

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik I für Innere Medizin
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek

**Experimentelle Therapie der
chronischen lymphatischen Leukämie vom B-Zell-
Typ (B-CLL) mit den *small molecule*-Inhibitoren
CGP 049090 und PKF 115-584**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Würde eines
doctor rerum medicinalium
der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

vorgelegt von
Birgit Hemsch
aus Düren

Promoviert am 22. April 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln, 2009.

Dekanin/Dekan:

Universitätsprofessor Dr. med. J. Klosterkötter

1. Berichterstatterin/Berichterstatter:

Privatdozent Dr. med. K.-A. Kreuzer

2. Berichterstatterin/Berichterstatter:

Universitätsprofessor Dr. med. F. Berthold

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials habe ich freundlichste Unterstützung von Herrn Privatdozent Dr. med. Karl-Anton Kreuzer erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar, noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht.

Köln, den 30. September 2008

(Birgit Hempsch)

Die vorliegende Arbeit sowie alle dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im Labor für molekulare Hämatologie und Onkologie, Klinik I für Innere Medizin des Klinikums der Universität zu Köln von März 2005 bis August 2008 in der Arbeitsgruppe von Herrn Privatdozent Dr. Karl-Anton Kreuzer von mir unter seiner Anleitung durchgeführt.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt und zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Privatdozent. Dr. med. Karl-Anton Kreuzer für die Themenstellung und die ständige Hilfsbereitschaft. Er hat sehr zu der Entwicklung dieser Arbeit beigetragen und ohne diese Zusammenarbeit wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. med. Michael Hallek, dass er mir die Möglichkeit geboten hat, in der Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln eine Forschungstätigkeit durchführen zu können.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Labors für molekulare Hämatologie und Onkologie, Klinik I für Innere Medizin des Klinikums der Universität zu Köln sowie allen Doktoranden-Kolleginnen und Kollegen - besonders Katharina Minke - die mir über die gesamte Zeit mit Freude und Hilfsbereitschaft, aber auch mit Kompetenz und Wissen zur Seite standen.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie für ihre großartige Unterstützung bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	9
1.1. Die B-Zell-chronische lymphatische Leukämie (B-CLL)	9
1.1.1. Definition	9
1.1.2. Ätiologie und Epidemiologie	9
1.1.3. Diagnose	10
1.1.3.1. Klinisches Erscheinungsbild	10
1.1.3.2. Zytomorphologische Charakteristika	11
1.1.3.3. Immunphänotyp	12
1.1.3.4. Zytogenetische Veränderungen	14
1.1.4. Klassifikation nach Rai und Binet.....	19
1.1.5. Therapieoptionen	21
1.1.5.1. Therapieindikationen	21
1.1.5.2. Zytostatische Behandlung.....	22
1.1.5.3. Immuntherapie: Monoklonale Antikörper.....	24
1.1.5.4. Stammzelltransplantation.....	25
1.2. Pathogenese der chronischen lymphatischen Leukämie	28
1.2.1. Grundlegende molekulare Mechanismen: Klonale autonome Proliferation	28
1.2.2. WNT/CTNNB1/LEF1-Signalkaskade	29
1.2.3. Lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF1)	32
1.2.4. Zielgene des Transkriptionsfaktors LEF1	33
1.2.4.1. CCND1	33

1.2.4.2. SURV	34
1.2.4.3. C-MYC.....	35
1.3. Die small molecule-Inhibitoren CGP 049090 und PKF 115-584	37
1.3.1. Struktur und chemische Eigenschaften	37
1.3.2. Wirkung von CGP 049090 und PKF 115-584 auf B-CLL-Zellen.....	39
2. Material und Methoden.....	41
2.1. Zellen/Patientenmaterial	41
2.1.1. Patientencharakteristika	41
2.1.1.1. B-CLL-Patienten	41
2.1.1.2. Gesunde Probanden	41
2.1.2. Reagenzien	41
2.1.3. Lymphozytenseparation mittels Dichtezentrifugation	42
2.1.4. Zellvitalitätsbestimmung/ Zellzahleinstellung	42
2.1.5. Primäre Zellkultivierung.....	43
2.2. CGP 049090 und PKF 115-584	43
2.3. ATP-Assay.....	43
2.3.1. Reagenzien	43
2.3.2. Messungen.....	43
2.3.3. Auswertung.....	45
2.4. Differential Staining Cytotoxicity (DiSC)-Assay	45
2.4.1. Reagenzien	45
2.4.1.1. Herstellung der Entenerythrozyten-Stocklösung	45
2.4.1.2. Herstellung kollagenbeschichteter Objektträger.....	46
2.4.1.3. Sonstige Reagenzien	46
2.4.2. Differential Staining Cytotoxicity Assay.....	47
2.4.3. Gegenfärbung nach Pappenheim	48

2.4.4. Mikroskopische Auswertung	48
2.5. DNA-Laddering	48
2.5.1. Reagenzien	48
2.5.2. Agarose-Gelelektrophorese	49
2.5.3. Auswertung	49
2.6. Caspase-3/7-Assay	49
2.6.1. Reagenzien	49
2.6.2 Messungen	49
2.6.3. Auswertung	51
2.7. Immunoblots	51
2.7.1. Reagenzien und Antikörper	51
2.7.2. Herstellung der Zelllysate	54
2.7.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	54
2.7.5. Immunoblot	55
2.8. Statistische Auswertung	56
2.8.1. Computer Hard- und Software	56
2.8.2. Mathematische Tests	57
3.8.2.1. Auswertung des DiSC-Assays	57
3. Ergebnisse	58
3.1. Untersuchungen zur zeit- und konzentrationsabhängigen Induktion des Zelltodes durch CGP 049090 und PKF 115-584	58
3.1.1 Zeitabhängige Induktion des Zelltodes	58
3.1.2. Konzentrationsabhängige Induktion des Zelltodes	61
3.1.2.1. Messung mit dem ATP-Assay	61
3.1.2.2. Messung mit dem DiSC-Assay	66
3.2. Induktion der Apoptose durch CGP 049090 und PKF 115-584	69

3.2.1. Untersuchungen zur Caspase 3/7-Induktion.....	69
3.2.2. Untersuchung zur Induktion der Spaltung von PARP.....	70
3.2.3. Untersuchungen zur Induktion der DNA-Fragmentierung.....	72
3.3. Untersuchungen zur Veränderung des Expressionsverhalten von CTNNB1 und LEF1 durch CGP 049090 und PKF 115-584.....	74
3.3.1 Expression von CTNNB1 nach Induktion der B-CLL-Zellen mit dem GSK- 3 β -Inhibitor SB 216763.....	74
3.3.2. Veränderung der Expression von CTNNB1 nach Inkubation mit CGP 049090 und PKF 115-584.....	75
3.3.3. Veränderung der Expression von LEF1 nach Inkubation mit CGP 049090 und PKF 115-584.....	77
3.4. Veränderung der Immunexpression der LEF1-Zielproteine nach Inkubation mit CGP 049090 und PKF 115-584.....	78
3.4.1. Veränderung der C-MYC-Expression.....	78
3.4.2. Veränderung der CCND1-Expression.....	79
3.4.3. Veränderung der SURV-Expression.....	80
4. Diskussion.....	82
5. Zusammenfassung.....	99
6. Literaturverzeichnis.....	101
7. Vorabveröffentlichungen.....	113
8. Lebenslauf.....	114

Abkürzungsverzeichnis

ALL	akute lymphatische Leukämie
Allo-SZT	allogene Stammzelltransplantation
AML	akute myeloische Leukämie
AP	alkalische Phosphatase
AP1	<i>Activating Protein 1</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ATM-Gen	<i>Ataxia Telangiectasia mutated gene</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Auto-SZT	autologe Stammzelltransplantation
Axin	<i>axis inhibitor-1</i>
BCL2	<i>B-cell-lymphoma-2</i>
B-CLL	chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ
BCR-ABL	„breakpoint cluster region“- Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1
bzw.	beziehungsweise
CCND1	Cyclin D1
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CML	chronische myeloische Leukämie
CO ₂	Kohlendioxid
CS	Cell Survival/ Zellüberleben
CTNNB1	β-Catenin
DiSC	Differential Staining Cytotoxicity
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DRBC	Entenerythrozyten (Duck Red Blood Cells)
DSH	<i>Dishevelled</i>
FAP	<i>Familial adenomatous polyposis coli</i>
FISH	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung
FZD	<i>Frizzled</i>
g	Gramm
GSK-3	Glykogen Synthase Kinase 3
GST	Glutathion-S-transferase

GVL	<i>graft versus leukemia</i>
h	Stunde
Hb	Hämoglobinwert
HLA	Humane Leukozytenantigene
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HTS	<i>High throughput screening</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
IC ₅₀	<i>inhibitory concentration 50%</i>
IgVH	Immunglobulinschwerkette
i.p.	intraperitoneal
kDA	Kilodalton
l	Liter
LEF1	<i>Lymphoid enhancer-binding factor 1</i>
m	milli, SI-Präfix für 10 ⁻³
M	Molarität (mol/l)
MCL	Mantelzell-Lymphom
min	Minute
mol	Stoffmenge
mRNA	messenger RNA
n	nano, SI-Präfix für 10 ⁻⁹
NaCl	Natriumchlorid
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
p53	pro-apoptotisches Protein 53
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly-ADP-Ribose-polymerase 1
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
RLU	<i>Relative light unit</i>
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RPMI	<i>Roswell Pak Memorial Institute</i>
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s	Sekunde
slg	Oberflächenimmunglobuline
STI	Signaltransduktionsinhibitor

SURV	Survivin
SZT	Stammzelltransplantation
TCF	<i>T-cell factor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRM	<i>treatment-related mortality</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
WNT	<i>Wingless-related Mouse mammary tumor virus (MMTV) integration site</i>
VC	Vital cells/ Vitale Zellen
Z/ml	Zellen pro milliliter
ZAP70	<i>zeta-associated protein</i>
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1. Die B-Zell-chronische lymphatische Leukämie (B-CLL)

1.1.1. Definition

Die B-Zell-chronische lymphatische Leukämie (B-CLL) ist eine klonale B-Zell-Neoplasie von morphologisch reifen, funktionell allerdings unreifen B-Zellen, welche Oberflächenantigene (sIgM) exprimieren. Die B-CLL ist gekennzeichnet durch eine Anhäufung von ausgewachsenen, nicht-funktionellen CD5+, CD19+ und CD23+ B-Zellen mit niedriger proliferativer Aktivität, die nicht mehr den programmierten Zell-Tod (Apoptose) eingehen können. Die monoklonale Expansion der malignen Zellen führt zur Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark. Die Folge ist die Ausschwemmung dieser Zellen in das periphere Blut und eine Akkumulation in verschiedenen Geweben wie Lymphknoten, Leber und Milz. Dies ist meistens mit Organvergrößerungen dieser assoziiert ist [Meinhardt et al., 1999; Rozman et al., 1995].

Obwohl die B-CLL bezüglich der Pathologie ein sehr einheitliches Bild liefert, verhält sich die Erkrankung klinisch äußerst variabel. Bei einigen Patienten verläuft sie rasch fortschreitend mit einer Überlebenszeit von nur wenigen Monaten nach Diagnosestellung, andere Patienten hingegen überleben 10 Jahre und länger ohne größere Komplikationen [Rozman et al., 1995; Dighiero et al., 1991]. Mittlerweile ist es möglich, sowohl durch die Immunphänotypisierung als auch durch die Zytogenetik Risikogruppen abzugrenzen.

1.1.2. Ätiologie und Epidemiologie

Die chronisch lymphatische Leukämie ist die häufigste Leukämieform bei Erwachsenen in der westlichen Welt [Yee et al., 2006]. Sie stellt 22-30% aller Leukämie-Fälle dar mit einer weltweiten Inzidenz zwischen 1 - 5.5 pro 100.000 Einwohner. Australien, die USA, Irland und Italien haben die höchsten B-CLL-Inzidenz-Raten. Die B-CLL betrifft nahezu ausschließlich Erwachsene, mit höheren Raten bei Männern als bei Frauen (Inzidenz im Jahr 2000 in den USA:

4,7 Männer pro 100.000 Einwohner im Gegensatz zu 2,4 Frauen) und ebenso höheren Raten bei Kaukasiern als bei Afro-Amerikanern (Inzidenz im Jahr 2000 in den USA: 3,7 pro 100.000 Einwohnern bei den Kaukasiern zu 2,5 bei den Afro-Amerikanern). Die Krankheit betrifft gewöhnlich ältere Menschen; das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt bei 64-70 Jahren. Die 5-Jahres-Überlebensrate erreichen in den USA 83% der Patienten, die bis zu 65 Jahre alt sind, und 68%, die schon älter als 65 Jahre sind [Redaelli et al., 2004].

Die Ursache der B-CLL ist noch immer unbekannt. Sie ist die einzige Leukämieform, die nicht mit Aussetzung gegenüber ionisierter Strahlung, Medikamenten oder Chemikalien assoziiert ist [Yee et al., 2006]. Ebenso existiert kein überzeugender Grund für eine virale Ätiologie [Faguet, 1994].

Studien haben gezeigt, dass das Risiko an einer B-CLL zu erkranken in Familien mit Verwandten, die selbst eine B-CLL haben, höher ist. Jedoch ist die exakte Rolle, die die Vererbung in der Entwicklung der Krankheit spielt, noch nicht vollständig geklärt. So gibt es keine Erklärung für die Tatsache, dass bei eineiigen Zwillingen, die beide eine B-CLL entwickelt hatten, unterschiedliche Mutationen vorgefunden wurden [Yuille et al., 2000; Andritsos et al., 2002; Houlston et al., 2002]. Weiterhin können keine biologischen Unterschiede - also IgVH-Gen-Mutations-Status, ZAP70-Expression, CD38-Expression, Zytogenetik sowie Transformationsrate zu höhergradigen NHL (Non-Hodgkin-Lymphom) - zwischen einer familiärer und sporadisch auftretender B-CLL festgestellt werden [Yee et al., 2006].

1.1.3. Diagnose

1.1.3.1. Klinisches Erscheinungsbild

Bei der B-CLL verläuft die subjektive Symptomentwicklung vor Diagnosestellung uncharakteristisch und in der Regel schleichend [Begemann et al., 1970]. Es überwiegen Lymphknotenschwellungen, Leber- und Milzvergrößerung sowie eine Leukozytose, gefolgt von unspezifischen Allgemeinsymptomen wie körperliche Abgeschlagenheit, Müdigkeit und Leistungsminderung. Patienten mit fortgeschrittener B-CLL klagen sehr häufig über Gewichtsabnahme, vermehrte

Schweißneigung – besonders Nachtschweiß –, Thrombozytopenie und Anämie. Zudem treten bei ca. 25% der Patienten verhäuft Infekte oder fieberhafte Zustände auf. Oft wird die B-CLL in den frühen Stadien (Rai 0, Binet A) im Rahmen von Routineuntersuchungen ohne klinische Manifestation festgestellt [Hallek et al., 2005].

Für die klinische Diagnose einer B-CLL ist eine anhaltende absolute Lymphozytose von 5×10^9 Lymphozyten/l im peripheren Blut Voraussetzung. Bei manchen Patienten wird sogar ein Wert von 1×10^{11} Lymphozyten/l überschritten. Die Lymphozyten erscheinen reif und klein. Weitere Maßnahmen der Diagnosestellung beinhalten die Immunphänotyp-Expression von CD5, CD19, CD20 und CD23 auf den B-Zellen. Bei 20% der Patienten liegt ein positiver Coombs-Test für Antikörper gegen Erythrozyten vor. Anämien mit Hämoglobinkonzentrationen < 11 g/dl liegen in 10-15% der Fälle vor; Thrombozytopenien ($< 100 \times 10^9$ Thrombozyten/l) in weniger als 10% [Kalil et al., 1999].

1.1.3.2. Zytomorphologische Charakteristika

In der panoptischen Färbung des Blutausstrichs finden sich typischerweise kleine, monomorphe Lymphozyten, deren Größe etwa 1 bis $1 \frac{1}{2}$ mal der Größe von Erythrozyten entspricht. Diese Zellen weisen einen schmalen, basophilen Zytoplasmasaum und einen dichten, meist regelmäßig begrenzten Kern auf. Die Kernstruktur ist grob, das Chromatin meistens verklumpt, Nukleoli sind in der Regel nicht nachweisbar. Teilweise können auch Prolymphozyten vorgefunden werden. Diese Zellen sind größer, besitzen einen weiteren Zytoplasmasaum und einen deutlichen Nukleolus. Häufig finden sich „Gumprecht'sche Kernschatten“ als Zeichen besonderer mechanischer Verletzlichkeit lymphatisch-leukämischer Zellen. Bei den Gumprecht'schen Kernschatten handelt es sich um „zerquetschte“ Zellen, die bei der B-CLL zwar häufig zu sehen, aber nicht spezifisch sind und auch bei anderen Non-Hodgkin-Lymphomen vorkommen [Löffler et al., 1999].

