Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin III

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. H. Döhner

Einfluss der Mikroumgebung auf das Signaling in der chronisch lymphatischen Leukämie

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Sarah Häbe
Münsingen
2014

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	PD Dr. rer. nat. Daniel Mertens
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Thomas Barth

Tag der Promotion: 19. Dezember 2014

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... **I**
Abkürzungsverzeichnis ..... **II**
1 Einleitung **1**
1.1 Tumorerkrankungen 1
1.2 Pathogenese von Tumoren 1
1.3 Einteilung der hämatologischen Neoplasien 2
1.4 Das System der B-Zellen 3
1.5 Chronisch lymphatische Leukämie 5
1.6 Fragestellung 21
2 Material und Methoden **22**
2.1 Material 22
2.2 Methoden 31
3 Ergebnisse **43**
3.1 Die Rolle von IL4 und CD40L für ihre Mikroumgebung 43
3.2 Identifikation von möglichen Genen und Signalwegen, welche für das Überleben der CLL-Zellen eine wichtige Rolle spielen könnten 52
3.3 Identifikation von pro-apoptotischen Substanzen, die das Überleben der CLL-Zellen in Kokultur reduzieren 61
4 Diskussion **70**
4.1 Die Bedeutung von IL4 und CD40L für das Überleben der CLL-Zellen 70
4.2 Die Interaktion von CLL-Zellen mit der humanen Stromazelllinie HS-5 74
4.3 Identifikation von Substanzen mit Hilfe von GEP, die das Überleben der CLL-Zellen in vitro reduzieren können 79
5 Zusammenfassung **85**
6 Literaturverzeichnis **87**
Danksagung **95**
Lebenslauf **96**

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-actinomycin D
APRIL	A proliferation-inducing ligand
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
BAFF	B-cell activating factor
BAK1	B-cell-antagonist 1
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-X	B-cell lymphoma X
BCR	B-cell receptor
BSA	Bovine serum albumin
CASP3	Cysteine-aspartic acid protease 3
CASP8	Cysteine-aspartic acid protease 8
CD	Cluster of differentiation
CDKN2D	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor D
CD40	Cluster of differentiation 40, TNF-Rezeptor-Superfamilie Mitglied 5
CD40L	Cluster of differentiation 40 Ligand
cDNA	Komplementäre DNA
CKLF	Chemokine-like factor
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)
CXCL13	CXC-Motiv-Chemokin 13
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, stromal cell-derived factor 1 receptor (SDF-1-Rezeptor)
DMEM	Dulbecco´s modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
E2F5	Transkriptionsfaktor E2F5

FBS	Fetales Rinderserum
GEP	Genexpressionsprofil
Hb	Hämoglobin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF-1	Hypoxia-inducible factor-1
HRP	Horseradish peroxidase-conjugated
ICAM2	Intercellular adhesion molecule 2
IFNγ	Interferon gamma
IFITM1	Interferon-induced transmembrane protein 1
Ig	Immunglobulin
IGHV	variabler Bereich der Immunglobulin-Schwerkette
IκB	Inhibitor von NF-κB
IKK	IκB-Kinase
IL2	Interleukin 2
IL4	Interleukin 4
IL6	Interleukin 6
IL8	Interleukin 8
LDH	Lactatdehydrogenase
LGALS1	Lectin, galactoside-binding, soluble 1
LY96	Lymphocyte antigen 96
M	Molar (mol/l)
MCL-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MSC	Mesenchymale Stromazellen
n	Anzahl
n	Nano
NF-κB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NME1	Nucleoside diphosphate kinase A
NP4O	Nonident-P40
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffered saline

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PECAM1	Cluster of differentiation 31
PI3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIGY	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Y
PRDX3	Peroxiredoxin 3
PSMA6	Proteasome subunit alpha type-6
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RHOC	Ras homolog gene family
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur (~ 20°C)
RT q-PCR	Real-Time quantitative PCR
SDHA	Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit A
SDS	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid
SELL	Selectin L
siRNA	Small interfering RNA
STAT1	transducer and activator of transcription 1
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6
TBP	TATA-box binding protein
TCL1A	T-cell leukemia/lymphoma
TGF	Transforming growth factor
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TNFRSF6	Tumornekrosefaktor 6
TNFRSF9	Tumornekrosefaktor 9
TNFRSF17	Tumornekrosefaktor 17
TP53	Tumorprotein 53
TUBA1C	Tubulin alpha-6 chain
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vs.	versus
ZAP-70	Zeta-associated protein kinase 70

1 Einleitung

1.1 Tumorerkrankungen

Tumorerkrankungen sind sehr heterogen und umfassen weltweit mehr als 100 verschiedene Entitäten, die sich bezüglich ihrer Epidemiologie und ihren Risikofaktoren unterscheiden (Stratton et al. 2009). Tumoren können solide oder multifokal auftreten und werden anhand ihrer Dignität in benigne oder maligne Tumoren unterteilt.

Tumoren sind eine der führenden Todesursachen weltweit (WHO 2013). In Deutschland sind Tumoren nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die zweithäufigste Todesursache mit ca. 26% (Stat.Bundesamt 2011).

1.2 Pathogenese von Tumoren

Die Entstehung von Tumoren basiert auf zwei Prozessen: Das Vorhandensein von genetischen Variationen im menschlichen Genom und die natürliche Selektion von verschiedenen Phänotypen, analog zu Darwins Evolutionstheorie (Stratton et al. 2009). Genetische und epigenetische Veränderungen führen dazu, dass normale menschliche Zellen in maligne Derivate umgewandelt werden. Diese Transformation ist ein multifaktorieller Prozess und fordert bei den Menschen mehrere Mutationen (Hahn et al. 1999). Bei vielen Tumoren zeigt sich außerdem eine altersabhängige Inzidenz (Nordling 1953).

Hanahan und Weinberg zeigten, dass fast alle Tumorerkrankungen sechs funktionelle Eigenschaften aufweisen und bezeichneten sie als die „Hallmarks of Cancer“: 1. Autonomie der Wachstumssignale, 2. Nichtbeachten der Anti-Wachstumssignale, 3. Apoptoseresistenz, 4. Unlimitiertes Replikationspotential, 5. Angiogenese, 6. Gewebeinvasion und Metastasierung (Hanahan and Weinberg 2000).

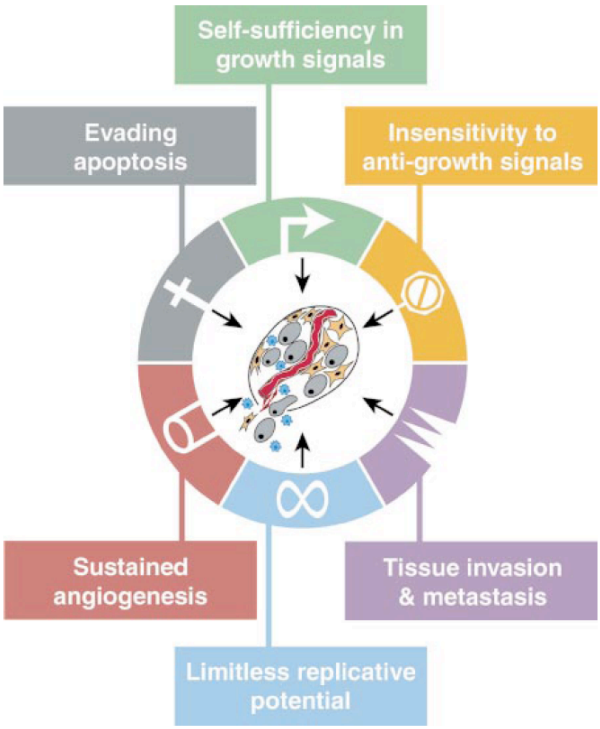


Abbildung 1: Hallmarks of cancer [entnommen von: The Hallmarks of Cancer, Hanahan D, Weinberg RA, *Cell* 100: 57-70, (2000); mit Genehmigung von Elsevier].

Apoptoseresistenz und Zellzyklusderegulation zählen zu den wichtigsten tumorösen Eigenschaften, welche die Zelle während ihrer Transformation erhält (Loeb et al. 2003). Die Apoptoseresistenz kann zum Beispiel durch Überexpression von Apoptoseinhibitoren, Herunterregulation oder Mutation von pro-apoptotischen Genen, Inaktivierung von Caspasen oder Veränderungen von Signalwegen erreicht werden (Loeb et al. 2003).

1.3 Einteilung der hämatologischen Neoplasien

Hämatologische Neoplasien machen circa 8% aller bösartigen Tumorerkrankungen aus. Im Jahr 2000 veröffentlichte die WHO die erste Klassifikation für hämatologische Tumoren (Harris et al. 2000). Die WHO klassifiziert die hämatologischen Neoplasien nach ihrer zellulären Herkunft: Myeloische Neoplasien, Lymphome (Non-Hodgkin und Hodgkin), Mastzellerkrankungen, histiozytische und dendritischen Neoplasien.

Die Lymphome werden nach ihrer Differenzierung (Vorläufer- oder reife Lymphome) und Linienzugehörigkeit (B- oder T-Zell-Lymphome) unterteilt.

1.4 Das System der B-Zellen

B-Zellen sind Teil der humoralen Antwort des spezifischen Immunsystems. Sie gehen aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks hervor und differenzieren sich zunächst antigenunabhängig in den primären lymphatischen Organen. Der entscheidende Schritt in der B-Zell-Entwicklung ist die Ausbildung eines membranständigen Rezeptors. Dieser besteht aus zwei schweren und zwei leichten Polypetidketten, die über Disuldfidbrücken zu einem Immunglobulin („Ig“) - Molekül verbunden sind. Jede Kette besitzt eine variable und eine konstante Region. Die variable Region beider Ketten ist für die Antigenspezifität verantwortlich. Die Antigenspezifität des Rezeptors wird über V-, D- und J-Gensegemente bestimmt. Bei dieser VDJ-Rekombination werden zuerst die V-, D- und J-Segmente der schweren Kette des B-Zell-Rezeptors (BCR) verknüpft, dann die V- und J-Segmente der leichten Kette. Danach werden die B-Zellen als immunkompetente, aber noch naive Lymphozyten in die Peripherie entlassen. Die zirkulierenden B-Zellen werden durch den Kontakt mit Fremdantigenen aktiviert. Bei der T-Zell-abhängigen Immunantwort wandern B-Zellen nach der Antigenaktivierung in die Primärfollikel der sekundären Lymphorgane ein. Durch die Bildung eines Keimzentrums, entwickelt sich aus dem Primärfollikel ein Sekundärfollikel (MacLennan 1994). Das Keimzentrum zeigt eine dunkle und eine helle Region (Kuppers 2005).

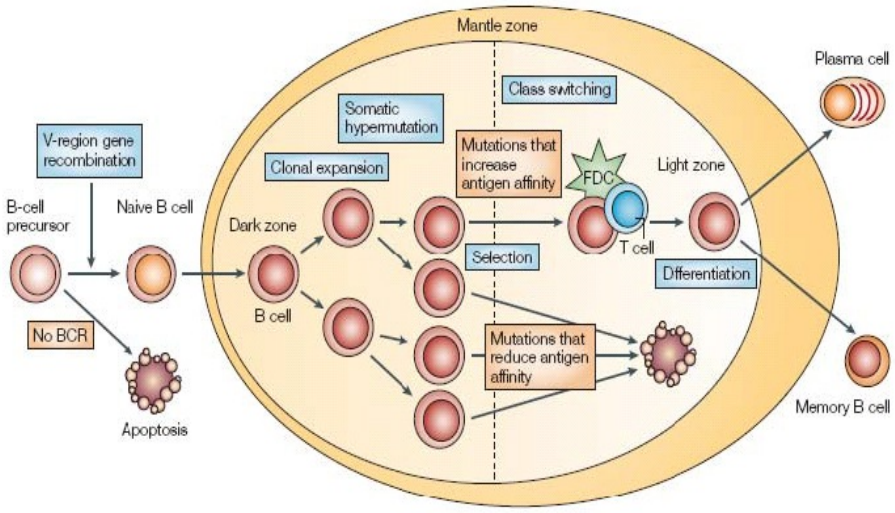


Abbildung 2: B-Zell-Differenzierung im Keimzentrum der Lymphknoten [entnommen von: Kuppers R: Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 5: 251-62, (2005); mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nat Rev Cancer].

In der dunklen Region finden die Proliferation und die somatische Hypermutation statt. Mittels somatischer Hypermutation wird die Antigenaffinität des B-Zell-Rezeptors optimiert. In der hellen Region werden B-Zellen mit niedrigaffinen Immunglobulinen negativ selektiert. Des Weiteren differenzieren sich in dieser Region die B-Zellen zu Plasmazellvorstufen und B-Gedächtniszellen.

Stimulation und Selektion der B-Zellen erfordert die Hilfe von T-Lymphozyten und follikulären dendritischen Zellen. Dennoch gibt es auch eine T-Zell-unabhängige Immunantwort außerhalb des Keimzentrums. Diese wird oft durch Bakterien und Viren aktiviert (Chiorazzi et al. 2005).

Viele B-Zell-Malignome finden in diesen Differenzierungs- und Aktivierungs-schritten ihren Ursprung, da die genomische DNA physiologisch manipuliert wird (Bruch, Mutation).

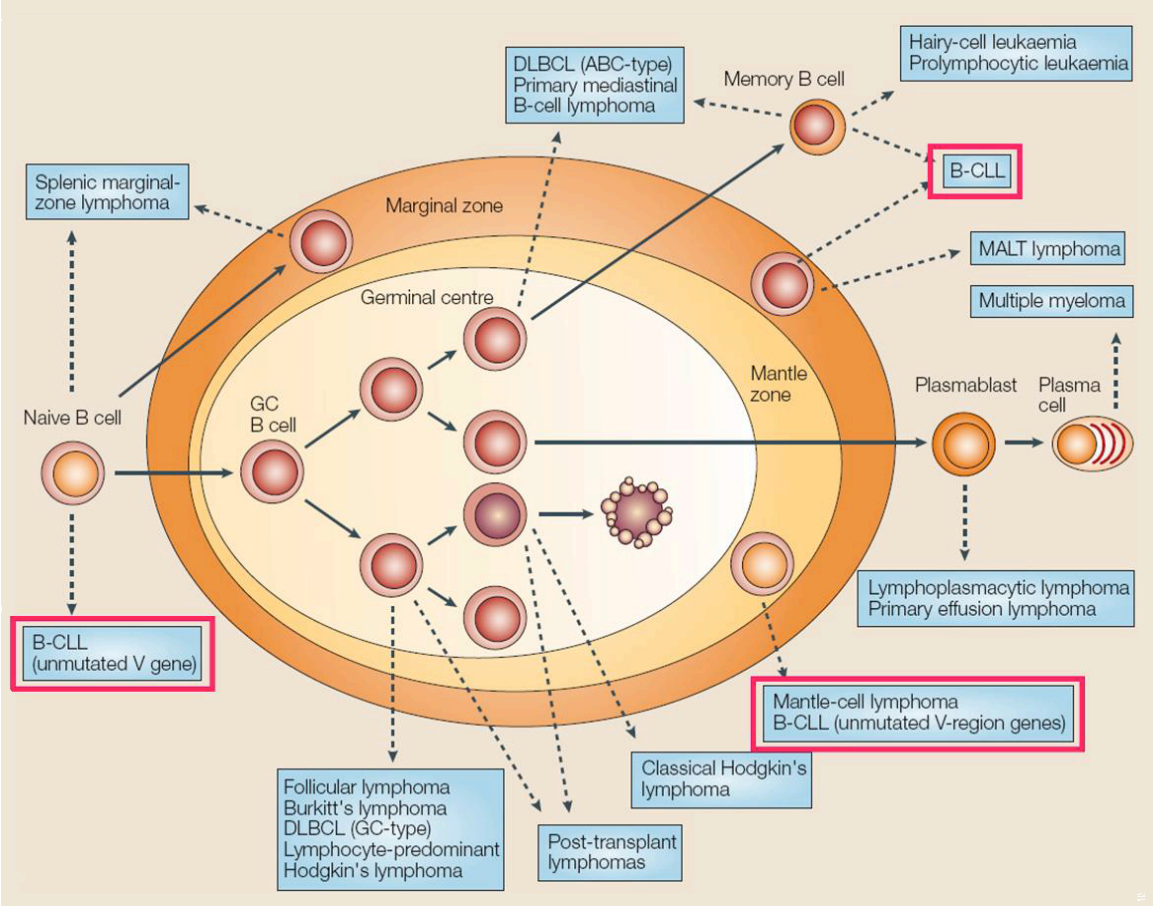


Abbildung 3: Zellulärer Ursprung der B-Zell-Leukämien und -Lymphome [entnommen von: Kuppers R: Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 5: 251-62, (2005); mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nat Rev Cancer]. Die potentiellen Entstehungsorte der chronisch lymphatischen Leukämie sind durch die roten Markierungen hervorgehoben.

1.5 Chronisch lymphatische Leukämie

Die chronisch lymphatische Leukämie gehört zu den Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zell-Reihe. Sie ist charakterisiert durch die Akkumulation von monoklonalen, immuninkompetenten B-Zellen in den Lymphknoten, im Knochenmark, in der Milz sowie im peripheren Blut (Ghia et al. 2007). Die CLL ist die häufigste Leukämieform des Erwachsenenalters in Nordamerika und Westeuropa (Dores et al. 2007). Die durchschnittliche Inzidenz beträgt 3 pro 100000 Einwohner pro Jahr, wobei Männer zweimal häufiger betroffen sind als Frauen (Dores et al. 2007). Das mediane Erkrankungsalter liegt bei circa 72 Jahren (Dores et al. 2007). Der

Pathomechanismus der CLL ist noch weitestgehend unbekannt, doch zeigt sich, dass die neoplastischen B-Zellen eine verlängerte Überlebenszeit aufweisen, welche viel mehr auf einer Akkumulation der B-Zellen als auf einer erhöhten Proliferationsrate beruht.

Der Krankheitsverlauf ist sehr heterogen und bei 50% der Patienten ein Zufallsbefund aufgrund erhöhter Lymphozytenzahlen, Leistungsminderung und Nachtschweiß. Vergrößerte Lymphknoten zeigen sich initial bei 50%, später bei allen Patienten (Binet et al. 1981, Chiorazzi et al. 2005, Hallek et al. 2008).

1.5.1 Stadieneinteilung der CLL

Klinisch hat sich die Stadieneinteilung nach Binet (Tabelle 1) durchgesetzt, die auf dem Lymphknotenstatus, der Thrombozytenzahl und dem Hämoglobingehalt beruht.

Tabelle 1: Stadieneinteilung der CLL nach Binet (Binet et al. 1981).

Stadium	Merkmale	Medianes Überleben (Jahre)
A	Hb > 10,0 g/dl, Thrombozyten > 100,000/µl, < 3 vergrößerte Lymphknoten	> 10
B	Hb > 10,0 g/dl, Thrombozyten > 100,000/µl, ≥ 3 vergrößerte Lymphknoten	5 bis 7
C	Hb < 10,0 g/dl, Thrombozyten < 100,000/µl, Lymphknotenstatus irrelevant	< 3

Eine weitere Stadieneinteilung wurde 1975 als RAI- Klassifikation (Tabelle 2) veröffentlicht.

Tabelle 2: Stadieneinteilung der CLL nach Rai (Rai et al. 1975).

Stadium	Merkmale	Medianes Überleben (Jahre)
0	Nur Lymphozytose	12,5
I	Zusätzlich Lymphknotenvergrößerung	8,5
II	Zusätzlich Hepato- u./o. Splenomegalie	6
III	Zusätzlich Anämie mit Hb < 11g/dl	1,5
IV	Zusätzlich Thrombozytopenie < 100,00/µl	1,5

Diese zwei Klassifikationssysteme lassen jedoch nur sehr ungenaue Aussagen über Krankheitsverlauf, Therapieansprechen und Überlebenszeit zu.

1.5.2 Prognostische Marker der CLL

Wie bereits oben erwähnt, sind die Überlebenszeiten der CLL-Patienten sehr variabel. Daher müssen weitere prognostische Marker für die CLL gefunden werden. Die Höhe des Serumspiegels der β_2-Mikroglobuline (Di Giovanni et al. 1989), der Thymidinkinase (Hallek et al. 1999, Kallander et al. 1984) und des löslichen CD23 korrelieren mit der Gesamttumormasse und ungünstigen Prognosen. Auch die LDH-Erhöhung, sowie die Expression von CD38 und der Tyrosinkinase ZAP-70 (Crespo et al. 2003) gelten als prognostisch ungünstig. Des Weiteren spielen der IGVH-Mutationsstatus (Damle et al. 1999, Hamblin et al. 1999, Krober et al. 2002) und die Zytogenetik (Dohner et al. 2000) für die Prognose eine wichtige Rolle.

1.5.3 Genomische Aberrationen und Genmutationen

Genomische Aberrationen kommen bei mehr als 80% der CLL-Patienten vor und haben einen sehr hohen prognostischen Stellenwert. Die häufigste Aberration ist die Deletion 13q14. Diese Region enthält die zwei mikroRNA Gene, mir-15a und mir-16-1, welche als Negativregulatoren von BCL-2 gelten und für die Induktion der Apoptose verantwortlich sind (Caligaris-Cappio and Ghia 2008).

Mit absteigender Häufigkeit treten Deletion 11q22-23, Trisomie 12q und Deletion 17p13 auf. Die betroffenen Loci beinhalten Onkogene und Tumorsuppressorgene wie zum Beispiel ATM in 11q22.3-q23.1 und TP53 in 17p13, welche die DNA Reparatur regulieren. Die Kenntnis der genomischen Aberrationen ist nicht nur für eine gezielte und individuelle Therapie wichtig, sondern gibt auch Auskunft über das mediane Überleben der Patienten. Die häufigste Deletion geht mit einem medianen Überleben von 133 Monaten einher (Dohner et al. 2000). Patienten mit einer 17p13 Deletion zeigen die kürzeste mediane Überlebenszeit von 32 Monaten (Dohner et al. 2000).

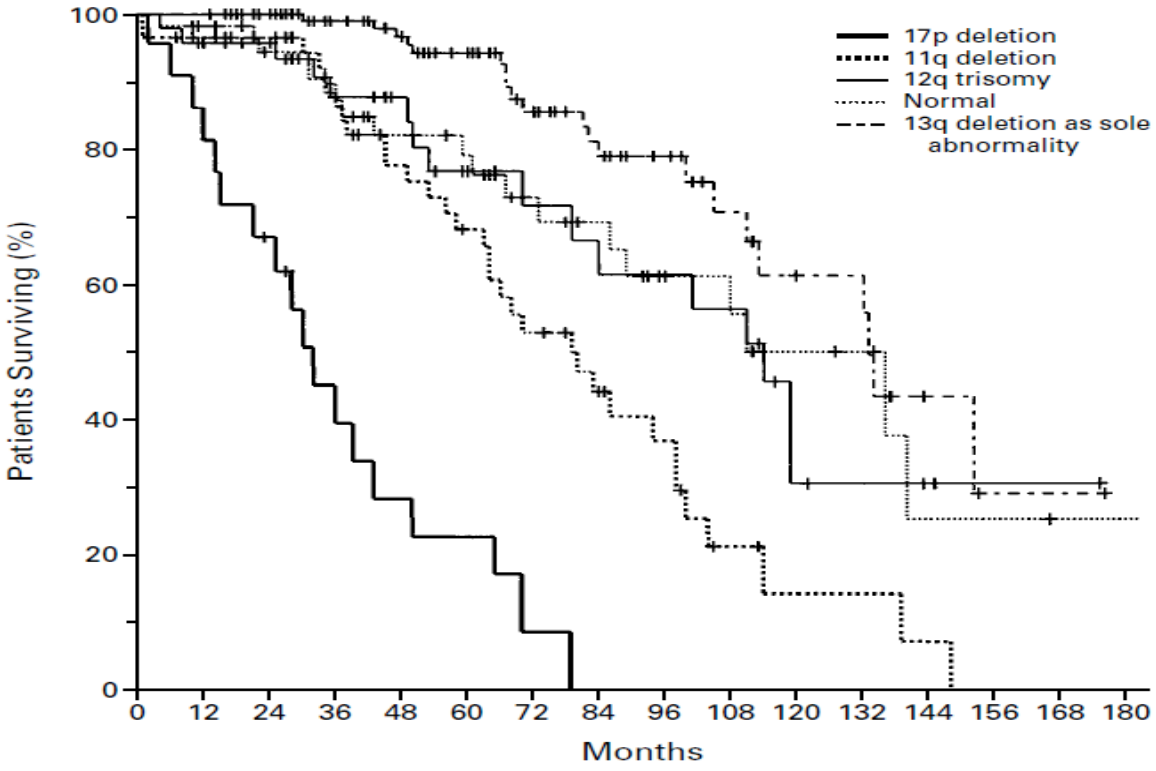


Abbildung 4: Kaplan Meier Diagramm: Das mediane Überleben der fünf häufigsten chromosomalen Subgruppen der chronisch lymphatischen Leukämie Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose [mit Genehmigung von: Dohner H: Genomic aberrations and survival in chronic lymphyocytic leukemia. *N Engl J Med* 343: 1910-6, (2000); Copyright Massachusetts Medical Society].

Wie bereits oben erwähnt, spielt auch der Mutationsstatus der schweren Immunglobulin Kette (IGHV) eine wichtige Rolle für die Prognose der CLL. Obwohl die IGHV-mutierten und -unmutierten Leukämiezellen die gleichen genomischen Abberation aufweisen, sind die chromosomalen Subgruppen mit schlechter Prognose bei den Patienten mit unmutierten IGVH-Status öfters vertreten (Dohner et al. 2000).

1.5.5 Die Bedeutung der Mikroumgebung in der CLL

Genetische und epigenetische Veränderungen führen zur Aktivierung und/oder Inaktivierung wichtiger Signalwege in der CLL. Zum Beispiel führen epigenetische Mechanismen wie Hypomethylierung oder genetischer Verlust der inhibierenden miRNAs miR15a/16-1 zu einer Aktivierung von anti-apoptotischen Genen wie BCL-2 (Caligaris-Cappio and Ghia 2008).

Collins und Kollegen konnten zeigen, dass die CLL-Zellen in vivo ein verlängertes Überleben aufweisen, wohingegen die CLL-Zellen in vitro schnell in Apoptose gehen (Collins et al. 1989).

Die Akkumulation der malignen B-Zellen ist der Hauptgrund für das verlängerte Überleben der Zellen, während die Proliferationsrate nur minimal erhöht ist (Caligaris-Cappio and Hamblin 1999, Kitada et al. 1998). Diese Apoptoseresistenz wird entscheidend durch Signale der Mikroumgebung gefördert (Panayiotidis et al. 1996).

Die Mikroumgebung unterstützt die CLL-Zellen direkt durch Zell-Zell-Interaktion, Antigenstimulation durch den B-Zell-Rezeptor und indirekt durch lösliche Faktoren. Wie bereits bei anderen hämatologischen Neoplasien bekannt, bildet auch die CLL eine spezielle Mikroumgebung im Knochenmark und den sekundären lymphatischen Organen aus, die die malignen Zellen vor Apoptose schützt. Dabei spielen die Interaktionen der CLL-Zellen mit den Stromazellen und den löslichen Faktoren der T-Lymphozyten eine sehr wichtige Rolle.

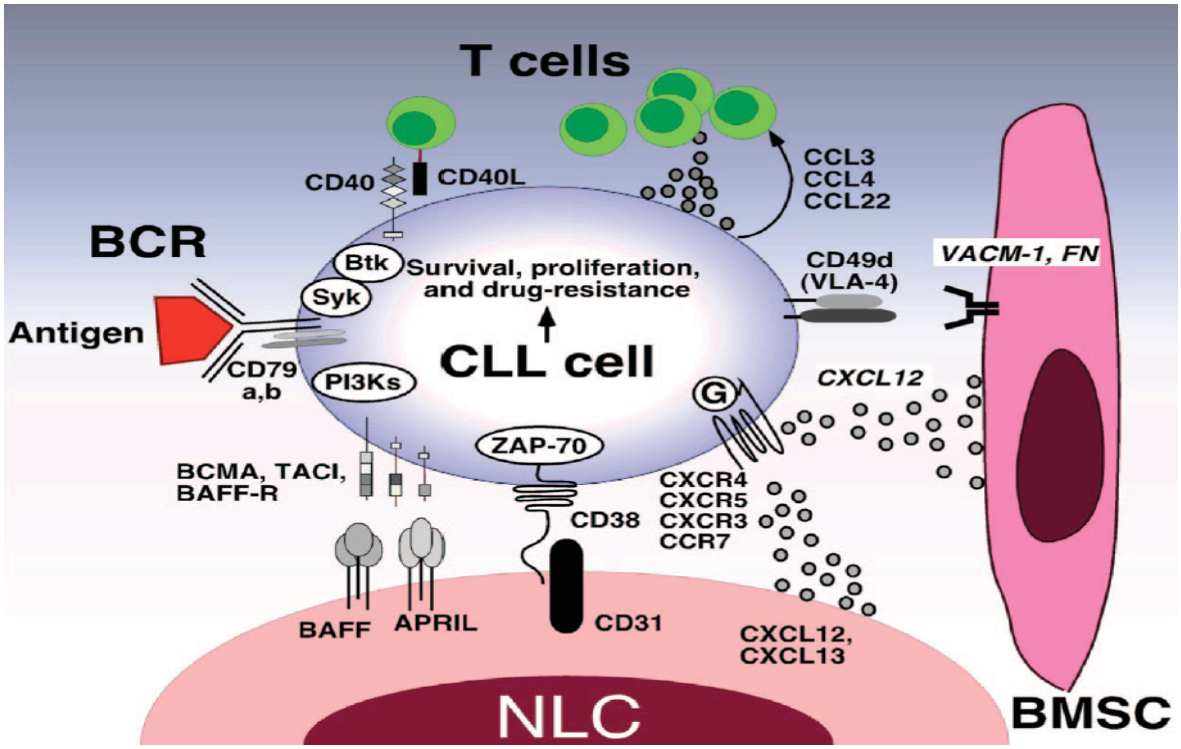


Abbildung 5: Molekulare Interaktion zwischen den CLL-Zellen und den Zellen des Knochenmarks und/oder der sekundär lymphatischen Organe [entnommen von: The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies, Burger JA, *Blood* 114: 3367-75, (2009); mit Genehmigung von Blood].

