz JR, Sarvaiya PJ, Vedeckis WV (2010): Glucocorticoid receptor knock down reveals a similar apoptotic threshold but differing gene regulation patterns in T-cell and pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia. Mol Cell Endocrinol 320, 76–86

Schwartz JR, Sarvaiya PJ, Leiva LE, Velez MC, Singleton TC, Yu LC, Vedeckis WV (2012): A facile, branched DNA assay to quantitatively measure glucocorticoid receptor auto-regulation in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Chin J Cancer 31, 381–391

Schwarz BA, Bhandoola A (2004): Circulating hematopoietic progenitors with T lineage potential. Nat Immunol 5, 953–960

Schweingruber N, Haine A, Tiede K, Karabinskaya A, van den Brandt J, Wust S, Metselaar JM, Gold R, Tuckermann JP, Reichardt HM et al. (2011): Liposomal Encapsulation of Glucocorticoids Alters Their Mode of Action in the Treatment of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. J Immunol 187, 4310–4318

Schweingruber N, Reichardt SD, Lühder F, Reichardt HM (2012): Mechanisms of Glucocorticoids in the Control of Neuroinflammation. J Neuroendocrinol 24, 174–182

Scollay R, Smith J, Stauffer V (1986): Dynamics of early T cells: prothymocyte migration and proliferation in the adult mouse thymus. Immunol Rev 91, 129–157

Screpanti I, Morrone S, Meco D, Santoni A, Gulino A, Paolini R, Crisanti A, Mathieson BJ, Frati L (1989): Steroid sensitivity of thymocyte subpopulations during intrathymic differentiation. Effects of 17 beta-estradiol and dexamethasone on subsets expressing T cell antigen receptor or IL-2 receptor. J Immunol 142, 3378–3383

Screpanti I, Bellavia D, Campese AF, Frati L, Gulino A (2003): Notch, a unifying target in T-cell acute lymphoblastic leukemia? Trends Mol Med 9, 30–35

Scupoli MT, Vinante F, Krampera M, Vincenzi C, Nadali G, Zampieri F, Ritter MA, Eren E, Santini F, Pizzolo G (2003): Thymic epithelial cells promote survival of human T-cell acute lymphoblastic leukemia blasts: the role of interleukin-7. Haematologica 88, 1229–1237

Scupoli MT, Perbellini O, Krampera M, Vinante F, Cioffi F, Pizzolo G (2007): Interleukin 7 requirement for survival of T-cell acute lymphoblastic leukemia and human thymocytes on bone marrow stroma. Haematologica 92, 264–266

Searfoss GH, Jordan WH, Calligaro DO, Galbreath EJ, Schirtzinger LM, Berridge BR, Gao H, Higgins MA, May PC, Ryan TP (2003): Adipsin, a biomarker of gastrointestinal toxicity mediated by a functional gamma-secretase inhibitor. J Biol Chem 278, 46107–46116

Sebzda E, Mariathasan S, Ohteki T, Jones R, Bachmann MF, Ohashi PS (1999): Selection of the T cell repertoire. Annu Rev Immunol 17, 829–874

Segal NH, Parsons DW, Peggs KS, Velculescu V, Kinzler KW, Vogelstein B, Allison JP (2008): Epitope landscape in breast and colorectal cancer. Cancer Res 68, 889–892

Sehn LH, MacDonald D, Rubin S, Cantin G, Rubinger M, Lemieux B, Basi S, Imrie K, Gascoyne RD, Sussman J et al. (2011): Bortezomib Added to R-CVP Is Safe and Effective for Previously Untreated Advanced-Stage Follicular Lymphoma: A Phase II Study by the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. J Clin Oncol 29, 3396–3401

Seliger B, Cabrera T, Garrido F, Ferrone S (2002): HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. Semin Cancer Biol 12, 3–13

Serwold T, Richie Ehrlich LI, Weissman IL (2009): Reductive isolation from bone marrow and blood implicates common lymphoid progenitors as the major source of thymopoiesis. Blood 113, 807–815

Shah DS, Kumar R (2013): Steroid resistance in leukemia. World J Exp Med 3, 21–25

Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD (2001): IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. Nature 410, 1107–1111

Shao LE, Dialynas DP, Yu AL, Mackintosh E, Yu J (2000): Human cord blood conditioned medium enhances leukemia colony formation in vitro. Leuk Res 24, 1041–1048

Sharma S, Lichtenstein A (2008): Dexamethasone-induced apoptotic mechanisms in myeloma cells investigated by analysis of mutant glucocorticoid receptors. Blood 112, 1338–1345

Sharma VM, Calvo JA, Draheim KM, Cunningham LA, Hermance N, Beverly L, Krishnamoorthy V, Bhasin M, Capobianco AJ, Kelliher MA (2006): Notch1 Contributes to Mouse T-Cell Leukemia by Directly Inducing the Expression of c-myc. Mol Cell Biol 26, 8022–8031

Shin HM, Minter LM, Cho OH, Gottipati S, Fauq AH, Golde TE, Sonenshein GE, Osborne BA (2006): Notch1 augments NF-kappaB activity by facilitating its nuclear retention. EMBO J 25, 129–138

Shortman K, Wu L (1996): Early T lymphocyte progenitors. Annu Rev Immunol 14, 29–47

Shuster JJ, Falletta JM, Pullen DJ, Crist WM, Humphrey GB, Dowell BL, Wharam MD, Borowitz M (1990): Prognostic factors in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. Blood 75, 166–173

Silverman LB, Sallan SE: Acute lymphoblastic leukemia; in: Hematology of infancy and childhood; hrsg. v. Nathan, DG; Ginsburg, D; Look, AT.; W.B. Saunders, Philadelphia 2000, 575-592

Singer A, Adoro S, Park J (2008): Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. Nat Rev Immunol 8, 788–801

Singh I, Swami R, Khan W, Sistla R (2014): Lymphatic system: a prospective area for advanced targeting of particulate drug carriers. Expert Opin Drug Deliv 11, 211–229

Sionov RV (2013): MicroRNAs and Glucocorticoid-Induced Apoptosis in Lymphoid Malignancies. ISRN Hematol 2013, 348212

Smedt M de, Hoebeke I, Plum J (2004): Human bone marrow $CD34^+$ progenitor cells mature to T cells on OP9-DL1 stromal cell line without thymus microenvironment. Blood Cells Mol Dis 33, 227–232

Smets LA, Salomons G, van den Berg, J (1999): Glucocorticoid induced apoptosis in leukemia. Adv Exp Med Biol 457, 607–614

Smialowicz RJ (2002): The rat as a model in developmental immunotoxicology. Hum Exp Toxicol 21, 513–519