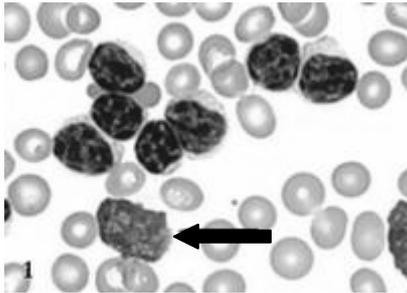


Abbildung 1: Mikroskopischer Blick auf den Blutausstrich eines B-CLL-Patienten. Zu erkennen sind kleine Lymphozyten mit rund/ovalen Kernen sowie ein Gumprecht'scher Kernschatten (Pfeil).

Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Privatdozent Dr. Karl-Anton Kreuzer

1.1.3.3. Immunphänotyp

Zur Abgrenzung der B-CLL von den übrigen B-NHLs ist eine immunphänotypische Untersuchung der Lymphozyten aus dem peripheren Blut notwendig. Da die B-CLL-Zellen immer den Pan-B-Zellmarker CD19 exprimieren, sind diese recht einfach von der in Europa seltenen CLL vom T-Zell-Typ zu unterscheiden. Ebenso exprimieren B-CLL-Zellen den Pan-B-Zellmarker CD20; dies erfolgt jedoch in geringerer Intensität verglichen mit den anderen B-chronisch lymphoproliferativen Krankheiten. In mehr als 90% der Fälle coexprimieren leukämische B-Lymphozyten CD5, einen T-Zell-Marker, sowie CD23. Zur Abgrenzung der B-CLL von anderen B-Zell-Lymphomen hilft die gleichzeitige Betrachtung von CD5, CD23 und CD79b. Da CD79b nahezu nie oder nur schwach exprimiert wird, kann man dies als Kriterium zur Abgrenzung zu den übrigen CD5-positiven Lymphomen bezeichnen. B-CLL Lymphozyten besitzen zudem eine schwache Expression der Oberflächenimmunglobuline SIgM und/oder SIgD, sehr häufig mit einer κ - oder λ -Leichtkettenrestriktion. Ebenso werden die B-Zell-Antigene FMC7 und CD22 gar nicht oder nur schwach exprimiert. CD38 wird nur in ca. 20% der B-CLL Fälle exprimieren [Hallek et al., 2005; Pangalis et al., 2002].

Der derzeit beste prognostische Marker für die B-CLL ist der individuelle Mutationsgrad eines Gens, das für den variablen Teil der Immunglobulinschwerkette (IgVH) kodiert. B-CLL-Patienten mit mutiertem IgVH-Gen weisen eine günstigere Krankheitsprognose auf als solche mit unmutiertem IgVH-Gen. Die Analyse des Mutationsgrades mittels Sequenzierung ist allerdings sehr aufwändig und als Routineuntersuchung ungeeignet. Eine Alternative stellt die durchflusszytometrische Bestimmung der ZAP70-Expression dar, da die Expression dieses Proteins mit dem Mutationsgrad des IgVH-Gens korreliert.

ZAP70 (zeta-associated protein) ist eine Tyrosinkinase, die essentiell an der T-Zell-Signaltransduktion beteiligt ist und intrazellulär in T-NK (Natural Killer)-Zellen vorkommt, in B-Zellen dagegen normalerweise nicht exprimiert wird. Es wird beschrieben, dass Patienten mit mutiertem IgVH-Gen und entsprechend niedriger ZAP70-Expression (<30%) einen deutlich günstigeren Krankheitsverlauf und eine höhere Überlebenschance aufweisen als Patienten mit unmutiertem IgVH-Gen und entsprechend hoher ZAP70-Expression (>30%) [Chen et al., 2002; Crespo et al., 2003].

Matutes et al. haben ein immunphänotypisches Scoring-System entwickelt, welches die Abgrenzung der B-CLL zu anderen lymphoproliferativen Erkrankungen erleichtert. Beim Scoring wird die Expression von sIgM, CD5, CD23, FMC7, und CD79b berücksichtigt. So konnte gezeigt werden, dass bei einer „typischen“ B-CLL in 96% der Fälle ein Score von 4 oder 5 Punkten erreicht wird, während die anderen B-Zell-NHL's nur einen Score von 0-2 zeigten [Hallek et al., 2005; Pangalis et al., 2002].

Membranmarker	1 Punkt	0 Punkte
slgM	schwach	mäßig/stark
CD5	positiv	negativ
CD23	positiv	negativ
FMC7	negativ	positiv
CD79b	negativ	positiv

Tabelle 1: Scoring-System für die Differentialdiagnose chronischer lymphoproliferativer Erkrankungen

1.1.3.4. Zytogenetische Veränderungen

Das Wissen über genomische Anomalien hat sich aufgrund des Fortschritts in der molekularen Genetik in den letzten Jahren rapide entwickelt. Die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) ermöglicht eine empfindliche Detektion spezifischer genomischer Anomalien nicht nur in Metaphase-Chromosomen, sondern auch im Interphase-Zell-Nukleus. Zytogenetische Anomalien werden mit modernen Methoden in über 80% aller B-CLL-Erkrankungen entdeckt [Winkler et al., 2006]. Eine bestimmte krankheitsspezifische zytogenetische Veränderung ist bei der B-CLL nicht bekannt. Die häufigste zytogenetische Anomalie ist eine 13q14-Deletion, die etwa bei der Hälfte der B-CLL-Patienten auftritt, gefolgt von Deletionen der Region 11q22.3-q23.1, der Trisomie 12, Deletionen von 6q21 und Deletionen/Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens (17p13) [Döhner et al., 1999].

Die Zytogenetik ist prognostisch außerordentlich bedeutsam. Das Auftreten von Chromosomenanomalien weist auf eine schlechtere Prognose als ein normaler Karyotyp hin [Han et al., 1987]. Patienten mit einzelnen Anomalien überleben länger als die mit mehrfachen Anomalien. So besitzen etwa Patienten mit einer 17p- oder 11q-Deletion eine schlechtere Prognose als Patienten mit einem normalem Karyotyp oder mit einer 13q-Deletion. Verschiedene zytogenetische Aberrationen identifizieren Patientengruppen mit bestimmten klinischen Merk-

malen. So weisen Patienten mit einer 11q-Deletion einen exzessiven Lymphknotenbefall, einen raschen Krankheitsverlauf und eine kurze Überlebenszeit auf. Patienten mit einer 17p-Deletion kennzeichnet ein schlechtes Therapieansprechen, besonders eine häufige Therapieresistenz gegen Fludarabin.

Ein weiterer molekulargenetischer Parameter zur Unterscheidung von pathogenetischen und prognostischen Subgruppen ist der Mutationsstatus der VH-Gene. B-CLL-Patienten mit einem nicht-mutierten IgVH-Gen haben eine prognostisch ungünstigere, aggressivere Form der B-CLL als solche mit einem mutierten IgVH-Gen sowie eine kürzere Überlebenszeit [Damle et al., 1999; Hamblin et al., 1999]. Diese Befunde zeigen außerdem, dass der Ursprung der B-CLL bei einem Teil der Patienten aus einer Memory-B-Zelle (mutiertes IgVH - Gen) stammt, bei dem anderen Teil der Patienten hingegen aus einer naiven B-Zelle (unmutiertes IgVH – Gen).

13q-Deletion (13q14)

In zytogenetischen Studien wurden als häufigste strukturelle Anomalie eine Deletion der Bande 13q14 identifiziert. Das Retinoblastom- Tumorsuppressorgen (RBI) befindet sich auf der Bande 13q14, allerdings wurde die Deaktivierung von beiden RBI-Genkopien bisher selten entdeckt [Winkler et al., 2006]. Die B-CLL mit einer 13q14-Deletion als einzige Anomalie ist durch einen günstigen Krankheitsverlauf gekennzeichnet. Die mittlere Überlebenszeit ist länger als bei allen anderen Abweichungen und sogar länger als bei Patienten mit einem normalen Karyotyp [Döhner et al., 2000]. Grund für die gute Prognose von B-CLL Patienten, bei denen nur eine 13q14 Deletion als einzige Genveränderung vorliegt, scheint der sehr langsame Krankheitsverlauf zu sein. Allerdings wird der Verlauf der Krankheit auch von dem VH-Mutationsstatus bestimmt.

Die klinische Signifikanz der 13q14-Deletion wurde das erste Mal durch multi-zentrische Studien des 1. und 2. IWCLL (International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia) nachgewiesen. Patienten mit Anomalien auf Chromosom 13 schienen eine höhere Lebenserwartung zu haben als Patienten mit normalem Karyotyp [Stilgenbauer S, Bullinger L et al., 2002]. Diese Ergebnisse wurden durch eine weitere Studie von Döhner et al. bestätigt [Döhner et al.,

2000]. Patienten, bei denen eine 13q14 Deletion als einzige Anomalie auftrat (weitere Veränderungen wurden durch umfassende Untersuchungen mit Hilfe einer FISH ausgeschlossen), wiesen die längste therapiefreie Zeit auf und besaßen die höchste Lebenserwartung (133 Monate). Hervorzuheben ist, dass die Lebenserwartung dieses Kollektivs höher war als die der Gruppe ohne erkennbare Genveränderungen (111 Monate) und die des Kollektivs mit Trisomie 12 (114 Monate).

Trisomie 12 (12q13)

Die Trisomie 12 gehört zu den am weitest verbreiteten genetischen Veränderungen bei der B-CLL [Rozman et al., 1995; Zwiebel et al., 1998]. Molekulare zytogenetische Untersuchungen mit der Interphase-FISH-Methode zeigten eine Häufigkeit von 10-20% in europäischen und von mehr als 30% in US-amerikanischen Studien [Winkler et al., 2006]. Die Funktion der Gene, die möglicherweise an der Pathogenese der B-CLL mit Trisomie 12 beteiligt sind, ist noch nicht völlig geklärt. Ältere Studien belegen, dass die Banden 12q13-q15 eine prädisponierte Region für den Zugewinn genetischen Materials enthalten und sich unter anderem Gene mit onkogenem Potential, wie CDK4, GLI und MDM2 in dieser Region befinden. Es ist allerdings zu betonen, dass bis dato noch keine Relevanz für die Pathogenese von B-CLL im Zusammenhang mit diesen Genen gefunden wurde. In mehreren Studien konnte das Vorhandensein einer Trisomie 12 mit einem aggressiveren Verlauf der B-CLL in Verbindung gebracht werden, allerdings konnte keine Studie belegen, dass eine Trisomie 12 die Prognose negativ beeinflusst. Bei einer Studie mit 325 Patienten war die Prognose der Gruppe mit Trisomie 12 mittelmäßig (mittlere Überlebenszeit 114 Monate) [Döhner et al., 2000]. Die Lebenserwartung war kürzer im Vergleich zur Gruppe, bei der nur eine 13q-Deletion als einzige genetische Anomalie vorlag, und länger im Vergleich zu den Gruppen mit 11q22-q23 und 17p13 Deletionen. In weitere Untersuchungen über die prognostische Bedeutung der Trisomie 12 konnten die Arbeitsgruppen von Juliusson und Escudier ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen Patienten mit und ohne Trisomie 12 aufdecken [Juliusson et al., 1990;

Escudier et al., 1993]. Bezog man allerdings konventionelle „Chromosome banding“-Daten mit in die Studie ein, sah man, dass die Lebenserwartung von Patienten mit Trisomie 12 deutlich kürzer war als die von Patienten mit normalem Karyotyp. Außerdem waren Patienten mit einer Anomalie auf Chromosom 12 stärker vorbehandelt und befanden sich im fortgeschrittenen Binet Stadium.

In seltenen Fällen kommen bei der B-CLL Zellen vor, die ein breites basophiles Zytoplasma haben und an Plasmazellen erinnern. Diese CLL-Typen mit über 10% dieser typischen Zellen werden auch als atypische CLL oder lymphoplasmazytoiden Zellen bezeichnet. Mit Hilfe der Interphase Zytogenetik konnte ein Zusammenhang zwischen Trisomie 12 und einem erhöhten Prozentsatz an diesen atypischen Lymphozyten und Prolymphozyten innerhalb der leukämischen Zellen nachgewiesen werden [Stilgenbauer S, Bullinger L et al., 2002].

11q-Deletion (11q22-23)

Ungefähr 10-20% aller Patienten haben Leukämie-Zellen mit Deletionen im langen Arm von Chromosom 11. Diese Patienten sind tendenziell jüngeren Alters (<55 Jahre). B-CLL Patienten mit einer 11q-Deletion zeichnen sich durch einen charakteristischen klinischen Verlauf aus. Das klinische Bild zeigt eine ausgeprägte Lymphadenopathie durch die Beteiligung von peripheren Lymphknoten und der Häufigkeit von mediastinalen und abdominalen Lymphadenopathien. Zudem verläuft die Krankheit schneller, einhergehend mit kürzeren Therapiepausen und einer verringerten Lebenserwartung [Döhner et al., 1997]. Eine Studie von Stilgenbauer et al., in der die Veränderungen auf 11q mit Hilfe von FISH bestimmt wurden, zeigte, dass alle Veränderungen eine 2-3Mb große Region auf 11q22.3-q23.1 betrafen [Stilgenbauer et al., 1996]. Diese Region beinhaltet das ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) Gen. Bei der B-CLL wurde eine verringerte ATM-Proteinexpression und eine Inaktivierung des ATM durch Deletion und/oder Mutation beobachtet. Allerdings wurde eine Mutation auf dem anderen ATM-Allel nur in 5 von 22 B-CLL Fällen mit 11q22-q23-Deletionen nachgewiesen. Dies könnte darauf hinweisen, dass möglicherweise weitere Gene in diesem Bereich involviert sind [Winkler et al., 2006].

6q-Deletion (6q21)

Veränderungen des langen Arms von Chromosom 6 gehören zu den am häufigsten auftretenden Veränderungen bei lymphatischen Neoplasien [Stilgenbauer S, Bullinger L et al., 2002]. Strukturelle Veränderungen wurden bei 6% aller untersuchbaren Tumore gefunden. Als kritische Region auf dem Gen wurde die Bande 6q21 festgestellt. Eine Reihe von Genen in diesem Abschnitt konnten identifiziert werden, keines davon scheint allerdings eine Rolle in der Pathogenese von B-CLL zu spielen. 6q-Deletionen gehen mit einer erhöhten Tumormasse einher. Das zeigt sich durch einen größeren Anteil an weißen Blutkörperchen und einer stärker ausgeprägten Lymphadenopathie. Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede bzgl. therapiefreien Intervalle und Lebenserwartung zwischen Patienten mit oder ohne 6q-Deletion festgestellt werden [Stilgenbauer et al., 1999].

17p-Deletion (17p13)

Da das Tumorsuppressorgen p53 (17p13) bei fast allen Tumoren eine Rolle spielt, wurde p53 als möglicher Kandidat für die B-CLL untersucht. Mutationen von p53 wurden mit einer Prävalenz von 10-15% bei B-CLL beobachtet [Winkler et al., 2006]. Mit Hilfe von FISH konnten Deletionen von 17p13, dem Genlokus von p53, bei 4-9% aller B-CLL-Fälle entdeckt werden [Döhner et al., 2000]. Um einen Zusammenhang zwischen 17p13-Deletionen und einer Inaktivierung von p53 durch Mutation auf dem übrigen Allel zu zeigen, wurden 110 Fälle untersucht. 15% zeigten eine Mutation des p53-Gens, wobei es sich bei der Hälfte der Fälle um biallelische Veränderungen handelte. In den Fällen, in denen eine 17p13-Deletion vorlag, zeigte die große Mehrheit zudem Mutationen im verbleibenden p53-Allel, während bei den Fällen ohne eine 17p13 Deletion eine p53-Mutation nur selten auftrat [Winkler et al., 2006]. Der klinische Verlauf von Patienten mit einer 17p13-Deletion und/oder einer Mutation von p53 zeichnet sich durch signifikant kürzere Überlebenszeiten im Vergleich zu Patienten ohne diese Veränderungen aus [Döhner et al., 1995]. Darüber hinaus ist der Verlauf

durch Therapieversagen mit alkylierenden Mitteln wie Fludarabin und Rituximab gekennzeichnet. Während 56% der Patienten ohne Mutation von p53 auf eine Behandlung mit Fludarabin ansprachen, war dies dagegen bei keinem Patienten mit einer p53-Mutation der Fall. Im Gegensatz dazu gibt es allerdings Hinweise, dass eine Remission bei B-CLL-Patienten mit 17p Deletion/p53-Mutation erreicht werden kann, wenn man den monoklonalen anti-CD52 Antikörper Alemtuzumab verwendet [Stilgenbauer S, Döhner H et al., 2002].

