

# Apoptoseresistenz beim kutanen T-Zell-Lymphom\*

## Apoptosis Resistance in Cutaneous T-Cell Lymphoma

**Autor**

**C. D. Klemke**

**Institut**

Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Mannheim, Medizinische Fakultät der Universität Heidelberg, Universitätsklinikum Mannheim

### Bibliografie

**DOI** <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1291549>  
 Online-Publikation: 13.1.2012  
 Akt Dermatol 2012; 38: 74–77  
 © Georg Thieme Verlag KG  
 Stuttgart · New York  
 ISSN 0340-2541

### Korrespondenzadresse

**Priv.-Doz. Dr. med.**  
**Claus-Detlev Klemke**  
 Klinik für Dermatologie,  
 Venerologie und Allergologie  
 Universitätsmedizin Mannheim  
 Theodor-Kutzer-Ufer 1–3  
 68135 Mannheim  
[claus-detlev.klemke@umm.de](mailto:claus-detlev.klemke@umm.de)

### Zusammenfassung

▼  
 Kutane Lymphome sind langsam wachsende, maligne Tumoren, deren klinischer Verlauf auf eine *Apoptoseresistenz* hindeutet. In unseren Untersuchungen haben wir bei verschiedenen CTCL-Tumorzelllinien gezielt die Wege des aktivierungsinduzierten Zelltods (AICD) untersucht, um das Konzept einer Apoptoseresistenz zu überprüfen. Dabei konnten wir keine Erhöhung der Expression des inhibitorischen Moleküls c-FLIP feststellen, während die T-Zell-Rezeptor (TZR)-Aktivierung mit dem  $\alpha$ -CD3-Antikörper keine Apoptose in den Tumorzelllinien auslösen konnte.

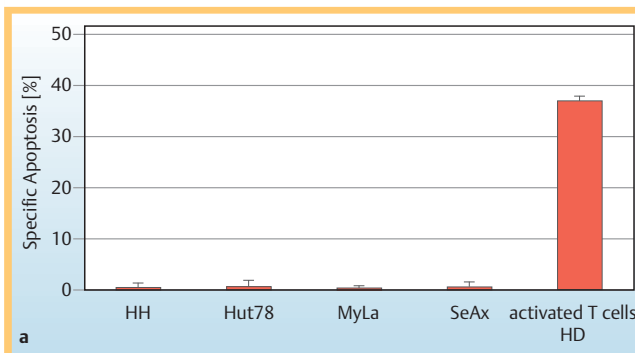
### Einleitung

▼  
 Das kutane T-Zell-Lymphom (CTCL) umfasst eine heterogene Gruppe verschiedener lymphoproliferativer Erkrankungen der Haut [1]. Es kommt hier zum Einwandern von monoklonalen neoplastischen T-Zellen in das Hautorgan, die zu verschiedenen klinischen Krankheitsbildern wie der Mykosis fungoides (MF), dem Sézary-Syndrom oder CD30<sup>+</sup>-lymphoproliferativen Erkrankungen führen können. Die überwiegende Anzahl dieser Erkrankungen zeigt einen langsam progredienten, indolenten klinischen Verlauf über Jahre bis Jahrzehnte. Durch immunhistologische und zellkulturelle Experimente hat man zeigen können, dass die Tumorzellen eine niedrige Proliferationsrate haben. Dies passt gut zum klinischen Bild der sehr langsam verlaufenden Erkrankung bei den meisten Patienten, was auf einen pathogenetisch bedeutsamen gestörten Zelltod im Sinne einer *Apoptoseresistenz* hindeutet [2].