Stromazellen

Humane Stromazellen besitzen die Fähigkeit auch in vitro das Überleben der CLL-Zellen zu fördern (Panayiotidis et al. 1996). Die Interaktionen der Stromazellen mit den CLL-Zellen sind bidirektional und führen zu einer Aktivierung beider Zellarten. Dabei spielt das Chemokin der Stromazellen CXCL12, welches an den CXCR4-Rezeptor der CLL-Zellen bindet, eine entscheidende Rolle im Pathomechanismus der CLL. Im Knochenmark bilden Stromazellen spezielle Nischen, in welchen die CLL-Zellen stimuliert und vor Zytostatika geschützt werden (Burger 2011). Die Kokultur mit der HS-5-Stromazelllinie schützt die CLL-Zellen auch in vitro vor Apoptose (Burger et al. 2000, Seiffert et al. 2007). Bhattacharya et al. konnten weiterhin zeigen, dass die Stromazellen das Überleben der CLL-Zellen stärker fördern als das der nicht malignen B-Zellen (Bhattacharya 2010). Auch stellte sie fest, dass nicht nur die Kokultur mit Stromazellen das Überleben der malignen Zellen fördert, sondern dass auch die Kultivierung der CLL-Zellen im

konditionierten Medium der HS-5-Zellen das Überleben der malignen Zellen verlängert (Bhattacharya 2010).

Genexpressionsprofil

Um herauszufinden, welche Gene für das Überleben der CLL-Zellen in Kokultur und in konditioniertem Medium wichtig sein könnten, analysierte Bhattacharya außerdem die Genexpressionsprofile der CLL-Zellen in unterschiedlichen Kulturmedien. Primäre CLL-Zellen eines Patienten wurden in vier verschiedenen Bedingungen kultiviert: In Kokultur mit HS-5-Zellen und mit M2-10B4-Zellen, einer murinen Stromazelllinie, in konditioniertem Medium der HS-5-Zellen und in Standardmedium DMEM. Anschließend wurden die RNA-Profile mit Illumina Expressionsarrays zu unterschiedlichen Zeitpunken (0 Std. bis 48 Std.) gemessen (Bhattacharya 2010). Vergleicht man die Expressionsmuster der Gene in unterschiedlichen Kulturmedien, so können Unterschiede in der Expressionskinetik detektiert werden. Bhattacharya legte ihren Schwerpunkt vor allem auf Gene, welche durch Stimulation mit Stromazelllinien im Vergleich zu unstimulierten Bedingungen dereguliert waren. Bhattacharya analysierte und ordnete die Gene mit der unten genannten Rankingstrategie (Bhattacharya 2010).

(1) Deregulierte Gene: Die Standardabweichungen aller Zeitpunkte und Konditionen wurden summiert. Gene mit hoher Standardabweichung haben hohe Ränge.
(2) Es wurden nur Gene ausgewählt, die sich in beiden Kokulturen gleich verhalten. Die Standardabweichungen zwischen Kokultur mit humanen und mit murinen Zellen wurden summiert. Gene mit der kleinsten Summe erhielten einen höheren Rang.
(3) Deregulation durch Kokulturstimulation im Vergleich zu unstimulierter Kultur. Die Signale beider Kokulturen wurden berechnet und durch das Signal der DMEM Kultur geteilt. Gene mit einem höheren absoluten Ratio erhielten einen höheren Rang.

Die mit dieser Rankingstrategie ausgewählten Gene spielen möglicherweise eine wichtigere Rolle im Überleben der CLL-Zellen und sind daher Ausgangspunkt für viele Experimente in dieser Dissertation.

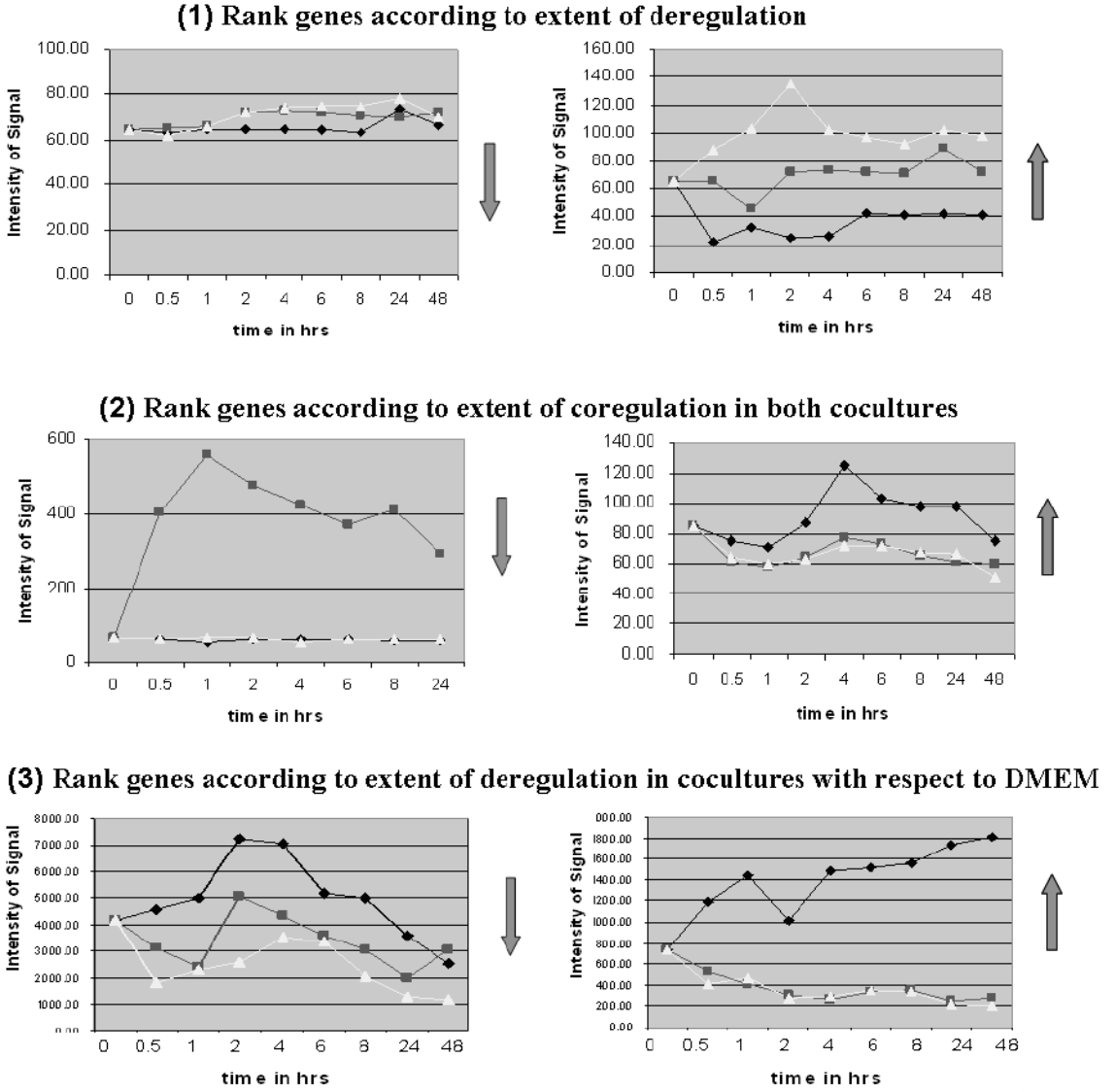


Abbildung 6: Rankingstrategie zur Identifizierung von potentielle pro-survival Genen der CLL-Zellen (Bhattacharya 2010).

In den Schritten (1), (2) und (3) sind rechts Gene dargestellt, die im Vergleich zu den linken Genen einen höheren Rang erhalten (angedeutet durch die Pfeilrichtung). Die unterschiedlichen Symbole reflektieren die Genexpressionsprofile der unterschiedlichen Kulturmedien: schwarze Karos = DMEM, graue Vierecke = HS-5-Kokultur, weiße Dreiecke = M2-10B4-Kokultur.

Liganden

Nicht nur Zell-Zell-Kontakte, sondern auch die Liganden der Mikroumgebung spielen eine wichtige Rolle für das Überleben der CLL-Zellen. Neben den pro-surival Faktoren BAFF (Nishio et al. 2005), APRIL (Nishio et al. 2005), PECAM1 (Deaglio et al. 2005), CXCL12/SDF-1 und CXCL13 von spezialisierten Zellen (Burger et al. 2000, Burkle et al. 2007), welche sich durch den Einfluss der CLL-Zellen aus $CD14^+$-Monozyten differenzieren (sogenannte „Nurse-like-Zelle“), spielen auch Zytokine der T-Zellen eine entscheidende Rolle.

Die Zahl der $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen ist bei unbehandelten CLL-Patienten erhöht (Rezvany et al. 2003). Zytokine der T-Zellen, die CLL-Zellen stimulieren, sind u.a. der Tumornekrosefaktor α, Interleukin 4, CD40 Ligand, Interferon α und Interferon γ (Buske et al. 1997, Fluckiger et al. 1992, Granziero et al. 2001, Kitada et al. 1999).

Nupur Bhatthacharya konnte in ihrer Dissertation zeigen, dass die Kombination der T-Zell-Liganden IL4 und CD40L den größten pro-survival Stimulus für die CLL-Zellen aufweist im Vergleich zu den Kombination SDF-1, BAFF und APRIL der Nurse-like-Zellen und der Stimulierung des BCR mittels IgM F(ab')2 Fragment (Bhattacharya 2010).

CD40L

$CD40L^+CD4^+$-T-Zellen kommen vermehrt im Knochenmark und in den Pseudofollikeln der Lymphknoten vor. Pseudofollikel sind Proliferationszentren, welche bei keiner anderen Lymphomart gefunden werden und daher spezifisch für die CLL sind (Granziero et al. 2001).

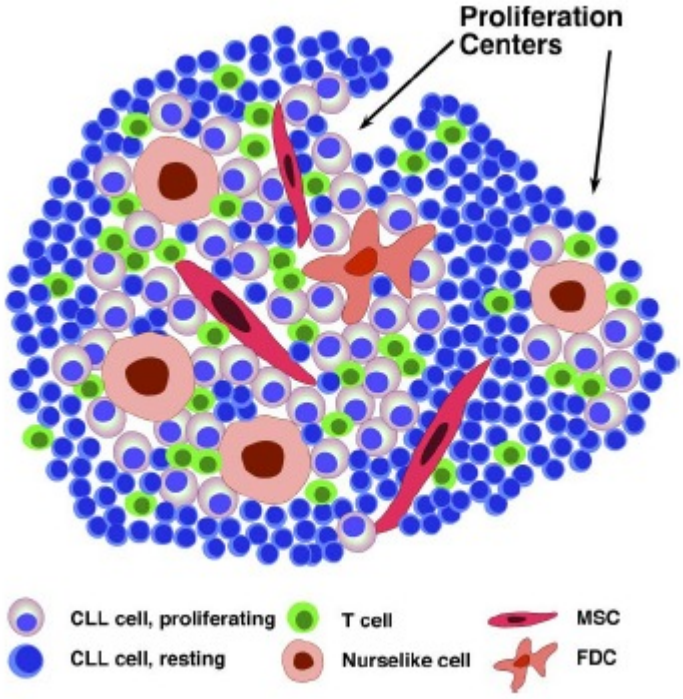


Abbildung 7: Proliferationszentren in Lymphknoten von CLL-Patienten. [entnommen von: The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies, Burger JA, *Blood* 114: 3367-75, (2009); mit Genehmigung von Blood]. In sekundärem lymphatischem Gewebe können CLL-Zellen mit verschieden Zellen, wie mesenchymale Fibroblasten (MSCs), T-Zellen und Nurse-like-Zellen, interagieren.

$CD40L^+CD4^+$-T-Zellen aktivieren durch den CD40-Rezeptor der CLL-Zellen anti-apoptotische Signalwege (Kitada et al. 1999, Stevenson and Caligaris-Cappio 2004). Während nicht maligne B-Zellen nur CD40-Rezeptoren besitzen, exprimieren CLL-Zellen sowohl Rezeptor als auch Ligand und erzeugen dadurch eine autokrine anti-apoptotische Schleife. Dabei wird unter anderem der anti-apoptotische Caspaseinhibitor Survivin induziert, der sich vermehrt in den Pseudofollikeln befindet (Granziero et al. 2001). Auch der anti-apoptotische NF-κB-Signalweg, der im Pathomechanismus der CLL eine wichtige Rolle spielt (s.u.), wird durch CD40L aktiviert und fördert dadurch das Überleben der CLL-Zellen (Hewamana et al. 2009).

IL4

Durch IL4 wird der PI3-Kinase-Signalweg aktiviert. Diese Aktivierung schützt die hämatopoetischen Zellen vor Apoptose und führt außerdem zu einer Erhöhung der anti-apototischen BCL-2-Familienmitglieder (Minshall et al. 1996). Die Reduktion der Apoptose und die Erhöhung der BCL-2-Expression wurde auch in CLL-Zellen nachgewiesen (Dyer et al. 1994, Kitada et al. 1998). Des Weiteren wurde in der Literatur mehrfach beschrieben, dass IL4 intrazelluläre Signalwege stimuliert, einschließlich der Aktivierung des STAT6-Signalwegs. Nach der Stimulierung wird STAT6 von der Jak-Kinase phosphoryliert und transloziert anschließend in den Zellkern, wo es die Transkription verschiedener Gene aktiviert (Keegan et al. 1994, Nelms et al. 1998).

1.5.6 Der NF-κB-Signalweg in der CLL

„Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“ ist ein kollektiver Name für eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, deren gemeinsames Merkmal die Rel-Homologie-Domäne ist. In humanen Zellen besteht diese Genfamilie aus c-Rel, RelB, p50, p52 und RelA (p65), welche im inaktivierten Zustand im Zytoplasma der Zelle vorliegen. Die Inaktivierung der Gene erfolgt über die Inhibitor-Proteine der IκB-Gruppe. NF-κB wird über viele Rezeptoren aktiviert. Diese Rezeptoren können in zwei Klassen eingeteilt werden.

1) Rezeptoren, welche nur den klassischen Weg des NF-κB-Signalwegs aktivieren
2) Rezeptoren, die sowohl den klassischen als auch den alternativen Weg stimulieren können.

Die erste Klasse enthält zum Beispiel den Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR), den Interleukin-1-Rezeptor (IL1R) und Mitglieder der Toll-like-Rezeptorfamilie (TLR). Der B-Zell-Rezeptor und der T-Zell-Rezeptor aktivieren ebenfalls den klassischen NF-κB-Signalweg. Zu der zweiten Klasse gehören unter anderem der Lymphotoxin-β-Rezeptor (LT-βR) und CD40. Der klassische Signalweg wird durch die Phosphorylierung von IκBα, welches an das zytosolische NF-κB gebunden ist, aktiviert. Die Phosphorylierung wird durch den IKK-Komplex, welcher aus IKK-γ und zwei katalytischen Untereinheiten, IKK-α und IKK-ß, besteht, durchgeführt. Diese Phosphorylierung führt zur Freisetzung des NF-κB-Heterodimer p50-RelA, welches in den Zellkern transloziert und Zielgene aktiviert. Der alternative

Signalweg wird durch TRAFs, NF-κB inducing kinase (NIK) und IKK-α kontrolliert. Die Aktivierung führt zu der Prozessierung von p100 zu NF-κB2, welches das Heterodimer p52-RelB bildet. Auch dieses Heterodimer migriert in den Zellkern. Im Zellkern kann NF-κB das Überleben der Zellen durch Induktion von Apoptoseinhibitoren verlängern (Siebenlist et al. 2005).

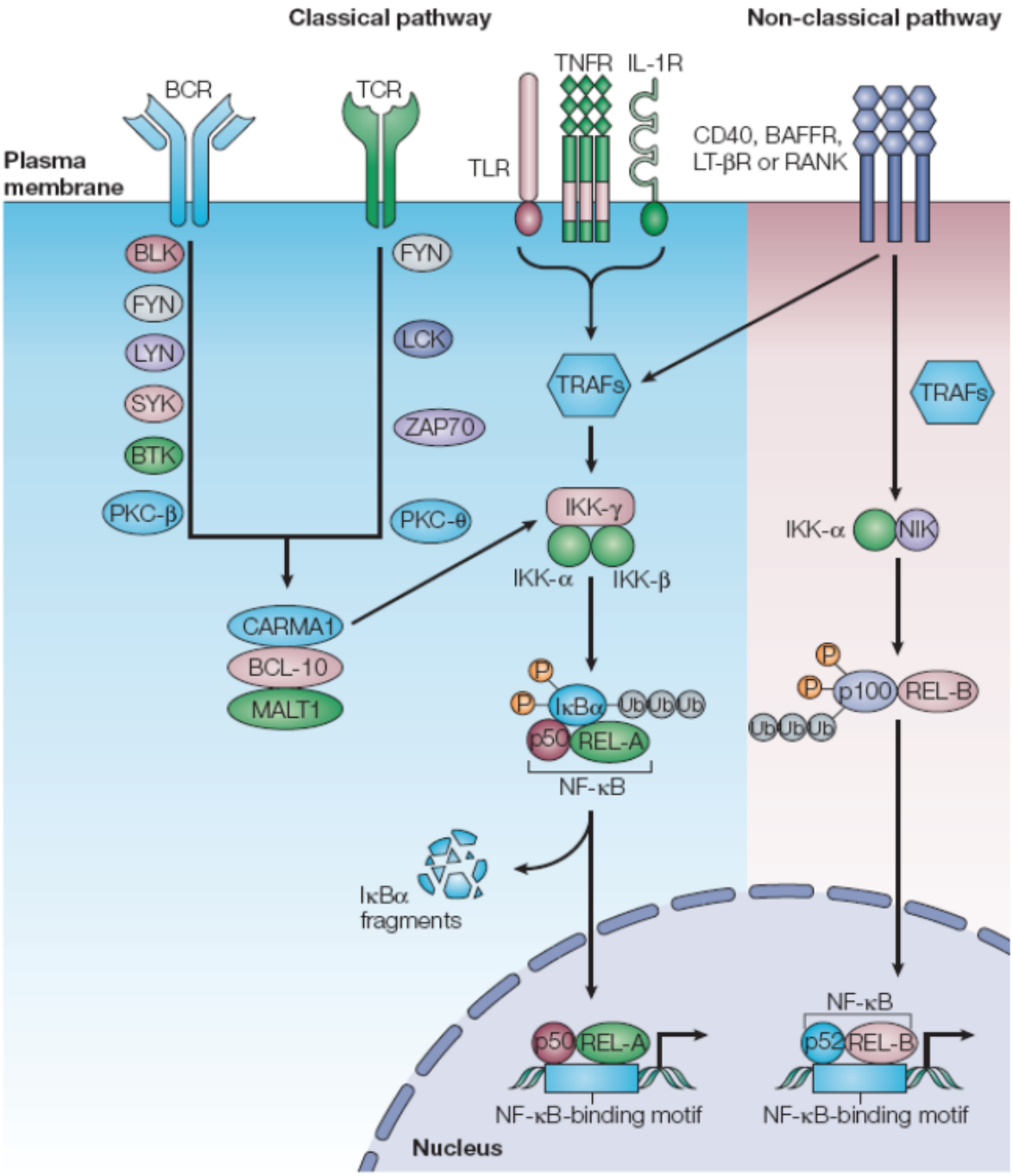


Abbildung 8: Signalwege der NF-kB-Aktivierung [entnommen von: Siebenlist U: Control of lymphocyte development by nuclear factor-κB. *Nat Rev Immunol* 5: 435-445, (2005), mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nat Rev Immunol].

1.5.7 Therapie der CLL

Im Gegensatz zu anderen Leukämien besteht die Therapieindikation bei der CLL nicht bei Erstdiagnose, sondern ist u.a. von der Klinik der Patienten abhängig (Hallek et al. 2008). Die Indikation für eine konventionelle Chemotherapie wird bei allen symptomatischen Patienten im Stadium B nach Binet und bei allen Patienten im Stadium C nach Binet gestellt. Dabei ist Chlorambucil die Standardtherapie bei Patienten über 65 Jahren. Purinanaloga wie z.B. Fludarabin sind indiziert bei Patienten unter 65 Jahren oder bei Versagen der Chlorambucil-Therapie. Bei jüngeren Patienten werden Fludarabinkombinationen empfohlen wie z.B. die FCR-Kombination (Fludarabin, Cyclophosphamid, Rituximab) (Stilgenbauer and Hallek 2013).

Jedoch gibt es keine Heilung unter der klassischen Chemotherapie und die Option der allogenen Stammzelltransplantation bleibt wegen der hohen therapieassoziierten Mortalität Hochriskiopatienten vorenthalten (Stilgenbauer and Hallek 2013). Daher ist es von großer Bedeutung weitere Therapiemöglichkeiten zu finden.

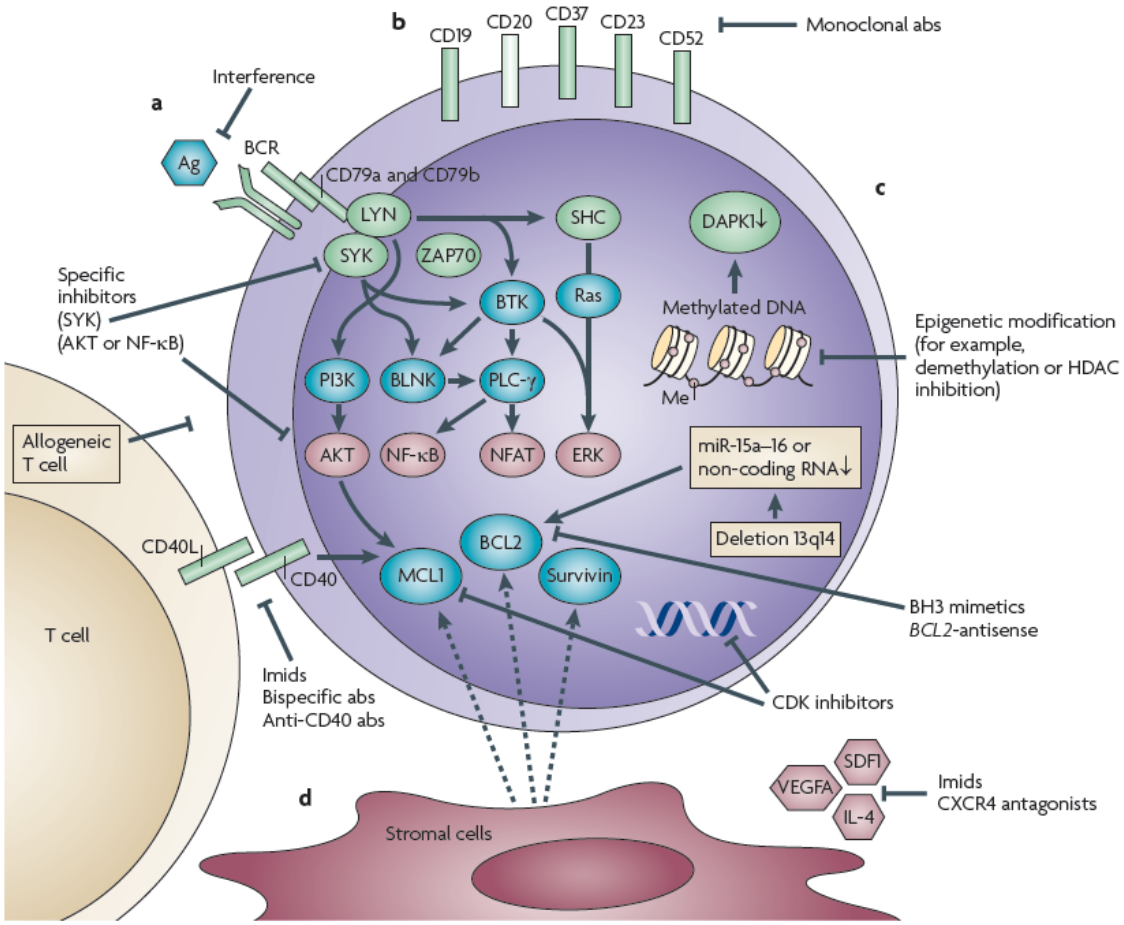


Abbildung 9: Pathomechanismus der chronisch lymphatischen Leukämie mit Beispielen für neue Therapieansätze [entnommen von: Zenz T: From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 10: 37-50, (2010); mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nat Rev Cancer]. Wichtige Angriffspunkte sind der BCR (a), multiple Epitope der CLL-Zellen (b), gemeinsame genetische Modifikationen (c) und die Interaktionen mit Stromazellen und T-Zellen (d).

Antikörper-basierte Therapie wie Alemtuzumab, ein Anti-CD52-Ak, wird bereits in der Rezidivtherapie eingesetzt (Abbildung 9b). Auch der BCR-Signalweg (Abbildung 9a) gilt als therapeutischer Ansatzpunkt für neue Therapiemöglichkeiten (Burger and Buggy 2013, Woyach et al. 2012). Zudem wird die Mikroumgebung immer mehr als Ansatzpunkt für neue Therapiemöglichkeiten angesehen (Burger 2011, Zenz, et al. 2010). Die CLL-Zell-Interaktionen mit den Stromazellen via Chemokin-Rezeptoren führen zu einer verlängerten Überlebenszeit der CLL-Zellen. Chemokin-Rezeptor-Antagonisten wie AMD3100,

welche in die CXCR4-CXCL12-Interaktion eingreifen, können das Überlebenssignal unterbinden (Pleyer et al. 2009). Auch Lenalidomid, die zweite Generation der immunmodulierenden Substanzen (IMids), wird bereits als first-line-Therapeutikum für das Multiple Myelom eingesetzt. Auch für die CLL laufen bereits klinische Studien der Phase II (Badoux et al. 2011). Lenalidomid hemmt pro-survival Zytokine wie TNFα, IL6, IL8 und VEGF, welche das Überleben und die Proliferation von Tumorzellen fördern (Anderson 2005, Marriott et al. 2003). Des Weiteren stimuliert Lenalidomid die Natürlichen Killerzellen und T-Lymphozyten und unterstützt dadurch die Immunität gegen die Tumorzellen (Corral et al. 1999).

Die Mikroumgebung bietet nicht nur neue Therapieansätze, sondern verstärkt auch die Therapieresistenz von BCL-2- und BCL-X-Inhibitoren um mehr als das 1000fache (Vogler et al. 2009). Vor allem der BCL-2-Inhibitor ABT-199 gilt als neues vielversprechendes Therapeutikum in der CLL (Souers et al. 2013). Dies alles zeigt, dass es von entscheidender Wichtigkeit ist, die Signalwege und Faktoren der Mikroumgebung weiter zu erforschen, um neue Therapiemöglichkeiten für die CLL-Patienten zu finden.

Neue Therapiemöglichkeiten mit Hilfe des Datenkollektivs „Connectivity Map“

Um neue Therapiemöglichkeiten zu finden, haben wir erneut mit den von Bhattacharya et al. erstellten Genexpressionsprofilen der CLL-Zellen in unterschiedlichen Kulturbedingungen (Einleitung 1.5.5) gearbeitet. Die Genexpressionsprofile, welche durch die Inkubation mit der Mikroumgebung dereguliert waren, wurden mit dem Datenkollektiv „Connectivity Map“ genauer untersucht.