1.1.4. Klassifikation nach Rai und Binet

Zwei traditionelle Systeme werden momentan verwendet, um die B-CLL zu klassifizieren: das Rai-System (1975) und das Binet-System (1981). Diese Systeme dienen dazu, klinische Erkenntnisse und Überlebenszeiten miteinander in Verbindung zu bringen und dadurch B-CLL-Patienten mit größtmöglicher Effizienz zu behandeln.

Man unterscheidet die drei Krankheitsstadien früh, mittel und fortgeschritten. Als Parameter, die in die Bewertung miteinfließen, sind die Existenz und die Ausprägung einer Lymphadenopathie, das Vorkommen einer tastbaren Spleno- und/oder Hepatomegalie und das Ausmaß einer Anämie und Thrombozytopenie zu nennen [Pangalis et al., 2002]. Beide Systeme zeigen, dass eine verstärkte Lymphozyten-Infiltration im Zusammenhang mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium und einer verkürzten Überlebenszeit steht [Kalil et al., 1999]. Das Rai System wird typischerweise in den USA angewendet, das Binet System in Europa. In den letzten Jahren wurde die Krankheit in immer früheren Krankheitsstadien diagnostiziert. Mittlerweile erfolgt die Diagnose bei bis zu 40% aller Patienten im Rai Stadium 0 [Pangalis et al., 2002].

Risikostufe	Stadium	Klinisches Erscheinungsbild
niedrig	0	Blutlymphozytose ($< 5000/\mu$) + Knochenmarklymphozytose ($< 30\%$)
mittel	I	Lymphozytose + Lymphadenopathie
	II	Lymphozytose (+/- Lymphadenopathie) + Splenomegalie und/oder Hepatomegalie
hoch	III	Lymphozytose (+/- Lymphadenopathie/ Organomegalie) + Anämie
	IV	Lymphozytose (+/- Lymphadenopathie/ Organomegalie/ Anämie) + Thrombozytopenie

Tabelle 2: Klassifikation nach Rai [Preiß et al., 2006/7]

Stadium	Klinisches Erscheinungsbild	Mittlere Überlebenszeit	Anteil der Patienten
A	< 3 Lymphknoten-Regionen befallen Hb $> 10\text{g/dl}$ Thrombozyten $> 100.000/\mu\text{l}$	$> 7-10$ Jahre	65%
B	≥ 3 Lymphknoten-Regionen befallen Hb $> 10\text{g/dl}$ Thrombozyten $> 100.000/\mu\text{l}$	5-7 Jahre	30%
C	≥ 3 Lymphknoten-Regionen befallen Hb $< 10\text{g/dl}$ Thrombozyten $< 100.000/\mu\text{l}$	$< 2-5$ Jahre	5%

Tabelle 3: Klassifikation nach Binet [Preiß et al., 2006/7]

1.1.5. Therapieoptionen

1.1.5.1. Therapieindikationen

Die Therapie ist bisher vorwiegend palliativ, da durch konventionelle Chemotherapien der maligne Zellklon nicht vollständig beseitigt werden konnte. Durch die Zunahme an Therapieoptionen hat sich die Situation in den letzten fünf Jahren erheblich gewandelt. Neben kurativen Therapieansätzen, wie der allogenen Stammzelltransplantation, wird in Studien überprüft, ob sich durch gegen die Leukämiezellen gerichtete Antikörper oder andere Immuntherapien eine minimale residuelle Erkrankung („minimal residual Disease“, MRD) eradizieren lässt [Wendtner, Eichhorst et al., 2004]. Zurzeit kann man zwischen drei unterschiedlichen Möglichkeiten der Primärtherapie abwägen:

- reine Beobachtung ohne Therapie („watch and wait“)
- Chemotherapie (ggf. in Kombination mit einer Immuntherapie)
- Allogene Stammzelltransplantation in kurativer Intention.

Um die geeignetste Therapie auszusuchen, wählt man als Kriterien das Alter und die Komorbidität des Patienten. Ausschlaggebende Faktoren stellen außerdem das Stadium dar, in welchem sich der Patient befindet sowie seine Krankheitsaktivität (Progression, Vorhandensein ungünstiger Prognosefaktoren). Weil es bisher noch keine kurative Therapie für B-CLL-Patienten gibt und die vorhandenen Therapien mit schweren Nebenwirkungen verbunden sind, ist zudem die Entscheidung, wann mit der Behandlung begonnen werden soll, sehr wichtig. So konnte z.B. gezeigt werden, dass eine unmittelbar begonnene Therapie mit Chlorambucil die Überlebenszeit von Patienten, die sich in einem frühen Stadium der Krankheit befanden, nicht verlängert hat [Dighiero et al., 1998].

Die NCI (Nation Cancer Institute)-Arbeitsgruppe hat eine Leitlinie herausgebracht, die über den Behandlungsbeginn Antwort gibt. Demnach benötigen Patienten in fortgeschrittenen Stadien (Rai Stadium III und IV) eine sofortige Behandlung. Für Patienten mit Rai Stadium 0 bis II muss man folgende Kriterien abwägen, um einen Behandlungsbeginn begründen zu können: starker Gewichtsverlust mit Abnahme von mehr als 10% des Körpergewichtes in den let-

zen sechs Monaten, extreme Müdigkeit, Fieber (höher als 38°C), welches länger als zwei Wochen andauert ohne einen Hinweis auf eine Infektion, Anzeichen für ein fortschreitendes Knochenmarksversagen, eine sich verschlechternde Anämie und/oder Thrombozytopenie, massive Splenomegalie (> 6cm) oder Lymphadenopathie (>10cm). Es existiert hingegen kein bestimmter Lymphozytenwert, der einen sofortigen Behandlungsbeginn begründen würde [Wierda et al., 2006].

1.1.5.2. Zytostatische Behandlung

1.1.5.2.1. Alkylantien

Chlorambucil

Chlorambucil stellt die bisher am häufigsten eingesetzte Substanz in der Behandlung der B-CLL dar und wird oft in Kombination mit Prednison gegeben. Ein Vorteil der Substanz liegt in der oralen Applikation. Eine häufig auftretende Nebenwirkung stellt die Myelotoxizität dar; seltener kommen Anfälle, Hautirritationen, Lungenfibrose, Lebertoxizität, Unfruchtbarkeit und Entstehung von sekundären Krebserkrankungen vor. Verglichen mit anderen Alkylantien führt Chlorambucil seltener zur Alopezie oder gastrointestinalen Störungen [Redaelli et al., 2004]. Insgesamt reagieren 50-60% der Patienten auf eine Chlorambucil-Behandlung. Es sprechen zwar weniger Patienten auf Chlorambucil als auf Fludarabin an, allerdings zeigen beide Stoffe gleiche Überlebenszeiten. Aufgrund der geringeren Toxizität, der geringeren Kosten und einer oralen Verfügbarkeit bei gleichen Überlebensraten ist Chlorambucil ein effektives Mittel der ersten Wahl [Andritsos et al., 2002; Hamblin, 2001].

Cyclophosphamid

Bei Unverträglichkeit von Chlorambucil kann das Alkylans Cyclophosphamid oral verabreicht werden. Cyclophosphamid verursacht weniger häufig Thrombozytopenien und kann deswegen insbesondere bei thrombozytopenen Patienten eingesetzt werden. Eine unerwünschte Nebenwirkung stellt die Alopezie dar, welche bei Chlorambucil seltener auftritt [Redaelli et al., 2004].

Bendamustin

Für das Alkylans Bendamustin muss zurzeit noch die optimale Dosierung bei der B-CLL ermittelt werden. Es ist dem Chlorambucil in seinen chemischen Eigenschaften ähnlich. Auch hier liegt als Nebenwirkung ein erhöhtes Auftreten von Myelotoxizitäten vor, ebenso kann es zu gastrointestinalen Störungen kommen [Bergmann et al., 2005].

1.1.5.2.2. Purinanaloga

Fludarabin

Fludarabin ist das am besten untersuchte Purinanalogon bei der B-CLL und erzielt als Einzelsubstanz häufiger und länger anhaltende komplette Remissionen als die Monotherapie mit Alkylantien. Fludarabin zeigt neben seinen Eigenschaften als Antimetabolit auch proapoptotische Aktivität. Es werden Ansprechraten von 70-80% bei nicht vorbehandelten Patienten erreicht sowie Ansprechraten von 13-67% bei Vorbehandelten [Keating et al., 1989]. Als Hauptnebenwirkung können bei Fludarabintherapien eine Myelosuppression mit Neutropenie und eine Lymphopenie auftreten, die vor allem die CD4+ T-Zellen betrifft. Aufgrund dessen kommen hier bestimmte, unter Alkylantien seltener Infektionen vor, von denen besonders vorbehandelte Patienten und Patienten in fortgeschrittenen Stadien betroffen sind. Als zwei weitere seltene Nebenwirkungen von Fludarabin sind das Tumorlyse-Syndrom sowie in etwa fünf Prozent der Fälle Autoimmunzytopenien zu nennen.

Fludarabin-Kombination

- Fludarabin + Cyclophosphamid [Hallek et al., 2001]
- Fludarabin + Cyclophosphamid + Mitoxantron [Bosch et al., 2002]
- Fludarabin + Epirubicin [Rummel et al., 1999]
- Fludarabin + Cyclophosphamid + Rituximab [Keating et al., 2005]

Cladribin

Mit Cladribin (2-Chlorodeoxyadenosin) können bei der rezidierten B-CLL Ansprechraten zwischen 45 und 70% erreicht werden, jedoch ist die Rate komplet-

ter Remissionen (5-10%) möglicherweise niedriger als bei der Therapie mit Fludarabin. Die Hauptnebenwirkung des Cladribin besteht in der Neutropenie, in deren Folge febrile Episoden oder bakterielle Infekte auftreten. Bei wiederholter Gabe kommt es zu einer kumulativen Myelotoxizität mit verlängerter Thrombozytopenie [Robak, 2005].

Weitere zytostatische Behandlungsmöglichkeiten

Bei Versagen der Primärtherapie können die folgenden Polychemotherapien zum Einsatz kommen:

- CHOP-Schema: Cyclophosphamid + Adriamycin + Vincristin + Prednison [Johnson et al., 1996]
- CAP-Schema: Cyclophosphamid + Adriamycin + Prednison [Leporrier et al., 2001]
- COP-Schema: Cyclophosphamid + Vincristin + Prednison [Raphael et al., 1991]

Jedoch zeigten diese Polychemotherapie-Regime bisher im Vergleich zur Monotherapie mit Fludarabin – sofern keine Resistenz gegen das Purinanalogon bestand – keinen Vorteil.

1.1.5.3. Immuntherapie: Monoklonale Antikörper

Rituximab

Rituximab ist ein chimärer Maus-/Mensch-IgG1κ-Antikörper und zytologisch wirksam gegen CD20-positive Zellen in Anwesenheit von Komplement- und Effektor-Zellen. Das Zielantigen CD20 ist essentiell für die Regulation des Zellzyklus und die Zelldifferenzierung [Tedder et al., 1994]. Es ist auf normalen und malignen B-Lymphozyten zu mehr als 90% in unterschiedlicher Dichte vorhanden, fehlt aber auf nicht-hämatologischen Zellen, B-Progenitor-Zellen, Plasmazellen, T-Lymphozyten, Monozyten, dendritischen Zellen und pluripotenten Stammzellen. Zu den Nebenwirkungen von Rituximab gehören Fieber, Schüttelfrost, Hauterscheinungen, Übelkeit, Dyspnoe und Blutdruckabfall. In einer retro-

spektiven Studie von Byrd et al. wurde eine kombinierte Gabe von Rituximab und Fludarabin mit einer alleinigen Fludarabin-Gabe verglichen. Die Kombinationstherapie erzielte ein signifikant höheres progressionsfreies Überleben sowie eine höhere Gesamtüberlebenszeit [Byrd et al., 2005].

Alemtuzumab

Bei Alemtuzumab handelt es sich um einen humanisierten IgG1-Antikörper, der an das CD52-Antigen bindet. CD52 befindet sich auf der Oberfläche von mehr als 95% aller Blut-Lymphozyten und Monozyten sowie auf den meisten B- und T-Zell-Lymphomen. Erythrozyten, Thrombozyten und Stammzellen exprimieren dieses Antigen nicht. Wie auch bei Rituximab (oben nicht erwähnt) kann bei Alemtuzumab als Nebenwirkung bei der ersten Infusion eine Tumorzelllyse mit den typischen Symptomen wie Fieber, Schüttelfrost, Thrombozytopenie und Blutdruckabfall entstehen. Zudem kann eine Lymphopenie auftreten [Wendtner, Ritgen et al., 2004].

1.1.5.4. Stammzelltransplantation

1.1.5.4.1. Allogene Stammzelltransplantation

Bei ausgewählten Patienten, die jünger als 60 Jahre sind und ein HLA (Humane Leukozytenantigene)-identisches Familienmitglied haben, kann eine allogene Stammzelltransplantation in Betracht gezogen werden. Durch eine allogene Stammzelltransplantation werden bei therapierefraktären Patienten und/oder vorbehandelten Patienten Ansprechraten von 70-87% erreicht [Pavletic et al., 2000].

Gründe für eine Allo-SZT liegen in einer höheren Antitumor-Aktivität mit höheren Dosen an Chemotherapeutika, dem GVL-Effekt (graft versus Leukemia) und der ausbleibenden Stammzell-Kontamination. Allerdings geht die Allo-SZT mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einher (TRM [treatment-related mortality]: bis zu 50%). Dies liegt an der Toxizität der Hochdosis-Chemotherapiebehandlung, der vorhandenen GVHD (graft versus host disease/ Spender-gegen-Wirt-Reaktion) und den Komplikationen aufgrund von Infekten. Darüber hinaus ist die Durchführbarkeit durch Altersbeschränkungen und der

Abhängigkeit von geeigneten Spendern beschränkt. Da Verwandte ersten Grades von B-CLL Patienten möglicherweise auch eine B-Zell-Population mit einem B-CLL-ähnlichen Immunphänotyp besitzen, sollte das Blut aller HLA-identischen Spender mit Hilfe der Durchfluss-Zytometrie vorher untersucht werden [Yee et al., 2006]. Im Gegensatz zur autologen SZT zeichnet sich die Allo-SZT durch höhere Raten an krankheitsfreiem Überleben und Gesamtüberleben aus. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass die Allo-SZT bei einigen Patienten kurativ wirken kann. Als weiterer Unterschied zur Auto-SZT können bei der Allo-SZT anhaltende Komplett-Remissionen bei Patienten mit chemorefraktärer Krankheit erzielt werden, möglicherweise durch einen GVL-Effekt. Im Gegensatz dazu ist bei der Auto-SZT ein Ansprechen auf die Chemotherapie für den Erfolg der Behandlung erforderlich [Yee et al., 2006; Hallek et al., 2005].

1.1.5.4.2. Autologe Stammzelltransplantation

Die autologe Transplantation von peripheren Blutstammzellen (Auto-PBSZT) ist bei der B-CLL deutlich weniger toxisch als die Allo-SZT oder –KMT (Knochenmarktransplantation) und wird bei Patienten im Alter bis zu 65 Jahren durchgeführt. Das Grundprinzip der Auto-SZT ergibt sich aus der linearen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung einiger Chemotherapeutika, bei denen der Einsatz höherer Dosen mehr Tumormasse absterben lässt. Die Methode wird durch die Möglichkeit einer Reinfusion von Tumorzellen durch die Entwicklung eines sekundären MDS (Myelodysplastisches Syndrom) und durch das Fehlen eines GVL-Effektes beschränkt. Obwohl es einen Zusammenhang zwischen der Auto-SZT und einer verringerten TRM (1-7%) gibt und auch molekulare Remissionen nachgewiesen werden konnten, ist es unwahrscheinlich, dass diese Methode die Krankheit heilen kann, da es keine Hinweise auf ein Plateau in PFS (Progressionsfreies Überleben) gibt [Yee et al., 2006].

Das Problem der Auto-SZT besteht in der möglichen Verunreinigung der autologen Progenitorzell-Transplantate durch B-CLL-Zellen. Vermutlich rezidiert deshalb die Erkrankung in den meisten Fällen nach Auto-SZT. Des Weiteren kommen als schwere Nebenwirkung das myelodysplastische Syndrom und aku-

te myeloische Leukämien hinzu, die vor allem in den ersten fünf Jahren nach Transplantation auftreten können (bis zu 15%) [Dreger et al. 2002].