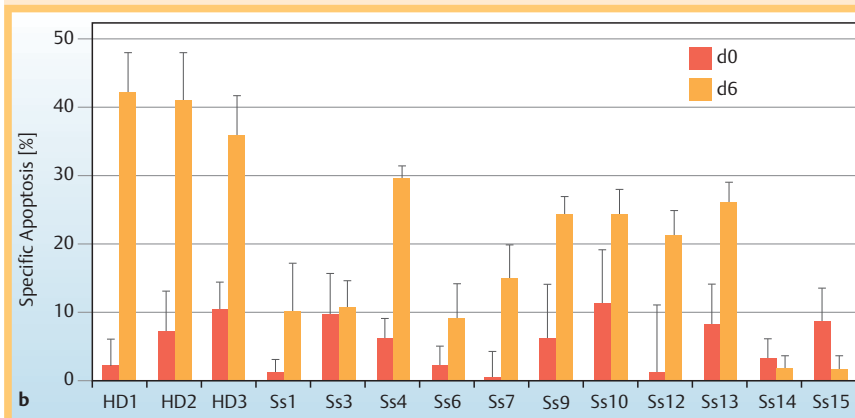
Diese AICD-Resistenz ließ sich auch bei zirkulierenden CD4<sup>+</sup>-Tumorzellen beim Sézary-Syndrom nachweisen, mit einer im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant reduzierten Apoptoserate nach TZR-Stimulation. Da der CD95-Rezeptor der Tumorzellen eine normale Funktion zeigte, wäre zu vermuten, dass eine Hemmung der TZR-Signalübertragung vorliegt, die zur Reduktion von ROS und intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> führt und somit die Bildung des CD95L blockiert, der für die Initiierung des AICD notwendig ist. Hieraus ergeben sich möglicherweise neue therapeutische Zielansätze zur Behandlung von Patienten mit CTCL.

Der Zelltod kann durch verschiedene Oberflächenmoleküle, sogenannte Todesrezeptoren, ausgelöst werden. Der bekannteste Signalweg zur Induktion von Apoptose wird über den CD95 (FAS/APO-1)-Rezeptor vermittelt [3]. Die Aktivierung des CD95-Rezeptors auf der Zelloberfläche durch seinen Liganden (CD95L) führt zur Bildung des todesinduzierenden Komplexes (DISC). Dies führt zur Aktivierung der Procaspasen-9 und -10 und der aktiven Caspasen-9 und -10. Die weitere Prozessierung führt schließlich zur Bildung von Effektor-Caspase-3 und -7. Diese Caspasen sind in der Lage den Zelltod auszulösen. Dieser Signalweg lässt sich unterhalb des DISC durch das Inhibitor-molekül c-FLIP sowie durch sogenannte Inhibitoren der Apoptose (IAP) hemmen. Als weitere Möglichkeit kann auch intrazellulär über die Mitochondrien der Zelle Apoptose ausgelöst werden. Dieser Weg führt über die Bildung des Apoptosoms ebenfalls über den Weg Caspase-9 zur Aktivierung der Effektor-Caspase-3. Der mitochondriale Weg der Apoptose kann zum Beispiel durch Bcl-2 oder Bcl-xl gehemmt werden. Auf der anderen Seite kann der CD95-Rezeptor auch das Zellüberleben vermitteln. In bestimmten Situationen kommt es durch die Aktivierung des CD95-Rezeptors zur Aktivierung des sogenannten IKK-Kom-

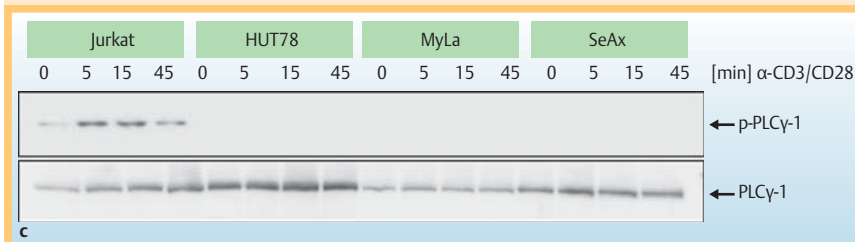
\* Nach einem Vortrag auf dem 11. Jahressymposium der Berliner Stiftung für Dermatologie am 2. Juli 2011 in Berlin, anlässlich der wissenschaftlichen Sitzung zu Ehren von Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. C. E. Orfanos. Die experimentellen Befunde wurden in Cancer Research 2009; 69: 4175–4183) veröffentlicht.



**Abb. 1** CTCL-Tumorzellen sind resistent gegenüber dem aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD). **a** AICD-Resistenz von CTCL-Tumorzelllinien. CTCL-Tumorzelllinien und PHA- und IL-2-aktivierte T-Zellen von gesunden Probanden (HD) wurden mit plattengebundenem  $\alpha$ -CD3 (30  $\mu$ g/ml) für 24 h stimuliert. Die spezifische Apoptose wurde mit dem FACS gemessen.



**b** AICD-Resistenz von Ss-Patientenzellen.  $CD4^+$ -Zellen von Ss und HD wurden mit PHA und IL-2 aktiviert und *in vitro* expandiert. An d0 und d6 wurden die kultivierten Zellen mit plattengebundenem  $\alpha$ -CD3 (30  $\mu$ g/ml) für 24 h stimuliert. Die spezifische Apoptose wurde mit dem FACS gemessen. Ein repräsentatives von 3 Experimenten, die alle in Triplikaten durchgeführt wurden, wird gezeigt.