Smith LJ, Curtis JE, Messner HA, Senn JS, Furthmayr H, McCulloch EA (1983): Lineage infidelity in acute leukemia. Blood 61, 1138–1145

Smits EA, Smits CJ, Vromans H (2013): The development of a method to quantify encapsulated and free prednisolone phosphate in liposomal formulations. J Pharm Biomed Anal 75, 47–54

Smits BM, Cuppen E (2006): Rat genetics: the next episode. Trends Genet 22, 232–240

Smits BM, Cotroneo MS, Haag JD, Gould MN (2007): Genetically engineered rat models for breast cancer. Breast Dis 28, 53–61

Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA (2000): Perforin-Mediated Cytotoxicity Is Critical for Surveillance of Spontaneous Lymphoma. J Exp Med 192, 755–760

Soligo D, Servida F, Delia D, Fontanella E, Lamorte G, Caneva L, Fumiatti R, Lambertenghi Deliliers G (2001): The apoptogenic response of human myeloid leukaemia cell lines and of normal and malignant haematopoietic progenitor cells to the proteasome inhibitor PSI. Br J Haematol 113, 126–135

Song G, Wu H, Yoshino K, Zamboni WC (2012): Factors affecting the pharmacokinetics and pharmacodynamics of liposomal drugs. J Liposome Res 22, 177–192

Song I, Buttgereit F (2006): Non-genomic glucocorticoid effects to provide the basis for new drug developments. Mol Cell Endocrinol 246, 142–146

Song I, Gold R, Straub RH, Burmester G, Buttgereit F (2005): New Glucocorticoids on the Horizon: Repress, Don't Activate! J Rheumatol 32, 1199–1207

Song LL, Peng Y, Yun J, Rizzo P, Chaturvedi V, Weijzen S, Kast WM, Stone, P J B, Santos L, Loredo A et al. (2008): Notch-1 associates with IKKalpha and regulates IKK activity in cervical cancer cells. Oncogene 27, 5833–5844

Soulier J, Clappier E, Cayuela J, Regnault A, García-Peydró M, Dombret H, Baruchel A, Toribio M, Sigaux F (2005): HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). Blood 106, 274–286

Spickett GP, Brandon MR, Mason DW, Williams AF, Woollett GR (1983): MRC OX-22, a monoclonal antibody that labels a new subset of T lymphocytes and reacts with the high molecular weight form of the leukocyte-common antigen. J Exp Med 158, 795–810

Spix C, Eletr D, Blettner M, Kaatsch P (2008): Temporal trends in the incidence rate of childhood cancer in Germany 1987-2004. Int J Cancer 122, 1859–1867

Spokoini R, Kfir-Erenfeld S, Yefenof E, Sionov RV (2010): Glycogen Synthase Kinase-3 Plays a Central Role in Mediating Glucocorticoid-Induced Apoptosis. Mol Endocrinol 24, 1136–1150

Staal FJ, Dongen JJ, Langerak AW (2007): Novel insights into the development of T-cell acute lymphoblastic leukemia. Curr Hematol Malig Rep 2, 176–182

Stahn C, Löwenberg M, Hommes DW, Buttgereit F (2007): Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. Mol Cell Endocrinol 275, 71–78

Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, Seed B (1991): The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. EMBO J 10, 343–348

Stamm O, Krücken J, Schmitt-Wrede H, Benten WPM, Wunderlich F (2002): Human ortholog to mouse gene imap38 encoding an ER-localizable G-protein belongs to a gene family clustered on chromosome 7q32-36. Gene 282, 159–167

Stams WA, den Boer ML, Beverloo HB, Meijerink JP, van Wering ER, Janka-Schaub GE, Pieters R (2005): Expression levels of TEL, AML1, and the fusion products TEL-AML1 and AML1-TEL versus drug sensitivity and clinical outcome in t(12;21)-positive pediatric acute lymphoblastic leukemia. Clin Cancer Res 11, 2974–2980

Stanulla M, Schrappe M (2009): Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. Semin Hematol 46, 52–63

Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA (2003): Positive and negative selection of T cells. Annu Rev Immunol 21, 139–176

Stefferl A, Linington C, Holsboer F, Reul JM (1999): Susceptibility and resistance to experimental allergic encephalomyelitis: relationship with hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responsiveness in the rat. Endocrinol 140, 4932–4938

Stephens LA, Mason D (2000): CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations. J Immunol 165, 3105–3110

Stiller CA, Kroll ME, Boyle PJ, Feng Z (2008): Population mixing, socioeconomic status and incidence of childhood acute lymphoblastic leukaemia in England and Wales: analysis by census ward. Br J Cancer 98, 1006–1011

Stoffel A (2005): The NF-kappaB signalling pathway: a therapeutic target in lymphoid malignancies? Expert Opin Ther Targets 9, 1045–1061

Stoler DL, Chen N, Basik M, Kahlenberg MS, Rodriguez-Bigas MA, Petrelli NJ, Anderson GR (1999): The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 15121–15126

Storb R (2003): Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation--yesterday, today, and tomorrow. Exp Hematol 31, 1–10

Strauss SJ, Maharaj L, Hoare S, Johnson PW, Radford JA, Vinnecombe S, Millard L, Rohatiner A, Boral A, Trehu E et al. (2006): Bortezomib Therapy in Patients With Relapsed or Refractory Lymphoma: Potential Correlation of In Vitro Sensitivity and Tumor Necrosis Factor Alpha Response With Clinical Activity. J Clin Oncol 24, 2105–2112

Street SE, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ (2002): Suppression of Lymphoma and Epithelial Malignancies Effected by Interferon. J Exp Med 196, 129–134

Strooper B de, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ et al. (1999): A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. Nature 398, 518–522

Struhl G, Adachi A (1998): Nuclear access and action of notch in vivo. Cell 93, 649–660

Stuart DD, Kao GY, Allen TM (2000): A novel, long-circulating, and functional liposomal formulation of antisense oligodeoxynucleotides targeted against MDR1. Cancer Gene Ther 7, 466–475

Sulong S, Moorman AV, Irving, J. A. E., Strefford JC, Konn ZJ, Case MC, Minto L, Barber KE, Parker H, Wright SL et al. (2009): A comprehensive analysis of the CDKN2A gene in childhood acute lymphoblastic leukemia reveals genomic deletion, copy number neutral loss of heterozygosity, and association with specific cytogenetic subgroups. Blood 113, 100–107

Sutheesophon K, Kobayashi Y, Takatoku M, Ozawa K, Kano Y, Ishii H, Furukawa Y (2006): Histone Deacetylase Inhibitor Depsipeptide (FK228) Induces Apoptosis in Leukemic Cells by Facilitating Mitochondrial Translocation of Bax, Which Is Enhanced by the Proteasome Inhibitor Bortezomib. Acta Haematol 115, 78–90