1.2. Pathogenese der chronischen lymphatischen Leukämie

1.2.1. Grundlegende molekulare Mechanismen: Klonale autonome Proliferation

Im Gegensatz zu den meisten bösartigen Tumoren proliferiert die klonale B-Zelle bei der B-CLL nur langsam. Die Apoptose ist dereguliert; dies geht mit einer Ansammlung von malignen Zellen und der Störung der normalen Immunfunktionen einher [Bannerji et al., 2000]. Die malignen B-CLL-Zellen akkumulieren in der G₀-Phase und überschwemmen das periphere Blut, das Knochenmark, die Milz und die Lymphknoten. Der Verbleib in der G₀-Phase hat zum Nachteil, dass die B-CLL-Zellen sich so eine Resistenz gegen Zellzyklus-aktive Wirkstoffe aneignen [Danilov et al., 2006].

Betrachtet man die klinische Heterogenität bei B-CLL-Patienten, so können auch verschiedene Signalkaskaden mit dem Beginn und dem Verlauf der B-CLL in Verbindung gebracht werden. Nach dem aktuellen Stand der Forschung sind in der B-CLL durch unbekannte Mechanismen dauerhaft verschiedene Signalkaskaden aktiviert, was zur Deregulation des Zellzyklus und zur Apoptose führt. Die Proteine der *BCL2* (B-cell-lymphoma-2-gen)-Familie, die bedeutend für die Regulation des programmierten Zelltodes sind, sind in 90% der malignen B-CLL-Zellen überexprimiert. Trotz dieser Überexpression konnte in fast allen Fällen (96-99%) keine Translokation auf dem *BCL2*-Gen nachgewiesen werden [Reed, 1997]. Mutationen auf dem Tumor-Suppressor Gen p53 und ein erhöhtes Expressionslevel des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors p27 korrelieren mit einer Progression der Erkrankung sowie einer schlechten Prognose. Ebenso konnte ein schlechtes Therapieansprechen mit p53-Mutationen verbunden werden [Kalil et al., 1999]. Auch Zytokine, die von B-CLL-Zellen produziert und freigesetzt werden, wie etwa der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und Interleukin 8 (IL-8) sowie IL-2, welches in T-Zellen produziert und dann von B-CLL-Zellen durch spezielle Rezeptoren aufgenommen wird, wirken bei den autokrinen und parakrinen Kreisläufen mit und beeinflussen das B-CLL-Zellüberleben sowie die Proliferation. Eine Reihe von Zytokinen sind beschrieben worden, die entweder den Zellzyklus beeinflussen oder die B-CLL-Zellen vor Apoptose bewahren. Neben vielen verschiedenen intrazellulären Signalkaskaden könnte die TNF α -

vermittelte Aktivierung des NF (nuclear factor)- κ B und die Familie der AP1 (Activating Protein 1)-Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle für das begünstigte Zellwachstum der B-CLL-Zellen spielen. C-jun und c-fos, die den AP1-Komplex bilden, werden nicht durch TNF α in B-CLL-Zellen induziert. Stattdessen sind aber c-fos und fos-B, ein weiteres Mitglied der AP-1-Familie, dauerhaft hochreguliert [Pezzella et al., 1990].

Zwei Gruppen von Proto-Onkogenen scheinen in der Entstehung der B-CLL wichtig zu sein: zum einen Suppressoren der Apoptose wie BCL2 und ein mutiertes p53-Gen, zum anderen Induzierer wie C-MYC, BAX (BCL2-associated X protein) und FAS. Ein Ungleichgewicht in der Aktivierung könnte nachhaltig das leukämische Zellwachstum beeinflussen, entweder durch Förderung oder Unterdrückung der Proliferation. Obwohl die exakte Aufgabe des Onkogens C-MYCs in der Pathogenese der B-CLL noch nicht geklärt ist, konnte gezeigt werden, dass eine C-MYC-Überexpression mit einer schlechten Prognose verbunden ist. Weiterhin kann sie zu einer Apoptose-Resistenz von B-CLL-Zellen führen [Vallat et al., 2003; Nagy et al., 2003].

1.2.2. WNT/CTNNB1/LEF1-Signalkaskade

Der WNT/CTNNB1-Signalweg reguliert durch CTNNB1 die Transkription spezifischer Zielgene. WNT-Proteine gehören zu einer großen, aus 19 Mitgliedern bestehenden hoch konservierten Familie von Cystein-reichen Glykoproteinsignalmolekülen. Der erste Vertreter der WNT-Familie wurde in *Drosophila* entdeckt. Wg1 (wingless gene) wurde als Gen identifiziert, welches verantwortlich für einen Defekt in der embryonalen Entwicklung war, der zu einem flügellosen Phänotyp in *Drosophila* führte. WNT-Proteine aktivieren Zelloberflächen-Rezeptor-vermittelnde Signalkaskaden, die eine Vielzahl von zellulären Aufgaben regulieren und die weitere Entwicklung der Zelle bestimmen, wie z.B. Proliferation, Migration und Genexpression [Khan et al, 2006].

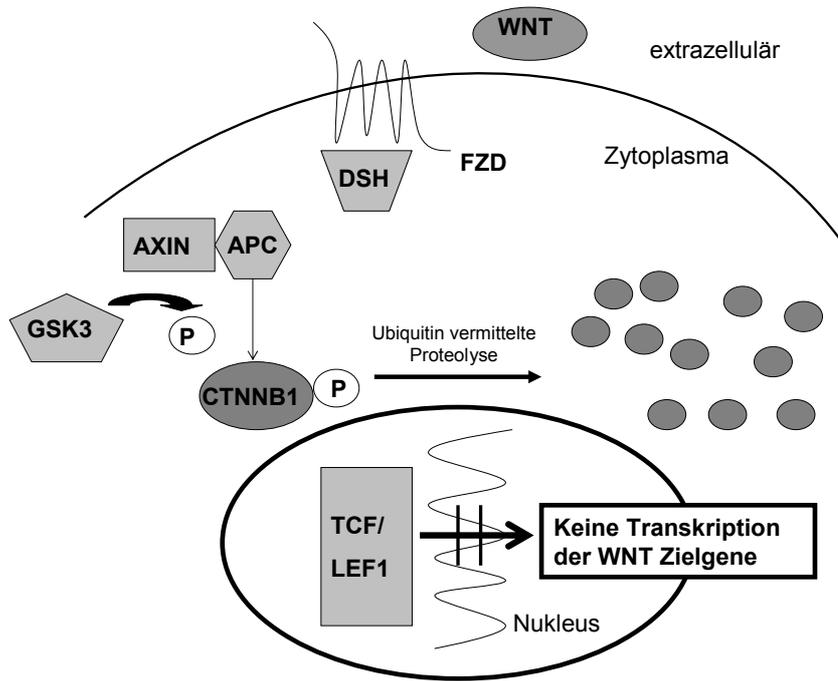
Die WNT/CTNNB1/LEF1-Signalkaskade spielt eine bedeutende Rolle in der frühen Embryogenese, der Organogenese sowie bei der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen [Khan et al, 2006] [Reya et al, 2003]. Zudem konnten Nachweise über eine Beteiligung dieses Signalweges bei der Entste-

hung von soliden Tumoren wie z.B. dem Kolon-, Ovarial- oder Mammakarzinom erbracht werden [Reya et al, 2005].

Der WNT/CTNNB1-Signalweg wird durch WNT-Proteine aktiviert, die an Rezeptoren der Frizzled Familie (FZD) an der Zelloberfläche binden. Das Binden von FZD an die Rezeptoren führt zur Phosphorylierung von Dsh (dishevelled). Dsh verbindet sich mit Axin (axis inhibitor-1) und verhindert so die Phosphorylierung des CTNNB1s durch GSK-3 (Glykogen-Synthase-Kinase 3). Dieser Vorgang wird wahrscheinlich durch *frat-1* (frequently rearranged in advanced T cell lymphomas) vermittelt. Unphosphoryliertes CTNNB1 bleibt stabil. Das stabile CTNNB1 sammelt sich im Zytoplasma an und diffundiert weiter in den Nukleus. Bei inaktiviertem Signalweg gehen TCF/LEF1 (t cell factor/ Lymphoid Enhancer Binding Factor 1) einen Komplex mit Groucho ein, welcher so als Transkriptionsrepressor fungiert [Reya et al., 2005]. Das nun im Nukleus befindliche CTNNB1 konvertiert diesen Repressor-Komplex in einen aktiven Transkriptionskomplex, indem Groucho durch die Histon-Acetylase CBP/p300 (cyclic AMP response element-binding protein) ersetzt wird und führt zur Transkription der WNT-Zielgene wie C-MYC, CCND1 und SURV.

In der Abwesenheit von WNT-Liganden wird CTNNB1 in einen Degradationskomplex gebunden, der aus APC (adenomatous polyposis of the colon gene) und Axin besteht. Dieser Komplex ermöglicht die Phosphorylierung von CTNNB1 durch Casein Kinase 1 (CK1) und anschließend durch GSK-3. Weiterhin führt der Prozess zur Ubiquitierung durch β -trcp (β -transducin repeat containing protein), einem Mitglied des Ubiquitin-Proteasomen Komplex, und proteasomalen Abbau von CTNNB1 [Moon et al., 2004].

I. Inaktivierter WNT-Signalweg



II: Aktivierter WNT-Signalweg

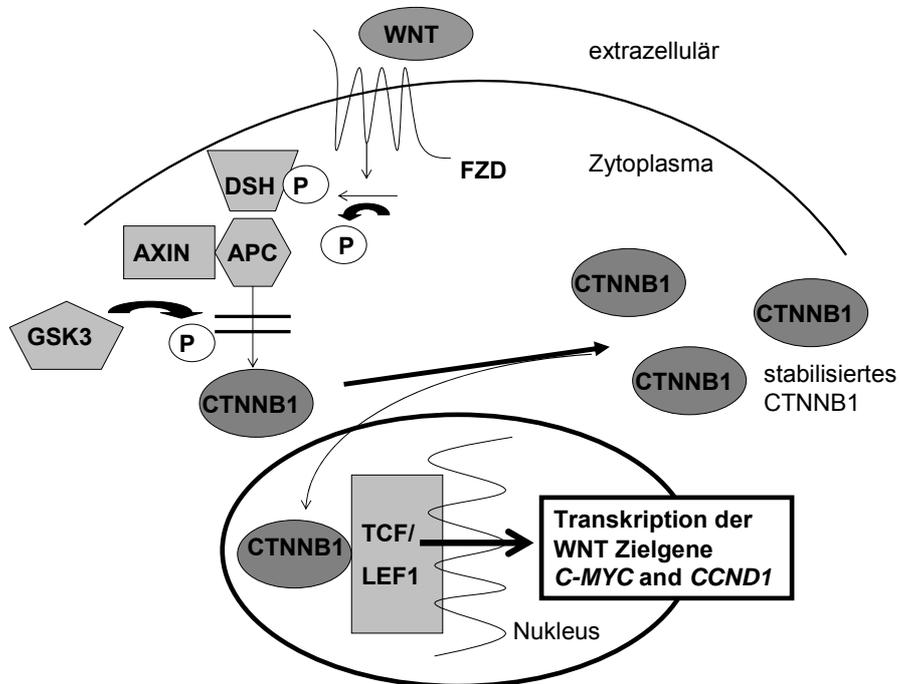


Abbildung 2: Darstellung des WNT/CTNNB1-Signalweges

-
- I. Inaktivierter WNT-Signalweg: In der Abwesenheit von WNT wird CTNNB1 abgebaut und so die Transkription der WNT-Zielgene unterdrückt.
 - II. Aktivierter WNT-Signalweg: Der WNT-Signalweg wird durch Bindung der WNT-Proteine an ihre Rezeptoren aktiviert. Dies verursacht eine Anreicherung von CTNNB1 im Zytoplasma. CTNNB1 kann in den Nukleus eindringen, wo es an die TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren bindet und so die Transkription der WNT-Zielgene aktiviert.

APC: adenomatous polyposis coli; DSH: Dishevelled; FZD: Frizzled; GSK3: glycogen synthase kinase 3; LEF1: Lymphoid enhancer-binding factor 1; P: phosphorylation; TCF: T-cell factor

Versuche der Arbeitsgruppe um Lu konnten nachweisen, dass die mRNA-Level von 6 der 18 WNT (das menschliche Homolog zum Drosophila wingless Gen)- und von 1 der 10 FZD-Mitgliedern in B-CLL-Zellen im Vergleich zu peripheren Blutlymphozyten und normalen B-Zellen deutlich erhöht waren [Lu et al., 2004]. Weiterhin konnte in zwei unabhängig voneinander durchgeführten Genexpressions-Arrays gezeigt werden, dass LEF1 in B-CLL-Zellen im Vergleich zu normalen B-Lymphozyten sehr stark überexprimiert wird [Jelinek et al., 2003; Klein et al., 2001]. Demzufolge kann angenommen werden, dass das Überleben der B-CLL-Zellen in vivo durch eine dauerhaft aktivierte WNT-Signalkaskade durch eine Überexpression von CTNNB1 (β -catenin) und LEF1 vermittelt wird, die das Überleben begünstigt und Apoptose zusammen mit C-MYC, SURV (Survivin) und CCND1 (Cyclin D1) hemmt.

1.2.3. Lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF1)

Der Transkriptionsfaktor LEF1 spielt eine wichtige Rolle im Prozess der Embryogenese. Aktiviert durch die Komplexbildung mit CTNNB1 initiiert LEF1 die Expression bestimmter Zielgene [Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996]. Diese Zielgene sind hauptsächlich in Zellregulierungs-Mechanismen wie Proliferation, Zellwachstum und Überleben in der pränatalen Entwicklung involviert. Zu

ihnen gehören z.B. C-MYC [He et al., 1998], CCND1 [Shtutman et al., 1999], SURV [Zhang et al., 2001] und LEF1 selbst [Hovanes et al., 2001].

Nach der Geburt sind LEF1-mRNA-Transkripte auf ein paar spezialisierte Gewebe begrenzt. Die LEF1-Expression ist stumm geschaltet, sobald die Zellen einen Arrest im Zellzyklus erreichen [Hovanes et al., 2001].

Der Einfluss der LEF1-Signalkaskade auf die Hämatopoese konnte durch Experimente von Reya et al. mit Knock-Out Mäusen demonstriert werden. Dort konnte gezeigt werden, dass die LEF1-Expression in bestimmten Stadien der B-Zelldifferenzierung für die Zellproliferation und das Überleben erforderlich ist, nicht aber für die Differenzierung [Reya et al., 2000].

Die Wichtigkeit von LEF1 und der Expression der LEF1-abhängigen Zielgene als Anstoß der Tumorgenese wurde von Aoki et al. [Aoki et al., 1999] deutlich belegt. Die Expression eines chimären Protein mit einer LEF1 Bindungssequenz, welche mit der Transkriptionsaktivierungsdomäne eines Estrogen-Rezeptors – als Ersatz der CTNNB1 Aktivierungsdomäne – fusioniert war, führte zu neoplastischen Veränderungen in Hühnerembryo-Fibroblasten. Dieses Ergebnis spricht für die Onkogenität eines aktiven LEF1-Signalweges. Zudem wurden bereits eine aktivierte LEF1-Signalkaskade im erwachsenen Gewebe mit verschiedenen Krebsarten wie Darmkrebs [Morin et al., 1997] und Brustkrebs [Imbert et al., 2001] als auch mit hämatologisch bösartigen Veränderungen wie Multiples Myelom [Derksen et al., 2004], AML (Akute myeloische Leukämie) [Simon et al., 2005], ALL (Akute lymphatische Leukämie) [Nygren et al., 2007] und B-CLL [Lu et al., 2004] in Verbindung gebracht.

1.2.4. Zielgene des Transkriptionsfaktors LEF1

1.2.4.1. CCND1

Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) stellen evolutionär konservierte Proteine dar, die essentiell für die Zellzyklus-Kontrolle in Eukaryonten sind. Cycline enthalten ein konserviertes Aminosäure-Sequenz-Motiv – die Cyclin-Box – die ihre Bindung zu den Cyclin-abhängigen Kinasen ermöglicht. Dadurch werden aktive Komplexe gebildet, die den Zellzyklus regeln. Zudem besitzen Cycli-

ne zusätzliche, nicht auf den Zellzyklus beschränkte Funktionen. Demnach wurden die Cycline in funktionelle Gruppen eingeteilt [Bates et al., 1996]. Proteine der Gruppe 1 (Cyclin A, B, D1, D2, D3, E und F) wirken primär in der Zellzyklusregulierung, während die der Gruppe 2 (Cyclin C und H) auch in der Regulierung der Transkription eine Rolle spielen. Die Gruppe 3 (Cyclin G1, G2 und I) dagegen ist in seiner Funktion deutlich sowohl vom Zellzyklus als auch von der Regulierung der Transkription abgegrenzt.