**c** Fehlende PLC $\gamma$ -1-Phosphorylierung. Die Kontrollzelllinie Jurkat- und CTCL-Tumorzelllinien wurden wie in **a** stimuliert. Dann erfolgte die WB-Analyse mit p-PLC $\gamma$ -1- und PLC $\gamma$ -1-Antikörpern.

plexes, der wiederum zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führt. Der CD95-Rezeptor ist somit in der Lage, sowohl Todes- als auch Überlebenssignale zu vermitteln.

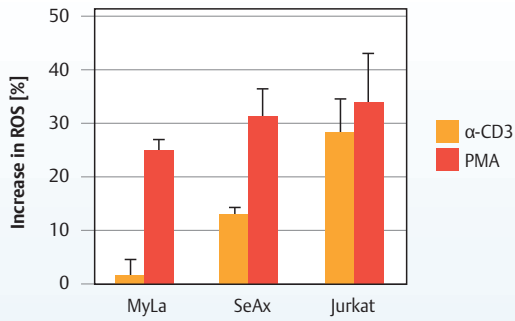
Eine besondere Form des Zelltodes besteht bei T-Lymphozyten. Die Aktivierung einer T-Zelle erfolgt über die Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TZR) [4]. Die erneute TZR-Stimulation einer bereits aktivierten T-Zelle führt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und der Ausschüttung von intrazellulärem Kalzium ( $Ca^{2+}$ ). Diese beiden Signale führen zur Bildung des CD95L, welcher dann aus der T-Zelle ausgeschleust wird. Hier kann er an die CD95-Rezeptoren der eigenen Zelle oder benachbarter T-Zellen binden, was dann zum Zelltod der T-Zelle führt. Diese Art der Apoptose von T-Zellen wird aktivierungsinduzierter Zelltod (AICD) genannt. Dieser spielt eine große Rolle bei der Regulation und vor allem dem Beenden von Immunantworten.

Beim CTCL handelt es sich um eine monoklonale Proliferation von  $CD4^+$ -T-Zellen [5]. Wir haben verschiedene CTCL-Tumorzelllinien auf den AICD hin untersucht. Die TZR-Aktivierung mit dem  $\alpha$ -CD3-Antikörper für 24 Stunden konnte keine Apoptose in den Tumorzelllinien auslösen, im Gegensatz zu apoptosesensitiven aktivierten T-Zellen. Diese Resistenz gegenüber AICD zeigte sich auch in der Untersuchung von  $CD4^+$ -Tumorzellen, die wir aus dem peripheren Blut von Patienten mit der leukämischen Variante des CTCL, dem Sézary-Syndrom, gewonnen haben. Diese zeigten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine signifikant