Mit „Connectivity Map“ entwickelte Lamb et al. 2006 das erste Datenkollektiv, welches einen systematischen Zugang zu Genen, Krankheiten und Medikamenten bietet (Lamb et al. 2006). Es wurden verschiedene humane Zelllinien mit bioaktiven Substanzen und Medikamenten behandelt und anschließend das Genexpressionsprofil der Zelllinien erstellt. Diese Genexpressionsprofile wurden in dem Datenkollektiv „Connectivity Map“ abgelegt. Die aktuellste Version, Connectivity Map 02, enthält 1309 getestete Komponenten, welche in über 7000

Genexpressionsprofilen repräsentiert werden. Dieses riesige Datenkollektiv bietet uns die Möglichkeit eigene Genexpressionsprofile mit den abgelegten Genexpressionsprofilen zu vergleichen, um, auf einfache Art, Substanzen zu finden, welche eine therapeutische Rolle in der CLL spielen könnten.
Unsere Genprofile, welche in den CLL-Zellen durch die Inkubation mit der Mikroumgebung dereguliert waren, wurden mit den abgelegten Genexpressionsprofilen von Connectivity Map verglichen.
Es wurden nur bioaktive Substanzen ausgewählt, welche sich in ihrem Genexpressionsprofil komplementär zu dem pro-survival Genexpressionsprofil der CLL-Zellen in Kokultur verhalten. Man geht davon aus, dass diese Substanzen den pro-survival Effekt der Kokultur reversieren können.
Die Substanzen wurden von Irina Idler weiter untersucht. Dabei wurde nicht nur der Connectivity Map Score (for reverse gene-expression signature) herangezogen, sondern auch Kriterien wie die Pharmakokinetik, die Wirkungen und Nebenwirkungen der Substanzen. Weiter wurde untersucht, ob die Substanzen bereits als Therapeutikum eingesetzt werden. Anschließend wurden die Substanzen nach ihren Wirkungsklassen geordnet.
Dabei fällt auf, dass die meisten der ausgewählten Substanzen sieben Wirkungsklassen zuzuordnen sind.
Unter diesen Wirkungsklassen befinden sich unter anderem Herzglykoside, welche die Signalwege von PI3-K und BCL-2 beeinflussen (Newman et al. 2008, Xie and Cai 2003, Zenz et al. 2010). Auch Kinase-Inhibitoren, welche in den BCR-Signalkaskaden und im Zellzyklus involviert sind, tauchen vermehrt in den Analysen auf.
Diese ausgewählten Substanzen wurden nun im Hinblick auf Wirkung, Pharmakokinetik und Dosis-Wirkung-Korrelation weiter untersucht.

1.6 Fragestellung

Während die CLL-Zellen in vivo ein verlängertes Überleben aufweisen, gehen sie in vitro sehr schnell in Apoptose. Dies zeigt, dass die Apoptoseresistenz der CLL-Zellen durch die Signale der Mikroumgebung gefördert wird. Dabei spielen die Interaktionen der CLL-Zellen mit der humanen Stromazelllinie HS-5 und den löslichen Faktoren der T-Lymphozyten eine sehr wichtige Rolle.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten verschiedene Aspekte der Mikroumgebung untersucht werden.

Zuerst sollte die Rolle der Mikroumgebungsstimuli IL4 und CD40L auf das Überleben der CLL-Zellen und der nicht malignen B-Zellen untersucht werden.

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob der Knockdown von potentiellen pro-survival Genen zu einer Reduktion der Apoptoseresistenz der CLL-Zellen in Kokultur führt?

Abschließend sollte untersucht werden, ob neue pro-apototische Substanzen das Überleben der CLL-Zellen in Kokultur reduzieren können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Reagenzien	Anbieter
6-aminohexanoic acid	EMD Millipore, Billerica (USA)
7-AAD Staining Solution	BD Biosciences, San Jose (USA)
Ampuwa Aqua dest.	Fresenius Kabi, Bad Homburg (DE)
Annexin V PE	BD Biosciences, San Jose (USA)
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Merck, Darmstadt (DE)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
ECL detection reagent	GE Healthcare Life Science, München (DE)
EDTA GIBCO (0,5 M, pH 8)	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Ethanol (99,8%)	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
FACS Lysing Solution (10x)	BD Biosciences, San Jose (USA)
Fludarabin	Universitätsklinikum Ulm, Ulm (DE)
Glycerol Calbiochem	Merck, Darmstadt (DE)
HEPES-Buffer (1 M)	Biochrom AG, Berlin (DE)
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt (DE)
Kaliumdesoxycholat	Merck, Darmstadt (DE)
Kaliumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
MACS CD19 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (DE)
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
Milchpulver Blotting grade	Carl Roth, Karlsruhe (DE)

Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
PBS Dulbecco (1x)	Biochrom AG, Berlin (DE)
Proteaseinhibitorcocktail	Roche, Filderstadt (DE)
Trizma base (Tris base)	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)

2.1.2 Zellkulturmaterial

Material	Anbieter
25 cm^2 Nunclon treated flask	Nunc Thermo Fisher Scientific, Roskilde (DK)
75 cm^2 Nunclon treated flask	Nunc Thermo Fisher Scientific, Roskilde (DK)
175 cm^2 Nunclon treated flask	Nunc Thermo Fisher Scientific, Roskilde (DK)
Bicoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin (DE)
DMEM GIBCO	Life Technologies GmbH, Darmstadt (DE)
FBS SeraPlus special processed	PAN Technology, Carlstadt (DE)
Gewebekulturplatten 24-well	Greiner Bio-One, Kremsmünster (AU)
Gewebekulturplatten 48-well	Greiner Bio-One, Kremsmünster (AU)
Gewebekulturplatten 96-well	Greiner Bio-One, Kremsmünster (AU)
PBS Dulbecco (1x)	Biochrom AG, Berlin (DE)
Penicillin / Streptomycin 1000 Units	PAA Laboratories, Cölbe (DE)
5% Trypsin-EDTA GIBCO (10x)	Invitrogen, Karlsruhe (DE)

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Anbieter
Durchflusszytometrie	
Anti-CD19 (FITC)	BD Biosciences, San Jose (USA)
Anti-CD3 (PE)	BD Biosciences, San Jose (USA)
Anti-CD45 (FITC)	Beckman Coulter Co., Marseille (FR)
Anti-CD45 (PerCP)	Abcam, Cambridge (UK)
Anti-Rabbit IgG, F(ab´) Fragment	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)
STAT6 Antibody	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)
Phospho-STAT6 Antibody	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)
ELISA	
Anti-Rel Antibody	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz (USA)
Peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz (USA)
Western Blot	
β-Aktin	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz (USA)
Polyclonal, goat anti-rabbit Immunoglobulins / HRP	Dako Deutschland GmbH, Hamburg (DE)
STAT6 Antibody	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)
Phospho-STAT6 Antibody	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)

2.1.4 Liganden

Liganden	Anbieter
Recombinant human Interleukin 4 (IL4)	Peprotech, Hamburg (DE)
Recombinant human CD40 Ligand (CD40L)	Peprotech, Hamburg (DE)

2.1.5 Kits

Kit	Anbieter
AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit	Agilent Technologies, Böblingen (DE)
AllPrep DNA/RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden (DE)
Amaxa Human B-Cell Nucleofector Kit	Lonza, Basel (CH)
Bicoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin (DE)
Bradford Protein Assay	BioRad, München (DE)
SYBR Green (Absolute QPCR SYBR Green ROX Mix)	Thermo Scientific, Surrey (UK)

2.1.6 Puffer

ELISA			
	Dignam A	10 mM	HEPES pH 7,9
		1,5 mM	$MgCl_2$
		10 mM	KCl
		1Tbl.	Roche Proteaseinhibitor
			pro 10ml
	Dignam C	20 mM	HEPES pH 7,9
		1,5 mM	$MgCL_2$
		0,42 M	NaCl
		0,2 mM	EDTA
		25%	Glycerol
		1Tbl.	Roche Proteaseinhibitor
			pro 10ml
	Bindungspuffer	4 mM	HEPES pH 7,9
		8%	Glycerol
		5 mM	DTT
		0,2%	BSA
		40 µg/ml	salmon sperm DNA
	Verdünnungspuffer	10 mM	1 x PBS
		50 mM	NaCl
		1%	fettarme Milch
FACS			
	Annexin-binding Puffer	10 mM	HEPES ph 7,4
		2,5 mM	$CaCl_2$
		150 mM	NaCl

Sortierung			
	MACS Puffer	20 mM	EDTA
		5%	BSA
		10%	10x PBS
Lyse			
	RIPA Puffer	50 mM	Tris base pH 8,0
		1%	NP4O
		0,5%	Kaliumdesoxycholat
		0,1%	SDS
		150 mM	NaCl
		5 mM	EDTA
		1%	Glycerol
		2,5 mM	$MgCl_2$
		1 mM	Kaliumorthovanadat
Western Blot			
	Transferpuffer:Anode I	30 mM	Tris base, pH 10,4
		20%	Methanol
	Anode II	300 mM	Tris base, pH 10,4
		20%	Methanol
	Katode	25 mM	Tris base, pH 9,7
		24,7 mM	6-aminohexanoic acid
		20%	Methanol

2.1.7 andere Materialien

andere Materialien	Anbieter
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Life Sciences, München (DE)
Eppendorf Tube (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg (DE)
FACS Tube	BD Biosciences, San Jose (USA)
Falcon Polypropylene Conical Tube (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences, San Jose (USA)
MicroAmp 8-Cap Stripe	Applied Biosystems, Foster City (USA)
MicroAmp 8-Tube Stripe (0,2 ml)	Applied Biosystems, Foster City (USA)
MACS Separation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (DE)
MACS Separation Unit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (DE)
Nunc Streptavidin F96 white	Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
Nunc 96-well optical bottom plates	Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20x)	Life Technologies GmbH, Darmstadt (DE)
NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel	Life Technologies GmbH, Darmstadt (DE)
PVDF-Membran	Bio-Rad Laboratories, München (DE)
Spritze (1 ml) BD Plastipak	Becton Dickison Labware, Franklin Lakes (USA)
TruCOUNT Röhrchen	BD Biosciences, San Jose (USA)
Whatman Gel blot paper	GE Healthcare Life Sciences, München (DE)
Wasserbad Julabo SW20	Julabo, Seelbach (DE)
Uvette	Eppendorf, Hamburg (DE)

2.1.8 Geräte

Geräte	Anbieter
Durchflusszytomerie	
FACSCalibur	BD Biosciences, San Jose (USA)
Inkubator	
Incubator Hera cell 240	Heraeus, Hanau (DE)
Luminometer	
GloMax 96	Promega GmbH, Mannheim (DE)
Sunrise microplate reader	Tecan Group, Männedorf (CH)
Mikroskop	
464042-9903	Zeiss, Oberkochen (DE)
Nucleofector	
Nucleofector II AMAXA biosystems	Lonza, Basel (CH)
PCR System	
7900 HT fast real time PCR system	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Thermocycler Basic 96 SC-TCSQB	SensoQuest, Göttingen (DE)
Pipette	
Eppendorf Reference (0,5-10 µl)	Eppendorf, Hamburg (DE)
IBS Pipetboy acu	Integra Biosciences, Lanquart (CH)
Multipette	Eppendorf, Hamburg (DE)
Pipetman (2-20µl, 200-1000µl)	Gilson, Limburg (DE)
Pasteur Pipette 7ML	VWR, Darmstadt (DE)

Transferpette-8 (0,5-10 µl, 10-100 µl, 30-300 µl)	BRAND, Wertheim (DE)
Schüttler	
PHMT microtube thermoshaker	Grant, Cambridge (UK)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Spektrometer	
Nano drop ND -1000 Spektrometer	Thermo Fischer Scientific, Wilmington (USA)
Waage	
Sartorius universal	Sartorius, Göttingen (DE)
Sartorius BP1200	Sartorius, Göttingen (DE)
Zellzählgerät	
Vi-Cell XR	Beckman Coulter GmbH, Krefeld (DE)
Neubauer Bright-Line Zellkammer	Assistant, Sontheim (DE)
Zentrifuge	
Aircooled Microliter Centrifuge Z233M-2 (Angle Rotor 220.87V05)	Hermle, Wehingen (DE)
VWR Galaxy Mini Microcenrtrifuge	VWR, Darmstadt (DE)
Microtube Rotor	VWR, Darmstadt (DE)
Strib Tube Rotor	VWR, Darmstadt (DE)

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation und Aufbereitung von primären Zellen

Nach Einholung der Einwilligung (Zustimmung 96/08, http://www.uni-ulm.de/ethikkommission) wurde Peripherblut von CLL-Patienten und gesunden Spendern gesammelt. Es wurden nur Patienten mit normalem Karyotyp oder 13q Deletion ausgewählt. Keiner der ausgewählten Patienten hatte zuvor eine Therapie bezüglich der chronisch lymphatischen Leukämie erhalten. Die Isolation der mononukleären Zellen aus den Buffy Coats (PBMC) erfolgte nach dem Protokoll der BICOLL Gradientenzentrifugation der Biochrom AG. Nach der Isolation wurden ein Teil der Zellen entweder direkt für Experimente verwendet oder in DMSO-haltigem Medium in flüssigem Stickstoff konserviert. Die in flüssigem Stickstoff tief gefrorenen Proben wurden zur Aufbereitung in einem 37 °C warmen Wasserbad aus den zur Aufbewahrung verwendeten Eppendorf-Röhrchen gelöst und danach schonend unter Zugabe von Medium aufgetaut.

2.2.2 Magnetische Selektion der isolierten PBMCs

Die Selektion der Zellen erfolgte mit Hilfe von MACS CD19 microBeads von Milteny Biotec. Für die positive Selektion der $CD19^+$-Lymphozyten aus den PBMCs wurden die B-Zellen mit CD19 MicroBeads markiert. Anschließend wurden die Zellen auf eine MACS Separation LS Column geladen, welche in das magnetische Feld des MACS Separation Unit gebracht wurden. Während die CD19-markierten Zellen in den MACS Separation LS Columns verblieben, passierten die unmarkierten Zellen die Columns. Als nächsten Schritt wurden die Columns aus dem magnetischen Feld entfernt und die verbliebenen Zellen konnten als $CD19^+$-Fraktion eluiert werden. Die Reinheit der $CD19^+$-Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Die Reinheit betrug bei den CLL-Zellen ca. 95%, bei gesunden Spendern 97%.

2.2.3 Zellkultur

Die adhärenten Zelllinien HS-5 und M2-10B4 wurden in Zellkulturflaschen mit Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) unter Zusatz von 10% fetalem Rindserum (FBS) in einem Inkubator mit 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 10% CO_2 kultiviert. Soweit nicht anders angegeben, wurde ein Zusatz von 100 I.U. Penicillin und 100 µg Streptomycin pro ml Kulturmedium verwendet. Für die Experimente wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden einmal in PBS gewaschen. Das Lösen der adhärenten Zellen erfolge mit Hilfe von 0,5% Trypsin-EDTA in PBS. Anschließend wurden die Zellen in frisches, vorgewärmtes Medium aufgenommen.

2.2.4 Kokultur

Die Kokultivierung der CLL-Zellen mit der Stromazelllinie HS-5 schützt CLL-Zellen in vitro vor Apoptose. Für die Validierung des Genexpressionsprofils wurden die CLL-Zellen mit HS-5-Zellen kokultiviert. Nach Aussaat der HS-5-Zellen ($3x10^5$ HS-5-Zellen in 2 ml pro well) in einer 6-well Platte und Inkubation für 48 Stunden bei 37 °C und 10% CO_2 erfolgte die Zugabe von $1x10^6$ CLL-Zellen in 20 µl DMEM + 10% FBS pro Well. Das Lösen der CLL-Zellen von den adhärenten HS-5-Zellen erfolgte duch vorsichtiges Schütteln und Spülen. Für die Validierung des Genexpressionsprofil wurden die CLL-Zellen außerdem in einem konditioniertem Medium der HS-5-Zellen kultiviert. Die Produktion des konditionierten Mediums erfolgte durch die Kultivierung von HS-5-Zellen für vier Tage in einer großen Zellkulturflasche. Nach Abnahme des Überstands und Zentrifugation (4000rpm für 10 Minuten) wurden je 2 ml konditioniertes Medium 2,5 Stunden vor der Zugabe der CLL-Zellen ($1x10^6$ CLL-Zellen in 20 µl DMEM + 10% FBS) in einem Well angelegt und ebenfalls bei 37 °C und 10% CO_2 inkubiert.

2.2.5 Isolation und Umschreibung der RNA

Für die Realtime q-PCR wurde die cDNA der CLL-Zellen verwendet. Die Isolation erfolgte aus $1x10^5$ bis $1x10^7$ großen Zellpellets mit dem AllPrep DNA/RNA Mini Kit von Qiagen. Die Durchführung des Experiments entsprach dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll. Die RNA-Konzentration wurde mittels Spektrophotometrie detektiert. Dieses Verfahren beruht auf dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nM. Um die RNA anschließend in Einzelstrang cDNA umzuschreiben, wurde das AffinityScript QPCR cDNA Synthese Kit von Agilent Technologies verwendet. Das Verfahren wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.6 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts für Western Blot oder ELISA erfolgte mit dem Bradford Protein Assay von Bio-Rad Laboratories. 1 µl Protein wurde mit 800 µl destilliertem Wasser und 200 µl Bradford Reagenz gemischt. Nach Vortexen und Inkubieren (10 Minuten bei RT) wurden die Proben erneut gevortext und je 200 µl von jeder Probe auf eine 96-well Platte transferiert. Die Messung der Extinktion bei 562 nm erfolgte mit dem Photometer ELISA Sunrise Reader.
Für die Berechnung der absoluten Proteinkonzentration wurde in jedem Versuch eine Standardreihe mit der BSA Standard Dilution (0,625 µg/µl bis 10 µg/µl) bestimmt. Alle Proben wurden in Duplikaten bestimmt.

2.2.7 Real Time quantitative PCR

Neben der Vervielfältigung der DNA ermöglicht diese Methode die Quantifizierung der Nukleinsäuren. Für die Experimente wurde der Absolute QPCR SYBR Green ROX Mix von Thermo Scientific und ein 7300 Real-Time PCR System von Applied Biosystems verwendet. Die Quantifizierung der Nukleinsäuren erfolgte anhand des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green. Dieser Fluoreszenzfarbstoff lagert sich in die Doppelstrang DNA ein, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Die Zunahme der gefärbten Target-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Der PCR Reaktionsmix enthielt 10 µl SYBR Green, forward und reverse Primer mit einer Endkonzentration von 70 nM, 8 µl

Aqua dest. und 2 µl cDNA-Material, und einem Endvolumen von 20 µl. Die initiale Aktivierung der Enzyme erfolgte für 15 Min. bei 95 °C, es folgten 40 Denaturierungs-Zyklen von je 15 Sekunden bei 95 °C, anschließend fand für 30 Sekunden bei 60 °C das Annealing bzw. die Elongation statt. Am Ende jeder Extensionsphase wurde die Doppelstrang-spezifische Fluoreszenz gemessen. Um unspezifische PCR Produkte zu eliminieren kann nach abgelaufener PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchführt werden. Anhand dieser die Fragmentlänge und dadurch die Spezifität bestimmt werden kann. Für die Schmelzkurve wurde die Doppelstrang-DNA durch kontinuierliches Erhitzen denaturiert (15 Sekunden bei 95 °C, 15 Sekunden bei 60 °C und innerhalb 20 Minuten auf 95 °C) Anschließend wurde die Probe innerhalb von 15 Sekunden auf 4 °C herunter gekühlt.

Für die Fluoreszenzmessungen wurden zu Beginn der exponentiellen Phase die Ct-Werte bestimmt. Diese zeigen den Zyklus an, in dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt. Die Ct-Werte sind umgekehrt proportional zum Logarithmus der eingesetzten Menge. Die eingesetzte Menge wurde mit Hilfe einer Standardkurve berechnet.

Um die Expression verschiedener Gene besser miteinander vergleichen zu können, wurde die Genexpression auf zwei Housekeeping-Gene normalisiert: SDHA codiert die Subunit A des Succinat Dehydrogenase-Komplex und TBP codiert das TATA-Box Bindungsprotein.

Des Weiteren wurden alle Proben in Duplikaten gemessen, um mögliche Fehler zu reduzieren und die Reproduzierbarkeit zu sichern.

2.2.8 Transfektion

Die Transfektion der Zellen für die Knockdown Experimente erfolgte mit dem AMAXA Nucleofector Elektroporationsgerät von Lonza. Primäre CLL-Zellen wurden mit 2 µg siRNA und 100 µl AMAXA B-cell nucleofector solution in eine Tranfektionsküvette gebracht und mittels des Nucleofectors transfiziert. Den Herstellerangaben zufolge wurde die Kombination aus Transfektionsreagenz B und Transfektionsprogramm U-15 verwendet. Nach der Transfektion wurden die Zellen in 500 µl vorgewärmtem konditioniertem Medium von HS-5-Zellen resuspendiert und zu den HS-5-Zellen, welche bereits 24 Stunden zuvor auf einer 24-well Platte ($2x10^5$ HS-5-Zellen/well) ausgesät wurden, hinzugefügt.

2.2.9 Behandlung der B-Zellen mit IL4 und CD40L

Nach Aufbereitung (siehe 2.2.1) und Separation (siehe 2.2.2) der malignen und nicht malignen B-Zellen wurden die $CD19^+$-B-Zellen in DMEM + 10% FBS aufgenommen und gleichmäßig auf 6-well Platten verteilt. Zwei Wells der malignen und zwei der nicht malignen Zellen blieben unbehandelt, jeweils zwei weitere Wells wurden mit 150 nM CD40L per Well und zwei mit 0,4 pM IL4 per Well behandelt. Alle Zellen wurden für 1 Stunde bei 37 °C und 10% CO_2 inkubiert.

2.2.10 Proteinextraktion für ELISA und Western Blot

Zur Vorbereitung der Western Blot- und ELISA-Analysen wurden CLL-Zellen ausgesät und zentrifugiert (5 Minuten bei 1200 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in der 3-5fachen Menge Puffer (Dignam A und C Puffer für ELISA, RIPA Puffer für Western Blot) aufgenommen und für 15 Min. auf Eis gekühlt. Die mechanische Lyse erfolgte mit Hilfe einer Spritze. Das Lysat wurde für 10 Min. bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde zur weiteren Analyse bei -80 °C flüssigem Stickstoff über Nacht gelagert. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation bei 4 °C für 45 Min. und anschließend die Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 Min. bei 4 °C.

2.2.11 Western Blot

Die Messung des TotalSTAT6- und des pSTAT6-Levels erfolgte mittels Western Blot.

Für jede Probe wurden 15 µg Protein mit der fünffachen Menge Ladefarbstoff gemischt und anschließend für 10 Minuten bei 70 °C denaturiert. Die Proteingemische wurden auf ein 4-12%iges Bis-Tris Gel mit MOPS Runningpuffer geladen und entsprechend ihrer Größe bei 150 V für 90 Minuten aufgetrennt. Nach der Gelelektrophorese erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran mit einer Stromstärke von 120 mA. Während die Wattman-Papiere in drei verschiedenen Puffersystemen, Anode I, Anode II und Katode, befeuchtet wurden, wurde die PVDF-Membran für die Äquilibrierung 15 Minuten in Methanol, danach 2 Minuten in Aqua dest. und 5 Minuten in Anode I aktiviert. Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurde die Membran in einer

Mischung aus PBST (PBS + 0,05% Tween20) und 5% Milchpulver über Nacht bei RT auf einem Schüttler (40 rpm) geblockt. Die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper, welcher in PBST + 3% Milchpulver verdünnt war, erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Rollmischer. Nach dreimaligem Waschen erfolgte eine 40minütige Inkubation bei RT mit einem 1:4000 verdünnten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Nach viermaligem Waschen wurde pro Membran 1 ml der ECL detection Lösung für 1 Minute aufgetragen und die Lumineszenz wurde in Filmkassetten auf den Film übertragen.
Die Expositionszeit der Filme war abhängig von der Intensität des Signals.
Zur Ladekontrolle diente die Analyse der ß-Aktin-Fraktion.

2.2.12 ELISA

Für die ELISA Experimente wurden Streptavidin-gecoateten 96-well Platten verwendet, welche mit 2 pmol Oligonukleotide des Wildtyps oder der Mutante von NF-κB für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert wurden. Nach zweimaligem Waschen mit PBS + 1% Tween-20 und einmaligem Waschen mit PBS wurde jedes Well mit 20 µl Proteinextrakt und 30 µl Bindungspuffer befüllt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (200 rpm) inkubiert. Danach erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS + 1% Tween-20.
Nach einstündiger Inkubation mit 100 µl des anti-RelA Antikörpers, welcher 1:500 mit Verdünnungspuffer verdünnt wurde, und erneutem Waschen mit PBS + 1% Tween-20, wurden 100 µl des Peroxidase-konjugierten Goat Anti-Rabbit IgG im Verhältnis 1:1000 jedem Well beigefügt und bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert. Die Messung der NF-κB Aktivität erfolgte mittels eines Luminometers (GloMax 96, Promega GmbH). Als Reagenz wurden 100 µl der ECL detection Lösung jedem Well beigefügt und nach 5 Sekunden wurde die Aktivität gemessen.

2.2.13 Behandlung von primären CLL-Zellen mit verschiedenen Substanzen

Primäre CLL-Zellen und nicht maligne B-Zellen wurden mit der humanen Stromazelllinie HS-5 kokultiviert um in vitro eine möglichst ähnliche Mikroumgebung zu simulieren. $2{,}5 \times 10^5$ HS-5-Zellen in 300 µl DMEM + 10% FBS

pro Well wurden einen Tag vor Beginn des Experiments ausgesät. Nach Aufarbeitung der lebendig eingefrorenen Zellen und der Zugabe von je $3x10^5$ Zellen in 10 µl DMEM + 10% FBS per Well erfolgte die Inkubation der Kokultur für drei Tage bei 37 °C und 10% CO_2. Am dritten Tag fand die Applikation der Substanzen statt. Die Kokultur wurde mit sechs verschiedenen Verdünnungsstufen der Substanzen behandelt (Tabelle 3). Für die Verdünnung wurde DMEM + 10% FBS benutzt. Nach weiteren zwei Tagen Inkubation unter den gleichen Bedingungen fand die Messung der Viabilität der Zellen mittels Durchflusszytometrie statt.

Tabelle 3: Konzentrationen der applizierten Substanzen.
Für jede Substanz wurden sechs Verdünnungsstufen getestet.

Substanzen	Konz. 1	Konz. 2	Konz. 3	Konz. 4	Konz. 5	Konz. 6
Substanz 1	4 µM	1,33 µM	0,44 µM	0,15 µM	0,05 µM	0,02 µM
Substanz 2	4 µM	1,33 µM	0,44 µM	0,15 µM	0,05 µM	0,02 µM
Substanz 3	10 µM	3,33 µM	1,11 µM	0,37 µM	0,12 µM	0,04 µM
Substanz 4	5 µM	1,67 µM	0,56 µM	0,19 µM	0,06 µM	0,02 µM
Fludarabin	10 µM	3,33 µM	1,11 µM	0,37 µM	0,12 µM	0,02 µM

2.2.14 Whole Blood Assay

Die Wirksamkeit der Substanzen im Hinblick auf das Überleben der Zellen im peripheren Blut wurde anhand der absoluten Zellzahlen mit Hilfe des Whole Blood Assay ermittelt.

Die Berechnung der absoluten Zahl an Zellen fand mittels TruCOUNT System von BD Biosciences statt. Jedes TruCOUNT Röhrchen enthält eine spezifische Anzahl an Mikropartikeln (beads), welche sich in Flüssigkeiten lösen und in der Durchflusszytometrie detektiert werden können. Mit Hilfe dieser Mikropartikel kann die absolute Zahl der B-Zellen in einem Röhrchen berechnet werden.

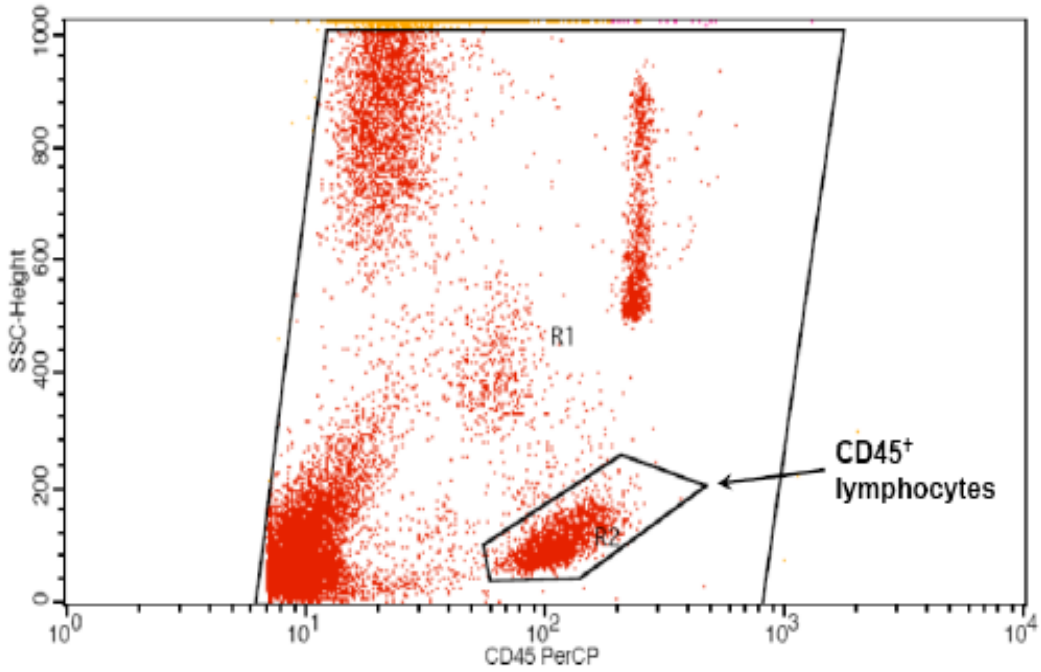
2.2.14.1 Vorbereitung der Proben für die Durchflusszytometrie

In ein TruCOUNT Röhrchen wurden je 10 µl von CD45 PerCP, CD19 FITC und CD3 PE Antikörper pipettiert. Anschließend wurde jedem Röhrchen 50 µl Blut beigefügt. Das Blut war zuvor, aufgrund der hohen Zellzahlen, 1:10 mit PBS verdünnt worden. Nach kurzem Vortexen (2 Sekunden) und Inkubation von 15 Minuten bei RT im Dunkeln wurden 450 µl FACS Lysepuffer hinzugefügt. Nach erneutem Vortexen wurde das Überleben der Zellen mit der Durchflusszytometrie gemessen. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

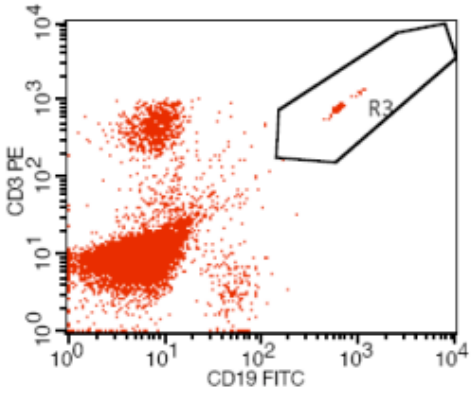
2.2.14.2 Analyse der Proben mit der Durchflusszytometrie

Für die Analyse wurde ein CD45 vs. Side Scatter (SSC) Diagramm mit zwei Gates angelegt (Abb. 10 a)). Gate R1 entspricht allen Lymphozyten, Gate R2 allen $CD45^+$-Lymphozyten.