Cycline vom D-Typ wurden als pathogenetisch relevant für die B-CLL beschrieben. Die Cycline spielen die Schlüsselrolle in der Steuerung des Zellzyklus. Während gezeigt werden konnte, dass die CCND1-mRNA in der B-CLL 4 – 6-fach überexprimiert war, wurde Cyclin D2 sowohl in B-CLL-Zellen als auch in gesunden B-Zellen gleich stark exprimieren [Paul et al., 2005]. Weiterhin kann die möglicherweise wichtige Rolle von CCND1 in B-CLL-Zellen durch die Erkenntnis einer inversen Korrelation der CCND1-Expression und des Überlebens der B-CLL-Patienten demonstriert werden [Lu et al., 2004; Faderl et al., 2002]. Zudem zeigte eine Studie von Plate [Plate et al., 2000], dass die Genexpression von CCND1 wesentlich runterreguliert war, wenn B-CLL-Zellen spontan in Apoptose gingen.

1.2.4.2. SURV

SURV gehört zu der Familie der Inhibitoren der Apoptose (IAP/inhibitor of apoptosis protein). Wie die anderen IAP-Proteine bindet auch SURV spezifisch an die Caspasen-3 und -7, jedoch nicht an die proximale Initiator-Protease Caspase-8. Caspase-3 and-7 agieren als abschließende Effektoren in der apoptotischen Protease-Kaskade. Während der fetalen Entwicklung im Menschen wird SURV reichlich exprimiert, es ist jedoch kaum im erwachsenen Gewebe vorhanden [Tamm et al., 1998]. Untersuchungen zu Unterschieden im Genexpressionsverhalten zwischen normalen und Tumorzellen konnten deutlich machen, dass SURV zu den Genen gehört, die am konstantesten in Tumorzellen überexprimiert werden (im Gegensatz zu normalem Gewebe). Tatsächlich wird

SURV reichlich in transformierten Zelllinien und in vielen menschlichen Krebsarten wie z.B. in Hämoblastosen exprimiert [Nakagawa et al., 2004].

Im normalen lymphatischen Gewebe reaktiver Lymphknoten ist die SURV-Expression auf Zellen des Keimzentrums konzentriert, die die Abteilung der B-Zellproliferation in lymphatischen Follikeln darstellen [Pezzella et al., 1990]. Dagegen ist bei der B-CLL die Proliferation in Lymphknoten-Pseudofollikeln angesiedelt, wo B-CLL Zellen sowohl SURV als auch BCL2 koexprimieren. Dies stellt einen auffälligen Gegensatz zu normalen Zellen des Keimzentrums dar, die kein BCL2 enthalten. Demzufolge unterscheiden sich pseudofolikuläre proliferierende B-CLL Zellen von normalen Keimzentrumszellen, weil sie ihre Fähigkeit in Apoptose zu gehen verloren haben, was zur Akkumulation der B-Zellen führt [Granziero et al., 2001].

SURV wird gewöhnlich im Zytoplasma von Tumorzellen detektiert und deswegen als zytoplasmatisches Protein angesehen. Jedoch haben einige Studien eine nukleäre Akkumulation von SURV bei Magen- und Lungenkrebszellen gezeigt. Ebenfalls wurde SURV bei Untersuchungen mit Knochenmarkszellen in unterschiedlichen Kompartimenten aufgefunden: In ALL-Zellen wurde SURV nukleär exprimiert, dagegen zytoplasmatisch in CLL-Zellen [Nakagawa et al., 2004].

Wie bereits erwähnt konnte gezeigt werden, dass von den LEF1-Zielgenen SURV eine signifikante Rolle in der B-CLL Pathogenese spielt, indem es die maligne Proliferation durch Apoptose kontrolliert [Granziero et al., 2001]. Zusätzlich konnte SURV als kritisches Tumor-Antigen in der B-CLL identifiziert werden. Ihm wird deshalb eine bedeutende Rolle als Ziel in der Immuntherapie zugeordnet [Giannopoulos et al., 2006].

1.2.4.3. C-MYC

Die MYC-Genfamilie besteht aus mindestens sieben nah verwandten Genen: C-MYC, N-MYC, L-MYC, P-MYC, R-MYC, S-MYC und B-MYC [De Pinho et al., 1991]. C-MYC greift in die Zell-Proliferation, -Transformation und -Differenzierung ein. Exprimiert wird es während der embryonischen Entwicklung und in vielen verschiedenen erwachsenen Geweben. Verstärkt kommt C-MYC in zahl-

reichen Tumoren vor, besonders bei Lungen-, Brust-, Zervikal- und Darm-Tumoren. Es wurde im Nukleus und/oder im Zytoplasma lokalisiert.

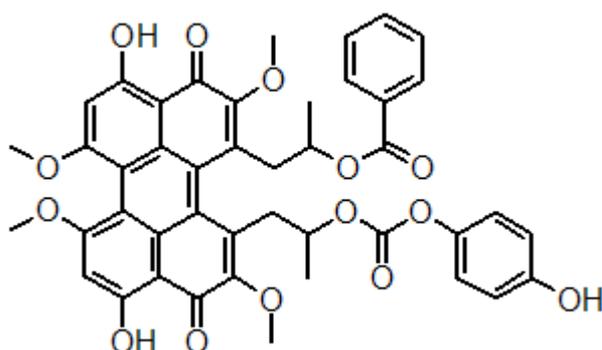
C-MYC besitzt drei Sequenz-Motive im Carboxyl-Terminus: eine Leukin-Zipper-Region, eine Helix-Loop-Helix-Region und eine basische Region. Es kann Sequenz-spezifische (CACGTG) DNA-Bindungsheterodimere mit MAX eingehen, ebenfalls ein Helix-Loop-Helix/Leucine-Zipper-Protein [Blackwood et al., 1991]. Beide Abschnitte, sowohl die Leukin-Zipper-Domäne als auch das Helix-Loop-Helix-Motiv von C-MYC, tragen zur Heterodimerbildung bei. Das C-MYC/MAX-Heterodimer führt zu einer konformativen Veränderung der DNA und zur Aktivierung der Transkription.

Eine C-MYC-Überexpression konnte mit einer Akkumulierung der B-CLL-Zellen in der ruhenden G_0/G_1 -Phase sowie einer erhöhten Lebensspanne von B-CLL-Zellen in Zusammenhang gebracht werden. Im Gegensatz zu ihrem in vivo-Verhalten gehen diese Zellen rasch den programmierten Zelltod ein, wenn sie ex vivo kultiviert werden. Dieses Verhalten ist ein Zeichen für die Doppelrolle des C-MYC, welches demnach sowohl das Zellwachstum als auch den Zelltod regulieren kann. Welche der beiden Eigenschaften nun eingeschaltet wird, hängt von den synergistischen oder antagonistischen Aktivitäten anderer aktivierter Onkogene oder vorhandener Zytokine ab, welche individuell variieren können [Vitale et al., 2003]. Tritt der programmierte Zelltod ein, ist die C-MYC-mRNA-Expression herunterreguliert [Plate et al., 2000]. Auch wenn die genaue Rolle von C-MYC in der Pathogenese der B-CLL noch nicht geklärt ist, konnte gezeigt werden, dass eine C-MYC-Überexpression mit einer schlechten Prognose sowie mit einer Apoptoseresistenz von B-CLL-Zellen verknüpft ist [Vallat et al., 2003; Nagy et al., 2003].

1.3. Die small molecule-Inhibitoren CGP 049090 und PKF 115-584

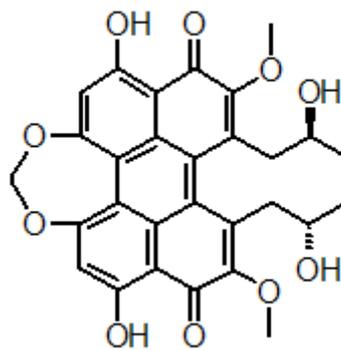
1.3.1. Struktur und chemische Eigenschaften

In diesem Projekt haben mit zwei von Novartis zur Verfügung gestellten Verbindungen gearbeitet: PKF 115-584 und CGP 049090. Beide sind aus Pilzen isoliert worden und antibiotisch wirksam [Luu et al., 2004; Lepourcelet et al., 2004].



PKF 115-584

C₄₉H₃₈O₁₄, MW = 790,76



CGP 049090

C₂₉H₂₆O₁₀, MW = 534,52

Abbildung 3: Strukturformel der Perylenchinonderivate PKF 115-584 und CGP 049090

Die Verbindungen sind gekennzeichnet durch ein anniliertes aromatisches Ringsystem. Beide besitzen als Grundstruktur ein Perylenchinon.

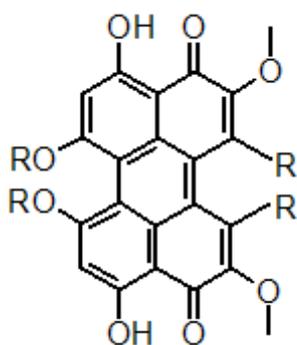


Abbildung 4: Perylenchinon-Grundgerüst

Auffällig ist, dass die Verbindungen nur aus den drei Elementen Sauerstoff, Kohlenstoff und Wasserstoff bestehen. Während PKF 115-584 nur ein reines Kohlenstoff-Ringsystem besitzt, weist CGP 049090 durch die Dietherstruktur der Reste einen Heterozyklus auf. Sowohl als Feststoff als auch in Lösung zeigen die Verbindungen eine rote Färbung. Diese tritt durch Mesomerieeffekte auf. Das aromatische Grundgerüst besitzt ein konjugiertes Pi-Elektronensystem. Das bedeutet, dass die Doppelbindungen nicht starr an einen Punkt fixiert sind, sondern verschiedene Zustände eingehen können. Weiterhin kann durch das aromatische Ringsystem die starke Lipophilie der Substanzen begründet werden.

Beide Substanzen weisen fluoreszierende Eigenschaften auf. In der Literatur wird berichtet, dass Fluoreszenz häufig bei Stoffgruppen beobachtet wird, die eine Starrheit des Moleküls aufweisen, wie z.B. aromatische Verbindungen, Verbindungen mit konjugierten Doppelbindungen, Carbonylverbindungen sowie konjugierte Heterozyklen [Rücker et al., 1992]. Während die ersten zwei Voraussetzungen auf beide Moleküle zutreffen, besitzt als dritten Punkt nur CGP 049090 einen konjugierten Heterozyklus.

Über den Metabolismus der Substanzen ist nichts bekannt. Da aber PKF 115-584 die gleiche Struktur wie Calphostin C aufweist, kann hier von dem gleichen Abbaumechanismus ausgegangen werden. Demnach wird die Substanz über Esterasen gespalten und unabhängig vom Cytochrom P450 System abgebaut [Chen et al., 1999].

1.3.2. Wirkung von CGP 049090 und PKF 115-584 auf B-CLL-Zellen

Die LEF1 Bindungsstelle an CTNNB1 liegt in der Region um die Armadillo Wiederholung 8. Basische Aminosäure-Reste und eine hydrophobe Tasche an CTNNB1 sind für diese Bindung an LEF1/TCF essentiell [Poy et al., 2001].

Um eine Verbindung zu identifizieren, die genau diese Verknüpfung zwischen TCF4 und CTNNB1 verhindert, wurde von Lepourcelet [Lepourcelet et al., 2004] ein Bindungsassay für „high throughput screening“ (HTS) entwickelt. Mikrotiter-Platten wurden mit reinem CTNNB1 beschichtet. Anschließend wurden sie mit einem TCF4-Fragment, welches an Glutathion-S-Transferase gebunden war (GST), einem anti-GST-Antikörper und einem alkalischen Phosphatase (AP)-konjugierten Zweitantikörper inkubiert. Verbindungen, die den CTNNB1/TCF-Komplex zerstörten, erfassten demnach verminderte AP-Werte.

Mit diesem HTS-Assay screenete die Arbeitsgruppe um Lepourcelet [Lepourcelet et al., 2004] fast 7000 gereinigte natürliche Verbindungen aus eigenen und öffentlichen Sammlungen, zunächst mit Konzentrationen von 10 μ M. Acht Verbindungen zeichneten sich durch reproduzierbare, dosisabhängige Hemmungen der CTNNB1/TCF-Interaktion mit $IC_{50} < 10 \mu$ M aus. Ihre Struktur und Reinheit wurde daraufhin durch HPLC und Massenspektrometrie bestätigt. Die acht Verbindungen zeigten verschiedene strukturelle Eigenschaften, obwohl sie alle die polyhydroxylierten planaren Besonderheiten besaßen.

Es konnte in mehreren unabhängigen in vitro-Assays gezeigt werden, dass die selektierten Verbindungen den CTNNB1/TCF-Komplex trennen. Zudem bekämpfen sie wirksam die zellulären CTNNB1-abhängigen Tätigkeiten wie die Aktivierung der Transkriptionsgene, die Expression von C-MYC und CCND1 sowie die Zellproliferation [Lepourcelet et al., 2004].

1.4. Hypothese und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegende Hypothese besagt, dass eine aberrante Überexpression des Transkriptionsfaktors LEF1 sowie seine Interaktion mit CTNNB1 bei der B-CLL einen maßgeblichen pathogenetischen Faktor darstellen. Ziel der Arbeit ist es daher, zum einen die vermutete Überexpression von LEF1 und einige seiner Zielgene in primären B-CLL-Zellen zu demonstrieren. Ferner soll untersucht werden, ob die beiden small molecule-Inhibitoren ein zytotoxisches Potential gegenüber B-CLL-Zellen besitzen. Zudem soll veranschaulicht werden, dass durch PKF 115-584 und CGP 049090 eine spezifische Hemmung der CTNNB1/LEF1-Interaktion herbeigeführt werden kann, die konzentrationsabhängig ist. Letztlich soll gezeigt werden, dass die verminderte LEF1-Wirkung zu einer veränderten Expression nachgeschalteter Proteine wie C-MYC, CCND1 und SURV sowie zur selektiven Induktion von Apoptose bei B-CLL-Zellen führt.

2. Material und Methoden

2.1. Zellen/Patientenmaterial

2.1.1. Patientencharakteristika

2.1.1.1. B-CLL-Patienten

Es wurde ausschließlich Zellmaterial von an chronischer lymphatischer Leukämie (B-Zell-Typ) erkrankten Personen verwendet.

Im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Leukämiediagnostik wurde dem Patienten mit dessen Einverständnis ca. 15ml peripheres Blut mittels Venenpunktion entnommen und in ein mit EDTA beschichtetes Röhrchen gefüllt. Das Material wurde bei Raumtemperatur gelagert und unmittelbar bzw. bis zu 24 h nach Entnahme aufgearbeitet.

2.1.1.2. Gesunde Probanden

Ebenso wurde von gesunden Spendern mit deren Einverständnis ca. 10 ml Blut mittels Venenpunktion entnommen und sofort aufgearbeitet.

2.1.2. Reagenzien

- Kulturmedium RPMI (Roswell Park Memorial Institute) mit 20% FCS

125 ml Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
6,4 ml Hapes Puffer	Gibco, UK
6,4 ml Penicillin 10.000 U/	
Streptomycin 10.000 µg/ml	Biochrom Ag, Berlin
gelöst in 500 ml RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin

Vor Gebrauch wurde das verwendete FCS im Wasserbad bei 56°C 30 min inaktiviert.

- Lymphoprep® Fresenius Kabi Norge AS, Norway
- NaCl 0,9% Delta Select, Pfullingen

2.1.3. Lymphozytenseparation mittels Dichtezentrifugation

Die Arbeit wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten Lösungen und das Medium wurden im Wasserbad auf eine Temperatur von 37°C angewärmt.

In ein Leucosep-Zentrifugenröhrchen mit Filterscheibe (Firma Greiner Bio-One, Frickenhausen) wurden 15 ml Lymphoprep® gegeben und dieses mittels Zentrifugation unter die Filterscheibe gebracht. Ca. 10 ml Blut wurden mit dem äquivalenten Volumen 0,9%iger Kochsalzlösung versetzt. Diese Mischung wurde auf die Filterscheibe geschichtet und bei 1600 U/min 15 min lang zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation wurden die mononuklearen Zellen aus der Interphase oberhalb des Lymphoprep® entnommen. Zum Waschen wurden diese Zellen mit ca. 15 ml RPMI 1640 Medium gemischt und erneut bei 2000 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in RPMI 1640 Medium mit 20 % FKS resuspendiert. Zum Schluss wurde die jeweils geeignete Zellkonzentration (meist 5×10^5 Zellen/ml) eingestellt.