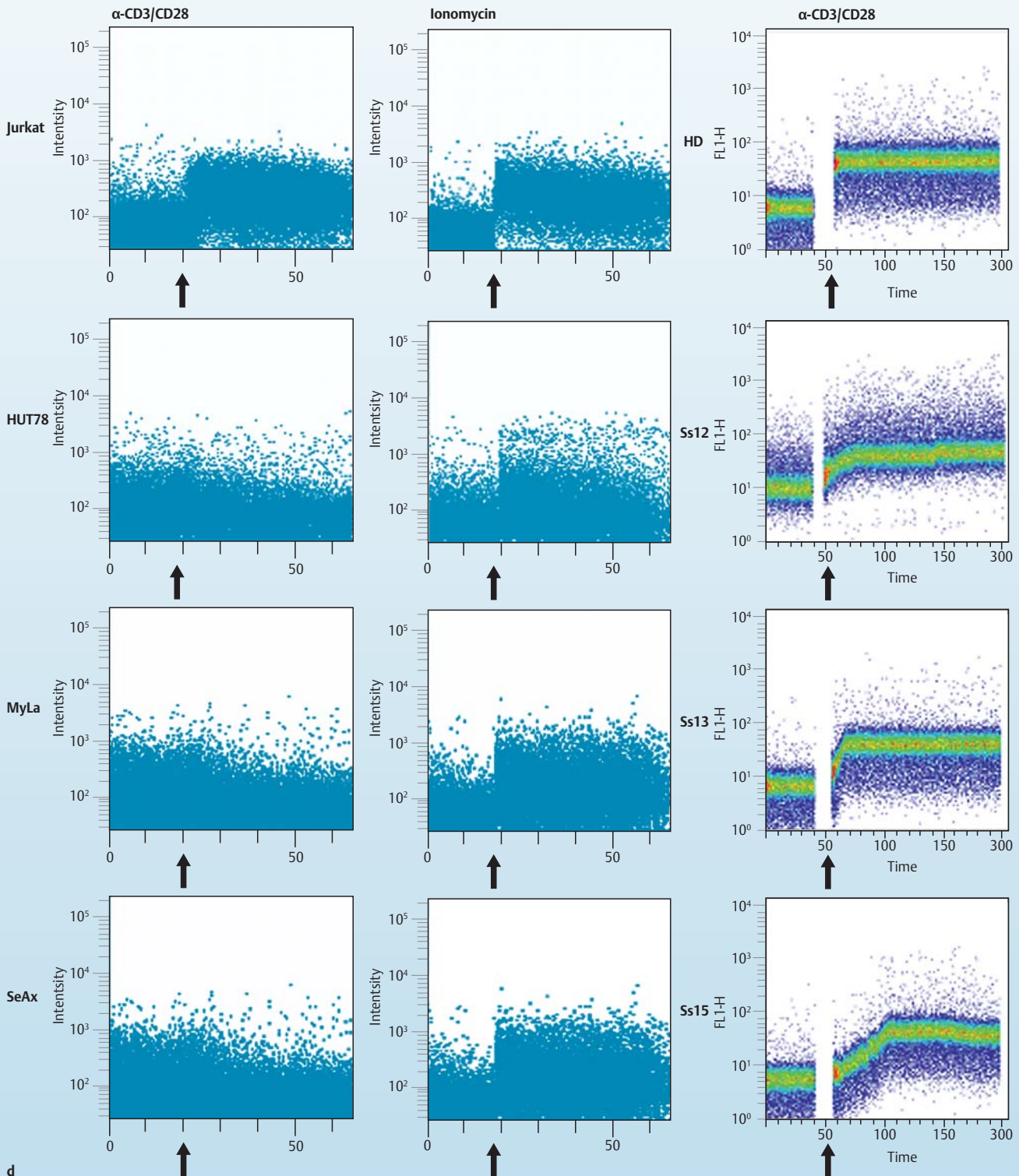
reduzierte Apoptoserate nach TZR-Stimulation (Abb. 1a). Andererseits zeigte der CD95-Rezeptor der Tumorzellen eine normale Funktion. Die Stimulation des CD95-Rezeptors mit  $\alpha$ -APO-1 zeigte eine gute Apoptoseinduktion sowohl in den Tumorzelllinien als auch in primären Tumorzellen von Sézary-Patienten [6] (Abb. 1b).

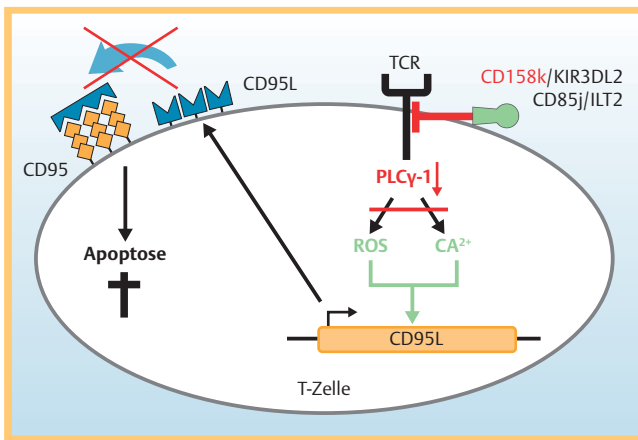
Eine mögliche Erklärung für die beobachtete AICD-Resistenz der CTCL-Tumorzellen könnte in einer erhöhten Expression inhibitorischen Moleküls c-FLIP liegen. Westernblot-Untersuchungen von Tumorzellen von Sézary-Patienten zeigten für einige Patienten eine erhöhte Expression von c-FLIP, was auch von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen wurde. Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutsamkeit der c-FLIP-Überexpression wurden Kontrollzellen und CTCL-Tumorzellen mit einer sh-RNA gegen c-FLIP behandelt, um c-FLIP in diesen Zellen auszuschalten. Die so behandelten Zellen wurden dann im Vergleich zu nicht sh-RNA-behandelten Zellen im Apoptose-Assay untersucht. Hier zeigte sich eine bei beiden Zellen vergleichbare Induktion von Apoptose durch die Aktivierung des CD95-Rezeptors. Die TZR-Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3 führte sowohl in den Kontrollzellen als auch in den sh-RNA-behandelten Zellen nicht zur Induktion von Apoptose. Somit zeigte sich keine funktionelle Bedeutung der c-FLIP-Überexpression für die beobachtete AICD-Resistenz der CTCL-Tumorzellen.