Swain SL (1983): T cell subsets and the recognition of MHC class. Immunol Rev 74, 129–142

Swanborg RH (2001): Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: lessons in T-cell immunology and autoreactivity. Immunol Rev 184, 129–135

Swerdlow SH, Campo E. Harris NL: Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th ed.; in: World Health Organization Classification of Tumours, Vol 2; IARC Press, Lyon, France 2008

Szczepanek J, Pogorzala M, Konatkowska B, Juraszewska E, Badowska W, Olejnik I, Kuzmicz M, Stanczak E, Malinowska I, Stefaniak J et al. (2010): Differential ex vivo activity of bortezomib in newly diagnosed paediatric acute lymphoblastic and myeloblastic leukaemia. Anticancer Res 30, 2119–2124

Tacke M, Clark GJ, Dallman MJ, Hünig T (1995): Cellular distribution and costimulatory function of rat CD28. Regulated expression during thymocyte maturation and induction of cyclosporin A sensitivity of costimulated T cell responses by phorbol ester. J Immunol 154, 5121–5127

Tacke M, Hanke G, Hanke T, Hünig T (1997): CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: Evidence for functionally distinct forms of CD28. Eur J Immunol 27, 239–247

Tagami S, Okochi M, Yanagida K, Ikuta A, Fukumori A, Matsumoto N, Ishizuka-Katsura Y, Nakayama T, Itoh N, Jiang J et al. (2008): Regulation of Notch signaling by dynamic changes in the precision of S3 cleavage of Notch-1. Mol Cell Biol 28, 165–176

Taghon T, Yui MA, Pant R, Diamond RA, Rothenberg EV (2006): Developmental and molecular characterization of emerging beta- and gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus. Immunity 24, 53–64

Takács L, Ruscetti FW, Kovacs EJ, Rocha B, Brocke S, Diamantstein T, Mathieson BJ (1988): Immature, double negative (CD4-,CD8-) rat thymocytes do not express IL-2 receptors. J Immunol 141, 3810–3818

Takahama Y (2006): Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. Nat Rev Immunol 6, 127–135

Tallen G, Ratei R, Mann G, Kaspers G, Niggli F, Karachunsky A, Ebell W, Escherich G, Schrappe M, Klingebiel T et al. (2010): Long-Term Outcome in Children With Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia After Time-Point and Site-of-Relapse Stratification and Intensified Short-Course Multidrug Chemotherapy: Results of Trial ALL-REZ BFM 90. J Clin Oncol 28, 2339–2347

Tamatani T, Miyasaka M (1990): Identification of monoclonal antibodies reactive with the rat homolog of ICAM-1, and evidence for a differential involvement of ICAM-1 in the adherence of resting versus activated lymphocytes to high endothelial cells. Int Immunol 2, 165–171

Tamatani T, Kotani M, Miyasaka M (1991a): Characterization of the rat leukocyte integrin, CD11/CD18, by the use of LFA-1 subunit-specific monoclonal antibodies. Eur J Immunol 21, 627–633

Tamatani T, Kotani M, Tanaka T, Miyasaka M (1991b): Molecular mechanisms underlying lymphocyte recirculation II. Differential regulation of LFA-1 in the interaction between lymphocytes and high endothelial cells. Eur J Immunol 21, 855–858

Tan C, Waldmann TA (2002): Proteasome inhibitor PS-341, a potential therapeutic agent for adult T-cell leukemia. Cancer Res 62, 1083–1086

Tan JB, Visan I, Yuan JS, Guidos CJ (2005): Requirement for Notch1 signals at sequential early stages of intrathymic T cell development. Nat Immunol 6, 671–679

Tanaka H, Makino Y, Okamoto K, Iida T, Yan K, Yoshikawa N (1999): Redox regulation of the glucocorticoid receptor. Antioxid Redox Signal 1, 403–423

Tanigaki K, Tsuji M, Yamamoto N, Han H, Tsukada J, Inoue H, Kubo M, Honjo T (2004): Regulation of alphabeta/gammadelta T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling. Immunity 20, 611–622

Tatarek J, Cullion K, Ashworth T, Gerstein R, Aster JC, Kelliher MA (2011): Notch1 inhibition targets the leukemia-initiating cells in a Tal1/Lmo2 mouse model of T-ALL. Blood 118, 1579–1590

Taub JW, Konrad MA, Ge Y, Naber JM, Scott JS, Matherly LH, Ravindranath Y (2002): High frequency of leukemic clones in newborn screening blood samples of children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood 99, 2992–2996

Taurog JD, Dorris ML, Satumtira N, Tran TM, Sharma R, Dressel R, van den Brandt J, Reichardt HM (2009): Spondylarthritis in HLA-B27/human β 2 -microglobulin-transgenic rats is not prevented by lack of CD8. Arthritis Rheum 60, 1977–1984

Tavernier E, Boiron J, Huguet F, Bradstock K, Vey N, Kovacsovics T, Delannoy A, Fegueux N, Fenaux P, Stamatoullas A et al. (2007): Outcome of treatment after first relapse in adults with acute lymphoblastic leukemia initially treated by the LALA-94 trial. Leukemia 21, 1907–1914

Tergaonkar V, Correa RG, Ikawa M, Verma IM (2005): Distinct roles of IkappaB proteins in regulating constitutive NF-kappaB activity. Nat Cell Biol 7, 921–923

Terpos E, Heath DJ, Rahemtulla A, Zervas K, Chantry A, Anagnostopoulos A, Pouli A, Katodritou E, Verrou E, Vervessou E et al. (2006): Bortezomib reduces serum dickkopf-1 and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand concentrations and normalises indices of bone remodelling in patients with relapsed multiple myeloma. Br J Haematol 135, 688–692

Terstappen LW, Huang S, Picker LJ (1992): Flow cytometric assessment of human T-cell differentiation in thymus and bone marrow. Blood 79, 666–677

Teshima M, Fumoto S, Nishida K, Nakamura J, Ohyama K, Nakamura T, Ichikawa N, Nakashima M, Sasaki H (2006): Prolonged blood concentration of prednisolone after intravenous injection of liposomal palmitoyl prednisolone. J Control Release 112, 320–328

Testa U (2011): Leukemia stem cells. Ann Hematol 90, 245–271

Teuffel O, Kuster SP, Hunger SP, Conter V, Hitzler J, Ethier M, Shah PS, Beyene J, Sung L (2011): Dexamethasone versus prednisone for induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. Leukemia 25, 1232–1238