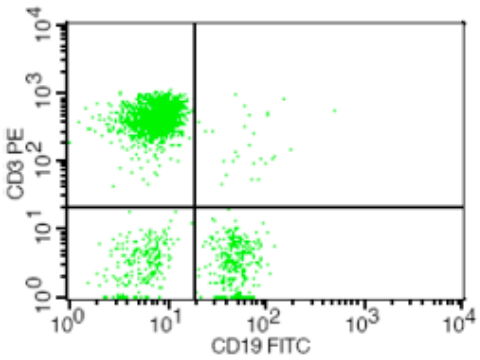
Die genauere Betrachtung der $CD45^+$-Zellen erfolgte in einem weiteren CD3 vs. CD19 Diagramm mit einem Gate R3 (Abb 10 b)). Laut Protokoll entspricht das R3 Gate den Mikropartikeln (beads). Die Durchflusszytometriemessung stoppte, sobald das Gerät 1000 Mikropartikel im R3 Gate gezählt hatte. Auch die Lymphozyten wurden in einem weiteren CD3 vs CD19 Diagramm genauer analysiert (Abb. 10 c)). Dabei entspricht der untere rechte Quadrant, welcher $CD19^+$-und $CD3^-$-Zellen beinhaltet, den B-Zellen.



a) CD45 vs. SSC Diagramm mit Lymphozyten Gate (R1) und $CD45^+$-Zellen Gate (R2)



Region	Events	% Gated	% Total
R1	40459	100.00	94.13
R3	1000	2.42	2.28
R2	2022	5.00	4.70



Quad	Events	% Gated	% Total
UL	1503	74.33	3.50
UR	27	1.34	0.06
LL	220	10.88	0.51
LR	272	13.45	0.63

b) CD3 vs. CD19 Diagramm der $CD45^+$-Zellen mit dem TruCOUNT Bead Gate (R3) und Region- und Quadrantstatistiken

c) CD3 vs. CD19 Diagramm aller Lymphozyten mit Region- und Quadrantstatistiken

Abbildung 10: B-Zell-Analyse mittels Durchflusszytometrie.

Subfiguren (a)-(c) zeigen verschiedene Gates und Statistiken.

R1: CD45 Gate, R2: Lymphozyten Gate, R3: TruCOUNT Bead Gate

2.2.14.3 Berechnung der absoluten Zahl der B-Zellen

Um die absolute Zahl der B-Zellen zu berechnen wurde die Zahl der $CD19^+$-und $CD3^-$-Zellen, durch die Beads dividiert, anschließend mit der TRuCOUNT Beadzahl multipliziert und durch das getestete Blutvolumen dividiert.
Die TruCount Beadzahl ist für alle Röhrchen aus einem Lot konstant und auf der Packung vermerkt.

2.2.15 Durchflusszytometrie

Viele Analysen dieser Arbeit erfolgten mittels Durchflusszytometrie. Unter anderem die Analysen der Viabilität der CLL-Zellen nach Transfektion und Applikation von Substanzen, die Berechnung der Dosis-Wirkung-Kurven der Zellen nach Applikation von Liganden sowie die Berechnung des pSTAT6-Levels nach Stimulation mit IL4.

2.2.15.1 Berechnung der Viabilität nach Transfektion

Um die Viabilität der CLL-Zellen nach Transfektion zu analysieren, erfolgte nach Entnahme der Zellen die Mischung mit 2 ml Annexin-Bindungspuffer und die Überführung in ein FACS Röhrchen. Nach der Zentrifugation, 5 Minuten bei 1200 rpm, wurde der Überstand verworfen und die CLL-Zellen wurden mit 100 µl ABP, 20 µl CD19 APC, 10 µl Annexin V PE und 10 µl 7-AAD für 20 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach Waschen und erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die CLL-Zellen wurden in 200 µl ABP aufgenommen und mittels Durchflusszytometrie gemessen.
Die CD19 APC Färbung ermöglichte es die B-Zellen von den HS-5-Zellen zu unterscheiden. Annexin V PE diente als Marker für die frühe Apoptose, 7-AAD für die späte Apoptose. Das prozentuale Überleben wurde mit den $CD19^+$-, 7-AAD- und Annexin V-negativen Zellen berechnet.

2.2.15.2 Analyse der Viabilität nach Applikation der Substanzen

Die Messung der Viabilität der CLL-Zellen nach Applikation unterschiedlicher Substanzen fand mittels 96-well FACS statt. Zuerst wurden die Zellen von der 48-well Platte auf eine 96-well Platte überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1200 rpm wurde der Überstand verworfen und die Zellen wurden in 150 µl ABP aufgenommen. Nach einmaligem Waschen und Inkubation der Zellen mit 50 µl ABP, 2,5 µl CD45 FITC, 1,5 µl Annexin PE und 1,5 µl 7-AAD für 15 Minuten bei Dunkelheit und RT wurden die Zellen erneut gewaschen und für die Analyse in 100 µl ABP aufgenommen. Für die Bestimmung der Apoptose wurden die $CD45^+$-, 7-AAD- und Annexin V-positiven Zellen gemessen.

2.2.15.3 Bestimmung des pSTAT6-Levels

Nach einstündiger Inkubation der CLL-Zellen mit IL4 wurde das pSTAT6-Level mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Nach Aufnahme der Zellen in 500 µl PBS + 3,7% Formaldehyd, Fixierung der Zellen für 10 Minuten bei 37 °C und einminütiger Lagerung der Proben auf Eis, erfolgte die Permeabilisation mit 4,5 ml Methanol für 30 Minuten auf Eis. Nach zweimaligem Waschen mit Inkubationspuffer wurden die Proben in 100 µl Inkubationsbuffer aufgenommen und 10 Minuten bei RT inkubiert. Danach folgte die Zugabe von 1 µl pSTAT6-Antikörper per Well und die erneute Inkubation für eine Stunde. Anschließend wurde jede Probe mit 1,5 µl des sekundären Antikörpers (Anti-Rabbit IgG) und 1500 µl Puffer für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen und Aufnahme der Pellets in 500 µl Inkubationspuffer fand die Analyse des pSTAT6-Levels der unstimulierten und IL4-stimulierten CLL-Zellen mittels Durchflusszytometrie statt.

2.2.16 Statistische Analyse

Für die Berechnung und Darstellung der Graphiken wurden die Programme Microsoft Excel (Microsoft Office Excel 2003), GraphPad Prism Version 3.0 (GraphPad Software, San Diego, Californien, USA), SigmaPlot Version 11.0 (SigmaPlot, SPSS Science Software GmbH, Erkrath, Deutschland) und Cluster and TreeView Version 1.6 (Cluster and TreeView Software, Stanford University, California, USA) verwendet. Alle Proben wurden als Duplikate angelegt und gemessen. In den Diagrammen werden die Mittelwerte der Daten ± Standardabweichung dargestellt. Für die Berechnung der Signifikanz zweier Verteilungen, zum Beispiel unbeeinflusst und beeinflusst, wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test angewendet. Um mehr als zwei Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurde der Kruskal-Wallis Test mit dem Dunn's Multiple Comparison Test verwendet.

Bei einem Wert von $p < 0,05$ wurden die Unterschiede als statisch signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

Die Interaktion der CLL-Zellen mit ihrer Mikroumgebung ist ein entscheidender Faktor für die Apoptoseresistenz der malignen B-Zellen. Obwohl bereits Signalwege, Gene und lösliche Faktoren bekannt sind, die bei der Apoptose in CLL-Zellen dereguliert sind, ist es weiterhin essentiell den Einfluss der Mikroumgebung in diesem Krankheitsbild zu erforschen. Dabei spielen vor allem die Zell-Zell-Interaktionen mit den Stromazellen sowie die indirekte Stimulierung der CLL-Zellen durch die T-Zell-Liganden IL4 und CD40L eine entscheidende Rolle.

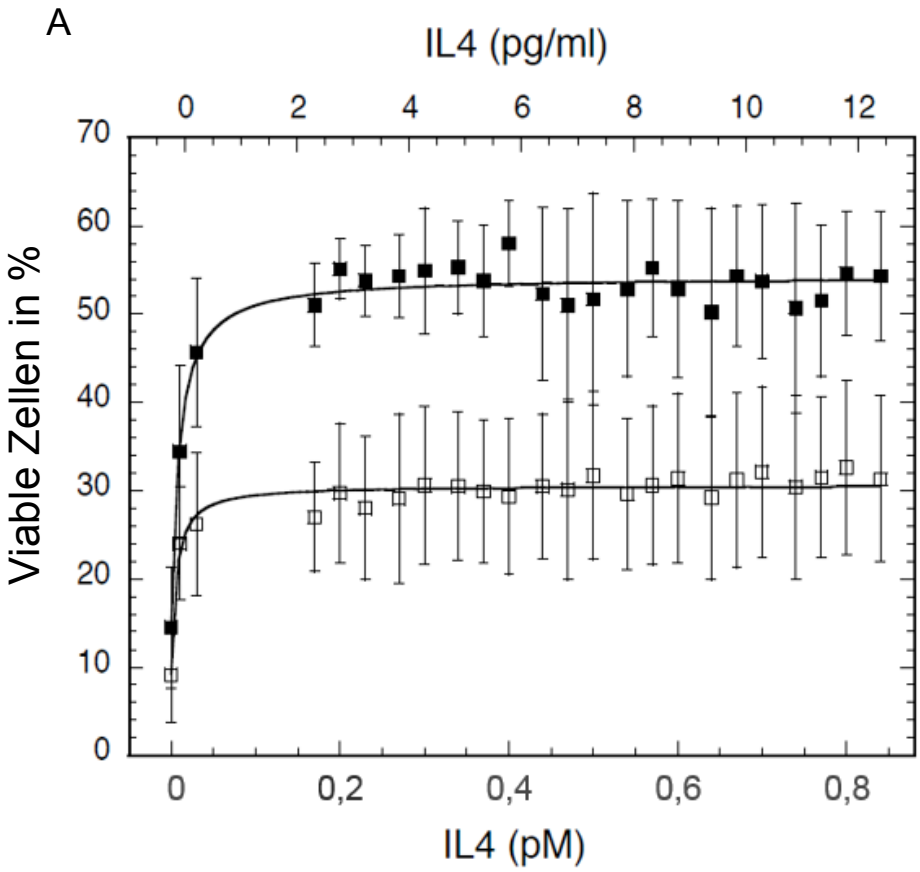
3.1 Die Rolle von IL4 und CD40L für ihre Mikroumgebung

Nicht nur die Zell-Zell-Interaktionen, sondern auch indirekte Stimulation durch Liganden unterstützt das Überleben der CLL-Zellen in ihrer Mikroumgebung. Wie in der Einleitung beschrieben konnten Bhattacharya et al. zeigen, dass vor allem die Stimulation durch IL4 und CD40L die CLL-Zellen vor Apoptose schützen kann.
In den folgenden Experimenten wurde nun untersucht, ob maligne und nicht maligne B-Zellen durch Stimulation gleichermaßen vor Apoptose geschützt werden oder ob sich die Kinetiken der Überlebenskurven unterscheiden. Des Weiteren bestand großes Interesse darin, die Signalwege der Liganden zu identifizieren, welche für das Überleben der CLL-Zellen von Bedeutung sein könnten.

3.1.1 Die Wirkungskurven weisen Unterschiede zwischen den malignen und den nicht malignen B-Zellen auf

In den ersten Experimenten wurde untersucht, ob nach Stimulation mit IL4 und CD40L Unterschiede im Überleben von nicht malignen und malignen B-Zellen zu sehen sind.

Viable eingefrorene B-Zellen von drei CLL-Patienten und drei gesunden Spendern wurden aufgetaut und anhand ihres Oberflächenmarkers CD19 separiert. Anschließend wurden je $3x10^5$ $CD19^+$-Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen von IL4 und CD40L behandelt. Die Überlebensraten der B-Zellen wurden nach vier Tagen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Für die Berechnung der prozentualen Überlebensrate wurden die toten Zellen mit 7-AAD angefärbt.



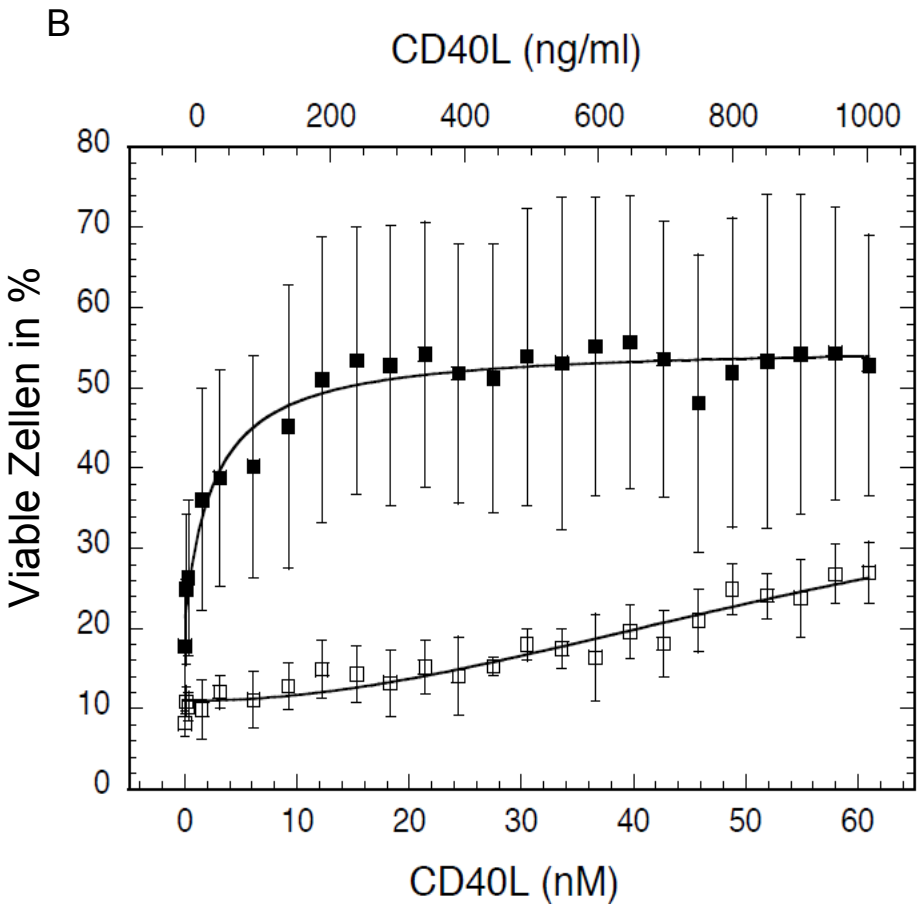


Abbildung 11: Maligne Zellen reagieren stärker auf IL4 (Interleukin 4) und CD40L (CD40 Ligand) als nicht maligne B-Zellen.

$CD19^+$ malignen und nicht maligne B-Zellen von jeweils drei Spendern wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL4 (A) und CD40L (B) behandelt. Der prozentuale Anteil der toten Zellen (7-AAD-positive Zellen) wurde vier Tage nach Stimulation mittels Durchflusszytometrie gemessen. Schattierte Vierecke = maligne Zellen, unschattierte Vierecke = nicht maligne B-Zellen.

Wie die Abbildungen deutlich zeigen, überleben die CLL-Zellen durch die Ligandenbehandlung besser als die nicht malignen B-Zellen. Während die CLL-Zellen durch die IL4-Behandlung zu ca. 54 ± 2% gerettet werden, sind es bei den nicht malignen Zellen nur ca. 30 ± 4%.

Das Gleiche zeigt sich auch bei den Dosis-Wirkung-Kurven nach Stimulation mit CD40L. Während die CLL-Zellen zu ca. 53 ± 2% überleben, sieht man bei den nicht malignen B-Zellen nur ein pro-survival Effekt von maximal 20%. Diese

beiden Abbildungen zeigen deutlich, dass die Stimulation von CD40L und IL4 das Überleben der CLL-Zellen stärker fördert als das der nicht malignen B-Zellen.
Des Weiteren sehen wir in den Abbildungen unterschiedliche Sättigungskonzentrationen für die beiden Liganden. Während IL4 schon bei 2,5 pg/ml das Überleben deutlich fördert und bei 12,5 pg/ml die Sättigungsgrenze erreicht hat, zeigt sich bei dem CD40L erst bei 150-200 ng/ml ein Überlebenseffekt. Außerdem fällt auf, dass maligne und nicht maligne Zellen bei der IL4-Stimulation bei der gleichen Konzentration eine Sättigung erreichen und sich die Kinetik der Wirkungskurven nicht unterscheidet.
Im Gegensatz dazu, zeigen sich bei den CD40L-Dosis-Wirkung-Kurven deutliche qualitative Unterschiede. Nicht maligne Zellen erreichen kein Sättigungsplateau und weisen nur eine geringe Affinität der Ligand-Rezeptor-Bindung auf (Kd = 70 pM), zeigen jedoch einen kooperativen Effekt in der Wirkungskurve. Im Gegensatz dazu erreichen die malignen Zellen bei der CD40L-Stimulation ein Sättigungsplateau. Die Antwort der CLL-Zellen auf die CD40L-Stimulation folgt einem einfachen Bindungsmodell mit steigender Affinität zwischen Ligand und Rezeptor ohne kooperativen Effekt. Dies zeigt sich durch den niedrigen Kd Wert von 2,6 pM bei der Hälfte der Ligandkonzentration bezogen auf das Sättigungsplateau.

Daraufhin untersuchten wir, ob sich intrazelluläre Unterschiede in den malignen und nicht malignen Zellen nach IL4- und CD40L-Stimulation detektieren lassen.

3.1.2 IL4-Stimulation führt zu erhöhten phosphorylierten STAT6-Levels

In den ersten Experimenten wurde gezeigt, dass auch die IL4-Stimulation zu einer verlängerten Überlebenszeit bei nicht malignen und malignen B-Zellen führt. In der Einleitung wurde bereits beschrieben, dass IL4-Stimulation zu einer Phosphorylierung von STAT6 (pSTAT6) führt, welches anschließend homodimerisiert und in den Zellkern transloziert (Hebenstreit et al. 2006, Kaplan et al. 1996).

Um herauszufinden, ob die Apoptoseresistenz der B-Lymphozyten in unseren Experimenten ebenfalls durch eine Phosphorylierung von STAT6 zu erklären ist, wurde in den folgenden Experimenten pSTAT6 nach IL4-Stimulation sowohl mit Durchflusszytometrie als auch mit Western Blot gemessen.

Für die Durchflusszytometriemessung wurden $CD19^{+}$-Lymphozyten von sechs CLL-Patienten und sechs gesunden Spendern in DMEM kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde mit 0,4 pg/ml IL4 für eine Stunde stimuliert, der andere verblieb in unstimuliertem Zustand. Anschließend erfolgte die Messung der Grundaktivität (TotalSTAT6) und der Aktivierung (pSTAT6) mittels Durchflusszytometrie.

Um die Aktivierung der B-Zellen miteinander vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse auf Grundaktivität (TotalSTAT6) normalisiert.

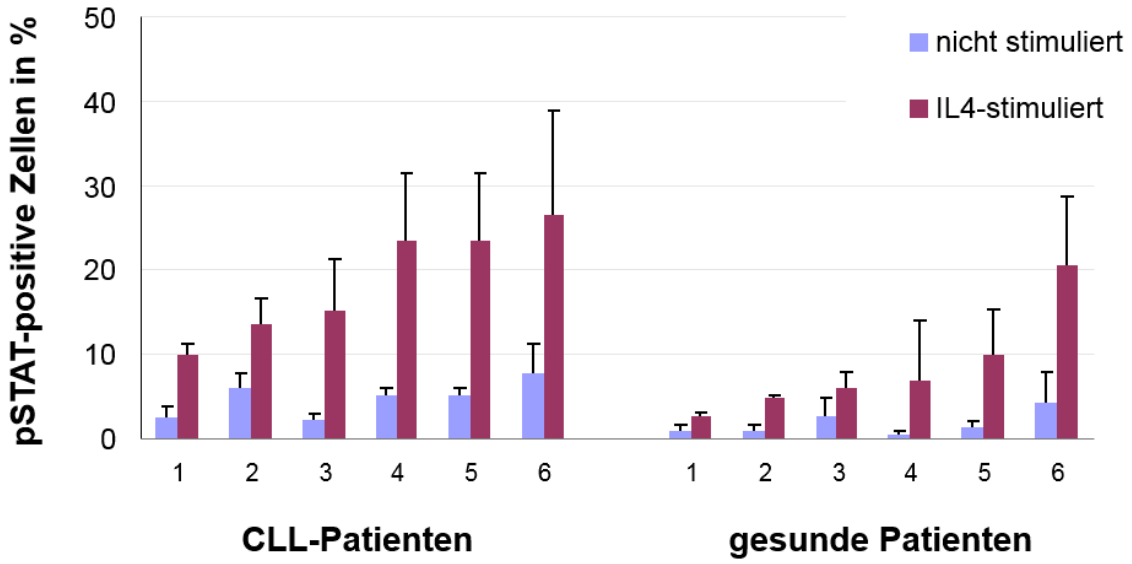


Abbildung 12: IL4-stimulierte und nicht stimulierte CLL-Zellen zeigen eine stärkere Phosphorylierung von STAT6 als die Zellen der gesunden Spender.
B-Zellen von sechs CLL-Patienten und sechs gesunden Spendern wurden mit IL4 stimuliert oder verblieben unstimuliert. Anschließend erfolgte die Messung des phospho-STAT6-Levels mittels Durchflusszytometrie. Gezeigt wird der prozentuale Anteil der Zellen, deren Signal über dem Hintergrundsignal liegt (unspezifische IgGs). Die Zellen wurden eine Stunde mit 0,4 pg/ml rekombinantem IL4 stimuliert. CLL = chronisch lymphatische Leukämie, IL4 = Interleukin 4.

Im unstimulierten Zustand zeigen die CLL-Zellen eine kaum merkliche Erhöhung des pSTAT6-Levels im Vergleich zu den nicht malignen Zellen. Signifikante Unterschiede zwischen den pSTAT6-Levels der malignen und nicht malignen Zellen zeigen sich erst nach Stimulation mit IL4. Die CLL-Zellen zeigen ein durchschnittliches pSTAT6-Level von ca. 18,6%, während die nicht malignen Zellen ein Level von 8,5% aufweisen. Dieses signifikant erhöhte pSTAT6-Level der CLL-Zellen nach IL4-Stimulation lässt sich auch im Western Blot bestätigen.
Für den Western Blot wurden die $CD19^{+}$-Zellen der CLL-Patienten (n=4) und der gesunden Spendern (n=4) ebenfalls in DMEM kultiviert. Ein Teil wurde mit 0,4 pg/ml IL4 für eine Stunde bei 37 °C stimuliert. Der andere Teil verblieb unstimuliert. Anschließend wurde die Aktivität des TotalSTAT6- und des pSTAT6-Levels mittels Western Blot ermittelt.

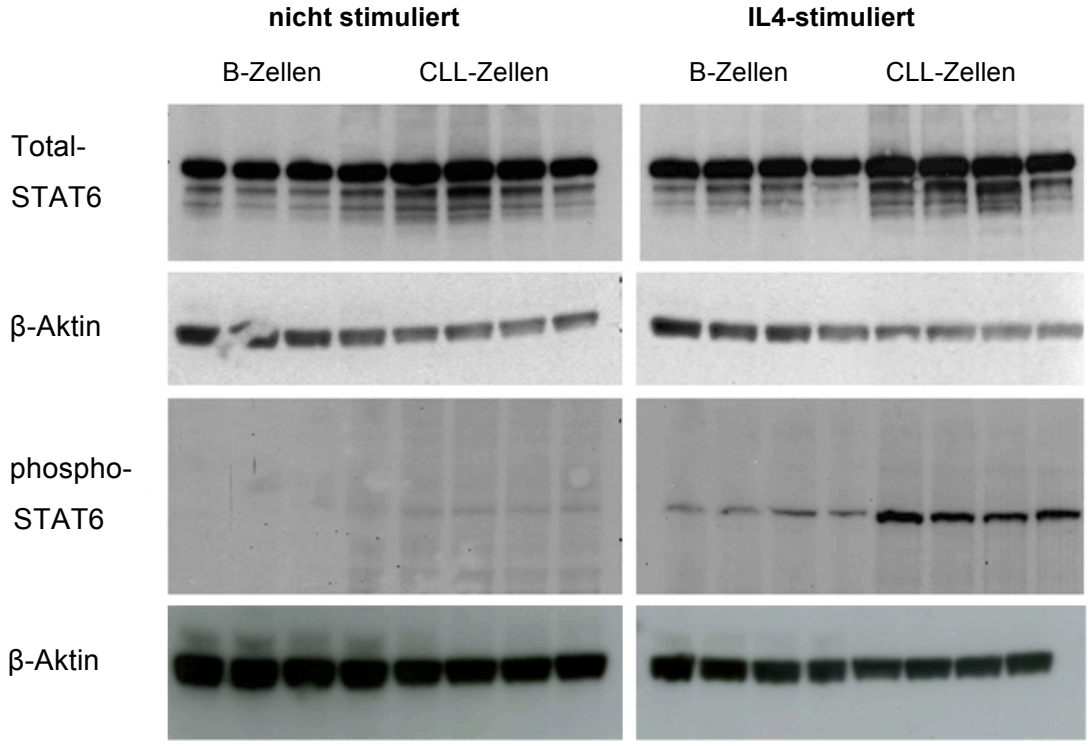


Abbildung 13: Nicht stimulierte und IL4-stimulierte CLL-Zellen zeigen eine stärkere Phophorylierung von STAT6 als nicht maligne B-Zellen.

B-Zellen von vier CLL-Patienten und vier gesunden Spendern wurden mit 0,4 pg/ml IL4 für eine Stunde stimuliert oder verblieben unstimuliert. Das TotalSTAT6-Level und das phospho-STAT6-Level wurden mittels Western Blot detektiert. Während das TotalSTAT6-Level bei den CLL-Zellen nur geringfügig erhöht war, konnte ein stark erhöhtes Level von pSTAT6 in den CLL-Zellen nach Stimulation (rechte Spuren), aber auch vor Stimulation (linke Spuren), beobachtet werden.
CLL = chronisch lymphatische Leukämie, IL4 = Interleukin 4.

Während sich die Menge an TotalSTAT6 der beiden Zellarten vor und nach der IL4-Stimulation kaum unterscheidet, findet man deutliche Unterschiede bei der Phosphorylierung von STAT6. Nach Stimulation mit IL4 lässt sich bei den CLL-Zellen ein erhöhtes Level von phospho-STAT6 detektieren. Die verbesserte Überlebensrate der CLL-Zellen, im Vergleich zu den nicht malignen B-Zellen, geht daher auch im Western Blot mit einem erhöhten pSTAT6-Level nach Stimulation einher. Die verbesserte Apoptoseresistenz der CLL-Zellen beruht daher u.a. auf einer verstärkten Phosphorylierung von STAT6 nach der IL4-Stimulation.

3.1.3 CLL-Zellen zeigen nach CD40L-Stimulation eine höhere NF-κB-Aktivität als nicht maligne B-Zellen

Im Hinblick auf den Verlust der Kooperativität, welcher in der CD40L-Wirkungskurve der CLL-Zellen beobachtet werden konnte, ist es interessant zu wissen, dass CD40L in nicht malignen Zellen sowohl Proliferation als auch Überleben induzieren kann, nicht jedoch in CLL-Zellen (Elgueta et al. 2009, Spriggs et al. 1992). CD40L induziert in den CLL-Zellen nur Überleben, welches über den NF-κB-Sigalweg reguliert wird (Jacob et al. 1998) Bei der Interaktion zwischen CD40L und CD40 kommt es bei den CLL-Zellen zu einem gezielten Verlust der Trimerisierung, welcher zu einem Verlust des kooperativen Effekts führt (Wieckowski et al. 2007). Faszinierenderweise führt die Monomerisierung von CD40L zu einer Veränderung des nachgeordneten NF-κB-Signalwegs (Wieckowski et al. 2007). Daher stellen wir uns die Frage, ob der Verlust der Kooperativität, der mit einer Verlagerung von Proliferation zu Überleben einhergeht, auf eine veränderte NF-κB-Aktivität in den CLL-Zellen zurückzuführen ist. Aufgrund dieser Frage haben wir die NF-κB-Aktivität ermittelt.