2.1.4. Zellvitalitätsbestimmung/ Zellzahleinstellung

Die Zellvitalität konnte mittels einer Trypanblaufärbung bestimmt werden. Da tote Zellen im Gegensatz zu lebenden Zellen den Farbstoff nicht aktiv ausschließen können, erscheinen diese blau. Auf diese Weise können tote Zellen bei der Zählung ausgeschlossen werden. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt und nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{vitale Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnung der Zellsuspension}}{\text{Anzahl der gezählten Quadrate}}$$

Mit dem RPMI 1640 Medium mit 20% FKS wurde die jeweils geeignete Zellkonzentration eingestellt.

2.1.5. Primäre Zellkultivierung

Die primären B-CLL-Zellen, die für jeden Versuch in unterschiedlichen Konzentrationen in RPMI 1640 Medium suspendiert vorlagen, wurden entweder in 6 Well- oder 96 Well-Platten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Dauer der Inkubation hing jeweils vom Versuch ab, überschritt jedoch nie mehr als 72h.

2.2. CGP 049090 und PKF 115-584

CGP 049090 Novartis, Schweiz

PKF 115-584 Novartis, Schweiz

Die Substanzen wurden jeweils in 70% DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und als eine 3,3 mM Stocklösung in Aliquots bei -20°C eingefroren.

2.3. ATP-Assay

2.3.1. Reagenzien

- CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay Promega, USA
- Dimethylsulfoxid Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
- Intrapep[®] Reagent 2 Permeabilization Immunotech, Frankreich

2.3.2. Messungen

Der ATP-Assay wurde mittels des CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay durchgeführt. Diese Methode zur Bestimmung von lebenden Zellen in Kultur basiert auf der Messung der Menge an ATP, welche mit der Anzahl an metabolisch aktiven Zellen korreliert.

Durch die Zugabe des CellTiter-Glo[®] Reagenz kommt es zur Zellyse und Erzeugung eines Lumineszenz-Signals, welches proportional zur vorhandenen ATP-Menge ist. Die Menge an ATP ist direkt proportional zur Anzahl an Zellen in Kultur.

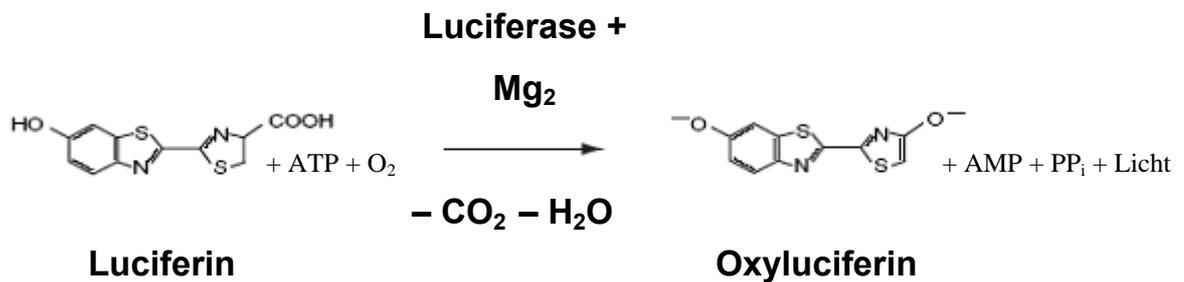


Abbildung 5: Luciferase/Luciferin-Reaktion.

Die Mono-Oxidierung des Luciferin zu Oxyluciferin wird durch Luciferase in Anwesenheit von Magnesiumionen (Mg^{2+}), Adenosintriphosphat (ATP) und molekularem Sauerstoff (O_2) unter Abspaltung von Wasser (H_2O), Kohlendioxid (CO_2), Adenosinmonophosphat (AMP) und Pyrophosphat (PP_i) katalysiert. Bei dieser Reaktion wird Energie in Form von Licht frei, dass luminometrisch erfasst werden kann.

Eine 96 Well Platte wurde mit 90 μ l einer auf 2×10^5 Z/ml eingestellten Zellsuspension (entweder von B-CLL-Patienten oder von gesunden Probanden) befüllt. Die Inhibitoren PKF 115-584 und CGP 049090 wurden zu je 10 μ l pro Well hinzugegeben. Zuerst wurde mit 4 verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen (10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M) gearbeitet, später auf 12 Konzentrationen (100 μ M, 10 μ M, 6 μ M, 3 μ M, 1 μ M, 0,75 μ M, 0,5 μ M, 0,25 μ M, 0,1 μ M, 0,06 μ M, 0,03 μ M, 0,01 μ M) erhöht. Pro Konzentration wurden 3 Ansätze angefertigt. Zur Kontrolle diente DMSO in den entsprechenden Verdünnungsstufen, die auch die PKF 115-584- bzw. CGP 049090-Lösungen als jeweilige DMSO-Konzentration enthielten (0,2%, 0,02%, 0,002%, 0,002% bzw. 2%, 0,2%, 0,12%, 0,06%, 0,02%, 0,015%, 0,01%, 0,005%, 0,002%, 0,0012%, 0,0006%, 0,0002%). Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle angesetzt. Hierfür wurden ebenfalls 90 μ l Zellsuspension in die Wells gefüllt und zur Abtötung der Zellen 10 μ l Intrapep[®] Reagent 2 (in einer 1:1 Verdünnung mit RPMI 1640 Medium) hinzugegeben. Die Platten wurden für 0.5 h, 24 h, 48 h oder 72 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde der ATP-Assay genau nach Anleitung durchgeführt und die Lumineszenz am Photometer gemessen.

2.3.3. Auswertung

Das CS (Cell Survival) wurde laut folgender Formel berechnet:

$$CS = \frac{q_{\text{behandelte Zellen}} - \text{Anzahl toter Zellen}}{q_{\text{DMSO}} - \text{Anzahl toter Zellen}}$$

Da in diesem Versuch die Einberechnung der toten Zellen den Wert des CS nur sehr geringfügig verändert hätte, konnte er vernachlässigt werden.

Mit dem Programm GraphPad Prism4® wurden anhand des CS die LC₅₀-Werte errechnet. Der LC₅₀-Wert gibt die Konzentration des Inhibitors an, bei der 50% der Zellen getötet werden.

2.4. Differential Staining Cytotoxicity (DiSC)-Assay

2.4.1. Reagenzien

2.4.1.1. Herstellung der Entenerythrozyten-Stocklösung

Das Entenblut wurde im Rahmen von Nutztierschlachtungen am Schlachthof entnommen und direkt mit 1000 Einheiten/ml Heparin versetzt. Die weitere Aufbearbeitung des Blutes erfolgte in Labor.

20 ml heparinisieretes Entenblut wurde 15 min bei 1000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Insgesamt wurden die Entenerythrozyten viermal gewaschen, indem das Sediment jeweils in 20 ml isotonischer NaCl-Lösung (150 mM) resuspendiert und anschließend bei 1000 U/min für 10 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Das Sediment wurde schrittweise in 200 ml einer 2 % (w/v) Paraformaldehyd-PBS (phosphate buffered saline/Phosphatpuffer)-Lösung resuspendiert und anschließend 6 Tage bei 4°C

mittels Magnetrührer gerührt. Nach erneuter Zentrifugation bei 1000 U/min für 10 min wurde das Sediment in 25 ml PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 25 ml 18% (v/v) Triton X-100/PBS (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde der Ansatz 15 min inkubiert. Eine weitere Inkubation erfolgte nach Zugabe von 400 ml Ethanol (reinst.) über Nacht bei 4°C. Die Entenerythrozyten wurden anschließend wiederholt wie oben beschrieben gewaschen. Zum Auftrennen von Erythrozytenaggregaten wurde der Ansatz für zwei Stunden im Ultraschallbad bei höchstens 20°C behandelt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Erythrozyten in einer Endkonzentration von 10^7 Z/ml in NaCl-Lösung (150 mM) mit 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin (Biochrom AG, Berlin) und 1 µg/ml Amphotericin B (Bristol-Myers Squibb, München) resuspendiert. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

2.4.1.2. Herstellung kollagenbeschichteter Objektträger

Auf einem sauberen Objektträger wurden jeweils 2 Tropfen Kollagen (Serva, Heidelberg) und ein Tropfen 6%ige NaCl-Lösung aufgebracht und mit einem zweiten Objektträger verstrichen. Die Beschichtung wurde durch Lufttrocknung fixiert.

2.4.1.3. Sonstige Reagenzien

- PBS Puffer

1 PBS-Tablette (Gibco™, UK) wurde in 500ml ddH₂O gelöst und auf pH 7,4 eingestellt.

- Nigrosin/Fast-Green-Farbstoff

1% (w/v)	Fast Green	Sigma, Taufkirchen
0,5% (w/v)	Nigrosin	Sigma, Taufkirchen

gelöst in 500 ml PBS

Die Lösung wurde vier Stunden mittels Magnetrührer gerührt. Anschließend wurden die nicht gelösten Bestandteile mittels Zentrifugation bei 400 U/min für 30 min sedimentiert. Der Überstand wurde mit einem Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert.

- Nigrosin/Fast-Green/Entenerythrozyten-Lösung

Jeweils frisch zum sofortigen Gebrauch wurden 6 ml Nigrosin/Fast-Green-Farbstoff mit 150 µl der Entenerythrozytenlösung vermischt.

- May-Grünwalds Eosin-Methylenblaulösung modifiziert Merck, Darmstadt
- Puffertabletten pH 6,8 zur Herstellung nach Weise Merck, Darmstadt
- Giemsa-Lösung Merck, Darmstadt
- NeoMount[®] Merck, Darmstadt

2.4.2. Differential Staining Cytotoxicity Assay

Für jeden Testansatz wurden 90 µl einer 5×10^5 Z/ml Zellsuspension mit je 10 µl unterschiedlicher PKF 115-584- bzw. CGP 049090-Verdünnungen (10 µM, 1 µM, 0,5 µM, 0,1 µM, 0,01 µM) versetzt und in einer 96-Well Platte für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Alle Konzentrationsstufen wurden in Triplets angesetzt. Zur Kontrolle diente DMSO in der jeweiligen Verdünnung entsprechend der DMSO-Konzentrationen, die in den PKF 115-584- bzw. CGP 049090-Lösungen enthalten waren. Als weitere Kontrolle wurden zudem in 3 Wells zu der Zellsuspension ausschließlich 10 µl RPMI 1640 Medium gegeben.

Nach Ablauf der 24 h wurden die Testansätze mit 100 µl der Nigrosin/Fast-Green/Entenerythrozyten-Lösung vermischt und 10 min auf dem Schüttler inkubiert.

Zwischenzeitlich wurden die beschichteten Objektträger, ein Filterpapier und ein Zytofunnel in eine Klammer eingespannt und in die Zytozentrifuge gelegt. Je 100 µl pro Ansatz wurden schräg an die Wand des Zytofunnels pipettiert. Anschließend wurde die Zytospin-Zentrifuge für 1 min bei 1000 U/min gestartet

und so die Ansätze auf die Objektträger gebracht. Nach Lufttrocknung erfolgte die Gegenfärbung nach Pappenheim.

2.4.3. Gegenfärbung nach Pappenheim

Hierzu wurden die Objektträger zuerst für 5 min mit May-Grünwald-Lösung inkubiert, anschließend für weitere 5 min in einer 1:1 Mischung aus May-Grünwald und Weise-Puffer und danach für 15 min in einer 1:9 Verdünnung von Giemsa-Lösung und Weise-Puffer inkubiert. Zum Schluss wurden die Objektträger in destilliertem Wasser gespült und zum Trocken ausgelegt. Nach dem Trocken wurden Deckgläser mit Hilfe von NeoMount[®] aufgebracht.

2.4.4. Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch mit Hilfe des Leuk-Programms. Es wurden die vitalen Zellen (VC) und die Entenerythrozyten (DRBC) gezählt. Pro Objektträger wurden so viele Gesichtsfelder ausgezählt, bis mindestens eine Summe von 100 DRBC erreicht war.

2.5. DNA-Laddering

2.5.1. Reagenzien

- TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer 50X

242 g	Tris
57,1 ml	Eisessig
100 ml	0,5 M EDTA

auf einen Liter ddH₂O gelöst und auf pH 7,4 eingestellt

- Quiagen Mini Kit[®] Quiagen, Hilden
- Ethidiumbromid Serva, Heidelberg

2.5.2. Agarose-Gelelektrophorese

Primäre B-CLL-Zellen wurden mit je 5 μ M PKF 115-584 bzw. CGP 049090 behandelt und für 24 h in 5% CO₂ inkubiert. Als Kontrolle wurden B-CLL-Zellen mit 0,1% DMSO versetzt und es wurde wie oben beschrieben weiterverfahren.

Zur DNA-Extraktion wurde das Quiagen Mini Kit® benutzt. Die somit erhaltenen DNA-Proben wurden auf ein 1,0%iges Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 1,5 h bei 75 V durchgeführt.

2.5.3. Auswertung

Während der Apoptose kommt es zu einer typischen DNA-Fragmentierung, die in Form einer Leiter im Agarosegel nachgewiesen werden kann.

Das Agarosegel enthielt Ethidiumbromid (0,5 mg/ml). Ethidiumbromid lagert sich in die DNA ein und kann unter UV-Licht (366nm) sichtbar gemacht werden. Das Gel wurde mit einem Videodokumentationssystem (BioRad®) dokumentiert und ausgewertet.

2.6. Caspase-3/7-Assay

2.6.1. Reagenzien

- Caspase-GloTM- 3/7-Assay Promega, USA

2.6.2 Messungen

Der Caspase-GloTM ist ein Lumineszenz-Assay, der die Aktivität der Caspasen 3 und 7 misst. Der Assay erzeugt ein prolumineszentes Caspase-3/7-Substrat, welches das Tetrapeptid DEVD enthält. Bei der Zugabe des Caspase-Glo-3/7-Reagenz zu der Zellsuspension reagieren die Caspasen, zerschneiden das Substrat und es findet eine Zellyse statt. Dadurch wird Luciferase umgesetzt und ein Lumineszenz-Signal erzeugt. Diese Lumineszenz ist proportional zur Menge an vorhandener aktiver Caspase.

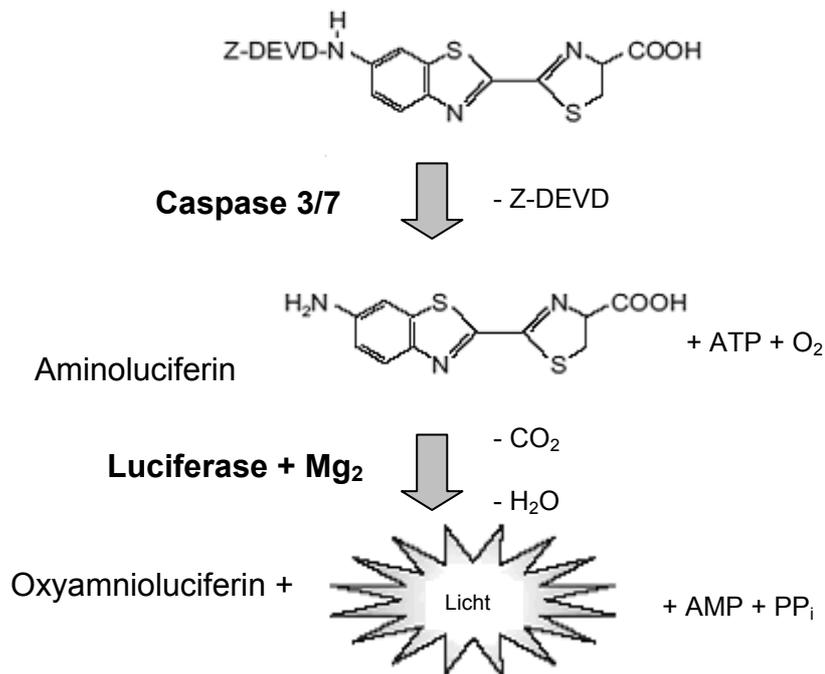


Abbildung 6: Spaltung des prolumineszenten Substrats mit Tetrapeptidsequenz (DEVD) durch die Caspase 3 und 7. Nach der Spaltung durch die Caspasen wird Aminoluciferin frei, welches in Gegenwart von Adenosin triphosphat (ATP), molekularem Sauerstoff (O₂) und Magnesiumionen (Mg²⁺) zu Oxyluciferin unter Abspaltung von Wasser (H₂O), Adenosinmonophosphat (AMP) und Pyrophosphat (PP_i) reagiert, durch Luciferase katalysiert. Bei dieser Reaktion entsteht Energie in Form von Licht, welches luminometrisch nachgewiesen werden kann.