Thalhammer-Scherrer R, Mitterbauer G, Simonitsch I, Jaeger U, Lechner K, Schneider B, Fonatsch C, Schwarzinger I (2002): The immunophenotype of 325 adult acute leukemias: relationship to morphologic and molecular classification and proposal for a minimal screening program highly predictive for lineage discrimination. Am J Clin Pathol 117, 380–389

Thiele K, Buttgereit F, Huscher D, Zink A (2005): Current use of glucocorticoids in patients with rheumatoid arthritis in Germany. Arthritis Rheum 53, 740–747

Thomas DA, Kantarjian H, Smith TL, Koller C, Cortes J, O'Brien S, Giles FJ, Gajewski J, Pierce S, Keating MJ (1999): Primary refractory and relapsed adult acute lymphoblastic leukemia: characteristics, treatment results, and prognosis with salvage therapy. Cancer 86, 1216–1230

Thomas ML, Green JR (1983): Molecular nature of the W3/25 and MRC OX-8 marker antigens for rat T lymphocytes: comparisons with mouse and human antigens. Eur J Immunol 13, 855–858

Thomas P (2012): Rapid steroid hormone actions initiated at the cell surface and the receptors that mediate them with an emphasis on recent progress in fish models. Gen Comp Endocrinol 175, 367–383

Thomas SN, Schudel A (2015): Overcoming transport barriers for interstitial-, lymphatic-, and lymph node-targeted drug delivery. Curr Opin Chem Eng 7, 65–74

Thomas X, Boiron JM, Huguet F, Dombret H, Bradstock K, Vey N, Kovacsovics T, Delannoy A, Fegueux N, Fenaux P et al. (2004): Outcome of Treatment in Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia: Analysis of the LALA-94 Trial. J Clin Oncol 22, 4075–4086

Thompson BJ, Buonamici S, Sulis ML, Palomero T, Vilimas T, Basso G, Ferrando A, Aifantis I (2007): The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. J Exp Med 204, 1825–1835

Thompson BJ, Jankovic V, Gao J, Buonamici S, Vest A, Lee JM, Zavadil J, Nimer SD, Aifantis I (2008): Control of hematopoietic stem cell quiescence by the E3 ubiquitin ligase Fbw7. J Exp Med 205, 1395–1408

Thompson EB (2008): Stepping stones in the path of glucocorticoid-driven apoptosis of lymphoid cells. Acta Biochim Biophys Sin 40, 595–600

Thompson EB, Johnson BH (2003): Regulation of a distinctive set of genes in glucocorticoid-evoked apoptosis in CEM human lymphoid cells. Recent Prog Horm Res 58, 175–197

Thompson EB, Thulasi R, Saeed MF, Johnson BH (1995): Glucocorticoid antagonist RU 486 reverses agonist-induced apoptosis and c-myc repression in human leukemic CEM-C7 cells. Ann N Y Acad Sci 761, 261–275

Thompson PK, Zúñiga-Pflücker JC (2011): On becoming a T cell, a convergence of factors kick it up a Notch along the way. Semin Immunol 23, 350–359

Tissing WJ, Meijerink JP, den Boer ML, Pieters R (2003): Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 17, 17–25

Tissing WJ, Lauten M, Meijerink JP, Den Boer ML, Koper JW, Sonneveld P, Pieters R (2005): Expression of the glucocorticoid receptor and its isoforms in relation to glucocorticoid resistance in childhood acute lymphocytic leukemia. Haematologica 90, 1279–1281

Tissing WJ, Meijerink JP, Brinkhof B, Broekhuis MJ, Menezes RX, Den Boer ML, Pieters R (2006): Glucocorticoid-induced glucocorticoid-receptor expression and promoter usage is not linked to glucocorticoid resistance in childhood ALL. Blood 108, 1045–1049

Tissing WJ, Den Boer ML, Meijerink JP, Menezes RX, Swagemakers S, van der Spek PJ, Sallan SE, Armstrong SA, Pieters R (2007): Genomewide identification of prednisolone-responsive genes in acute lymphoblastic leukemia cells. Blood 109, 3929–3935

Tomko RJ, Hochstrasser M (2011): Order of the proteasomal ATPases and eukaryotic proteasome assembly. Cell Biochem Biophys 60, 13–20

Tong C, Huang G, Ashton C, Li P, Ying Q (2011): Generating gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. Nat Protoc 6, 827–844

Torres-Nagel N, Kraus E, Brown MH, Tiefenthaler G, Mitnacht R, Williams AF, Hünig T (1992): Differential thymus dependence of rat CD8 isoform expression. Eur J Immunol 22, 2841–2848

Tosello V, Ferrando AA (2013): The NOTCH signaling pathway: role in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia and implication for therapy. Ther Adv Hematol 4, 199–210

Touw I, Pouwels K, van Agthoven T, van Gurp R, Budel L, Hoogerbrugge H, Delwel R, Goodwin R, Namen A, Lowenberg B (1990): Interleukin-7 is a growth factor of precursor B and T acute lymphoblastic leukemia. Blood 75, 2097–2101

Townsend AR, Gotch FM, Davey J (1985): Cytotoxic T cells recognize fragments of the influenza nucleoprotein. Cell 42, 457–467

Tremblay CS, Curtis DJ (2014): The clonal evolution of leukemic stem cells in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Curr Opin Hematol 21, 320–325

Trence DL (2003): Management of patients on chronic glucocorticoid therapy: an endocrine perspective. Prim Care 30, 593–605

Tsai SY, Carlstedt-Duke J, Weigel NL, Dahlman K, Gustafsson JA, Tsai MJ, O'Malley BW (1988): Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. Cell 55, 361–369

Tucci F, Arico M (2008): Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. Haematologica 93, 1124–1128

Tuckermann JP, Kleiman A, McPherson KG, Reichardt HM (2005): Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. Crit Rev Clin Lab Sci 42, 71–104

Turunen JP, Ustinov J, Renkonen R (1993): Adhesion molecules involved in protein kinase A- and C-dependent lymphocyte adherence to microvascular endothelial cells. Scand J Immunol 37, 282–288

Tuscano JM, Martin SM, Ma Y, Zamboni W, O'Donnell RT (2010): Efficacy, biodistribution, and pharmacokinetics of CD22-targeted pegylated liposomal doxorubicin in a B-cell non-Hodgkin‘s lymphoma xenograft mouse model. Clin Cancer Res 16, 2760–2768

Uckun FM, Gaynon PS, Sensel MG, Nachman J, Trigg ME, Steinherz PG, Hutchinson R, Bostrom BC, Sather HN, Reaman GH (1997): Clinical features and treatment outcome of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia according to the apparent maturational stage of T-lineage leukemic blasts: a Children's Cancer Group study. J Clin Oncol 15, 2214–2221