Die NF-κB-Aktivität der $CD19^+$-Zellen von CLL-Patienten (n=11) und gesunden Spendern (n=16) wurde mit dem Co-ELISA gemessen. Dieses Co-ELISA-Protokoll wurde eigens für die Messung der NF-κB-Aktivität in B-Zellen von Nupur Bhattacharya entwickelt (Bhattacharya 2010).
Die viable eingefrorenen B-Lymphozyten der Patienten und gesunden Spendern wurden für dieses Experiment aufgetaut, $CD19^+$ selektiert mit 150 ng/ml CD40L für eine Stunde bei 37°C stimuliert oder blieben unstimuliert. Anschließend wurde die NF-κB-Aktivität der unstimulierten und stimulierten Zellen mittels Co-ELISA gemessen.

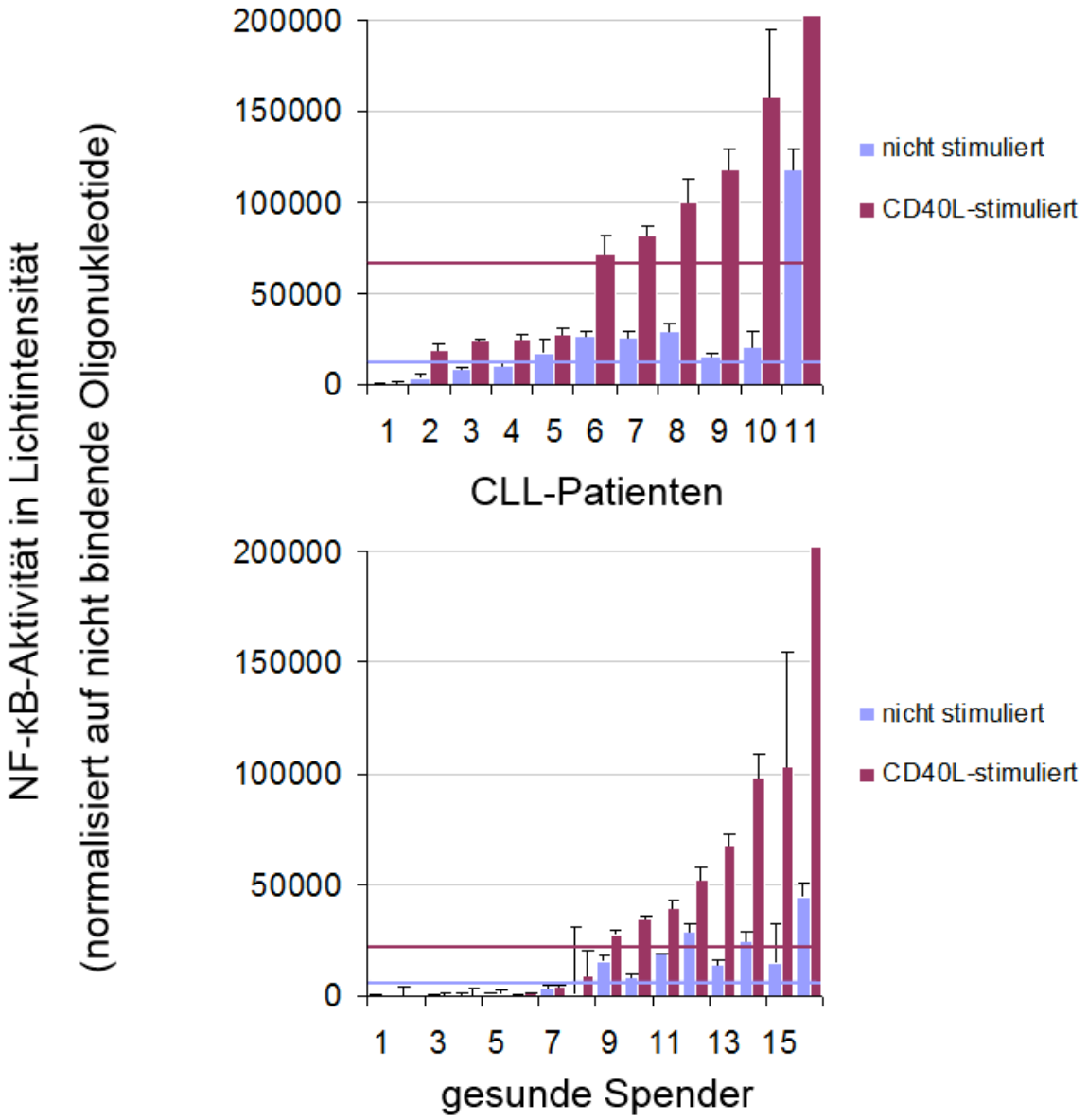


Abbildung 14: Nicht stimulierte und CD40L-stimulierte CLL-Zellen zeigen eine stärkere NF-κB-Aktivierung als nicht maligne Zellen.

$CD19^+$-Zellen von CLL-Patienten und gesunden Spendern wurden mit 150 ng/ml CD40L (rote Säule) für eine Stunde behandelt oder blieben unstimuliert (blaue Säule). Die Aktivität von NF-κB wurde mit dem Co-ELISA gemessen. Obwohl maligne und nicht maligne Zellen eine große Variabilität der NF-κB-Aktivität aufzeigen, ist der Median (horizontale Linie) der Grundaktivität und der stimulierten Aktivität von NF-κB in den CLL-Zellen höher als in den nicht malignen Zellen.
CLL = chronisch lymphatische Leukämie, CD40L = CD40 Ligand.

Die gemessene Grundaktivität ist bereits bei den CLL-Zellen größer als bei den gesunden Zellen. Durch die CD40L-Stimulation nimmt die NF-κB-Aktivität jedoch in beiden Gruppen zu. Obwohl CLL-Zellen und gesunde B-Zellen eine sehr große Bandbreite an unterschiedlicher NF-κB-Aktivität aufweisen, ist die mediane Aktivität in malignen Zellen deutlich höher als in den nicht malignen B-Zellen. Die Abbildung zeigt deutlich, dass der Median bei den CLL-Zellen nach CD40L-Stimulation ein Vielfaches über dem Median der nicht malignen Zellen liegt. Die Medianwerte im unstimulierten Zustand unterscheiden sich jedoch kaum.
Diese Ergebnisse unterstreichen die Vermutung, dass es in den CLL-Zellen zu einer Modulation der NF-κB-Aktivität kommt.

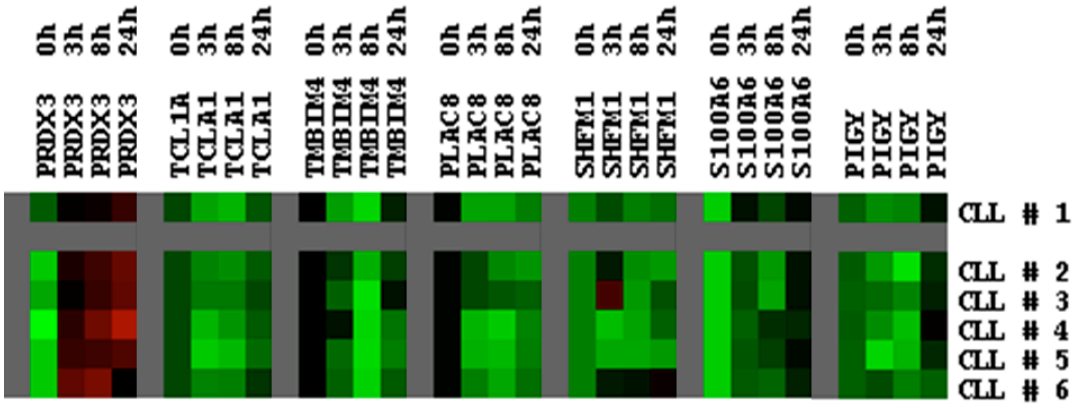
3.2 Identifikation von möglichen Genen und Signalwegen, welche für das Überleben der CLL-Zellen eine wichtige Rolle spielen könnten

Nicht nur lösliche Faktoren fördern das Überleben der CLL-Zellen in vitro, auch die Kokultivierung mit den Stromazelllinien M2-10B4 und HS-5 (Burger et al. 2000, Seiffert et al. 2007) verhindert die frühzeitige Apoptose der malignen B-Zellen. Des Weiteren konnte Bhattacharya in ihrer Dissertation zeigen, dass auch die Kultivierung der CLL-Zellen in dem konditionierten Medium dieser Zelllinien das Überleben der CLL-Zellen in geringerem Maße verlängert (Bhattacharya 2010).
Daher ist es von großem Interesse, Gene und ihre Signalwege zu identifizieren, welche für das verlängerte Überleben der CLL-Zellen in Kokultur verantwortlich sein könnten.
Als potentielle pro-survival Gene wurden Gene, wie in der Einleitung beschrieben (1.5.5), ausgewählt. Diese Kandidaten wurden nun in weiteren Patienten validiert.

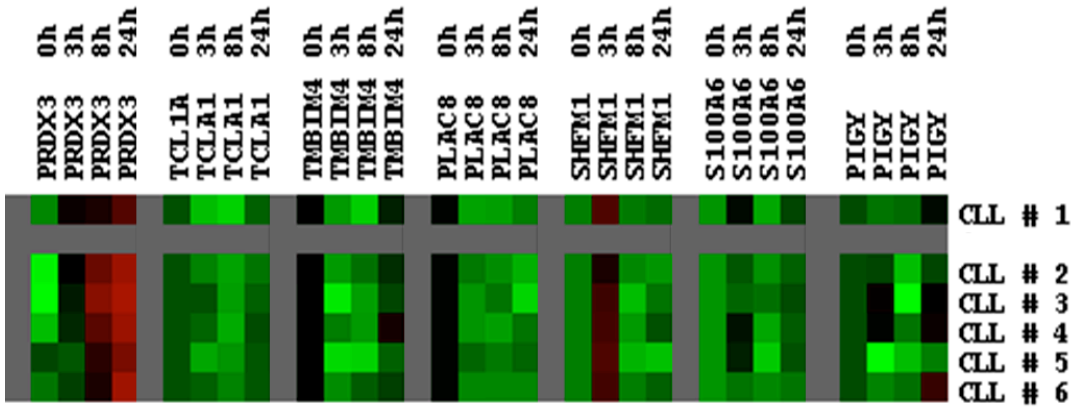
3.2.1 Technische Validierung des Genexpressionsprofils an fünf weiteren CLL-Patienten

Von fünf weiteren Patienten wurden die Expressionen ausgewählter Gene zu vier verschiedenen Zeitpunkten gemessen und sie mit dem bereits vorhandenen Genexpressionsprofil verglichen. Die Patienten weisen alle einen normalen oder 13q Genotyp auf. Je $1x10^7$ $CD19^+$-CLL-Zellen wurden in drei unterschiedlichen Medien kultiviert: Kokultur mit HS-5, konditioniertes Medium von HS-5 und Standardmedium DMEM. Die Kultur der HS-5-Zellen wurde drei Tage zuvor angelegt. Das konditionierte Medium und das Standardmedium wurden zusammen mit den CLL-Zellen ausgesät. Zu den Zeitpunkten 0 Std., 3 Std., 8 Std. und 24 Std. wurden jeweils Zellen für die Apoptosemessung mittels Durchflusszytometrie (nicht gezeigt) und Nukleinsäuremessung mittels Real-Time q-PCR (Abb. 15) entnommen.

Die relativen Mengen der mRNAs wurden mit Hilfe einer Standardkurve berechnet. Die relative Genexpression der verschiedenen Zeitpunkte ist in einer Heatmap-Abbildung dargestellt (Abbildung 15).



a) Das Genexpressionsprofil der CLL-Zellen in Kokultur mit den HS-5-Zellen.



b) Das Genexpressionsprofil der CLL-Zellen in konditioniertem Medium der HS-5-Zellen

Abbildung 15: Die CLL-Zellen in Kokultur und konditioniertem Medium zeigen einen ähnlichen Verlauf ihrer Genexpressionen.

Die Heatmaps präsentieren den Verlauf der Genexpressionen über vier verschiedene Zeitpunkte (0 Std., 3 Std., 8 Std., 24 Std.) in zwei verschiedenen Kulturmedien. In Abbildung a) ist das GEP der CLL-Patienten in Kokultur mit HS-5-Zellen dargestellt, in Abbildung b) ist das GEP der CLL-Zellen in konditioniertem Medium der HS-5-Zellen. Auf der x-Achse sind jeweils die Genexpressionen zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt, welche mittels Real-Time q-PCR gemessen wurden, auf der y-Achse die verschiedenen CLL-Patienten. Die grauen Balken dienen als Trennlinien zwischen den verschiedenen Genen und den zu vergleichenden Patienten. Für die Validierung wurde das GEP des CLL-Patienten # 1 (Einleitung 1.5.5.) mit den Profilen der anderen fünf Patienten (CLL-Patient #2-6) verglichen. Die Genexpressionen wurden mittels Realtime q-PCR gemessen und auf zwei Housekeeping-Gene normalisiert. Die Farbvariationen geben die Expression der Gene wieder. Rot = positive Werte, grün = negative Werte, CLL = chronisch lymphatische Leukämie, GEP = Genexpressionsprofil.

Vergleicht man die Expressionsmuster der ausgewählten Gene des CLL-Patienten #1 mit den Expressionen der anderen CLL-Patienten #2-6 zu den verschiedenen Zeitpunkten, so fällt deutlich auf, dass die Expressionen sich kaum unterscheiden. Sowohl in der Kokultur als auch in dem konditionierten Medium der HS-5-Zellen verhalten sich die Expressionsmuster aller CLL-Patienten ähnlich. Dies zeigt deutlich, dass das GEP nicht patientenspezifisch ist, sondern für die Mehrzahl der CLL-Patienten mit dem gleichen Karyotyp als Prototyp verwendet werden kann. Unsere Rankingstrategie und unsere Experimente beruhen daher nicht nur auf dem GEP eines CLL-Patienten, sondern sind bei anderen CLL-Patienten reproduzierbar.

3.2.2 Analyse der hochregulierten Gene mittels Ingenuity Pathway Analysis

Nachdem gezeigt wurde, dass das Genexpressionsprofil und die Rankingmethode technisch validierbar sind, wurden die interessantesten Gene anhand ihrer beschriebenen Funktionen („Gene Ontologie Terms“, GO-terms) in zelluläre Stoffwechselwege klassifiziert. („Ingenuity Pathway Analysis“). Die verschiedenen Analyseprogramme ermöglichten uns, unsere Gene nach ihren biologischen Eigenschaften, den entsprechenden Signalwegen und zellulären Lokalisationen in Netzwerken anzuordnen. Die Verknüpfungspunkte der 350 am stärksten deregulierten Gene, welche mit Apoptose assoziiert sind, wurden in dem Analyseprogramm „Ingenuity Pathway Analysis“ bildlich dargestellt und analysiert.
Die Gene mit den gewünschten biologischen Eigenschaften und den meisten Verknüpfungspunkten wurden für weitere Experimente ausgewählt. Diese Gene sind: CD27 (cluster of differentiation 27), CDKN2D (cyclin-dependent kinase 4 inhibitor D), CKLF (chemokine-like factor), E2F5 (transcription factor E2F5), IFITM1 (interferon-induced transmembrane protein 1), NME1 (nucleoside diphosphate kinase A), LGALS1 (lectin, galactoside-binding, soluble, 1), LY96 (lymphocyte Antigen 96), PRDX3 (peroxiredoxin 3), PSMA6 (proteasome subunit alpha type-6), RHOC (ras homolog gene family, member C), SELL (selectin L), STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1), TCL1A (T-cell leukemia/lymphoma), TUBA1C (Tubulin alpha-6 chain) und TNFRSF17 (tumor necrosis factor superfamily, member 17).

3.2.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz und Apoptoserate

Aufgrund der technischen und biologischen Validierungen wurden sechszehn Gene ausgewählt, welche als potentielle pro-survival Gene anzusehen sind. Wir stellen die Hypothese auf, dass falls es sich bei diesen deregulierten Genen um potentielle pro-survival Gene handeln sollte, welche für das Überleben der CLL-Zellen in Kokultur mit HS-5 und konditioniertem Medium von HS-5 eine Rolle spielen, würde der Knockdown dieser Gene in einer erhöhten Apoptoserate der CLL-Zellen zu sehen sein. Um unsere Hypothese zu bestätigen, wurden die Gene in weiteren Experimenten durch Gen-spezifische siRNAs herunterreguliert und anschließend die Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Da in der Literatur mehrfach beschrieben wurde, dass primäre Lymphozyten schwer zu transfizieren sind und die Transfektion meist zur Apoptose der Zellen führt, haben wir in Vorexperimenten zunächst die Transfektioneffizienz mittels GFP-Expression und die Apoptoserate untersucht.
Die Transfektionseffizienz wurde mit zirkulärem pmaxGFP, linearem pmaxGFP und GFP-spezifischer mRNA evaluiert.

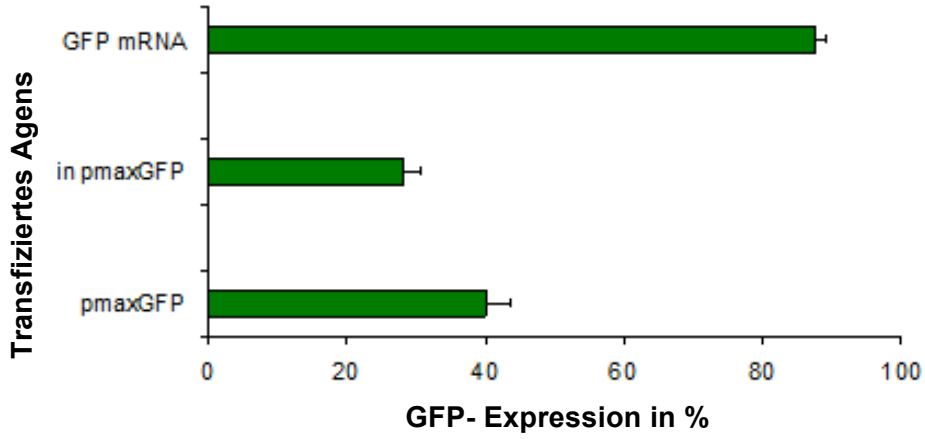


Abbildung 16: Messenger RNA transfizierte Zellen zeigen die größte Transfektionseffizienz. $1x10^6$ frisch isolierte maligne B-Zellen wurden mit DNA und messenger RNA transfiziert und für 24 Stunden in Kokultur mit HS-5-Zellen inkubiert. Die GFP-Expression wurde nach 24 Stunden mittels Durchflusszytometrie in gemessen.

Wie in Abbildung 17 dargestellt, liegt die Expression bei linearen pmaxGFP (28% GFP^+-Zellen) und zirkulärem pmaxGFP (40% GFP^+-Zellen) weit unter der Transfektionseffizienz von GFP-spezifischer mRNA (> 80%) bei primären CLL-Zellen. Um möglichst hohe Transfektionseffizienzen in den CLL-Zellen zu erreichen, wurden die Transfektionen mit Gen-spezifischen siRNAs durchgeführt, welche den mRNAs in ihrem Aufbau und ihrer Größe sehr ähneln.

Um herauszufinden, ob die Struktur der transfizierten Nukleinsäuren einen Effekt auf die Apoptoserate der CLL-Zellen hat, wurden Experimente mit zirkulären und linearen Plasmiden sowie GFP-spezifischer mRNA durchgeführt und anschließend die Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abb. 17). Interessanterweise führte allein die Transfektion des zirkulären oder linearen Plasmids zur Apoptose der CLL-Zellen, wohingegen die Apoptoserate nach mRNA-Transfektion vergleichbar mit der Apoptoserate der CLL-Zellen war, wenn keine DNA oder RNA dem Transfektionsprotokoll hinzugefügt wurde. Diese Ergebnisse stimmen mit den Veröffentlichungen von Seiffert et al. überein und erlauben durch Vergleich mit Negativkontrollen die spezifisch durch Herunterregulierung eines Gens ausgelöste Apoptoserate zu messen. (Seiffert et al. 2007).

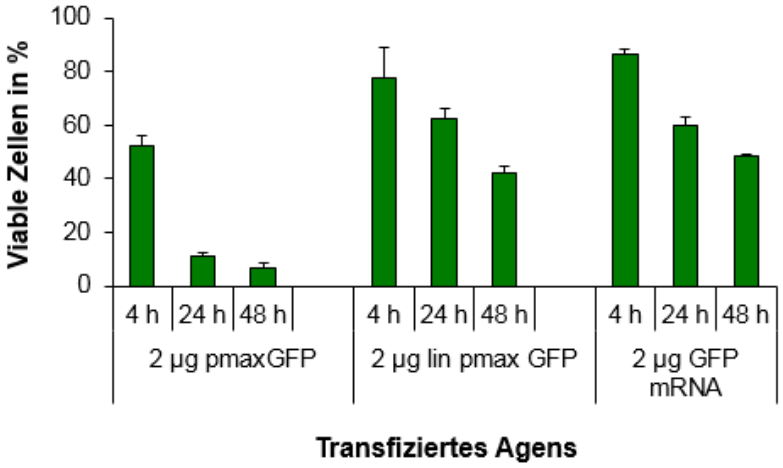


Abbildung 17: Die höchste Überlebensrate zeigen messenger RNA transfizierte Zellen.
$1x10^6$ frisch isolierte maligne B-Zellen wurden mit DNA und mRNA transfiziert und in HS-5-Kokultur inkubiert. Nach der Transfektion wurde das Überleben mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

3.2.4 Lösen die Kandidatengene Apoptose aus?

In den folgenden Experimenten wurden die ausgewählten Gene mittels siRNAs herunterreguliert und anschließend die Apoptoserate der CLL-Zellen bestimmt.
Maligne B-Zellen von CLL-Patienten, die aus frischem Volblut durch das Bicoll-Protokoll gewonnen wurden, wurden mit Gen-spezifischen siRNAs transfiziert und anschließend auf HS-5-Zellen kokultiviert. Nach 48 Std. und 72 Std. wurde das Überleben der CLL-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Für die Berechnung der prozentualen Überlebensrate, wurden die toten Zellen mit Annexin V PE und 7-AAD angefärbt. Um sicher zu gehen, dass nur B-Zellen in der Durchflusszytometrie berücksichtigt werden, wurden in den Berechnungen nur $CD19^+$-gefärbten Zellen analysiert.
Als Negativkontrolle wurde eine unspezifische siRNA eingesetzt, welche kein zelluläres Zielgen aufweisen soll und daher wahrscheinlich die Apoptosemechanismen der CLL-Zellen nicht beeinflusst. Als Positivkontrolle wurde eine MCL-1-spezifische siRNA verwendet, welche durch das Abschalten des MCL-1 Gens zu einer erhöhten Apoptoserate der malignen B-Zellen führt. Alle Ergebnisse wurden auf das natürliche Überleben der CLL-Zellen nach einer MOCK Transfektion (Transfektionsprotokoll ohne Hinzufügen einer siRNA) normalisiert.

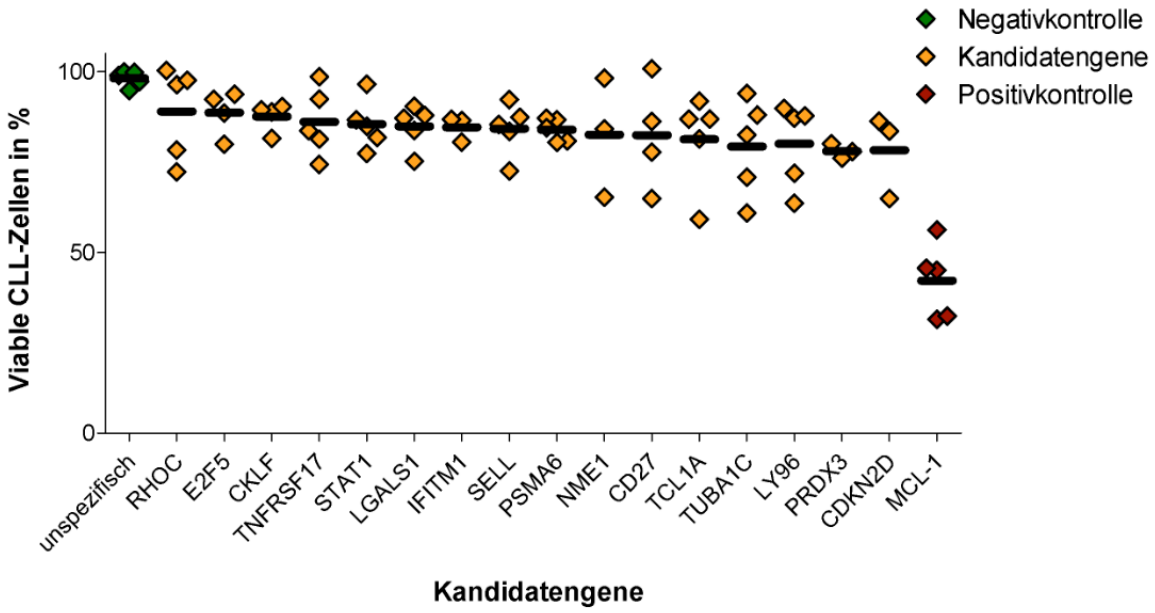


Abbildung 18: Die Kandidatengene induzieren Apoptose in primären CLL-Zellen.
$1x10^6$ frisch isolierte CLL-Zellen von verschiedenen Patienten (Karos) wurden mit 2 µg siRNA der verschiedenen Kandidatengene transfiziert und in HS-5-Kokultur inkubiert. Nach 72 Stunden wurde das Überleben (7-AAD- und Annexin V-negativen Zellen) der $CD19^+$-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Kandidatangene sind nach den Mittelwerten ihrer prozentualen Überlebensrate in absteigender Reigenfolge geordnet. Das Überleben wurde auf die Kontrolle ohne Nukleinsäure normalisiert. CLL = chronisch lymphatische Leukämie.

Die Abbildung zeigt deutlich, dass alle Kandidatengene einen geringen Effekt auf das Überleben der CLL-Zellen in Kokultur haben. Das Überleben der CLL-Zellen variiert von circa 89% (RHOC) bis circa 70% (CDKN2D) und bleibt deutlich hinter der Apoptoseinduktion des MCL-1 Gens zurück. Darüber hinaus fällt die große Variabilität der einzelnen CLL-Patienten auf. Da die Patienten sich weder im Genotyp noch in der erhaltenen Therapie unterscheiden müssen die Unterschiede auf unbekannte individuelle Eigenschaften der Patienten zurückgeführt werden. Trotz der geringeren Effektivität der Kandidatengene, im Vergleich zu der Positivkontrolle, zeigt der Mann-Whitney Test bei sechs der sechzehn Kandidatengene eine Signifikanz von p = 0,01-0,001 der Überlebensrate im Vergleich zu der Negativkontrolle.

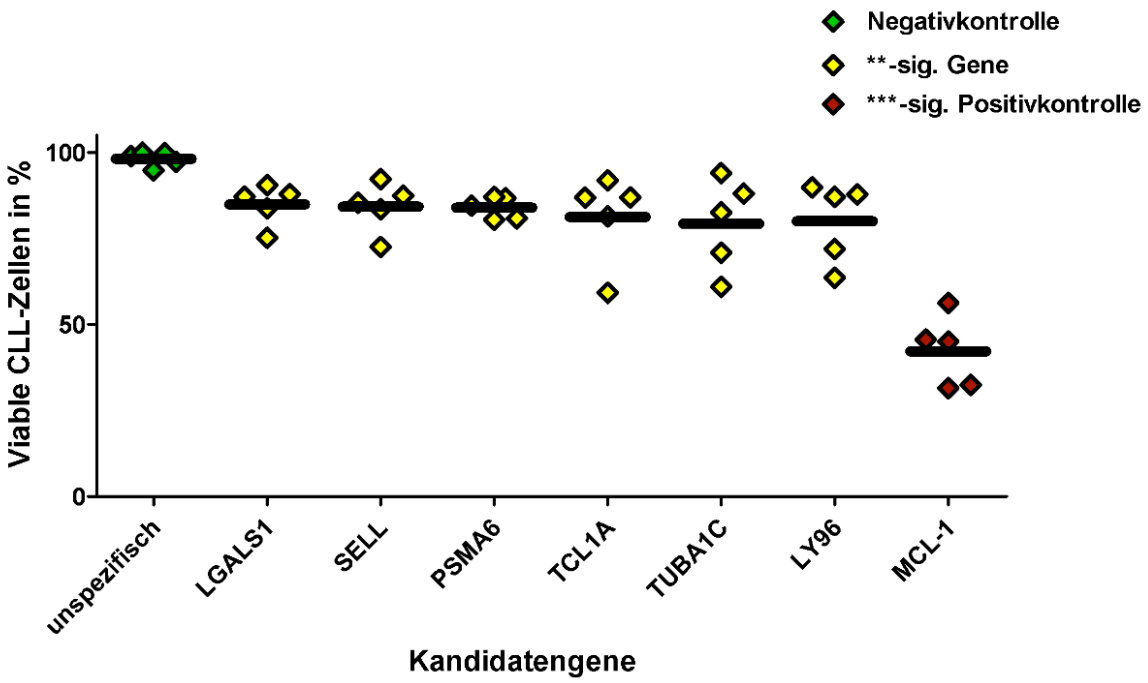


Abbildung 19: Signifikante Kandidatengene.

Abbildung analog zu Abb 19. Es sind nur die Kandidatengene dargestellt, welche im Vergleich zu der Negativkontrolle das Überleben der CLL-Zellen signifikant reduzieren (Mann-Whitney Test: **-sig. = 0,01 – 0,001, ***-sig. = 0,001 – 0,001). CLL = chronisch lymphatische Leukämie.