Eine 96-Well Platte wurde mit einer auf die Zellzahl 2×10^5 Z/ml eingestellten B-CLL-Zellsuspension befüllt und mit den Inhibitoren PKF 115-584 und CGP 049090, deren Konzentration jeweils 10 μ M betrug, behandelt. Zur Kontrolle diente 0,2% DMSO, welches der Verdünnungsstufe entsprach, die auch die PKF 115-584- bzw. CGP 049090-Lösungen als jeweilige DMSO-Konzentration enthielten sowie eine Negativkontrolle mit unbehandelte Zellen. Zusätzlich gab es eine Blindprobe, die nur aus RPMI 1640 Medium bestand. Sie wurde benutzt, um das Signal messen zu können, welches alleine vom Medium erzeugt

wird. Diese Kontrolle mit zellfreiem Medium wurde anschließend von dem Signal subtrahiert, welches von den behandelten und unbehandelten Zellen erzeugt wurde. Die Platten wurden für jeweils 2 h, 4 h, 6 h und 8 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Kit nach Herstellerangaben verwendet und die Caspase-Aktivität anhand eines Luminometers gemessen.

2.6.3. Auswertung

Von den jeweiligen Ergebnissen der Caspase-Aktivitäten der PKF 115-584-, CGP 049090-, DMSO- und Negativkontroll-Versuchen (in RLU angegeben), die am Luminometer gemessen wurde, wurden die Werte der „blank reaction“ subtrahiert. Die so neu erhaltenen Werte wurden anhand GraphPad Prism4® berechnet.

2.7. Immunoblots

2.7.1. Reagenzien und Antikörper

Primär-Antikörper

- Purified mouse anti β -catenin Mab
BD Biosciences Pharmingen, USA; Kat.-Nr 610154
- Purified mouse anti human cyclin D1
BD Biosciences Pharmingen, USA: Kat.-Nr. 554181
- Purified mouse anti Actin Ab5 Mab
BD Biosciences Pharmingen, USA; Kat.-Nr. 612656
- Purified mouse anti human Bcl-2
BD Biosciences Pharmingen, USA; Kat.-Nr. 556354
- Purified mouse anti cleaved PARP (Asp-214) Mab
BD Biosciences Pharmingen, USA; Kat.-Nr. 51-9000017
- C-Myc (N-262) rabbit polyclonal IgG
Santa Cruz Biotechnology, USA; sc-764

- LEF1 (C-19) goat polyclonal IgG
Santa Cruz Biotechnology, USA; sc-8592
- Survivin goat polyclonal IgG
Santa Cruz Biotechnology, USA; sc-8807
- Affinity purified rabbit anti human survivin Ab
R&D Systems, USA; Kat.-Nr. AF886

Sekundär-Antikörper

- Polyclonal goat anti mouse Immunglobulins/HRP
Dako Cytomation, Dänemark; P0447
- Polyclonal rabbit anti goat Immunglobulins/HRP
Dako Cytomation, Dänemark; P0449
- Polyclonal goat anti rabbit Immunglobulins/HRP
Dako Cytomation, Dänemark; P0448
- Donkey anti goat Immunglobulins/HRP
Santa Cruz Biotechnology, USA; sc-2020

Proteine

- Normal goat serum
Santa Cruz Biotechnology, USA; sc-2043

Weitere Materialien und Lösungen für die Western Blots

- SB 216763 als 10 nM Lösung in DMSO gelöst
Sigma Aldrich, USA; Kat. Nr. S3442-5MG
- Ponceau S-Lösung (Stocklösung)

2g	Ponceau S
30g	Trichloressigsäure
30g	Sulfosalicylsäure

mit ddH₂O auf 100 ml auffüllen. Zum Gebrauch 1T Stocklösung mit 3T ddH₂O verdünnen.

- Blocking Lösung I
5% Milchpulver und 10% Roti-Block[®] in PBS lösen. Lösung mischen und filtrieren.
- Blocking Lösung II
5% Milchpulver in PBS lösen. Lösung mischen und filtrieren.

- NuPAGE[®] Sample Reducing Agent (10X)
Invitrogen, USA; NP0004
- NuPAGE[®] LDS Sample Buffer (4X)
Invitrogen, USA; NP0007
- NuPAGE[®] Antioxidant
Invitrogen, USA; NP0005
- NuPAGE[®] MES SDS Running Buffer (20X)
Invitrogen, USA; NP0002
- NuPAGE[®] Transfer Buffer (20X)
Invitrogen, USA; NP0006
- NuPAGE[®] 4-12% Bis-Tris-Gel
Invitrogen, USA; NP0321
- NuPAGE[®] Nitrocellulose Membran
Invitrogen, USA; LC2000
- SeeBlue[®] Plus 2 Prestained Standard (1X)
Invitrogen, USA; LC5925
- ECL Western Blotting detection reagents 1+2
Amersham Biosciences, UK; Lot 150
- Dithiothreitol (DTT)
Sigma Aldrich, Deutschland
- Complete[®] Tabletten
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.7.2. Herstellung der Zelllysate

Blutproben von B-CLL-Patienten wurden laut Ficoll-Protokoll (s.o.) bearbeitet und eine Zellsuspension von 1×10^7 Z/ml hergestellt. Die Zellen wurden mit $5 \mu\text{M}$ des GSK-3 β -Inhibitor SB 216763 für 24 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit jeweils 5 oder $10 \mu\text{M}$ PKF 115-884- bzw. CGP 049090-Lösung versetzt. Zur Kontrolle dienten DMSO in den entsprechenden Konzentrationen sowie zusätzlich die Zellen, die nur mit SB 216763 behandelt worden waren. Erneut wurde für 24 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubation wurden die jeweiligen Zellsuspensionen in einer Zentrifuge auf höchster Umdrehung pelletiert und der Überstand danach abdekantiert. Das Zellpellet wurden mit $200 \mu\text{l}$ kalten Triton X-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Das Triton X-Puffer enthielt $1 \mu\text{l/ml}$ DDT als reduzierendes Agens sowie eine Complete® Tablette als Protease-Inhibitor. Die resuspendierten Zellen wurden auf Eis gelagert und 3×40 sec mit Ultraschall bearbeitet. Danach wurde die Zellsuspension in einer Tischzentrifuge bei 4°C für 15 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, während die weißlichen Zellrückstände verworfen wurden. Die dekantierte Lösung enthielt das Protein-Zelllysate.

2.7.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können denaturierte Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dabei wandern die denaturierten, durch SDS negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld zum Pluspol. Anfangs werden sie in einem Sammelgel fokussiert und anschließend in einem Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch Molekulargewichtsstandards kann die Größe der Proteine bestimmt werden.

Die Elektrophorese wurde mit NuPAGE® 4-12% Bis-Tris-Fertiggelen in einer Elektrophoresekammer (Invitrogen) für ca. 35min bei 200V durchgeführt. Als Laufpuffer wurde NuPAGE® MES SDS Running Buffer verwendet.

2.7.4. Western Blot

Beim Western Blot werden die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Membran transferiert, auf der sie indirekt detektiert werden können. Durch die Bindung spezifischer primärer Antikörper an den Proteinen auf der Membran können Peroxidase-konjugierte sekundäre Antikörper angelagert werden. Durch die Peroxidase wird ein Chemilumineszenzreagenz umgesetzt, welches einen Film belichten kann, der nach dem Entwickeln die Proteinbanden sichtbar macht.

Hierzu wurde das Gel auf eine Nitrocellulose Membran gelegt und beides von mit Transfer-Puffer durchtränkten Schwämmchen eingedeckt. Dieses „Sandwich“ wurde in ein Western Blot Modul (Invitrogen) eingelegt und 1 h lang bei 30 V geblottet.

Um zu testen, ob der Western Blot erfolgreich war, wurde die Nitrocellulose-Membran mit Ponceau S-Lösung gefärbt. Diese Lösung lässt Proteine rot erscheinen.

2.7.5. Immunoblot

Der Immunoblot dient zum Nachweis spezifischer Proteine auf der Nitrocellulose-Membran.

Hierzu wurde die Nitrocellulose-Membran über Nacht bei 4°C in Blocking Lösung I inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Anschließend wurde der Primärantikörper im geeigneten Verhältnis mit der Blocking Lösung I gemischt und die Membran wieder über Nacht bei 4°C in der Antikörper-Lösung inkubiert. Nach Beendigung wurde die Membran viermal je 10 min mit PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper, der im entsprechenden Verhältnis zu der Blocking Lösung II gegeben wurde, erfolgte nun für 1 h bei Raumtemperatur. Danach wurde erneut die Membran viermal 10 min in PBS gewaschen.

Zur Aktivierung wurde die Membran schließlich mit ECL-Lösung versetzt und auf einen Film gelegt. Abhängig von den Proteinen wurden die Filme 1 min bis

zu mehreren Stunden lang auf der Membran exponiert. Die belichteten Filme wurden dann in einem automatischen Entwickler (Kodak) entwickelt.

Verdünnungen der Primärantikörper

• Purified mouse anti β -catenin Mab	1:500
• Purified mouse anti human cyclin D1	4 μ l/ml
• Purified mouse anti Actin Ab5 Mab	1:3000
• Purified mouse anti human Bcl-2	1:1500
• Purified mouse anti cleaved PARP (Asp-214) Mab	0,25 μ l/ml
• c-Myc (N-262) rabbit polyclonal IgG	1:200
• LEF1 (C-19) goat polyclonal IgG	1:200
• Survivin goat polyclonal IgG	1:200
• RD affinity purified rabbit anti human survivin Ab	0,5 μ l/ml

Verdünnungen der Sekundärantikörper

• Polyclonal goat anti mouse Immunglobulins/HRP	1:1000
• Polyclonal rabbit anti goat Immunglobulins/HRP	1:200
• Polyclonal goat anti rabbit Immunglobulins/HRP	1:2000
• Donkey anti goat Immunglobulins/HRP	1:1000

2.8. Statistische Auswertung

2.8.1. Computer Hard- und Software

Die Datenberechnung und Auswertung erfolgte rechnerunterstützt unter der Verwendung der Software MS Office Excel® (Microsoft Corp.) sowie GraphPad Prism 4® (GraphPad Software Inc.).

Des Weiteren stand zur Auswertung des DiSC-Assays das Leuk-Programm zur Verfügung. Dabei handelt es sich um eine MS-DOS programmierte Spezialsoftware, welche in der Arbeitsgruppe Dr. Schinköthe (Uni Köln) entwickelt wurde.

2.8.2. Mathematische Tests

3.8.2.1. Auswertung des DiSC-Assays

Berechnung des Zellüberlebens

Das CS gibt Auskunft darüber, wie viele Zellen in vitro bei Inkubation eines bestimmten Wirkstoffs (z.B. Zytostatikum, small molecule-Inhibitor) im Verhältnis zur Inkubation im Kontrollmedium überlebt haben.

Zur Ermittlung des Zellüberlebens (CS) musste zuerst für jede inkubierte Probe der Quotient q errechnet werden. Dieser gibt das Verhältnis der vitalen Zellen (VZ) zu den gleichzeitig gezählten Entenerythrozyten an.

$$\text{Quotient } Q = \frac{VC}{DRBC}$$

Aus den Kontrollansätzen (Proben mit DMSO inkubiert) $q_{\text{Kontrolle}} = q_{\text{DMSO}}$ muss der Mittelwert errechnet werden. Das CS ergibt sich dann wie folgt:

$$CS = \frac{q_{\text{small molecule-Inhibitor}} \times 100}{q_{\text{DMSO}}} \%$$

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchungen zur zeit- und konzentrationsabhängigen Induktion des Zelltodes durch CGP 049090 und PKF 115-584

3.1.1 Zeitabhängige Induktion des Zelltodes

Um die Zeit zu ermitteln, die CGP 049090 bzw. PKF 115-584 brauchen effektiv auf B-CLL-Zellen zu wirken, wurden B-CLL-Zellen mit dem jeweiligen small molecule-Inhibitor versetzt und 30 min, 24 h, 48 h sowie 72 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Zellüberleben mittels des ATP-Assays bestimmt und anhand GraphPad Prism4® ausgewertet.

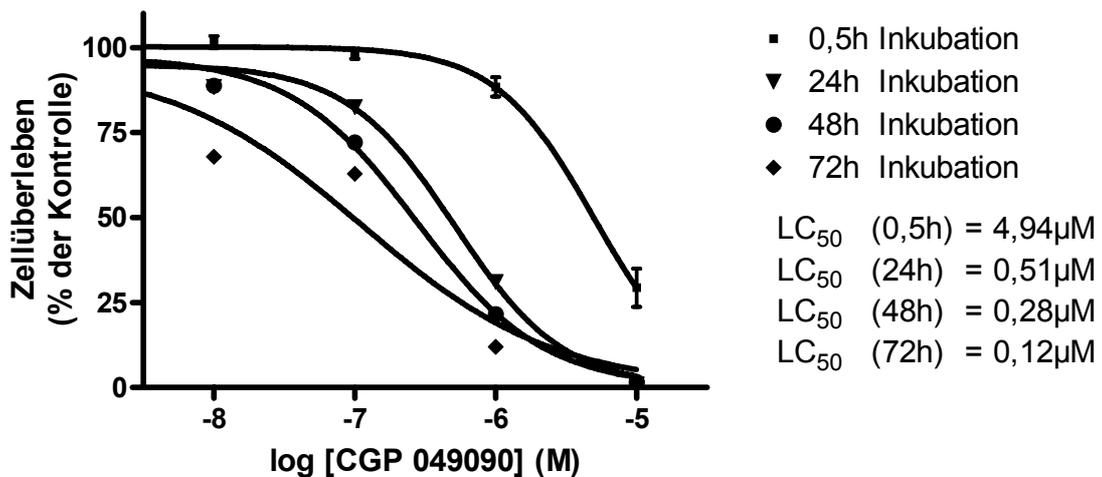


Abbildung 7: Konzentrationsabhängiges relatives Zellüberleben nach Inkubation mit CCG 049090

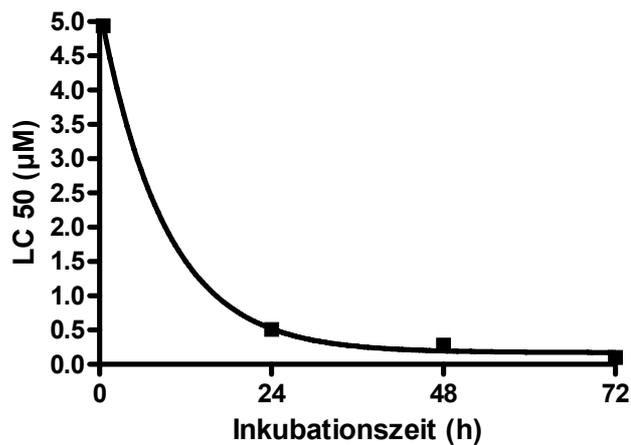


Abbildung 8: Darstellung der LC₅₀-Werte von CGP 049090 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

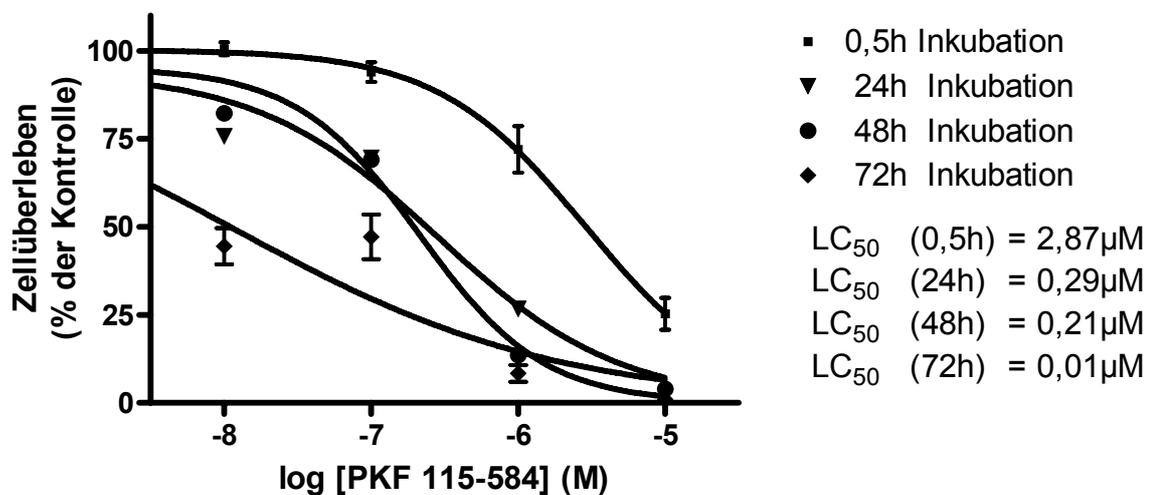


Abbildung 9: Konzentrationsabhängiges relatives Zellüberleben nach Inkubation mit PKF 115-584

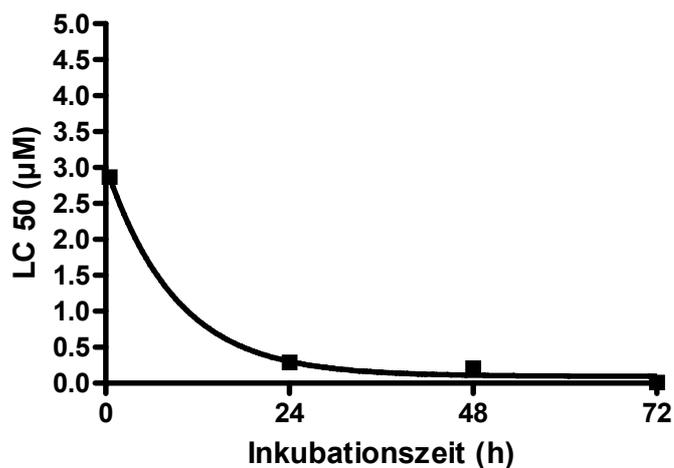


Abbildung 10: Darstellung der LC₅₀-Werte von PKF 115-584 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Ein deutlicher Unterschied lag zwischen den LC₅₀-Werten nach 0,5 h und 24 h Inkubationszeit. Jedoch waren die LC₅₀-Werte nach Inkubationszeiten von 24 h, 48 h und 72 h so ähnlich, dass eine längere Inkubation als 24 h keinen wesentlichen Vorteil mehr brachte.