Uckun FM, Sensel MG, Sun L, Steinherz PG, Trigg ME, Heerema NA, Sather HN, Reaman GH, Gaynon PS (1998): Biology and treatment of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia. Blood 91, 735–746

Uhmann A, van den Brandt J, Dittmann K, Hess I, Dressel R, Binder C, Luhder F, Christiansen H, Fassnacht M, Bhandoola A et al. (2011): T Cell Development Critically Depends on Prethymic Stromal Patched Expression. J Immunol 186, 3383–3391

Ulmansky R, Turjeman K, Baru M, Katzavian G, Harel M, Sigal A, Naparstek Y, Barenholz Y (2012): Glucocorticoids in nano-liposomes administered intravenously and subcutaneously to adjuvant arthritis rats are superior to the free drugs in suppressing arthritis and inflammatory cytokines. J Control Release 160, 299–305

Uyttebroeck A, Suciu S, Laureys G, Robert A, Pacquement H, Ferster A, Marguerite G, Mazingue F, Renard M, Lutz P et al. (2008): Treatment of childhood T-cell lymphoblastic lymphoma according to the strategy for acute lymphoblastic leukaemia, without radiotherapy: Long term results of the EORTC CLG 58881 trial. Eur J Cancer 44, 840–846

Uyttenhove C, Maryanski J, Boon T (1983): Escape of mouse mastocytoma P815 after nearly complete rejection is due to antigen-loss variants rather than immunosuppression. J Exp Med 157, 1040–1052

Uzan B, Poglio S, Gerby B, Wu C, Gross J, Armstrong F, Calvo J, Cahu X, Deswarte C, Dumont F et al. (2014): Interleukin-18 produced by bone marrow-derived stromal cells supports T-cell acute leukaemia progression. EMBO Mol Med 6, 821–834

Vacca A, Felli MP, Farina AR, Martinotti S, Maroder M, Screpanti I, Meco D, Petrangeli E, Frati L, Gulino A (1992): Glucocorticoid receptor-mediated suppression of the interleukin 2 gene expression through impairment of the cooperativity between nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhancer elements. J Exp Med 175, 637–646

Vacchio MS, Ashwell JD (2000): Glucocorticoids and thymocyte development. Semin Immunol 12, 475–485

Vaitkevičienė G, Forestier E, Hellebostad M, Heyman M, Jonsson OG, Lähteenmäki PM, Rosthoej S, Söderhäll S, Schmiegelow K (2011): High white blood cell count at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukaemia: biological background and prognostic impact. Results from the NOPHO ALL-92 and ALL-2000 studies. Eur J Haematol 86, 38–46

Vallabhapurapu S, Karin M (2009): Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. Annu Rev Immunol 27, 693–733

van den Brandt J, Wang D, Kwon S, Heinkelein M, Reichardt HM (2004a): Lentivirally generated eGFP-transgenic rats allow efficient cell tracking in vivo. Genesis 39, 94–99

van den Brandt J, Wang D, Reichardt HM (2004b): Resistance of single-positive thymocytes to glucocorticoid-induced apoptosis is mediated by CD28 signaling. Mol Endocrinol 18, 687–695

van den Brandt J, Kwon S, Hünig T, McPherson KG, Reichardt HM (2005): Sustained pre-TCR expression in Notch1IC-transgenic rats impairs T cell maturation and selection. J Immunol 174, 7845–7852

van den Brandt J, Kwon S, McPherson KG, Petrovic S, Zettl A, Müller-Hermelink HK, Reichardt HM (2006): Unexpected features of acute T lymphoblastic lymphomas in Notch1IC transgenic rats. Eur J Immunol 36, 2223–2234

van den Brandt J, Lühder F, McPherson KG, Graaf KL de, Tischner D, Wiehr S, Herrmann T, Weissert R, Gold R, Reichardt HM (2007): Enhanced Glucocorticoid Receptor Signaling in T Cells Impacts Thymocyte Apoptosis and Adaptive Immune Responses. Am J Pathol 170, 1041–1053

van der Velden VH, Boeckx N, van Wering ER, van Dongen JJ (2004): Detection of minimal residual disease in acute leukemia. J Biol Regul Homeost Agents 18, 146–154

van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J, Rawstron A, Asnafi V, Lécrevisse Q, Lucio P et al. (2012): EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. Leukemia 26, 1908–1975

van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H, Cozijnsen M, Robine S, Winton DJ, Radtke F et al. (2005): Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. Nature 435, 959–963

van Ewijk W (1991): T-Cell Differentiation is Influenced by Thymic Microenvironments. Annu Rev Immunol 9, 591–615

van Grotel M, Meijerink JPP, van Wering ER, Langerak AW, Beverloo HB, Buijs-Gladdines JG, Burger NB, Passier M, van Lieshout EM, Kamps WA et al. (2007): Prognostic significance of molecular-cytogenetic abnormalities in pediatric T-ALL is not explained by immunophenotypic differences. Leukemia 22, 124–131

van Rooijen N, Sanders A (1994): Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. J Immunol Methods 174, 83–93

van Vlierberghe P, Ferrando A (2012): The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. J Clin Invest 122, 3398–3406

VanderWielen BD, Yuan Z, Friedmann DR, Kovall RA (2011): Transcriptional repression in the Notch pathway: thermodynamic characterization of CSL-MINT (Msx2-interacting nuclear target protein) complexes. J Biol Chem 286, 14892–14902

Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellstrom-Lindberg E, Tefferi A et al. (2009): The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood 114, 937–951

Veerman AJ, Kamps WA, van den Berg H, van den Berg E, Bökkerink JP, Bruin MC, van den Heuvel-Eibrink MM, Korbijn CM, Korthof ET, van der Pal K et al. (2009): Dexamethasone-based therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia: results of the prospective Dutch Childhood Oncology Group (DCOG) protocol ALL-9 (1997–2004). Lancet Oncol 10, 957–966

Vermeer LA, Boer NK de, Bucci C, Bos NA, Kroese FGM, Alberti S (1994): MRC OX19 recognizes the rat CD5 surface glycoprotein, but does not provide evidence for a population of CD5bright B cells. Eur J Immunol 24, 585–592

Versteeg R, Kruse-Wolters KM, Plomp AC, van Leeuwen A, Stam NJ, Ploegh HL, Ruiter DJ, Schrier PI (1989): Suppression of class I human histocompatibility leukocyte antigen by c-myc is locus specific. J Exp Med 170, 621–635

Vesely MD, Schreiber RD (2013): Cancer immunoediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy. Ann N Y Acad Sci 1284, 1–5