Bei diesen Genen handelt es sich um LGALS1, PSMA6, LY96, TUBA1C, TCL1A und SELL. Manche dieser Gene sind bereits mit dem Pathomechansimus der CLL assoziiert während andere Gene bis jetzt nicht im Bezug auf die CLL untersucht wurden.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Knockdown der Kandidatengene zu einer Reduktion der Überlebensrate führt und daher eine Rolle im Pathomechanismus der CLL eine Rolle spielen könnte. Dennoch wird auch deutlich, dass keines der Gene allein eine Schlüsselfunktion in der Apoptoseresistenz der CLL-Zellen hat. Daher ist es von großer Bedeutung, die Funktion dieser Kandidatengene, der beteiligten Signalwege und ihrer Verknüpfungspunkte weiter zu erforschen.

3.3 Identifikation von pro-apoptotischen Substanzen, die das Überleben der CLL-Zellen in Kokultur reduzieren

Neben der Detektion von Genen, die zu einem verlängertem Überleben der CLL-Zellen führen, konnten durch Abgleich der Genexpressionsprofile mit der Datenbank Connectivity Map auch pro-apoptotische Substanzen identifiziert werden (1.5.7). Vier Substanzen aus verschiedenen Substanzklassen wurden weiter untersucht: Zwei Alkaloide (Substanz 1 und 2), ein Kineaseinhibitor (Substanz 3) und ein Herzglykosid (Substanz 4).

Zuerst wurde anhand von Dosis-Wirkung-Kurven untersucht, ob die ausgewählten Substanzen tatsächlich in vitro eine pro-apoptotische Wirkung auf CLL-Zellen in Kokultur haben. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Substanzen spezifisch gegen CLL-Zellen wirken oder auch nicht-maligne B-Zellen vermehrt in Apoptose gehen. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse wurden die Substanzen nicht nur an frisch isolierten CLL-Zellen sondern auch im peripheren Vollblut getestet.

Fludarabin, ein Purinanalogon das bereits als Zytostatikum bei der CLL eingesetzt wird, wurde als Positivkontrolle benutzt.

3.3.1 Kandidatensubstanzen zeigen eine dosisabhängige pro-apoptotische Wirkung auf CLL-Zellen in Kokultur

Um die Effektivität der Kandidatensubstanzen zu testen, wurden Dosis-Wirkung-Kurven für jede Substanz erstellt.

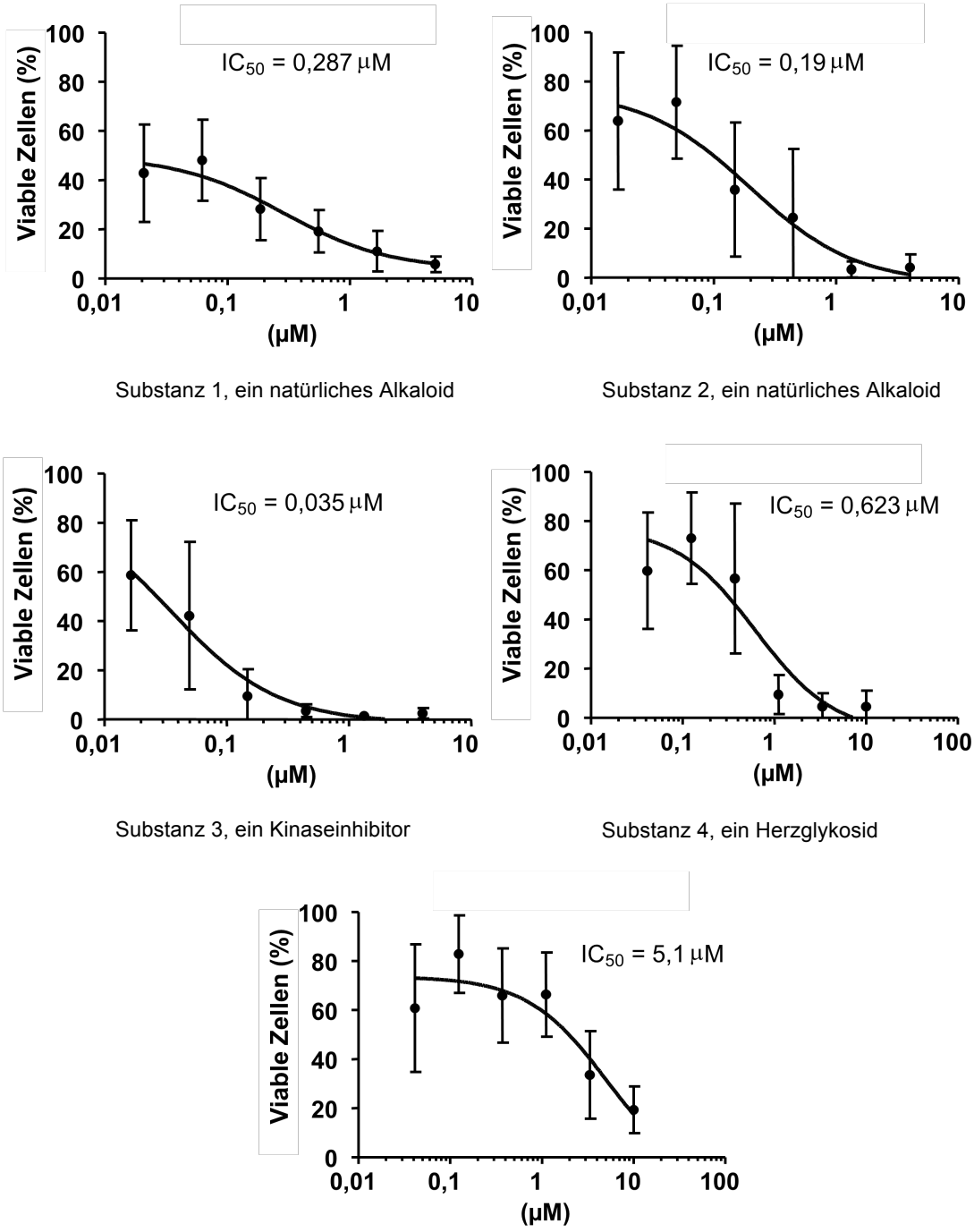


Abbildung 20: Die Kandidatensubstanzen zeigen einen stärkeren pro-apoptotischen Effekt als Fludarabin.

Primäre $CD19^+$-Zellen von Leukämie-Patienten wurden mit HS-5-Zellen kultiviert und mit unterschiedlichen Konzentrationen der Kandidatensubstanzen behandelt. Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie das Überleben bestimmt (7-AAD- und Annexin V-negative Zellen) und die IC_{50}-Werte berechnet. Alle Messpunkte wurden in Duplikaten angelegt.

Am ersten Tag wurden 2,5x10^3 HS-5-Zellen in 300 µl DMEM ausgesät und bei 37 °C inkubiert. Nach 24 Stunden wurden 3x10^5 CLL-Zellen in 10 µl DMEM für 72 Stunden kokultiviert. Nach vier Tagen wurde die Kokultur mit sechs verschiedenen Konzentrationen der ausgewählten Substanzen behandelt. Anschließend wurden die apoptotischen Zellen mit 7-AAD und Annexin V angefärbt und das Überleben und die IC_{50}-Werte der Zellen berechnet.

Der IC_{50}-Wert gibt die Konzentration eines Inhibitors an, die für die halbmaximale Inhibition eines Targets notwendig ist. In der Pharmakologie werden die IC_{50}-Werte verwendet, um die Wirkungsstärke diverser Antagonisten miteinander zu vergleichen.

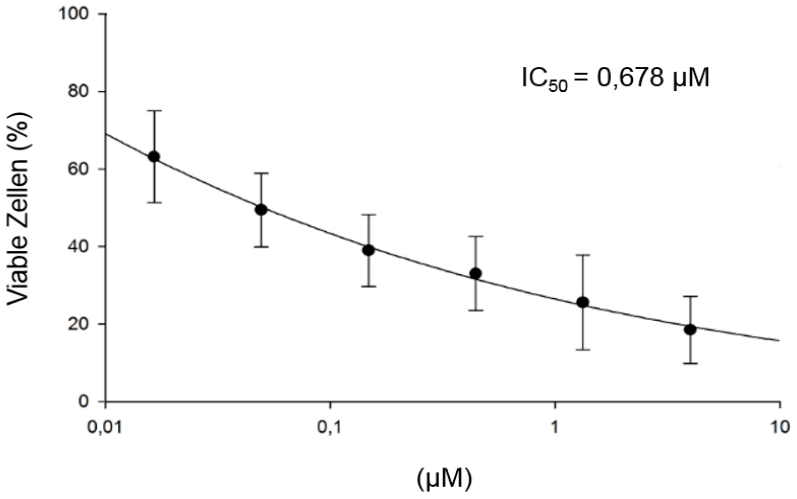
Die IC_{50}-Werte der ausgewählten Substanzen sind variabel und reichen von 0,035 uM (Substanz 2) bis 0,623 uM (Substanz 4). Trotz der großen Variabilität sind die effektiven Konzentrationen der neuen Substanzen niedrig und liegen z.B. um zwei Zehnerpotenzen unter der IC_{50}-Konzentration von Fludarabin. Dies bedeutet, dass die Substanzen eine stärkere pro-apoptotische Wirkung haben als das bereits eingesetzte Zytostatikum Fludarabin.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde nun untersucht, ob diese Substanzen spezifisch gegen maligne Zellen wirken.

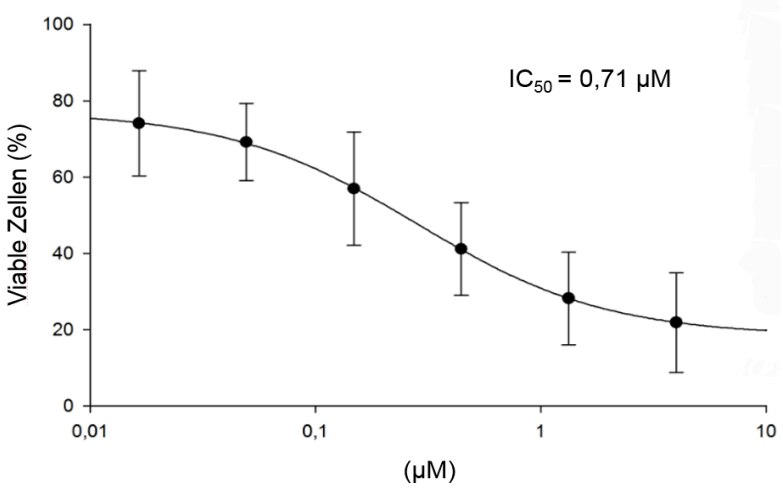
3.3.2 Die Substanzen zeigen einen stärkeren pro-apoptotischen Effekt bei CLL-Zellen im Vergleich zu nicht malignen B-Zellen

Als nächstes wurde untersucht, ob die pro-apoptotische Wirkungen der Substanzen spezifisch für CLL-Zellen sind oder ob auch nicht maligne B-Zellen vermehrt in Apoptose geführt werden.

Dafür wurden für B-Zellen von gesunden Spendern ebenfalls Dosis-Wirkung-Kurven erstellt. Die gesunden B-Zellen wurden unter den gleichen Bedigungen inkubiert und behandelt wie die malignen Zellen (3.3.1). Anschließend wurden ebenfalls die IC_{50}-Werte bestimmt und mit denen der CLL-Zellen verglichen.



a) Substanz 1, ein natürliches Alkaloid



b) Substanz 2, ein natürliches Alkaloid

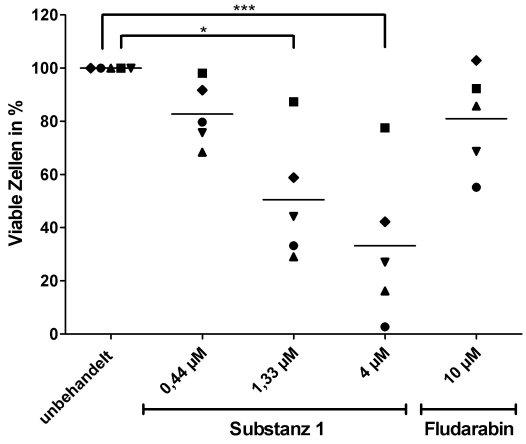
Abbildung 21: Die Kandidatensubstanzen zeigen einen stärkeren pro-apoptotischen Effekt bei malignen B-Zellen im Vergleich zu nicht malignen B-Zellen.

Primäre $CD19^+$-Zellen von verschiedenen gesunden Spendern wurden mit HS-5-Zellen kokultiviert und mit unterschiedlichen Konzentrationen der Kandidatensubstanzen behandelt. Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie das Überleben bestimmt (7-AAD- und Annexin V-negative Zellen) und die IC_{50}-Werte berechnet. Alle Proben wurden in Duplikaten angelegt und gemessen.

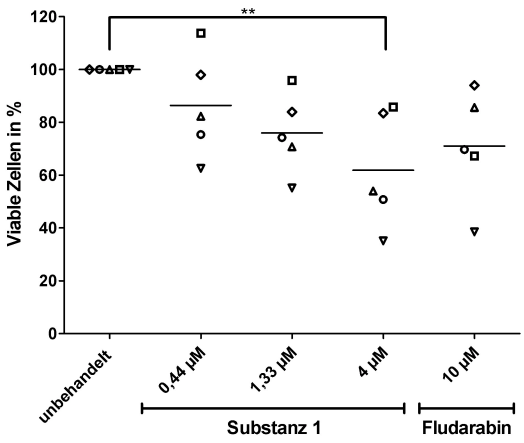
Die IC_{50}-Werte der zwei ausgewählten Substanzen liegen bei den gesunden B-Zellen deutlich über den IC_{50}-Werten der malignen B-Zellen. Bei den gesunden B-Zellen ist bei Substanz 1 die zweifache Konzentration (0,678 µM), bei Substanz 2 sogar die mehr als die dreifache Konzentration (0,71 µM) notwenig, um 50% der gesunden B-Zellen im Vergleich zu 50% der malignen B-zellen zu töten. Dies zeigt, dass die Substanzen in niedrigen Konzentrationen einen stärkeren pro-apoptotischen Effekt bei den CLL-Zellen im Vergleich zu den nicht malignen B-Zellen aufweisen.

3.3.3 Substanzen reduzieren das Überleben der CLL-Zellen und nicht malignen B-Zellen auch im Vollblut

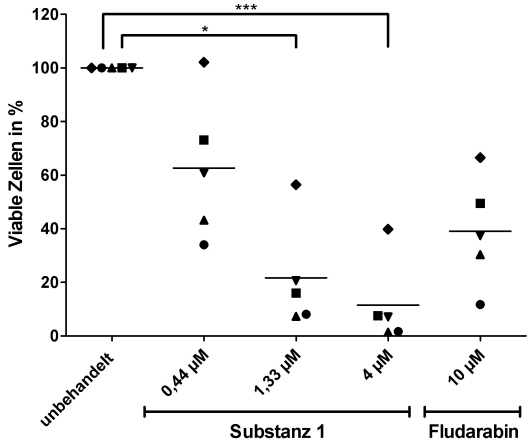
Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse wurden die Substanzen nun im Vollblut getestet, in dem die Lymphozyten eine physiologischere Mikroumgebung haben. Für die Experimente wurde das periphere Blut von CLL-Patienten (n=5) und gesunden Spendern (n=5) mit drei unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Substanz behandelt. Die Auswertung dieser Experimente erfolgte mit dem TruCount Whole Blood Assay von BD (siehe Material und Methoden). In diesem Assay wird die absolute Zahl der $CD19^+$-Zellen zum Zeitpunkt 0, 24 und 48 Stunden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Zahlen der nicht malignen B-Zellen bei gesunden Spendern unterlagen physiologischen Schwankungen von 130 Zellen/ml bis 270 Zellen/ml. Auch die Zahlen der CLL-Zellen der Patienten zeigten eine große Variabilität, waren aber im Mittel im Vergleich zu den gesunden Zellen um das 200fache höher. Um diese Variabilität zu vereinheitlichen und die Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurden bei der Auswertung der Ergebnisse anstatt der absoluten Zahlen die prozentualen Anteile der viablen B-Zellen berechnet und auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Als Referenzsubstanz wurde Fludarabin mit einer Konzentration von 10 uM eingesetzt. Da die Versuche für die Substanzen 3 und 4 von einer Kollegin durchgeführt wurden, werden in dieser Dissertation nur die Ergebnisse der Substanz 1 und 2 dargestellt und diskutiert.



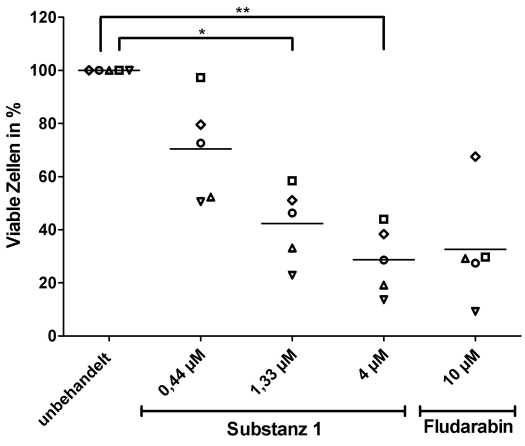
a) Überlebens der CLL-Zellen 24 Std. nach Applikation der Substanz 1



b) Überleben der gesunden B-Zellen 24 Std. nach Applikation der Substanz 1



c) Überlebensrate der CLL-Zellen 48 Std. nach Applikation der Substanz 1

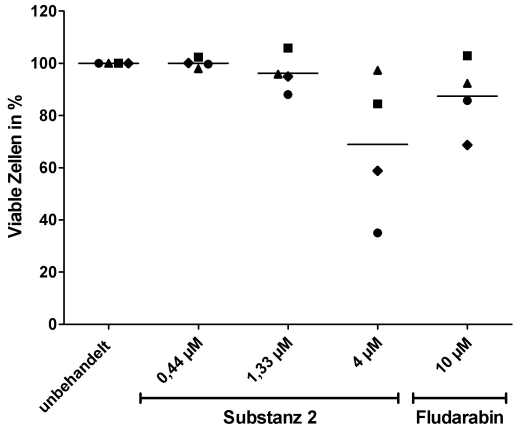


d) Überlebensrate der gesunden B-Zellen 48 Std. nach Applikation der Substanz 1

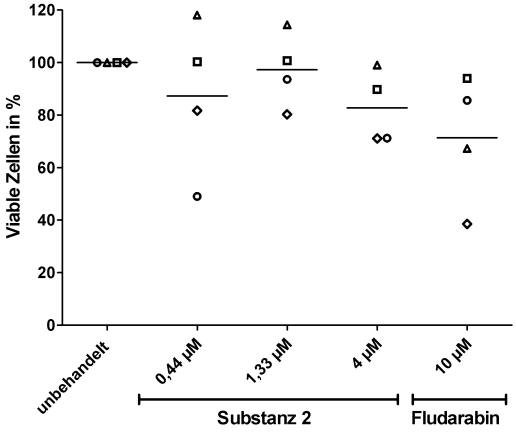
Abbildung 22: Substanz 1 reduziert die relative Zahl der B-Zellen im peripheren Blut nach 24 und 48 Stunden.

Die B-Zellen der fünf CLL-Patienten ((a), (c)) und der fünf gesunden Spender ((b), (d)) wurden auf die Zellen der unbehandelten Kontrolle 24 und 48 Stunden nach Applikation der Substanz 1 normalisiert. Die schattierten Symbole repräsentieren die Daten der CLL-Patienten, die unschattierten Symbole die Daten der gesunden Spender. Für die statistischen Tests wurde Kruskal-Wallis Test mit dem Dunn´s Multiple Comparison Test kombiniert (*-sig. = 0,05 – 0,01, **-sig. = 0,01 – 0,001, ***-sig. = 0,001 – 0,001). CLL = chronisch lymphatische Leukämie.

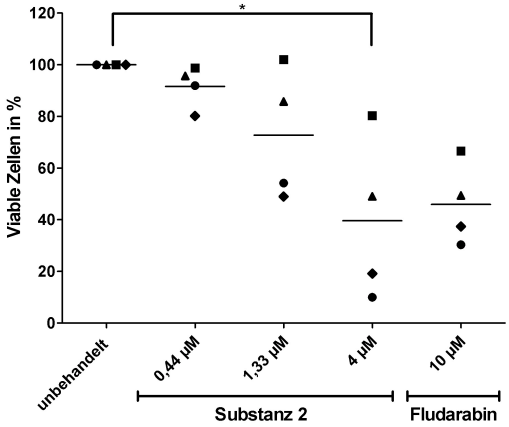
Wie die Graphiken deutlich zeigen, kann der dosisabhängige pro-apoptotische Effekt der Substanz 1 auch im peripheren Blut der CLL-Patienten und der gesunden Spender nachgewiesen werden.
Vergleicht man die Überlebensraten der CLL-Zellen mit denen der gesunden Zellen, zeigt sich bereits nach 24 Stunden und vor allem bei 4 µM, dass die Substanz 1 eine deutlich stärkere pro-apoptotische Wirkung auf die CLL-Zellen hat (ca. 28% viable Zellen), als auf gesunde B-Zellen (ca. 60% viable Zellen). Diese Spezifität der Substanz 1 für CLL-Zellen wird auch nach 48 Stunden deutlich. Der Kruskal-Wallis Test mit dem Dunn´s Multiple Comparison Test kombiniert, zeigt bei den CLL-Zellen bei 4 µM eine signifikante Reduktion der Überlebensrate von $p = < 0,01$ mit ca. 15% viablen Zellen, während er bei den gesunden Zellen nur eine Signifikanz von $p = 0,01 – 0,001$ (ca. 30% viable Zellen) aufweist.
Darüber hinaus zeigt sich, dass die höchste Dosis der Substanz 1 eine stärkere pro-apoptotische Wirkung aufweist, als die bereits therapeutisch eingesetzte Dosis von Fludarabin. Bei den gesunden B-Zellen zeigen die höchsten Konzentrationen der Substanz 1 und Fludarabin vergleichbare Apoptoseraten.



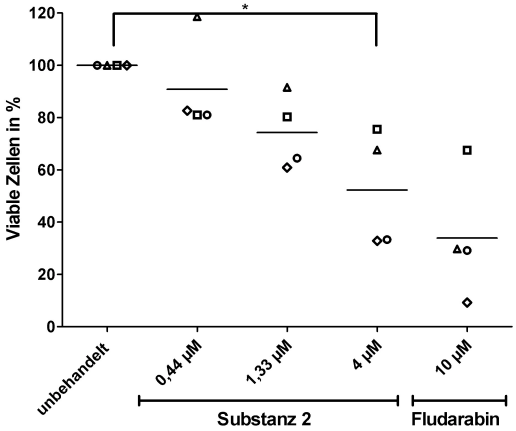
a) Überleben der CLL-Zellen 24 Std. nach Applikation der Substanz 2



b) Überleben der gesunden B-Zellen 24 Std. nach Applikation der Substanz 2



c) Überleben der CLL-Zellen 48 Std. nach Applikation der Substanz 2



d) Überleben der gesunden B-Zellen 48 Std. nach Applikation der Substanz 2

Abbildung 23: Substanz 2 reduziert die relative Zahl B-Zellen im peripheren Blut nach 48 Stunden.

Die Zahl der B-Zellen der fünf CLL-Patienten ((a), (c)) und der fünf gesunden Spender ((b), (d)) wurden auf die Zahl an B-Zellen der unbehandelten Kontrolle 24 und 48 Stunden nach Applikation der Substanz 2 relativiert. Die schattierten Symbole repräsentieren Daten der CLL-Patienten, die unschattierten Symbole die Daten der gesunden Spender. Für die statistischen Tests wurde der Kruskal-Wallis Test mit dem Dunn´s Multiple Comparison Test kombiniert (*-sig. = 0,05 – 0,01, **-sig. = 0,01 – 0,001, ***-sig. = 0,001 – 0,001). CLL = chronisch lymphatische Leukämie.

Eine dosisabhängige pro-apoptotische Wirkung lässt sich auch eindeutig bei der Substanz 2 im Vollblut von Gesunden und CLL-Patienten nachweisen. Bereits nach 24 Stunden sind bei der applizierten Konzentration von 4 µM nur noch 65% der CLL-Zellen viable, bei den gesunden Zellen noch > 80%. Auch nach 48 Stunden zeigt die Substanz 2 eine Reduktion der Überlebensrate, jedoch beträgt die Signifikanz nur p = 0,05 – 0,01 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Dennoch ist der pro-apoptotische Effekt der Substanz 2 sowohl nach 24 Stunden, als auch nach 48 Stunden größer als Fludarabin. Als positiven Nebeneffekt lässt sich ebenfalls erkennen, dass die gesunden B-Zellen von der Substanz 1 weniger angegriffen werden als von Fludarabin. Diese Ergebnisse zeigen daher deutlich, dass Substanz 2 nicht nur einen größeren pro-apoptotischen Effekt auf die CLL-Zellen hat als Fludarabin, sondern dass auch die nicht malignen B-Zellen durch die Substanz 2 weniger angegriffen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide Substanzen eine dosisabhängige Wirkung auch im Vollblut aufweisen. Auch zeigen beide Substanzen größere pro-apoptotische Effekte als das bereits eingesetzte Zytostatikum Fludarabin. Des Weiteren haben beide Substanzen, vor allem Substanz 2, eine höhere Spezifität für CLL-Zellen als für nicht maligne B- Zellen und sind damit z.B. Fludarabin überlegen.

4 Diskussion

Die Mikroumgebung spielt eine entscheidende Rolle für das verlängerte Überleben von CLL-Zellen. Während primäre CLL-Zellen in vitro sehr schnell in Apoptose gehen, wird das Überleben der Zellen in vivo durch unterschiedliche Faktoren der Mikroumgebung beeinflusst (Burger et al. 2009, Caligaris-Cappio and Hamblin 1999, Seiffert et al. 2007, Zenz et al. 2010). Dieser Einfluss erfolgt wahrscheinlich direkt durch Zell-Zell-Kontakte oder indirekt durch lösliche Faktoren (Burger and Gandhi 2009). Stromazellen induzieren das verlängerte Überleben der CLL-Zellen unter anderem durch CXCL12/SDF-1 der an den CXCR4-Rezeptor der CLL-Zellen bindet (Burger et al. 1999). Die CLL-Zellen selbst produzieren und exprimieren sowohl Rezeptoren als auch Liganden von pro-survival Faktoren wie zum Beispiel IL2, IL4, IL8, TNFα, VEGF und modulieren dadurch ihr eigenes Überleben (Munk Pedersen and Reed 2004). Das verlängerte Überleben der CLL-Zellen ist damit ein Zusammenspiel von intrinsischen Veränderungen der malignen Zellen und der Interaktion mit der Mikroumgebung. Interessanterweise sind die Interaktionen zwischen den malignen B-Zellen und den nicht malignen Zellen oft bidirektional und konstruieren eine Mikroumgebung, welche die Apoptose der malignen Lymphozyten reduziert (Gorgun et al. 2005, Ramsay et al. 2008).

4.1 Die Bedeutung von IL4 und CD40L für das Überleben der CLL-Zellen

Vor allem die Interaktion zwischen CLL-Zellen und T-Lymphozyten spielt eine wichtige Rolle im Pathomechanismus der CLL (Gorgun et al. 2005). Die T-Lymphozyten fördern das Überleben der CLL-Zellen einerseits durch direkte Zell-Zell-Kontakte, andererseits durch ihre löslichen Faktoren.

Bhattacharya et al. konnten zeigen, dass die Kombination der T-Zell Liganden IL4 und CD40L im Vergleich zu SDF-1, BAFF, APRIL und anti-IgM den größten pro-surival Effekt auf die CLL-Zellen hat (Bhattacharya 2010).