Wie oben erwähnt, ist für die Bildung des CD95L die Bildung von ROS und intrazellulärem  $Ca^{2+}$  bedeutsam [7]. Der Signalweg unterhalb des TZR zur Induktion dieser Signale läuft über den Faktor



**Abb. 1 d** Reduzierte ROS-Bildung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Jurkat- und CTLCL-Zellen wurden mit DCFDA ( $5 \mu\text{M}$ ) für 30 min gefärbt, um die ROS-Produktion im FACS nach einer 30-minütigen Stimulation mit plattengebundenem  $\alpha$ -CD3 ( $30 \mu\text{g/ml}$ ) oder PMA ( $10 \text{ ng/ml}$ ) zu messen. Es wird ein repräsentatives von mindestens 3 Experimenten gezeigt. Jurkat- und CTLCL-Tumorzelllinien wurden mit löslichem  $\alpha$ -CD3 ( $10 \mu\text{g/ml}$ ),  $\alpha$ -CD28 ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) und Ziege  $\alpha$ -Maus ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) oder Ionomycin ( $1 \mu\text{M}$ ) zur Messung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms im FACS stimuliert ( $\uparrow$ ). Ss = Sézary-Syndrom, HD = gesunder Proband, d0 = Tag 0, d6 = Tag 6.





**Abb. 2** Modell der AICD-Resistenz beim kutanen T-Zell-Lymphom. Eine gestörte Signalgebung des T-Zell-Rezeptors (TCR) verhindert eine Phosphorylierung von PLC $\gamma$ -1 und reduziert dadurch die Generation von reaktiven Sauerstoffspezies und den intrazellulären Ca $^{2+}$ -Einstrom. Dadurch kommt es nicht zur Bildung des CD95L. Dadurch fehlt der Auslöser des aktivierungs-induzierten Zelltods (AICD) und die CTCL-Tumorzelle befindet sich in einem AICD-resistenten Zustand.

PLC $\gamma$ -1. Die TZR-Aktivierung führt bei T-Zellen üblicherweise zu einer Phosphorylierung von PLC $\gamma$ -1. Diese Phosphorylierung findet in den untersuchten CTCL-Tumorzelllinien nicht statt (Abb. 1 c). Ebenfalls zeigte sich nach TZR-Stimulation mit  $\alpha$ -CD3/ $\alpha$ -CD28 ein fehlender Kalziumeinstrom in das Zytosol der Zelle, wie es üblicherweise bei gesunden Kontroll-T-Zellen beobachtet wird. Primäre Tumorzellen von Sézary-Patienten zeigten einen deutlich reduzierten Ca $^{2+}$ -Einstrom in die Zelle nach TZR-Stimulation. Interessanterweise zeigte sich nach TZR-Stimulation bei den CTCL-Tumorzellen auch eine verminderte Induktion von ROS (Abb. 1 d). Die sich daran anschließenden Experimente konnten zeigen, dass eine Stimulation des TZR in CTCL-Tumorzellen nicht zur Induktion des CD95L führt. Dies beruht auf der fehlenden Phosphorylierung von PLC $\gamma$ -1 und der damit reduzierten Bildung von ROS und Ca $^{2+}$ . Die fehlende Bildung des CD95L erklärt somit die AICD-Resistenz der CTCL-Tumorzellen. Möglicherweise entsteht die defekte TZR-Signalgebung durch die Expression von inhibitorischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche der CTCL-Tumorzellen wie z. B. CD158k [8] (Abb. 2).