Vilimas T, Mascarenhas J, Palomero T, Mandal M, Buonamici S, Meng F, Thompson B, Spaulding C, Macaroun S, Alegre M et al. (2006): Targeting the NF-κB signaling pathway in Notch1-induced T-cell leukemia. Nat Med 13, 70–77

Vink J, Cloos J, Kaspers GJ (2006): Proteasome inhibition as novel treatment strategy in leukaemia. Br J Haematol 134, 253–262

Visan I, Tan JB, Yuan JS, Harper JA, Koch U, Guidos CJ (2006): Regulation of T lymphopoiesis by Notch1 and Lunatic fringe-mediated competition for intrathymic niches. Nat Immunol 7, 634–643

Visani G, Guiducci B, D'Adamo F, Mele A, Nicolini G, Leopardi G, Sparaventi G, Barulli S, Malerba L, Isidori A et al. (2005): Cyclophosphamide, pegylated liposomal doxorubicin, vincristine and prednisone (CDOP) plus rituximab is effective and well tolerated in poor performance status elderly patients with non-Hodgkin's lymphoma. Leuk Lymphoma 46, 477–479

Volanakis EJ, Williams RT, Sherr CJ (2009): Stage-specific Arf tumor suppression in Notch1-induced T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 114, 4451–4459

Wallace AD, Cidlowski JA (2001): Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. J Biol Chem 276, 42714–42721

Wallberg AE, Pedersen K, Lendahl U, Roeder RG (2002): p300 and PCAF Act Cooperatively To Mediate Transcriptional Activation from Chromatin Templates by Notch Intracellular Domains In Vitro. Mol Cell Biol 22, 7812–7819

Waltzer L, Bourillot PY, Sergeant A, Manet E (1995): RBP-J kappa repression activity is mediated by a co-repressor and antagonized by the Epstein-Barr virus transcription factor EBNA2. Nucleic Acids Res 23, 4939–4945

Wang D, Müller N, McPherson KG, Reichardt HM (2006): Glucocorticoids engage different signal transduction pathways to induce apoptosis in thymocytes and mature T cells. J Immunol 176, 1695–1702

Wang J, Fu L, Gu F, Ma Y (2011): Notch1 is involved in migration and invasion of human breast cancer cells. Oncol Rep 26, 1295–1303

Wang X, Zheng J, Liu J, Yao J, He Y, Li X, Yu J, Yang J, Liu Z, Huang S (2005): Increased population of CD4(+)CD25(high), regulatory T cells with their higher apoptotic and proliferating status in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients. Eur J Haematol 75, 468–476

Wang Y, Liang Y, Zhang Y, Wu D, Liu H (2015): Bortezomib inhibits bone marrow-derived dendritic cells. Int J Clin Exp Pathol 8, 4857–4862

Wang Z, Sheng C, Li T, Teng F, Sang L, Cao F, Wang Z, Zhu W, Li W, Zhao X et al. (2012): Generation of tripotent neural progenitor cells from rat embryonic stem cells. J Genet Genomics 39, 643–651

Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM (2002): Neuroendocrine regulation of immunity. Annu Rev Immunol 20, 125–163

Weerkamp F, de Haas EF, Naber BA, Comans-Bitter WM, Bogers AJ, van Dongen JJ, Staal FJ (2005): Age-related changes in the cellular composition of the thymus in children. J Allergy Clin Immunol 115, 834–840

Weerkamp F, Luis TC, Naber BA, Koster EE, Jeannotte L, van Dongen JJ, Staal FJ (2006): Identification of Notch target genes in uncommitted T-cell progenitors: No direct induction of a T-cell specific gene program. Leukemia 20, 1967–1977

Wei P, Walls M, Qiu M, Ding R, Denlinger RH, Wong A, Tsaparikos K, Jani JP, Hosea N, Sands M et al. (2010): Evaluation of selective gamma-secretase inhibitor PF-03084014 for its antitumor efficacy and gastrointestinal safety to guide optimal clinical trial design. Mol Cancer Ther 9, 1618–1628

Weigelin B, Krause M, Friedl P (2011): Cytotoxic T lymphocyte migration and effector function in the tumor microenvironment. Immunol Lett 138, 19–21

Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP 4th, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC (2004): Activating Mutations of NOTCH1 in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Science 306, 269–271

Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, Arcangeli ML, Lau A, Wai C, Del Bianco C, Rodriguez CG, Sai H, Tobias et al. (2006): c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. Genes Dev 20, 2096–2109

Weng AP, Nam Y, Wolfe MS, Pear WS, Griffin JD, Blacklow SC, Aster JC (2003): Growth suppression of pre-T acute lymphoblastic leukemia cells by inhibition of notch signaling. Mol Cell Biol 23, 655–664

Werlen G, Hausmann B, Naeher D, Palmer E (2003): Signaling Life and Death in the Thymus: Timing Is Everything. Science 299, 1859–1863

Westermann J, Nagahori Y, Walter S, Heerwagen C, Miyasaka M, Pabst R (1994): B and T lymphocyte subsets enter peripheral lymph nodes and Peyer's patches without preference in vivo: no correlation occurs between their localization in different types of high endothelial venules and the expression of CD44, VLA-4, LFA-1, ICAM-1, CD2 or L-selectin. Eur J Immunol 24, 2312–2316

Wick M, Dubey P, Koeppen H, Siegel CT, Fields PE, Chen L, Bluestone JA, Schreiber H (1997): Antigenic Cancer Cells Grow Progressively in Immune Hosts without Evidence for T Cell Exhaustion or Systemic Anergy. J Exp Med 186, 229–238

Wiegers GJ, Knoflach M, Bock G, Niederegger H, Dietrich H, Falus A, Boyd R, Wick G (2001): CD4(+)CD8(+)TCR(low) thymocytes express low levels of glucocorticoid receptors while being sensitive to glucocorticoid-induced apoptosis. Eur J Immunol 31, 2293–2301

Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G, Saha V, Biondi A, Greaves MF (1999): Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. Lancet 354, 1499–1503

Wikström A (2003): Glucocorticoid action and novel mechanisms of steroid resistance: role of glucocorticoid receptor-interacting proteins for glucocorticoid responsiveness. J Endocrinol 178, 331–337

Williams AF, Barclay AN, Clark SJ, Paterson DJ, Willis AC (1987): Similarities in sequences and cellular expression between rat CD2 and CD4 antigens. J Exp Med 165, 368–380

Williams S, Pettaway C, Song R, Papandreou C, Logothetis C, McConkey DJ (2003): Differential effects of the proteasome inhibitor bortezomib on apoptosis and angiogenesis in human prostate tumor xenografts. Mol Cancer Ther 2, 835–843