In der Literatur wurde mehrfach beschrieben, dass maligne CLL-Zellen durch Stimulation mit IL4 und CD40L stärker vor Apoptose geschützt werden als nicht-maligne Zellen.
Warum die CLL-Zellen im Vergleich zu den nicht malignen B-Zellen sensitiver auf die Stimulation reagieren ist bis jetzt noch ungeklärt.
Interessanterweise zeigen unsere Dosis-Wirkung-Kurven nach CD40L-Stimulation bei malignen und nicht malignen Zellen eine unterschiedliche Kinetik, während sich die Kinetik nach IL4-Stimulation bei den beiden Zellarten kaum unterscheidet.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass sowohl maligne und zu einem geringeren Grad auch nicht maligne B-Zellen durch Stimulation mit IL4 vor Apoptose geschützt werden. Während CLL-Zellen durch die IL4-Behandlung zu mehr als 54 ± 2% gerettet werden, sind es bei den nicht malignen Zellen nur ca. 30 ± 4%. Dies deutet darauf hin, dass nicht nur die Stimulation der Mikroumgebung, sondern auch die Empfindlichkeit der Zellen auf die Stimulation wichtig für ein verlängertes Überleben der CLL-Zellen sein könnte.
Die Kinetik, die Sättigungskonzentration, die Dissoziationskonstante, Kd 0,01 pM, und das Fehlen eines kooperativen Effekts ($\alpha = 1$) der IL4-Wirkungskurven unterscheiden sich in den malignen und nicht malignen Zellen nicht. Dies deutet darauf hin, dass beide Zelltarten durch die gleichen Signalwege vor Apoptose geschützt werden. Warum jedoch werden malignen Zellen im Vergleich zu nicht malignen Zellen stärker vor Apoptose geschützt? Douglas konnte bereits 1997 zeigen, dass der IL4-Rezeptor bei CLL-Zellen eine dreifach höhere Präsenz an der Zellmembran aufweist als bei den nicht malignen B-Zellen (Douglas et al. 1997). Diese vermehrte Expression erklärt das verbesserte Überleben der CLL-Zellen im Vergleich zu den nicht malignen Zellen bei gleicher IL4-Stimulation.
Durch IL4 werden intrazelluläre Signalwege stimuliert, unter anderem der STAT6-Signalweg. Durch die IL4/IL4R-Interaktion wird STAT6 rekrutiert und durch die Jak-Kinase phosphoryliert (Nelms et al. 1998). Das phosphorylierte STAT6 bildet Dimere und transloziert in den Zellkern (Hebenstreit et al. 2006, Kaplan et al. 1996, Keegan et al. 1994).
Im Zellkern wirkt STAT6 als Transkriptionsfaktor und induziert Gene, wie zum Beispiel c-Jun und NF-κB, welche für die Entwicklung der Th2-Helferzellen von

Bedeutung sind und in der Pathogenese der CLL eine große Rolle spielen. Unter den Zielgenen befindet sich auch CD23, welches von CLL-Zellen sezerniert wird und prognostische Relevanz in der CLL hat (Kay and Pittner 2003).
Um herauszufinden, ob die Apoptoseresistenz der B-Zellen in unseren Experimenten ebenfalls durch die Phosphorylierung von STAT6 zu erklären ist, wurde in weiteren Experimenten das pSTAT6-Level nach IL4-Stimulation sowohl mit Durchflusszytometrie als auch mit Western Blot gemessen.
Unsere Ergebnisse (Abb. 12, Abb. 13) zeigen, dass das verbesserte Überleben der CLL-Zellen im Vergleich zu den nicht malignen Zellen mit einem erhöhten pSTAT6-Level einhergeht. Die CLL-Zellen zeigen in Abbildung 12 ein pSTAT6-Level von ca. 18,6%, während die nicht malignen Zellen ein Level von 8,5% aufweisen. Dieses signifikant erhöhte pSTAT6-Level der CLL-Zellen nach IL4-Stimulation lässt sich auch im Western Blot (Abb. 13) bestätigen. Dies steht im Einklang mit der Publikation von Steele et al. in der der IL4-Signalweg durch den JAK3-Inhibitor PF-956980 blockiert wird und die CLL-Zellen durch die Reduktion des pSTAT6-Levels vermehrt in Apoptose gehen (Steele et al. 2010).
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IL4 maligne und nicht maligne Zellen u.a. über den STAT6-Signalweg vor Apoptose schützt und, dass das verbesserte Ansprechen der CLL-Zellen vermutlich auf die verstärkte Rezeptorexpression der Zellen zurückzuführen ist.

Interessanter ist die Wirkung des CD40 Liganden auf die CLL-Zellen.
Auch überleben die CLL-Zellen durch die CD40L-Stimulation besser als die nicht malignen B-Zellen. Während die CLL-Zellen zu ca. 53 ± 2% überleben, sieht man bei den nicht malignen Zellen nur einen pro-survival Effekt von maximal 20%.
Im Gegensatz zu den IL4-Wirkungskurven zeigen sich bei den CD40L-Wirkungskurven deutliche qualitative Unterschiede. Nicht maligne Zellen weisen nur eine geringe Affinität der Ligand-Rezeptor-Bindung auf (Kd = 70 pM), zeigen jedoch einen kooperativen Effekt in der Wirkungskurve. Im Gegensatz dazu folgt die Antwort der CLL-Zellen auf die sCD40L-Stimulation einem einfachen Bindungsmodell mit steigender Affinität zwischen Ligand und Rezeptor ohne kooperativen Effekt. Dies zeigt sich durch den niedrigen Kd Wert von 2,6 pM bei der Hälfte der Ligandkonzentration bezogen auf das Sättigungsplateau. Diese

Ergebnisse zeigen, dass die CLL-Zellen im Vergleich zu den nicht malignen B-Zellen eine 30fach erhöhte Ligand-Rezeptor-Affinität aufweisen.

Wie erklären sich die unterschiedlichen Dosis-Wirkung-Kurven der malignen und nicht malignen Zellen?

Der CD40-Rezeptor ist ein Mitglied der TNF-Familie und vermittelt die Differenzierung und das Überleben von B-Zellen (Granziero et al. 2001).

Sezernierter CD40L (sCD40L) kann jedoch nur in nicht malignen B-Zellen Proliferation induzieren, nicht aber in CLL-Zellen (Jacob et al. 1998, Schattner et al. 1998). In den CLL-Zellen sind zusätzliche Signale und/oder Vernetzungen am CD40-Rezeptor nötig (Jacob et al. 1998, Schattner et al. 1998).

In den CD40L-Dosis-Wirkung-Kurven der nicht malignen B-Zellen konnten wir einen kooperativen Effekt beobachten, welcher normalerweise durch Oligomerisierung eines Liganden und/oder Rezeptors verursacht wird. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass der CD40L trimerisiert und eine stöchiometrische Interaktion mit dem CD40-Rezeptor, mit einem Kooperationsfaktor h von 2,9 eingeht (Lane et al. 1993, Mazzei et al. 1995). In nicht malignen B-Zellen induziert der trimerische CD40L Proliferation, Differenzierung und verhindert Apoptose (Mazzei et al. 1995).

Das Überleben und die Proliferation werden über den NF-κB-Sigalweg reguliert (Snapper et al. 1996).

In den Dosis-Wirkung-Kurven der CLL-Zellen kann ein Verlust der Kooperativität beobachtet werden (Abb. 11). Bei der Interaktion zwischen CD40L und CD40 kommt es bei den CLL-Zellen zu einem gezielten Verlust der Trimerisierung, welcher zu einem Verlust des kooperativen Effekts führt (Wieckowski et al. 2007). Faszinierenderweise führt die Monomerisierung von CD40L zu einer Veränderung des nachgeordneten NF-κB-Signalwegs (Wieckowski et al. 2007). Die Aktivierung von NF-κB führt durch die Induktion des anti-apoptotischen BCL-2 zu einer verlängerten Überlebenszeit der CLL-Zellen. Im Unterschied zu den nicht malignen Zellen wird die Proliferation der Zellen nicht über den NF-κB-Signalweg induziert (Snapper et al. 1996). Daher stellte wir uns die Frage, ob der Verlust der Kooperativität in den CLL-Zellen, welcher mit dem Verlust der dualen Funktion

Überleben und Proliferation einhergeht, auf Veränderungen des NF-κB-Sigalwegs zurückzuführen ist.
Tatsächlich unterscheidet sich die NF-κB-Aktivität der CLL-Zellen und der nicht malignen Zellen nach CD40L-Stimulation (Abb. 14). Die mediane NF-κB-Aktivität in den CLL-Zellen ist deutlich höher als in den nicht malignen Zellen. Diese Ergebnisse unterstreichen die Vermutung, dass es in den CLL-Zellen durch die Stimulation von CD40L zu einer Modulation der NF-κB-Aktivität kommt. Möglicherweise ist die Ursache der erhöhten NF-κB-Aktivität teilweise eine qualitative Verschiebung des CD40L-Signalwegs von Proliferation in Richtung Überleben in den CLL-Zellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nicht nur die Stimulation der Mikroumgebung das Überleben der CLL-Zellen fördert, sondern dass auch intrinsische Veränderungen der Zellen das Überleben modulieren. Darüber hinaus muss das Signalnetzwerk der CLL-Zellen weiter erforscht werden um den Pathomechanismus besser verstehen zu können und neue Therapiemöglichkeiten für die CLL zu finden.

4.2 Die Interaktion von CLL-Zellen mit der humanen Stromazelllinie HS-5

Nicht nur die Interaktionen mit sekretierten Liganden verbessert das Überleben von CLL-Zellen, sondern auch der direkte Zell-Zell-Kontakt mit der humanen Stromazelllinie HS-5 schützt CLL-Zellen in vitro vor Apoptose (Seiffert et al. 2007). Dagegen gehen CLL-Zellen in normalem Medium wie DMEM sehr schnell in Apoptose.
Ungeklärt ist dabei, welche Signalwege und Gene das Überleben der CLL-Zellen in Kokultur schützen? Um diese Frage zu beantworten haben Kollegen ein Genexpressionsprofil (GEP) eines CLL-Patienten in unterschiedlichen Kulturmedien erstellt (1.5.5).
Das GEP gibt Auskunft über den zeitlichen Verlauf und die Deregulation aller Gene in verschiedenen Kulturmedien. Wie bereits in der Einleitung erläutert, wurden deregulierte Gene identifiziert und anhand weiteren Patienten validiert

(Abb. 15). Vergleicht man die Expressionsmuster der ausgewählten Gene des CLL-Patienten #1 mit den Expressionen der anderen CLL-Patienten #2 - 6 zu den verschiedenen Zeitpunkten, so fällt deutlich auf, dass die Expressionen sich kaum unterscheiden (Abb. 15). Das GEP ist daher nicht patientenspezifisch, sondern kann als Prototyp für die Mehrzahl der CLL-Patienten verwendet werden.

Unter den am stärksten deregulierten Genen in der Kokultur befinden sich Kandidatengene, die bereits mit dem Pathomechanismus der CLL in Verbindung stehen. Ein Beispiel ist PIM2 (pim-2 oncogene), ICAM2 (intercellular adhesion molecule 2) und ICAM3 (intercellular adhesion molecule 3).
Des Weiteren sind Gene dereguliert, die mit Überlebens- oder Apoptose-Signalwegen in Verbindung stehen, wie zum Beispiel PIGY (phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Y) oder PRDX3 (peroxiredoxin 3). Vielversprechende Gene wurden mit Ingenuity Map auf die beteiligten Signalwege und Verknüpfungspunkte zu anderen Genen und Signalwegen untersucht.
Gene, die sowohl in Kokultur als auch in konditionierten Medium gegenüber dem Kontrollexperiment ohne Stimulation (DMEM) dereguliert und hochreguliert waren und zusätzlich mit Apoptose-Signalwegen assoziiert waren, wurden als potentielle pro-survival Gene angesehen.
Mit sechzehn potentiellen pro-survival Genen wurden Knockdown Experimente durchgeführt. Bei diesen Genen handelt es sich um CD27, CDKN2D, CKLF, E2F5, IFITM1; LGALS1, LY96, NME1, PRDX3, PSMA6, RHOC, SELL, STAT1, TCL1A, TNFRSF17, TUBA1C.
Wir stellten die Hypothese auf, dass falls es sich bei den ausgewählten Genen um potentielle pro-survival Gene handeln sollte, würde der Knockdown dieser Gene in einer erhöhten Apotoserate der CLL-Zellen zu sehen sein. Hierzu wurde die Überlebensrate nach den Knockdown Experimenten mittels Durchflusszytometrie ermittelt (Abb. 18). Als Positivkontrolle wurde eine MCL-1-spezifische siRNA verwendet, welche durch das Abschalten des MCL-1 Gens zu einer erhöhten Apoptoserate der malignen B-Zellen führt. Obwohl die Apoptoseinduktion deutlich hinter der des MCL-1 Gens zurück blieb, konnte eine signifikante Reduktion von

p = 0,01-0,001 im Überleben der CLL-Zellen in vitro nach Knockdown von sechs der sechzehn Genen gemessen werden (Abb. 19). Bei diesen Gene handelt es sich um: LGALS1, LY96, PSMA6, SELL, TCL1A, TUBA1C.
Am interessantesten erscheinen uns die Gene TCL1A und PSMA6.

Das Onkogen TCL1A (t-cell leukemia/lymphoma) wird auf dem Chromosom 14q31.2 kodiert und ist in vielen B-Zell Neoplasien inklusive der CLL dereguliert (Zenz et al. 2010).
Eine Überexpression von TCL1A in den CLL-Zellen geht mit einer aggressiveren Form der Erkrankung einher (Pekarsky et al. 2006). Das Onkogen ist ein Koaktivator des NF-κB-Signalwegs und spielt daher eine Rolle in der Apoptoseresistenz der CLL-Zellen (Pekarsky et al. 2000, Pekarsky et al. 2008). Die Reduktion der Überlebensrate durch unsere Knockdown Experimente bestätigen die bereits beobachteten Erkenntnisse und betonen die Rolle von TCL1A in der Apoptoseresistenz. Eine neuere Veröffentlichung konnte zeigen, dass TCL1A mit dem Gen ATM interagiert (Gaudio et al. 2012). Das ATM (ataxia-telangiectasia mutated) Gen ist in der chromosomalen Bande 11q22-q23 lokalisiert und verantwortlich für die Erkrankung Ataxia telangiectasia, die durch zerebelläre Degenerationen, Genominstabilität sowie Prädispositionen für maligne lymphoide Erkrankungen charakterisiert ist (Lavin 2008). ATM ist eine Ser/Th-Kinase, die unter anderem für die Phosphorylierung von IκBa, einem Inhibitor des Transkriptionsfaktor NF-κB, verantwortlich ist. Die Phosphorylierung von IκBα führt zur Aktivierung des NF-κB-Signalwegs, der in vielen hämatologischen Neoplasien involviert ist (Hewamana et al. 2009, Sivina et al. 2012). Der biallelische Verlust von ATM bei der Erkrankung der Ataxia telangiectasia führt zur einer Translokation und Inversion in 14q31.2, welche mit einer Überexpression von TCL1A einhergehen (Cardinaud et al. 2009). Gaudi et al. zeigten weiterhin, dass die Interaktion zwischen ATM und TCL1A zu einer vermehrten Phosphorylierung und Ubiquitinierung des Inhibitors IκBα führt und dadurch zu einer verstärkten Aktivierung des NF-κB-Signalwegs. TCL1 verstärkt einerseits die Aktivität der ATM-Kinase und führt dadurch zu einer vermehrten Phosphorylierung von Iκbα, andererseits interagiert TCL1 direkt mit dem Inhibitor (Gaudio et al. 2012).

Die Interaktion von TCL1A und ATM, besonders ihre Rolle in der Apoptoseresistenz, wurde von unserer Arbeitsgruppe weiter untersucht. TCL1A und ATM zeigen bei CLL-Zellen mit normalem Karyotyp oder mit 13q Deletion ein ähnliches Expressionsmuster nach verschiedenen Stimulationen der CLL-Zellen. Des Weiteren befinden sich die zwei Gene unter den am stärksten deregulierten Genen. Vergleicht man die Interaktionen der acht am stärksten deregulierten Gene untereinander, korreliert die Expression von TCL1A und ATM am stärksten miteinander, was die funktionelle Verknüpfung dieser beiden Gene weiter unterstreicht (Garding et al. 2012).
Wie bereits oben erwähnt, ist die Interaktion von TCL1A und ATM mit dem NF-κB-Signalweg assoziiert. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der Knockdown von TCL1A zu einer Reduktion der Viabilität von CLL-Zellen in vitro führt (Abb. 19). Ob die Apoptoseinduktion mit einer reduzierten NF-κB-Aktivität einhergeht, oder ob es sich um andere Signalwege handelt, die durch TCL1A aktiviert werden, muss in zukünftigen Experimenten weiter untersucht werden.
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TCL1A und ATM eine ähnliche Expressionskinetik nach unterschiedlichen Stimuli in vitro aufweisen und der Knockdown von TCL1A Apoptose induziert. Daher kann man davon ausgehen, dass beide Gene in ähnlichen Signalwegen involviert sind und einen wichtigen Beitrag zur Apoptoseresistenz und der damit einhergehenden massiven Akkumulation von malignen B-Zellen in CLL-Patienten leisten.

Auch PSMA6 (proteasome subunit alpha type-6) in chromosomaler Bande 14q13 kann von seiner Funktion her eine entscheidende Rolle im Pathomechanismus der CLL spielen. PSMA6 ist ein Teil des Proteasomens, das aus α- und ß-Untereinheiten aufgebaut ist. Das Proteasom ist Teil eines nicht-lysosomalen proteolytischen Signalwegs für Proteine, dem Ubiquitin-vermittelten Abbau. Der Proteinabbau spielt eine entscheidene Rolle in der Apoptose, der Zellzykluskontrolle und der Proliferation (Dimmeler et al. 1999, Karin and Delhase 2000, Maki et al. 1996, Salghetti et al. 1999).
Die regulatorische Funktion der Proteasomen spielt in der Tumorgenese und bei den Interaktionen der malignen und nicht malignen Zellen eine wichtige Rolle (Naujokat and Hoffmann 2002). Eine Überexpression von PSMA6 wurde bereits in

verschiedenen Malignitäten, unter anderem auch in leukämischen Zellen, beschrieben (Kumatori et al. 1990). Frühere Daten deuten darauf hin, dass bei manchen hämatologischen Erkrankungen die Proteasomenkonzentration in humanem Blut, welche durch einer erhöhten Tumorlyse der malignen Zellen entsteht, mit der Tumorbelastung der Erkrankungen korreliert (Wada et al. 1993). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in der Anzahl der α6-Untereinheiten mit unterschiedlichen Eigenschaften der Proteasomen, zum Beispiel mit der Differenzierung der leukämischen Zellen, assoziiert sind (Baz et al. 1997). Interessanterweise führt auch die Überexpression von PSMA6 in den malignen Zellen des Multiplen Myeloms zu einer erhöhten Aktivierung von NF-κB (Li et al. 2008). Wie bereits oben beschrieben, kann eine erhöhte NF-κB-Aktivität auch in den CLL-Zellen detektiert werden und geht mit einer schlechteren Prognose der Erkrankung einher (Hewamana et al. 2009). Leider gibt es in der Literatur noch keine Hinweise, ob eine Überexpression von PSMA6 auch bei den CLL-Zellen mit einer erhöhten NF-κB-Aktivität einhergeht. Dennoch kann man sagen, dass beide Gene, TCL1A und PSMA6, mit Apoptosesignalwegen assoziiert sind und beide vermutlich auch eine Rolle in dem NF-κB-Signalweg spielen. Ob beide Gene miteinander verknüpft sind und vielleicht additive Wirkung in Bezug auf die Apoptoseresistenz in den CLL-Zellen haben, muss weiter untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sechs der sechszehn Gene eine signifikante Reduktion in der Überlebensrate der CLL-Zellen aufweisen und viele dieser Gene auch mit Apoptose-Signalwegen assoziiert sind. Wahrscheinlich spielt jedoch keines dieser Gene alleine eine Schlüsselrolle im Pathomechanismus der CLL. Weitere Experimente müssen untersuchen, ob gemeinsame Signalwege, wie zum Beispiel der NF-κB-Signalweg, existieren. Falls dies der Fall sein sollte, muss weiter untersucht werden, ob und wie die Gene sich gegenseitig regulieren. Der nächste Schritt wäre ein gleichzeitiger Knockdown von zwei Genen und die Analyse, ob dieser Knochdown verstärkt Apoptose in CLL-Zellen auslösen kann.

4.3 Identifikation von Substanzen mit Hilfe von GEP, die das Überleben der CLL-Zellen in vitro reduzieren können

Die Mikroumgebung ist wichtig für die Apoptoseresistenz der CLL-Zellen und bietet durch ihre Zell-Zell-Interaktionen und lösliche Faktoren auch wichtige Angriffspunkte für neue Therapiemöglichkeiten in der CLL.

Es gibt bereits neue Ansätze die Mikroumgebung der CLL-Zellen therapeutisch zu modulieren. Lenalidomid, ein Immunmodulator, welcher bereits als Therapeutikum für das Multiple Myelom eingesetzt wird (Palumbo et al. 2012), durchläuft aktuell klinischen Studien für den therapeutischen Einsatz in der CLL (Badoux et al. 2011). Lenalidomid hemmt die von der Mikroumgebung ausgeschütteten Zytokine TNFα, IL6, IL8 und VEGF, die das Überleben und die Proliferation von Tumorzellen fördern (Anderson 2005, Marriott et al. 2003).

Es konnte auch gezeigt werden, dass die Mikroumgebung die Therapieresistenz von CLL-Zellen gegenüber BCL-2-und BCL-X-Inhibitoren um mehr als das 1000fache erhöht (Vogler et al. 2009). Vor allem der BCL-2-Inhibitor ABT-199 gilt als neues vielversprechendes Therapeutikum in der CLL (Souers et al. 2013).

Ein Abgleich der in CLL-Zellen durch Kultur deregulierten Gensignatur mit Datenbanken konnte neue Substanzen identifizieren, die eine ähnliche Signatur auslösen. Eine dieser Datenbanken „Connectivity Map“ verknüpft Medikamente, Gene und Erkrankungen mittels Genexpressionssignaturen (Lamb et al. 2006). Daher bietet uns der GEP Datensatz nicht nur die Möglichkeit potentielle pro-survival Gene der CLL zu detektieren, sondern kann ebenfalls dazu genutzt werden, neue Substanzen und Medikamente zu finden, welche das Überleben der CLL-Zellen in Kokultur mit HS-5 reduzieren.

Es wurden Substanzen gewählt, die ein Genexpressionsprofil induzieren, das mit dem Genexpressionsprofil der CLL-Zellen in Kokultur negativ korreliert. Wir untersuchten daher, ob diese Substanzen den pro-survival Effekt der Kokultur umkehren können (1.5.7).

Unter den ausgewählten Substanzen befinden sich Substanzen, welche bereits im Zusammenhang mit der CLL beschrieben wurden wie zum Beispiel LY-294002 oder Bortezomib. Der PI3-Kinase-Inhibitor LY-294002 hemmt den PI3-Kinase-Signalweg, welcher bereits als pro-survival Signalweg in den CLL-Zellen beschrieben wurde (Cuni et al. 2004). Kinaseinhibitoren rücken immer mehr in den

Fokus als neue Therapiemöglichkeiten bei hämatologischen Erkrankungen (Byrd et al. 2004, O'Brien 2008, Robak and Robak 2012). Auch der Proteasomeninhibitor Bortezomib führt zu einem vermehrten Sterben der CLL-Zellen in vitro (Jantus-Lewintre et al. 2006). Eine weitere Gruppe stellen die Herzglykoside dar, die die N^+/K^+-ATPase aktivieren. Sie aktivieren komplexe Signalkaskaden und führen zur Deregulation von Proteinen wie BCL-2, welches Apoptose in Tumorzellen verhindern kann (Newman et al. 2008, Xie and Cai 2003). Um das Wirkungspotential dieser Substanzen zu bestimmen, wurden primäre CLL-Zellen mit der humanen Stromazelllinie HS-5 kokultiviert und mit aufsteigenden Konzentrationen der Substanzen behandelt (Abb. 20). Fludarabin, ein Purinanalogon das bereits als Zytostatikum bei der CLL eingesetzt wird, wurde als Positivkontrolle benutzt. Aus den Dosis-Wirkung-Kurven wurde der IC_{50}-Wert für jede Substanz berechnet. Der IC_{50}-Wert gibt die Konzentration eines Inhibitors an, die für die halbmaximale Inhibition eines Targets notwendig ist. In der Pharmakologie werden die IC_{50}-Werte verwendet, um die Wirkungsstärke diverser Antagonisten miteinander zu vergleichen.
Vier Substanzen mit niedrigen IC_{50}-Werten und somit hoher pro-apoptotischer Aktivität wurden für weitere Experimente ausgewählt:
Zwei Alkaloide (Substanz 1 und 2), ein Herzglykosid (Substanz 3), sowie ein Kinaseinhibitor (Substanz 4).
Die Substanzen 3 und 4 wurden von einer Kollegin untersucht und werden deshalb hier nicht diskutiert.

Als nächster Schritt wurde untersucht, ob die Substanzen spezifisch auf CLL-Zellen wirken oder ob auch nicht maligne B-Zellen durch die Substanzen vermehrt in Apoptose gehen (Abb. 21). Die IC_{50}-Werte der zwei ausgewählten Substanzen liegen bei den gesunden B-Zellen deutlich über den IC_{50}-Werten der malignen B-Zellen. Zum Beispiel beträgt der IC_{50}-Wert der Substanz 1 bei den CLL-Zellen nur 0,287 µM während er bei den gesunden Zellen bei 0,678 µM liegt. Bei Substanz 2 ist bei den gesunden Zellen im Vergleich zu den CLL-Zellen sogar die dreifache Konzentration notwendig um 50% der Zellen zu töten. Dies zeigt, dass die Substanzen in niedrigen Konzentrationen einen stärkeren pro-apoptotischen Effekt bei den CLL-Zellen im Vergleich zu den nicht malignen B-Zellen aufweisen. Die

Ergebnisse zeigen, dass die Substanzen nicht spezifisch auf CLL-Zellen wirken, jedoch der Apoptoseeffekt bei den CLL-Zellen gegenüber den nicht malignen Zellen deutlich erhöht ist.

Anschließend wurde die Substanzen ex vivo in peripherem Vollblut von fünf CLL-Patienten und fünf gesunden Spendern getestet. Peripherblut ist im Vergleich zu den Zellkulturmethoden eine komplexere Umgebung und enthält unter anderem Plasmaproteine wie Albumin, welches mit Substanzen interagieren kann und dadurch die Wirkung der Substanzen reduzieren kann (Meyer and Guttman 1968). Vergleicht man die Zahlen der B-Zellen im Peripherblut der Spender miteinander, fällt die Variabilität der Zellzahlen auf. Während die Gesunden Zahlen zwischen 130 Zellen/ml und 270 Zellen/ml aufweisen, variiert die Zahl der Zellen bei den Patienten von 18000 Zellen/ml bis 85000 Zellen/ml. Um die Wirkungseffekte der Substanzen trotzdem miteinander vergleichen zu können, wurden die Zahl der B-Zellen auf die unbehandelten Kontrollen normalisiert. Als Referenzsubstanz wurde Fludarabin benutzt.

Substanz 1 führt sowohl bei Zellen von gesunden Probanden als auch bei den CLL-Zellen nach 24 Stunden und 48 Stunden zu einer Reduktion der B-Zellen (Abb. 22). Interessanterweise gehen die CLL-Zellen (28% lebendige Zellen) im Vergleich zu den nicht malignen B-Zellen (60% lebendige Zellen) vermehrt in Apoptose, was dafür spricht, dass die Substanz stärker und selektiver auf maligne als auf nicht maligne Zellen wirkt. Des Weiteren zeigt die Substanz 1 im Vergleich der Messung nach 24 Stunden und 48 Stunden eine zeitliche Zunahme ihrer Wirkung (Abb. 22). Auch zeigt die Substanz 1 in ihrer Höchstdosis (4 µM), die weit unter der Höchstdosis von Fludarabin (10 µM) liegt, eine größere Wirkung als Fludarabin (Abb. 22). Die Substanz 1 wirkt daher nicht nur spezifischer auf die CLL-Zellen, sondern zeigt gegenüber dem bereits eingesetzten Therapeutikum Fludarabin auch eine stärkere pro-apoptotische Wirkung.

Auch Substanz 2 führt zu einer Reduktion der Überlebenszeit der malignen und nicht malignen B-Zellen im Peripherblut (Abb. 23). Während nach 24 Stunden kaum eine Reduktion der Überlebenszeit zu detektieren ist, zeigt sich nach 48

Stunden eine deutliche Reduktion (ca. 55% lebendige Zellen) (Abb. 23). Vergleicht man die zwei Substanzen, so ist die Effektivität der zweiten Substanz niedriger. Dennoch zeigt auch Substanz 2 in ihrer Höchstkonzentration (4 µM) eine stärkere Wirksamkeit bei den CLL-Zellen als Fludarabin (10 µM). Interessanterweise zeigt Fludarabin bei den nicht malignen B-Zellen eine stärkere Wirkung als Substanz 2. Aus dieser Beobachtung geht hervor, dass Fludarabin toxischer auf nicht maligne B-Zellen wirkt und eine geringere Effektivität in CLL-Zellen aufweist als die neu getestete Substanz 2.

Bei den zwei Substanzen handelt es sich um natürliche Alkaloide, die bereits als Therapeutika eingesetzt werden. Die Substanzen sind chemisch eng miteinander verwandt. Substanz 1 entspricht der nicht methylierten Form der Substanz 2. Während Substanz 2 in den letzten Jahren immer wieder Bestandteil von experimenteller und klinischer Forschung bezüglich Tumortherapien war, gibt es zu Substanz 1 kaum Daten.