*Ist es möglich, die Apoptoseresistenz beim CTCL zu überwinden?* Verschiedene Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass die CTCL-Tumorzellen eine konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B aufweisen [9]. Die Behandlung von CTCL-Tumorzelllinien und Tumorzellen von Sézary-Patienten mit einem NF $\kappa$ B-Inhibitor führt zur signifikanten Induktion von Apoptose im Vergleich zu T-Zellen von gesunden Spendern [10]. In Gen-Expressions-Experimenten wurde die CTCL-Tumorzelllinie Myla untersucht, in NF $\kappa$ B-Inhibitor-unbehandeltem Zustand und nach NF $\kappa$ B-Inhibitorbehandlung. Hier zeigte sich nach NF $\kappa$ B-Inhibition eine signifikante Herunterregulierung der Gen-Expression der sogenannten Eisenschwertkette (FHC). Die Eisenschwertkette ist in der Zelle für die Bindung von freiem Eisen verantwortlich. Weitere Experimente konnten zeigen, dass die Behandlung mit dem NF $\kappa$ B-Inhibitor zu einer signifikanten Erhöhung des freien Eisens in CTCL-Tumorzelllinien und primären Tumorzellen von Sézary-Patienten im Vergleich zu gesunden T-Zellen führt. Durch die NF $\kappa$ B-Hemmung wird die intrazelluläre Fentonreaktion angestoßen. Diese führt über Superoxid-Anionen und freies Eisen zur Bildung von ROS. Die Bildung von ROS ist, wie oben dar-

gestellt, eine wesentliche Voraussetzung zur Induktion von Apoptose.

Insgesamt zeigt das CTCL eine für die Pathogenese relevante Apoptoseresistenz. Insbesondere eine Hemmung der TZR-Signalübertragung bedingt eine AICD-Resistenz der CTCL-Tumorzellen. Diese kann durch eine Hemmung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B über die Induktion von ROS überwunden werden. Hieraus ergibt sich eine möglicherweise neue interessante therapeutische Zielstruktur zur Behandlung von Patienten mit CTCL.

### Interessenkonflikt

Der Autor erhielt Kongressunterstützungen und Vortragshonore der Firmen Cephalon und Therakos.

### Abstract

#### Apoptosis Resistance in Cutaneous T-Cell Lymphoma

The clinical course of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) is slow, possibly suggesting resistance of the tumor cells to apoptosis. In order to better understand this concept, we analyzed the pathways of activation-induced cell death (AICD), both in CTCL-tumor cell lines and in circulating CD4 $^{+}$  cells from patients with Sézary's syndrome. In our experiments we found no increased expression of c-FLIP, whereas, there was no apoptosis induced by  $\alpha$ -CD3 antibody. The resistance to AICD showing reduced apoptosis after TCR stimulation was found significant, as compared to normal controls. Since the CD95 receptor was found functionally responsive, inhibitory signals interacting with TCR stimulation reduce intracellular ROS and Ca $^{2+}$  and thereby block the induction of the CD95L, which is required for the induction of AICD. Based on these findings new therapeutic approaches in CTCL may be considered.

### Literatur

- 1 Willemze R, Jaffe ES, Burg G et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 2005; 105: 3768–3785
- 2 Klemke CD, Goerd S, Schrama D et al. Kutanes T-Zell Lymphom: Von der Molekularbiologie zur zielgerichteten Therapie. *JDDG* 2006; 5: 395–406
- 3 Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; 407: 789–795
- 4 Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 532–542
- 5 Klemke CD, Dippel E, Dembinski A et al. Clonal T cell receptor gamma-chain gene rearrangement by PCR-based GeneScan analysis in the skin and blood of patients with parapsoriasis and early-stage mycosis fungoides. *J Pathol* 2002; 197: 348–354
- 6 Klemke CD, Brenner D, Weiss EM et al. Lack of T-cell receptor-induced signaling is crucial for CD95 ligand up-regulation and protects cutaneous T-cell lymphoma cells from activation-induced cell death. *Cancer Res* 2009; 69: 4175–4183
- 7 Kaminski M, Kiessling M, Suss D et al. Novel role for mitochondria: protein kinase C $\theta$ -dependent oxidative signaling organelles in activation-induced T-cell death. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 3625–3639
- 8 Nikolova M, Musette P, Bagot M et al. Engagement of ILT2/CD85j in Sézary syndrome cells inhibits their CD3/TCR signaling. *Blood* 2002; 100: 1019–1025
- 9 Sors A, Jean-Louis F, Pellet C et al. Down-regulating constitutive activation of the NF- $\kappa$ B canonical pathway overcomes the resistance of cutaneous T-cell lymphoma to apoptosis. *Blood* 2006; 107: 2354–2363
- 10 Kiessling MK, Klemke CD, Kaminski MM et al. Inhibition of constitutively activated nuclear factor- $\kappa$ B induces reactive oxygen species- and iron-dependent cell death in cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Res* 2009; 69: 2365–2374