Wilson A, MacDonald HR, Radtke F (2001): Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. J Exp Med 194, 1003–1012

Winoto A, Littman DR (2002): Nuclear hormone receptors in T lymphocytes. Cell 109 Suppl, S57-66

Winter SS, Sweatman JJ, Larson RS (2000): Improved quantification of cell survival on stromal monolayers by flow cytometric analyses. Cytometry 40, 26–31

Winter SS, Sweatman JJ, Lawrence MB, Rhoades TH, Hart AL, Larson RS (2001): Enhanced T-lineage acute lymphoblastic leukaemia cell survival on bone marrow stroma requires involvement of LFA-1 and ICAM-1. Br J Haematol 115, 862–871

Wolfer A, Bakker T, Wilson A, Nicolas M, Ioannidis V, Littman DR, Lee PP, Wilson CB, Held W, MacDonald HR et al. (2001): Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8 T cell development. Nat Immunol 2, 235–241

Wolfer A, Wilson A, Nemir M, MacDonald HR, Radtke F (2002): Inactivation of Notch1 impairs VDJbeta rearrangement and allows pre-TCR-independent survival of early alpha beta Lineage Thymocytes. Immunity 16, 869–879

Wong ET, Tergaonkar V (2009): Roles of NF-kappaB in health and disease: mechanisms and therapeutic potential. Clin Sci (Lond) 116, 451–465

Wong GT, Manfra D, Poulet FM, Zhang Q, Josien H, Bara T, Engstrom L, Pinzon-Ortiz M, Fine JS, Lee HJ et al. (2004): Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. J Biol Chem 279, 12876–12882

Wong GW, Zúñiga-Pflücker JC (2010): γδ and αβ T cell lineage choice: Resolution by a stronger sense of being. Semin Immunol 22, 228–236

Wood AJ, Pui C, Evans WE (1998): Acute Lymphoblastic Leukemia. N Engl J Med 339, 605–615

Woodle MC, Lasic DD (1992): Sterically stabilized liposomes. Biochim Biophys Acta 1113, 171–199

Woodle MC, Newman MS, Cohen JA (1994): Sterically stabilized liposomes: physical and biological properties. J Drug Target 2, 397–403

Woollett GR, Barclay AN, Puklavec M, Williams AF (1985): Molecular and antigenic heterogeneity of the rat leukocyte-common antigen from thymocytes and T and B lymphocytes. Eur J Immunol 15, 168–173

Wu G, Lyapina S, Das I, Li J, Gurney M, Pauley A, Chui I, Deshaies RJ, Kitajewski J (2001): SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation. Mol Cell Biol 21, 7403–7415

Wu L, Aster JC, Blacklow SC, Lake R, Artavanis-Tsakonas S, Griffin JD (2000): MAML1, a human homologue of Drosophila mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. Nat Genet 26, 484–489

Wu L, Sun T, Kobayashi K, Gao P, Griffin JD (2002): Identification of a family of mastermind-like transcriptional coactivators for mammalian notch receptors. Mol Cell Biol 22, 7688–7700

Wu Y, Cain-Hom C, Choy L, Hagenbeek TJ, de Leon GP, Chen Y, Finkle D, Venook R, Wu X, Ridgway J et al. (2010): Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. Nature 464, 1052–1057

Wuchter C, Karawajew L, Ruppert V, Buchner T, Schoch C, Haferlach T, Ratei R, Dorken B, Ludwig WD (1999): Clinical significance of CD95, Bcl-2 and Bax expression and CD95 function in adult de novo acute myeloid leukemia in context of P-glycoprotein function, maturation stage, and cytogenetics. Leukemia 13, 1943–1953

Wuchter C, Karawajew L, Ruppert V, Schrappe M, Harbott J, Ratei R, Dorken B, Ludwig W (2000): Constitutive expression levels of CD95 and Bcl-2 as well as CD95 function and spontaneous apoptosis in vitro do not predict the response to induction chemotherapy and relapse rate in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 110, 154–160

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

Xia X, Zhang Y, Zieth CR, Zhang S (2007): Transgenes delivered by lentiviral vector are suppressed in human embryonic stem cells in a promoter-dependent manner. Stem Cells Dev 16, 167–176

Yamamoto S, Nakata M, Sasada R, Ooshima Y, Yano T, Shinozawa T, Tsukimi Y, Takeyama M, Matsumoto Y, Hashimoto T (2012): Derivation of rat embryonic stem cells and generation of protease-activated receptor-2 knockout rats. Transgenic Res 21, 743–755

Yan XQ, Sarmiento U, Sun Y, Huang G, Guo J, Juan T, Van G, Qi MY, Scully S, Senaldi G et al. (2001): A novel Notch ligand, Dll4, induces T-cell leukemia/lymphoma when overexpressed in mice by retroviral-mediated gene transfer. Blood 98, 3793–3799

Yang JJ, Bhojwani D, Yang W, Cai X, Stocco G, Crews K, Wang J, Morrison D, Devidas M, Hunger SP et al. (2008): Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 112, 4178–4183

Yang L, Zhang S, George SK, Teng R, You X, Xu M, Liu H, Sun X, Amin HM, Shi W (2015): Targeting Notch1 and proteasome as an effective strategy to suppress T-cell lymphoproliferative neoplasms. Oncotarget 6, 14953–14969

Yang T, Choi M, Cui F, Lee S, Chung S, Shim C, Kim D (2007a): Antitumor effect of paclitaxel-loaded PEGylated immunoliposomes against human breast cancer cells. Pharm Res 24, 2402–2411

Yang T, Cui F, Choi M, Cho J, Chung S, Shim C, Kim D (2007b): Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: in vitro and in vivo evaluation. Int J Pharm 338, 317–326

Yashiro-Ohtani Y, He Y, Ohtani T, Jones ME, Shestova O, Xu L, Fang TC, Chiang MY, Intlekofer AM, Blacklow SC et al. (2009): Pre-TCR signaling inactivates Notch1 transcription by antagonizing E2A. Genes Dev 23, 1665–1676

Yost AJ, Shevchuk OO, Gooch R, Gusscott S, You MJ, Ince TA, Aster JC, Weng AP (2013): Defined, serum-free conditions for in vitro culture of primary human T-ALL blasts. Leukemia 27, 1437–1440

Yu C, Rahmani M, Dent P, Grant S (2004): The hierarchical relationship between MAPK signaling and ROS generation in human leukemia cells undergoing apoptosis in response to the proteasome inhibitor Bortezomib. Exp Cell Res 295, 555–566

Yuan F, Leunig M, Huang SK, Berk DA, Papahadjopoulos D, Jain RK (1994): Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. Cancer Res 54, 3352–3356