Bei Substanz 2 handelt es sich um einen Proteinsyntheseinhibitor, welcher die Translokation der Peptidyl-tRNA an die Ribosomen blockiert (Grollman and Huang 1973). Die Substanz wurde bereits Jahrzehnte lang in der Therapie der Amoebiasis eingesetzt. Darüber hinaus wurde die Substanz bereits in einer Phase II Studie als Therapeutikum für solide Tumoren evaluiert (Siddiqui et al. 1973). Laut Literatur reguliert die Substanz 2 die Apoptose in verschiedenen Tumorzelllinien über das alternative Splicing von BCL-X, welches zu der BCL-2-Proteinfamilie gehört. Die kürzere Isoform, BCL-XS, wirkt pro-apoptotisch, wohingegen BCL-XL anti-apoptotisch wirkt (Boise et al. 1993). Das natürliche Alkaloid forciert die pro-apoptotische Variante BCL-XS und erhöht den Quotienten von BCL-XS / BCL-XL (Boon-Unge et al. 2007). Auch in den CLL-Zellen kann während des Apoptosevorgangs eine erhöhte Expression der pro-apoptotischen BCL-XS-Isoform detektiert werden (Willimott et al. 2011). Leider konnte diese erhöhte Expression von Willimott et al. nach einer Behandlung mit der Substanz 2 nicht gemessen werden. Auch führt die Behandlung laut Willimott et al. nicht zu einer signifikanten Reduktion der Überlebensrate (Willimott et al. 2011). Unsere Arbeitsgruppe konnte jedoch sowohl in primären isolierten CLL-Zellen sowie im

Peripherblut von CLL-Patienten eine signifikante Reduktion der Überlebensrate nach Behandlung mit der Substanz 2 zeigen (Abb. 21 und 23). Ob die Zellen eine erhöhte Expression von BCL-XS nach der Behandlung aufweisen oder ob die Substanz über einen anderen Wirkmechanismus die CLL-Zellen in Apoptose führt, muss weiter untersucht werden. Man kann jedoch davon ausgehen, dass die Wirkung des natürlichen Alkaloids nicht allein auf der vermehrten Expression des pro-apoptotischen BCL-XS beruht, sondern auch andere Signalwege involviert sind.

Interessanterweise verstärkt das natürliche Alkaloid die Wirkung von verschiedenen Chemotherapeutika wie Doxorubicin, Etoposid, Docetaxel und Oxaliplatin in Tumorzelllinien (Larsson et al. 2009). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch eine Kombination von Cisplatin und Substanz 2 die Expression der pro-apoptotischen Gene wie z. B. BAK1, CASP3, CASP8, CASP9, TNFRSF6 und TNFRSF9 in Jurkat Zellen signifikant erhöht werden, wohingegen durch die Behandlung von Cisplatin alleine nur CASP8 und TNFRSF6 erhöht werden (Moller et al. 2007).

In jüngster Zeit rückt der Transkriptionsfaktor HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) immer mehr in den Fokus des Pathomechansimus der malignen Tumorzellen. HIF-1 reguliert die Antwort der Zellen auf Hypoxie in der normalen Entwicklung und in pathologischen Prozessen wie z.B. kardiovaskulären Erkrankungen oder Tumoren. Das schnelle Wachstum der Tumorzellen führt zu einer hypoxischen Umgebung, welche HIF-abhängige Überlebens-Signalwege und Angiogenese induziert.

Des Weiteren reguliert HIF-1 eine Vielzahl von Gene, welche bei Apoptose, Invasion und Metastasierung eine wichtige Rolle spielen (Greer et al. 2012). In vielen Tumorzelllinien konnte eine Überexpression des Transkriptionsfaktors detektiert werden. In der akuten lymphatischen und akuten myeloischen Leukämie geht die Überexpression dieses Faktors mit einer schlechteren Prognose und verminderter Ansprechrate der Chemotherapie einher (Deeb et al. 2011, Wellmann et al. 2004). Shachar et al. konnten auch in CLL-Zellen eine Überexpression des HIF-1-Transkriptionsfaktors zeigen. Im Gegensatz zu den nicht malignen B-Zellen exprimieren die CLL-Zellen HIF-1 sogar unter Normoxie

(Shachar et al. 2012). Daher gilt die Blockade des Transkriptionsfaktors HIF-1 als ein viel versprechender neuer Therapieansatz in der Tumortherapie.

Auch unsere beiden Substanzen können die Akkumulation der HIF-1 Proteine verhindern und das HIF-abhängigen Level des Wachstumsfaktors VEGF reduzieren (Zhou et al. 2005). Kong et al. konnten zeigen, dass Substanz 2 in klarzelligen Nierenkarzinomen zu einer Reduktion des hypoxia-inducible factor-2α führt (Kong et al. 2010). Die Substanz führt zu einer Reduktion der HIF-abhängigen Zielgene wie z.B. VEGF, sowie zu einer Reduktion der VEGF- und TGF-Synthese in den Nierenkarzinomzellen. Diese Genprodukte sind für die HIF-regulierte Proangiogenese und die pro-survival Proteine essentiell, welche die Tumorgenität vermitteln (Kong et al. 2010).

Zusammen mit der Literatur zeigen unsere Daten das Potential der Substanz 2 als neue Therapieoption auf. Es muss weiter untersucht werden, ob Substanz 2 auch in leukämischen Zellen zu einer Reduktion der HIF-1-Aktivierung und des VEGF-Levels führt. Falls dies zutreffen sollte, bieten Substanz 2 und 1 neue interessante Ansatzmöglichkeiten für die Behandlung von hämatologischen Neoplasien, welche gezielt in die Signalwege der malignen Zellen eingreifen.

Die Ergebnisse sind vielversprechend und der Abgleich des in Kultur induzierten Genexpressionsprofil mit einem Datenkollektiv wie „Connectivity Map“ stellt eine gute Möglichkeit dar, neue Therapiemöglichkeiten für verschiedene Erkrankungen zu finden. Es ist wichtig, die Wirkungsweise und die Angriffspunkte der Substanzen weiter zu erforschen um neue Erkenntnisse über den Pathomechanismus und die Bedeutung der Mikroumgebung zu erlangen. So können CLL-Patienten neue Therapiemöglichkeiten angeboten werden, die die Klinik und das Überleben der Patienten verbessern können.

5 Zusammenfassung

Die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) ist die häufigste Leukämieform der westlichen Welt. Während die immuninkompetenten CLL-Zellen im peripheren Blut akkumulieren und eine verlängerte Überlebenszeit aufweisen, gehen sie in vitro sehr schnell in Apoptose. Dies deutet darauf hin, dass die Mikroumgebung eine entscheidende Rolle in der Apoptoseresistenz der Zellen spielt.
In dieser Doktorarbeit wurden verschiedene Signalwege und Gene, welche für die bidirektionalen Interaktionen zwischen den CLL-Zellen und ihrer Mikroumgebung relevant sind, analysiert.

Als erstes wurde die Bedeutung der Mikroumgebungs-Stimuli Interleukin 4 und CD40 Ligand auf die verlängerte Überlebenszeit der CLL-Zellen untersucht.
Die Überlebensantwort der CLL-Zellen auf die löslichen Liganden wurde analysiert und anschließend mit der Überlebensantwort der nicht malignen B-Zellen verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die CLL-Zellen stärker auf die löslichen Liganden der Mikroumgebung reagieren, als die nicht malignen B-Zellen. Des Weiteren wurde untersucht, welche Signalwege für die unterschiedliche Überlebensantworten verantwortlich sind und welche intrinsischen Veränderungen die CLL-Zellen, im Vergleich zu den nicht malignen B-Zellen, durchlaufen.

Zweitens wurde der Einfluss der Kokultur der humanen Knochenmarksstromazelllinie HS-5 auf die Apoptoseresistenz der CLL-Zellen untersucht. Wichtige Gene und Signalwege wurden mit Hilfe eines Genexpressionsprofils eines CLL-Patienten in unterschiedlichen Kulturmedien und der Analysesoftware „Ingenuity Pathway Analysis“ identifiziert. Ob die ausgewählten Gene die Apoptoreresistenz der CLL-Zellen in Kokultur mit den HS-5 beeinflussen, wurde mit Knockdown Experimenten weiter untersucht. Die Herunterregulation von sechs der sechszehn ausgewählten Gene (LGALS1 (lectin, galactoside-binding, soluble 1), LY96 (lymphocyte antigen 96), PSMA6 (proteasome subunit alpha type-6), SELL (selectin L), TCL1A (t-cell

leukemia/lymphoma) TUBA1C (tubulin alpha-6 chain)) zeigte eine signifikante Reduktion der Überlebensrate der CLL-Zellen.

Als dritter Punkt wurde die Mikroumgebung als Ansatzpunkt für neue Therapiemöglichkeiten in der CLL analysiert. Mit Hilfe des Genexpressionsprofils und des Datenkollektivs „Connectivity Map“ wurden Substanzen ausgewählt, welche die supportiven Stimuli der Mikroumgebung auf das Überleben der CLL-Zellen reduzieren.
Zuerst wurde das Potential der ausgewählten Substanzen anhand der IC_{50}-Werte der Substanzen bestimmt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Substanzen stärker auf CLL-Zellen wirken, als auf nicht maligne B-Zellen. Anschließend wurde mit Hilfe des Whole Blood Assay untersucht, ob die Substanzen auch im peripheren Blut von CLL-Patienten wirken. Die beiden untersuchten Substanzen zeigen auch im Peripherblut eine Reduktion der Überlebensrate der CLL-Zellen und können somit als interessante und vielversprechende neue Therapieansätze in der CLL angesehen werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Anderson KC: Lenalidomide and thalidomide: mechanisms of action--similarities and differences. *Semin Hematol* 42: S3-8, (2005).
2. Badoux XC, Keating MJ, Wen S, Lee BN, Sivina M, Reuben J, Wierda WG, O'Brien SM, Faderl S, Kornblau SM, Burger JA, Ferrajoli A: Lenalidomide as initial therapy of elderly patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 118: 3489-98, (2011).
3. Baz A, Henry L, Caravano R, Scherrer K, Bureau JP: Changes in the subunit distribution of prosomes (MCP-proteasomes) during the differentiation of human leukemic cells. *Int J Cancer* 72: 467-76, (1997).
4. Bhattacharya N.: Microenvironmental Signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia. Dissertation, Universität Ulm (2010).
5. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F: A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48: 198-206, (1981).
6. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB: bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74: 597-608, (1993).
7. Boon-Unge K, Yu Q, Zou T, Zhou A, Govitrapong P, Zhou J: Emetine regulates the alternative splicing of Bcl-x through a protein phosphatase 1-dependent mechanism. *Chem Biol* 14: 1386-92, (2007).
8. Burger JA: Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011: 96-103, (2011).
9. Burger JA, Buggy JJ: Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765). *Leuk Lymphoma* 54: 2385-91, (2013).
10. Burger JA, Burger M, Kipps TJ: Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood* 94: 3658-67, (1999).
11. Burger JA, Gandhi V: The lymphatic tissue microenvironments in chronic lymphocytic leukemia: in vitro models and the significance of CD40-CD154 interactions. *Blood* 114: 2560-1; author reply 2561-2, (2009).
12. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F: The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* 114: 3367-75, (2009).
13. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ: Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 96: 2655-63, (2000).
14. Burkle A, Niedermeier M, Schmitt-Graff A, Wierda WG, Keating MJ, Burger JA: Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 110: 3316-25, (2007).

15. Buske C, Gogowski G, Schreiber K, Rave-Frank M, Hiddemann W, Wormann B: Stimulation of B-chronic lymphocytic leukemia cells by murine fibroblasts, IL-4, anti-CD40 antibodies, and the soluble CD40 ligand. *Exp Hematol* 25: 329-37, (1997).
16. Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW: Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 163-83, (2004).
17. Caligaris-Cappio F, Ghia P: Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? *J Clin Oncol* 26: 4497-503, (2008).
18. Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ: B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol* 17: 399-408, (1999).
19. Cardinaud B, Moreilhon C, Marcet B, Robbe-Sermesant K, LeBrigand K, Mari B, Eclache V, Cymbalista F, Raynaud S, Barbry P: miR-34b/miR-34c: a regulator of TCL1 expression in 11q- chronic lymphocytic leukaemia? *Leukemia* 23: 2174-7, (2009).
20. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M: Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 352: 804-15, (2005).
21. Collins RJ, Verschuer LA, Harmon BV, Prentice RL, Pope JH, Kerr JF: Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol* 71: 343-50, (1989).
22. Corral LG, Haslett PA, Muller GW, Chen R, Wong LM, Ocampo CJ, Patterson RT, Stirling DI, Kaplan G: Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha. *J Immunol* 163: 380-6, (1999).
23. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marce S, Lopez-Guillermo A, Campo E, Montserrat E: ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 348: 1764-75, (2003).
24. Cuni S, Perez-Aciego P, Perez-Chacon G, Vargas JA, Sanchez A, Martin-Saavedra FM, Ballester S, Garcia-Marco J, Jorda J, Durantez A: A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 18: 1391-400, (2004).
25. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N: Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94: 1840-7, (1999).
26. Deaglio S, Vaisitti T, Bergui L, Bonello L, Horenstein AL, Tamagnone L, Boumsell L, Malavasi F: CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood* 105: 3042-50, (2005).
27. Deeb G, Vaughan MM, McInnis I, Ford LA, Sait SN, Starostik P, Wetzler M, Mashtare T, Wang ES: Hypoxia-inducible factor-1alpha protein expression is associated with poor survival in normal karyotype adult acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 35: 579-84, (2011).
28. Di Giovanni S, Valentini G, Carducci P, Giallonardo P: Beta-2-microglobulin is a reliable tumor marker in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol* 81: 181-5, (1989).

29. Dimmeler S, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM: Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J Exp Med* 189: 1815-22, (1999).
30. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P: Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343: 1910-6, (2000).
31. Dores GM, Anderson WF, Curtis RE, Landgren O, Ostroumova E, Bluhm EC, Rabkin CS, Devesa SS, Linet MS: Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *Br J Haematol* 139: 809-19, (2007).
32. Douglas RS, Capocasale RJ, Lamb RJ, Nowell PC, Moore JS: Chronic lymphocytic leukemia B cells are resistant to the apoptotic effects of transforming growth factor-beta. *Blood* 89: 941-7, (1997).
33. Dyer MJ, Zani VJ, Lu WZ, O'Byrne A, Mould S, Chapman R, Heward JM, Kayano H, Jadayel D, Matutes E, et al.: BCL2 translocations in leukemias of mature B cells. *Blood* 83: 3682-8, (1994).
34. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ: Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* 229: 152-72, (2009).
35. Fluckiger AC, Rossi JF, Bussel A, Bryon P, Banchereau J, Defrance T: Responsiveness of chronic lymphocytic leukemia B cells activated via surface Igs or CD40 to B-cell tropic factors. *Blood* 80: 3173-81, (1992).
36. Garding A, Bhattacharya N, Haebe S, Mueller F, Weichenhan D, Idler I, Ickstadt K, Stilgenbauer S, Mertens D: TCL1A and ATM are coexpressed in chronic lymphocytic leukemia cells without deletion of 11q. *Haematologica*, (2012).
37. Gaudio E, Spizzo R, Paduano F, Luo Z, Efanov A, Palamarchuk A, Leber AS, Kaou M, Zanesi N, Bottoni A, Costinean S, Rassenti LZ, Nakamura T, Kipps TJ, Aqeilan RI, Pekarsky Y, Trapasso F, Croce CM: Tcl1 interacts with Atm and enhances NF-kappaB activation in hematologic malignancies. *Blood* 119: 180-7, (2012).
38. Ghia P, Ferreri AM, Caligaris-Cappio F: Chronic lymphocytic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 64: 234-46, (2007).
39. Gorgun G, Holderried TA, Zahrieh D, Neuberg D, Gribben JG: Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. *J Clin Invest* 115: 1797-805, (2005).
40. Granziero L, Ghia P, Circosta P, Gottardi D, Strola G, Geuna M, Montagna L, Piccoli P, Chilosi M, Caligaris-Cappio F: Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 97: 2777-83, (2001).
41. Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, Ohh M: The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J* 31: 2448-60, (2012).
42. Grollman AP, Huang MT: Inhibitors of protein synthesis in eukaryotes: tools in cell research. *Fed Proc* 32: 1673-8, (1973).
43. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA: Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400: 464-8, (1999).
44. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ: Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from

the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 111: 5446-56, (2008).

45. Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dietzfelbinger H, Adorf D, Ostwald M, Busch R, Kuhn-Hallek I, Thiel E, Emmerich B: Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 93: 1732-7, (1999).
46. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK: Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94: 1848-54, (1999).
47. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70, (2000).
48. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD: The World Health Organization classification of hematological malignancies report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Mod Pathol* 13: 193-207, (2000).
49. Hebenstreit D, Wirnsberger G, Horejs-Hoeck J, Duschl A: Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev* 17: 173-88, (2006).
50. Hewamana S, Lin TT, Rowntree C, Karunanithi K, Pratt G, Hills R, Fegan C, Brennan P, Pepper C: Rel a is an independent biomarker of clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 27: 763-9, (2009).
51. Jacob A, Pound JD, Challa A, Gordon J: Release of clonal block in B cell chronic lymphocytic leukaemia by engagement of co-operative epitopes on CD40. *Leuk Res* 22: 379-82, (1998).
52. Jantus-Lewintre E, Sarsotti E, Terol MJ, Benet I, Garcia-Conde J: Bortezomib induces different apoptotic rates in B-CLL cells according to IgVH and BCL-6 mutations. *Clin Transl Oncol* 8: 805-11, (2006).
53. Kallander CF, Simonsson B, Hagberg H, Gronowitz JS: Serum deoxythymidine kinase gives prognostic information in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 54: 2450-5, (1984).
54. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ: Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4: 313-9, (1996).
55. Karin M, Delhase M: The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol* 12: 85-98, (2000).
56. Kay NE, Pittner BT: IL-4 biology: impact on normal and leukemic CLL B cells. *Leuk Lymphoma* 44: 897-903, (2003).
57. Keegan A, Nelms K, Paul WE: The IL-4 receptor--signaling mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 365: 211-5, (1994).
58. Keegan AD, Nelms K, Wang LM, Pierce JH, Paul WE: Interleukin 4 receptor: signaling mechanisms. *Immunol Today* 15: 423-32, (1994).
59. Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, Wang HG, Zhang X, Bullrich F, Croce CM, Rai K, Hines J, Reed JC: Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* 91: 3379-89, (1998).
60. Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC: Bryostatin and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes

in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 106: 995-1004, (1999).
61. Kong HS, Lee S, Beebe K, Scroggins B, Gupta G, Lee MJ, Jung YJ, Trepel J, Neckers L: Emetine promotes von Hippel-Lindau-independent degradation of hypoxia-inducible factor-2alpha in clear cell renal carcinoma. *Mol Pharmacol* 78: 1072-8, (2010).
62. Krober A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Bruckle E, Lichter P, Dohner H, Stilgenbauer S: V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100: 1410-6, (2002).
63. Kumatori A, Tanaka K, Inamura N, Sone S, Ogura T, Matsumoto T, Tachikawa T, Shin S, Ichihara A: Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7071-5, (1990).
64. Kuppers R: Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 5: 251-62, (2005).
65. Lamb J, Crawford ED, Peck D, Modell JW, Blat IC, Wrobel MJ, Lerner J, Brunet JP, Subramanian A, Ross KN, Reich M, Hieronymus H, Wei G, Armstrong SA, Haggarty SJ, Clemons PA, Wei R, Carr SA, Lander ES, Golub TR: The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* 313: 1929-35, (2006).
66. Lane P, Brocker T, Hubele S, Padovan E, Lanzavecchia A, McConnell F: Soluble CD40 ligand can replace the normal T cell-derived CD40 ligand signal to B cells in T cell-dependent activation. *J Exp Med* 177: 1209-13, (1993).
67. Larsson DE, Hassan S, Larsson R, Oberg K, Granberg D: Combination analyses of anti-cancer drugs on human neuroendocrine tumor cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 65: 5-12, (2009).
68. Lavin MF: Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 759-69, (2008).
69. Li ZW, Chen H, Campbell RA, Bonavida B, Berenson JR: NF-kappaB in the pathogenesis and treatment of multiple myeloma. *Curr Opin Hematol* 15: 391-9, (2008).
70. Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP: Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 776-81, (2003).
71. MacLennan IC: Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 12: 117-39, (1994).
72. Maki CG, Huibregtse JM, Howley PM: In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Res* 56: 2649-54, (1996).
73. Marriott JB, Dredge K, Dalgleish AG: Thalidomide derived immunomodulatory drugs (IMiDs) as potential therapeutic agents. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 3: 181-6, (2003).
74. Mazzei GJ, Edgerton MD, Losberger C, Lecoanet-Henchoz S, Graber P, Durandy A, Gauchat JF, Bernard A, Allet B, Bonnefoy JY: Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active. *J Biol Chem* 270: 7025-8, (1995).
75. Meyer MC, Guttman DE: The binding of drugs by plasma proteins. *J Pharm Sci* 57: 895-918, (1968).

76. Minshall C, Arkins S, Freund GG, Kelley KW: Requirement for phosphatidylinositol 3'-kinase to protect hemopoietic progenitors against apoptosis depends upon the extracellular survival factor. *J Immunol* 156: 939-47, (1996).
77. Moller M, Herzer K, Wenger T, Herr I, Wink M: The alkaloid emetine as a promising agent for the induction and enhancement of drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Oncol Rep* 18: 737-44, (2007).
78. Munk Pedersen I, Reed J: Microenvironmental interactions and survival of CLL B-cells. *Leuk Lymphoma* 45: 2365-72, (2004).
79. Naujokat C, Hoffmann S: Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest* 82: 965-80, (2002).
80. Nelms K, Huang H, Ryan J, Keegan A, Paul WE: Interleukin-4 receptor signalling mechanisms and their biological significance. *Adv Exp Med Biol* 452: 37-43, (1998).
81. Newman RA, Yang P, Pawlus AD, Block KI: Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. *Mol Interv* 8: 36-49, (2008).
82. Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, Zvaifler NJ, Kipps TJ: Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood* 106: 1012-20, (2005).
83. Nordling CO: A new theory on cancer-inducing mechanism. *Br J Cancer* 7: 68-72, (1953).
84. O'Brien S: New agents in the treatment of CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 457-64, (2008).
85. Palumbo A, Hajek R, Delforge M, Kropff M, Petrucci MT, Catalano J, Gisslinger H, Wiktor-Jedrzejczak W, Zodelava M, Weisel K, Cascavilla N, Iosava G, Cavo M, Kloczko J, Blade J, Beksac M, Spicka I, Plesner T, Radke J, Langer C, Ben Yehuda D, Corso A, Herbein L, Yu Z, Mei J, Jacques C, Dimopoulos MA: Continuous lenalidomide treatment for newly diagnosed multiple myeloma. *N Engl J Med* 366: 1759-69, (2012).
86. Panayiotidis P, Jones D, Ganeshaguru K, Foroni L, Hoffbrand AV: Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol* 92: 97-103, (1996).
87. Pekarsky Y, Koval A, Hallas C, Bichi R, Tresini M, Malstrom S, Russo G, Tsichlis P, Croce CM: Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3028-33, (2000).
88. Pekarsky Y, Palamarchuk A, Maximov V, Efanov A, Nazaryan N, Santanam U, Rassenti L, Kipps T, Croce CM: Tcl1 functions as a transcriptional regulator and is directly involved in the pathogenesis of CLL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19643-8, (2008).
89. Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, Volinia S, Alder H, Liu CG, Rassenti L, Calin GA, Hagan JP, Kipps T, Croce CM: Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res* 66: 11590-3, (2006).
90. Pleyer L, Egle A, Hartmann TN, Greil R: Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches. *Nat Rev Clin Oncol* 6: 405-18, (2009).
91. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS: Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46: 219-34, (1975).

92. Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, Gorgun G, Le Dieu R, Blum W, Byrd JC, Gribben JG: Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest* 118: 2427-37, (2008).
93. Rezvany MR, Jeddi-Tehrani M, Wigzell H, Osterborg A, Mellstedt H: Leukemia-associated monoclonal and oligoclonal TCR-BV use in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 101: 1063-70, (2003).
94. Robak T, Robak E: Tyrosine kinase inhibitors as potential drugs for B-cell lymphoid malignancies and autoimmune disorders. *Expert Opin Investig Drugs* 21: 921-47, (2012).
95. Salghetti SE, Kim SY, Tansey WP: Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *EMBO J* 18: 717-26, (1999).
96. Schattner EJ, Mascarenhas J, Reyfman I, Koshy M, Woo C, Friedman SM, Crow MK: Chronic lymphocytic leukemia B cells can express CD40 ligand and demonstrate T-cell type costimulatory capacity. *Blood* 91: 2689-97, (1998).
97. Seiffert M, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P: Efficient nucleofection of primary human B cells and B-CLL cells induces apoptosis, which depends on the microenvironment and on the structure of transfected nucleic acids. *Leukemia* 21: 1977-83, (2007).
98. Shachar I, Cohen S, Marom A, Becker-Herman S: Regulation of CLL survival by hypoxia-inducible factor and its target genes. *FEBS Lett* 586: 2906-10, (2012).
99. Siddiqui S, Firat D, Olshin S: Phase II study of emetine (NSC-33669) in the treatment of solid tumors. *Cancer Chemother Rep* 57: 423-8, (1973).
100. Siebenlist U, Brown K, Claudio E: Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB. *Nat Rev Immunol* 5: 435-45, (2005).
101. Sivina M, Hartmann E, Vasyutina E, Boucas JM, Breuer A, Keating MJ, Wierda WG, Rosenwald A, Herling M, Burger JA: Stromal cells modulate TCL1 expression, interacting AP-1 components and TCL1-targeting micro-RNAs in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 26: 1812-20, (2012).
102. Snapper CM, Zelazowski P, Rosas FR, Kehry MR, Tian M, Baltimore D, Sha WC: B cells from p50/NF-kappa B knockout mice have selective defects in proliferation, differentiation, germ-line CH transcription, and Ig class switching. *J Immunol* 156: 183-91, (1996).
103. Souers AJ, Leverson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, Dayton BD, Ding H, Enschede SH, Fairbrother WJ, Huang DC, Hymowitz SG, Jin S, Khaw SL, Kovar PJ, Lam LT, Lee J, Maecker HL, Marsh KC, Mason KD, Mitten MJ, Nimmer PM, Oleksijew A, Park CH, Park CM, Phillips DC, Roberts AW, Sampath D, Seymour JF, Smith ML, Sullivan GM, Tahir SK, Tse C, Wendt MD, Xiao Y, Xue JC, Zhang H, Humerickhouse RA, Rosenberg SH, Elmore SW: ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 19: 202-8, (2013).
104. Spriggs MK, Armitage RJ, Strockbine L, Clifford KN, Macduff BM, Sato TA, Maliszewski CR, Fanslow WC: Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion. *J Exp Med* 176: 1543-50, (1992).

105. Statistisches Bundesamt: Todesursachen 2011
Link:http://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html
aufgerufen am 28.06.2013
106. Steele AJ, Prentice AG, Cwynarski K, Hoffbrand AV, Hart SM, Lowdell MW, Samuel ER, Wickremasinghe RG: The JAK3-selective inhibitor PF-956980 reverses the resistance to cytotoxic agents induced by interleukin-4 treatment of chronic lymphocytic leukemia cells: potential for reversal of cytoprotection by the microenvironment. *Blood* 116: 4569-77, (2010).
107. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F: Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 103: 4389-95, (2004).
108. Stilgenbauer S, Hallek M: [Chronic lymphocytic leukemia. Treatment and genetic risk profile]. *Internist (Berl)* 54: 164, 166-70, (2013).
109. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA: The cancer genome. *Nature* 458: 719-24, (2009).
110. Vogler M, Butterworth M, Majid A, Walewska RJ, Sun XM, Dyer MJ, Cohen GM: Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 113: 4403-13, (2009).
111. Wada M, Kosaka M, Saito S, Sano T, Tanaka K, Ichihara A: Serum concentration and localization in tumor cells of proteasomes in patients with hematologic malignancy and their pathophysiologic significance. *J Lab Clin Med* 121: 215-23, (1993).
112. Wellmann S, Guschmann M, Griethe W, Eckert C, von Stackelberg A, Lottaz C, Moderegger E, Einsiedel HG, Eckardt KU, Henze G, Seeger K: Activation of the HIF pathway in childhood ALL, prognostic implications of VEGF. *Leukemia* 18: 926-33, (2004).
113. WHO: Cancer key facts (2013)
Link: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html
aufgerufen am 28.06.2013
114. Wieckowski S, Trouche N, Chaloin O, Guichard G, Fournel S, Hoebeke J: Cooperativity in the interaction of synthetic CD40L mimetics with CD40 and its implication in cell signaling. *Biochemistry* 46: 3482-93, (2007).
115. Willimott S, Merriam T, Wagner SD: Apoptosis induces Bcl-XS and cleaved Bcl-XL in chronic lymphocytic leukaemia. *Biochem Biophys Res Commun* 405: 480-5, (2011).
116. Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC: The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood* 120: 1175-84, (2012).
117. Xie Z, Cai T: Na+-K+--ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol Interv* 3: 157-68, (2003).
118. Zenz T, Mertens D, Kuppers R, Dohner H, Stilgenbauer S: From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 10: 37-50, (2010).
119. Zhou YD, Kim YP, Mohammed KA, Jones DK, Muhammad I, Dunbar DC, Nagle DG: Terpenoid tetrahydroisoquinoline alkaloids emetine, klugine, and isocephaeline inhibit the activation of hypoxia-inducible factor-1 in breast tumor cells. *J Nat Prod* 68: 947-50, (2005).

Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei Herrn Prof. H. Döhner für die Annahme als Doktorandin bedanken.

Ich danke meinem Doktorvater Herrn PD Dr. D. Mertens, der mir mit seinem Fachwissen immer zur Seite stand, viel mit mir diskutiert hat und mir nicht zuletzt auch in privaten Gespächen sehr geholfen hat.
Mein besonderer Dank gilt Nupur Bhattacharya, Angela Garding, Irina Idler, Karin Müller, Elli Woinikanis und Danilo Allegra für die gedulige Einführung in die medizinische Forschung und die wundervolle und freundschaftliche Unterstützung während unserer gemeinsamen Zeit.

Für die bedingungslose Unterstützung möchte ich mich sehr herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Allen voran bei meinen Eltern und meinem Bruder, die mich das ganze Studium unterstützt haben und mir immer ein Rückhalt waren.

Lebenslauf

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.