Yuan X, Salama AD, Dong V, Schmitt I, Najafian N, Chandraker A, Akiba H, Yagita H, Sayegh MH (2003): The role of the CD134-CD134 ligand costimulatory pathway in alloimmune responses in vivo. J Immunol 170, 2949–2955

Yuh YS, Thompson EB (1989): Glucocorticoid effect on oncogene/growth gene expression in human T lymphoblastic leukemic cell line CCRF-CEM. Specific c-myc mRNA suppression by dexamethasone. J Biol Chem 264, 10904–10910

Yun TJ, Bevan MJ (2003): Notch-regulated ankyrin-repeat protein inhibits Notch1 signaling: multiple Notch1 signaling pathways involved in T cell development. J Immunol 170, 5834–5841

Zage PE, Nolo R, Fang W, Stewart J, Garcia-Manero G, Zweidler-McKay PA (2012): Notch pathway activation induces neuroblastoma tumor cell growth arrest. Pediatr Blood Cancer 58, 682–689

Zalipsky S, Saad M, Kiwan R, Ber E, Yu N, Minko T (2007): Antitumor activity of new liposomal prodrug of mitomycin C in multidrug resistant solid tumor: insights of the mechanism of action. J Drug Target 15, 518–530

Zamboni WC, Strychor S, Joseph E, Walsh DR, Zamboni BA, Parise RA, Tonda ME, Yu NY, Engbers C, Eiseman JL (2007): Plasma, tumor, and tissue disposition of STEALTH liposomal CKD-602 (S-CKD602) and nonliposomal CKD-602 in mice bearing A375 human melanoma xenografts. Clin Cancer Res 13, 7217–7223

Zan Y, Haag JD, Chen K, Shepel LA, Wigington D, Wang Y, Hu R, Lopez-Guajardo CC, Brose HL, Porter KI et al. (2003): Production of knockout rats using ENU mutagenesis and a yeast-based screening assay. Nat Biotechnol 21, 645–651

Zhang L, Chen X, Liu X, Kline DE, Teague RM, Gajewski TF, Kline J (2013): CD40 ligation reverses T cell tolerance in acute myeloid leukemia. Journal Clin Invest 123, 1999–2010

Zhang Q, Huang X, Gao L (2009): A clinical study on the premedication of paclitaxel liposome in the treatment of solid tumors. Biomed Pharmacother 63, 603–607

Zhang X, Lu W (2014): Recent advances in lymphatic targeted drug delivery system for tumor metastasis. Cancer Biol Med 11, 247–254

Zhang Y, Luo W, Wang H, Lin P, Vetrivel KS, Liao F, Li F, Wong PC, Farquhar MG, Thinakaran G et al. (2005): Nicastrin is critical for stability and trafficking but not association of other presenilin/gamma-secretase components. J Biol Chem 280, 17020–17026

Zheng P, Guo Y, Niu Q, Levy DE, Dyck JA, Lu S, Sheiman LA, Liu Y (1998): Proto-oncogene PML controls genes devoted to MHC class I antigen presentation. Nature 396, 373–376

Zheng Z, Katoh S, He Q, Oritani K, Miyake K, Lesley J, Hyman R, Hamik A, Parkhouse RM, Farr AG (1995): Monoclonal antibodies to CD44 and their influence on hyaluronan recognition. J Cell Biol 130, 485–495

Zhou J, Cidlowski JA (2005): The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. Steroids 70, 407–417

Zhou Q, Bucher C, Munger ME, Highfill SL, Tolar J, Munn DH, Levine BL, Riddle M, June CH, Vallera DA et al. (2009): Depletion of endogenous tumor-associated regulatory T cells improves the efficacy of adoptive cytotoxic T-cell immunotherapy in murine acute myeloid leukemia. Blood 114, 3793–3802

Zilberman Y, Zafrir E, Ovadia H, Yefenof E, Guy R, Sionov RV (2004): The glucocorticoid receptor mediates the thymic epithelial cell-induced apoptosis of $CD4^{+}8^{+}$ thymic lymphoma cells. Cell Immunol 227, 12–23

Zinkernagel RM, Doherty PC (1974a): Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. Nature 248, 701–702

Zinkernagel RM, Doherty PC (1974b): Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. Nature 251, 547–548

Zschemisch N, Eisenblätter R, Rudolph C, Glage S, Dorsch M (2014): Immortalized tumor derived rat fibroblasts as feeder cells facilitate the cultivation of male embryonic stem cells from the rat strain WKY/Ztm. SpringerPlus 3, 588

Zúñiga-Pflücker JC (2004): T-cell development made simple. Nat Rev Immunol 4, 67–72

Zúñiga-Pflücker JC, Lenardo MJ (1996): Regulation of thymocyte development from immature progenitors. Curr Opin Immunol 8, 215–224

Zweidler-McKay PA, He Y, Xu L, Rodriguez CG, Karnell FG, Carpenter AC, Aster JC, Allman D, Pear WS (2005): Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies. Blood 106, 3898–3906

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Holger Reichardt für die Ermöglichung der Promotion, für die ausgezeichnete Betreuung, für seine beständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie für seinen beachtlichen Beitrag bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich in besonderem Maße Herrn Dr. Jens van den Brandt für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor danken, in denen er mich in das wissenschaftliche Arbeiten eingeführt und mir stets mit unermüdlichem Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Sein Interesse und seine Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Dr. Henrike Fischer möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich für ihre Anteilnahme und unvergleichliche Hilfsbereitschaft würdigen, mit denen sie mich ermutigt und unterstützt hat.

Der Arbeitsgruppe im Institut für Zelluläre und Molekulare Immunologie der Universität Göttingen, hier namentlich hervorzuheben Dr. Anna Karabinskaya, Dr. Jennifer Theis, Dr. Denise Tischner und Dr. Toni Weinhage, danke ich für das angenehme Arbeitsklima und das hilfsbereite Miteinander. Gesondert möchte ich mich bei Amina Bassibas und Julian Koch für ihre zuverlässige Unterstützung bedanken.

Überdies danke ich Herrn PD Dr. Fred Lühder aus dem Institut für Multiple-Sklerose-Forschung der Universitätsmedizin Göttingen für das Überlassen der Liposomen und ferner seiner Arbeitsgruppe am Institut für Neuroimmunologie für das Bereitstellen der Instrumente zum Anfertigen der histologischen Schnitte.

Meinen Eltern, die mir das Studium und die Promotion ermöglicht haben, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls danken. Ihnen widme ich diese Arbeit.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Lebensgefährtin Sandra für ihre unermüdliche Unterstützung, ihre fortwährende Nachsicht und Ihren bedingungslosen Rückhalt bedanken.