Bei der Inkubation mit CGP 049090 lag der LC₅₀-Wert nach 30 min bei 4,94 µM, während sie danach alle Werte unter 0,5 µM annahm (0,51 µM nach 24 h, 0,28 µM nach 48 h, 0,10 µM nach 72 h). Wie man den Abbildungen 9 und 10 entnehmen kann, sahen die Versuchsergebnisse nach Inkubation mit PKF 115-584 ähnlich aus. Nach 30 min war der LC₅₀-Wert mit 2,87 µM noch recht hoch, erreichte aber nach 24 h schon einen Wert von 0,29 µM. Sowohl nach 48 h als auch nach 72 h befanden sich die LC₅₀-Werte mit 0,21 µM und 0,01 µM noch in vergleichbaren Bereichen.

Diese Versuchsergebnisse zeigen, dass die Induktion des Zelltodes nach 24 h schon fast vollständig abgeschlossen ist. Deshalb wurde fortan die dosisabhängige Induktion jeweils nur bei einer 24 h Inkubation untersucht.

3.1.2. Konzentrationsabhängige Induktion des Zelltodes

3.1.2.1. Messung mit dem ATP-Assay

- **Messung mit 4 unterschiedlichen Konzentrationen**

B-CLL-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen – 10 μM , 1 μM , 0,1 μM und 0,01 μM - von PKF 115-584 und CGP 049090 versetzt und 24 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Das Zellüberleben wurde mit Hilfe des ATP-Assays gemessen.

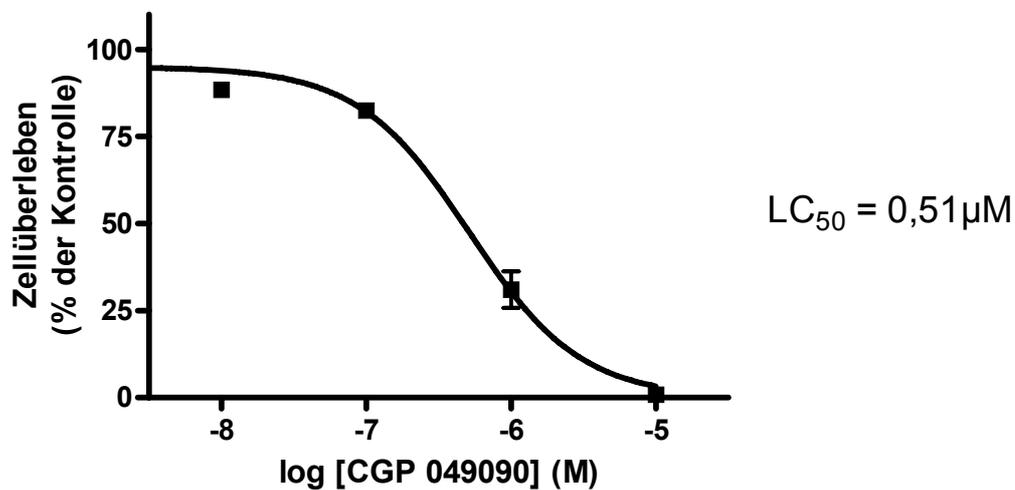


Abbildung 11: Darstellung des B-CLL-Zellüberlebens in Abhängigkeit von der CGP 049090-Konzentration nach 24 h Inkubationszeit

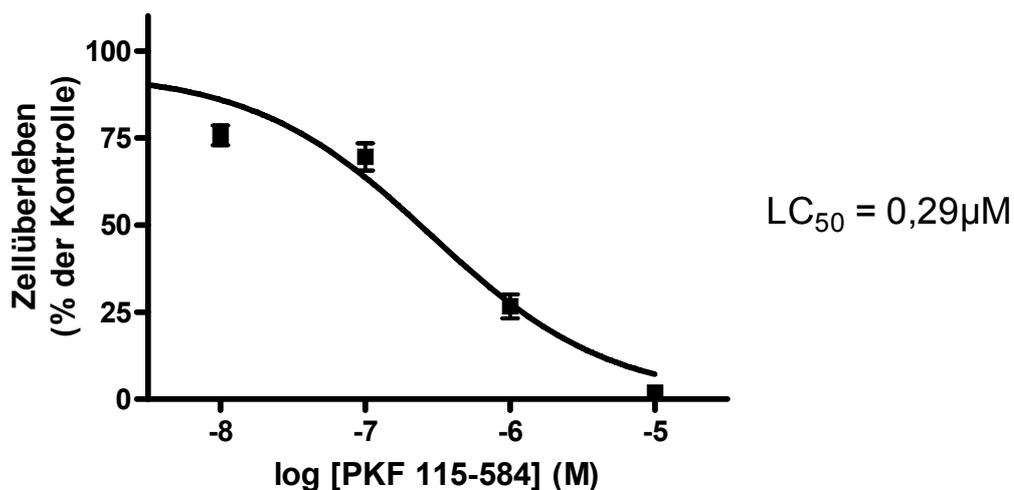


Abbildung 12: Darstellung des B-CLL-Zellüberlebens in Abhängigkeit von der PKF 115-584-Konzentration nach 24 h Inkubationszeit

Zur Messung der Toxizität wurde der gleiche Versuch nach identischem Schema wiederholt; es wurde jedoch statt mit B-CLL-Zellen mit mononukleären Zellen von gesunden Probanden gearbeitet.

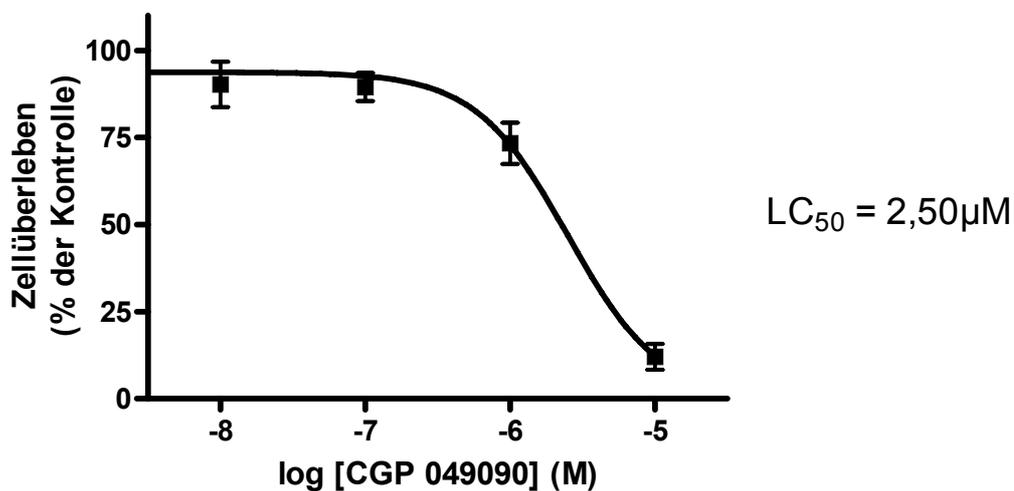


Abbildung 13: Darstellung des Zellüberlebens von gesunden Lymphozyten in Abhängigkeit von der CGP 049090-Konzentration nach 24 h Inkubationszeit (Gesundkontrolle)

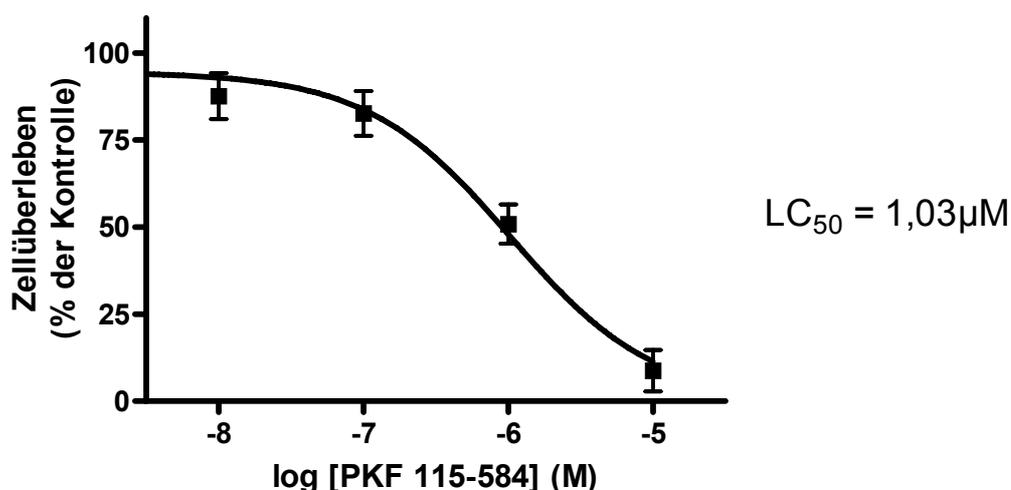


Abbildung 14: Darstellung des Zellüberlebens von gesunden Lymphozyten in Abhängigkeit von der PKF 115-584-Konzentration nach 24 h Inkubationszeit (Gesundkontrolle)

Wie in Abbildung 11 und 12 zu erkennen, üben die Inhibitoren CGP 049090 und PKF 115-584 in etwa gleichstarker Weise zytotoxische Effekte auf B-CLL-Zellen mit LC₅₀-Werten von 0,51 µM und 0,29 µM aus. Die Toxizität im Vergleich zu gesundem Blut ist jedoch bei beiden Inhibitoren auch recht hoch (siehe Abbildung 13 und 14), hier werden LC₅₀-Werte von 2,50 µM für CGP 049090 und 1,03 µM für PKF 115-584 erreicht.

○ Messung mit 12 unterschiedlichen Konzentrationen

Um die letale Konzentration genauer bestimmen zu können, wurden zusätzliche Messpunkte gewählt, besonders im Bereich um der vermuteten LC₅₀-Werte herum. Dazu wurden erneut B-CLL-Zellen mit den jeweiligen small molecule-Inhibitoren versetzt, nun in den Verdünnungsstufen 100 µM, 10 µM, 6 µM, 3 µM, 1 µM, 0,75 µM, 0,5 µM, 0,25 µM, 0,1 µM, 0,06 µM, 0,03 µM, 0,01 µM. Der restliche Versuchsablauf war identisch.

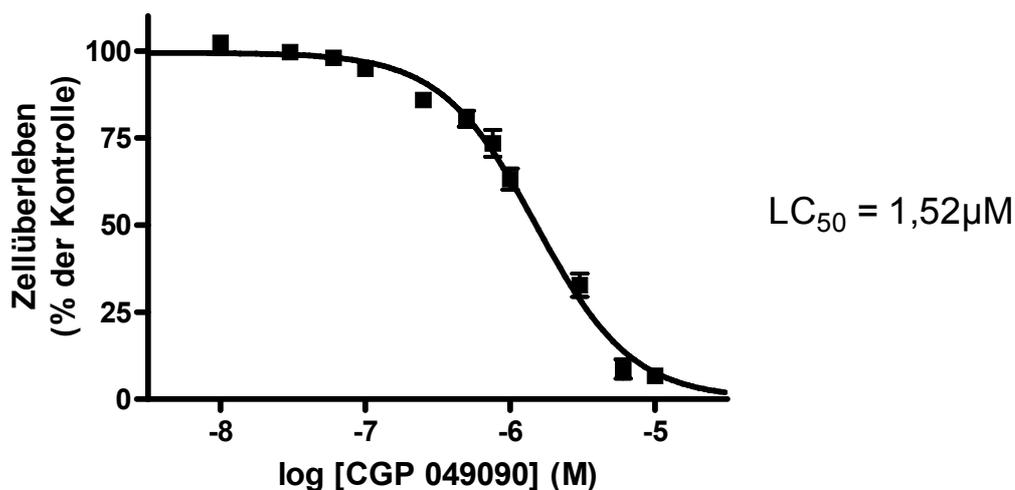


Abbildung 15: Darstellung des Zellüberlebens von B-CLL-Zellen in Abhängigkeit von der CGP 049090-Konzentration nach 24 h Inkubationszeit

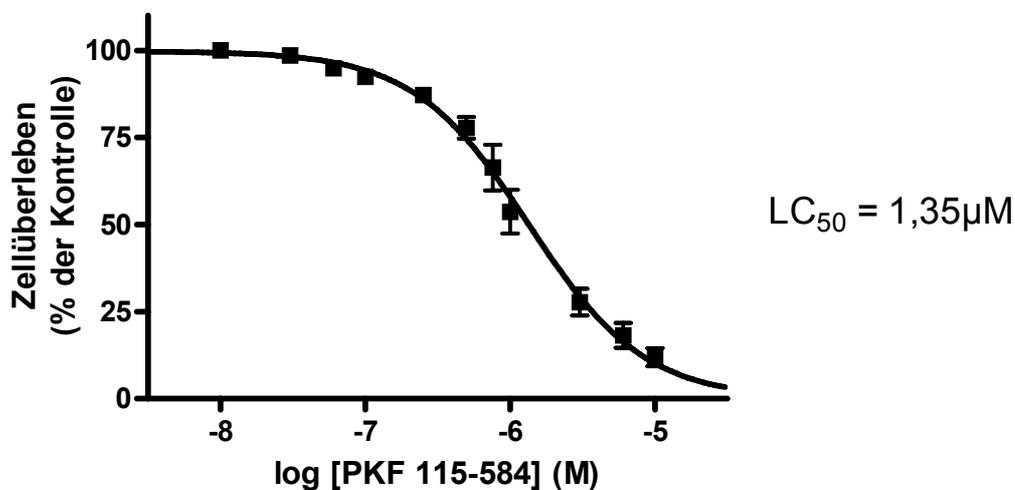


Abbildung 16: Darstellung des Zellüberlebens von B-CLL-Zellen in Abhängigkeit von der PKF 115-584-Konzentration nach 24 h Inkubationszeit

Ebenfalls wurde hier ein Vergleich mit gesundem Blut durchgeführt.

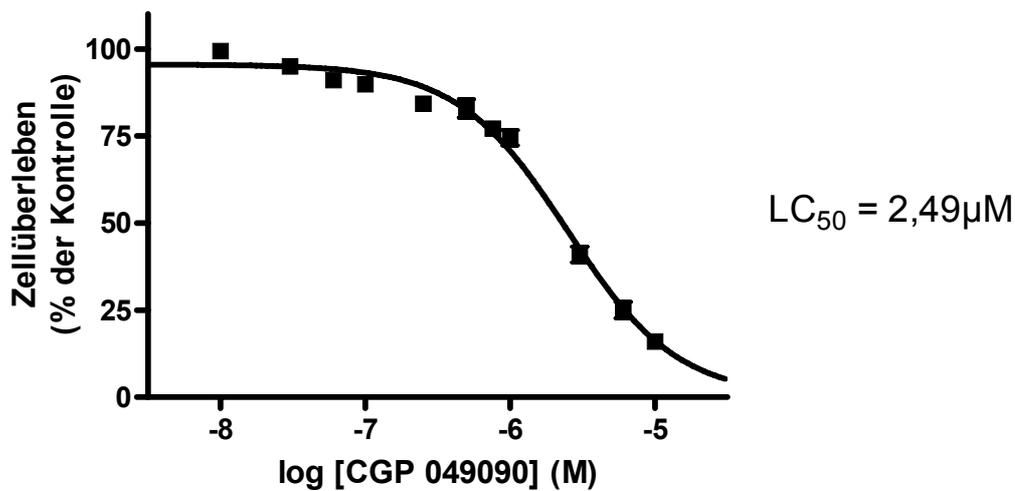


Abbildung 17: Darstellung des Zellüberlebens von gesunden Lymphozyten in Abhängigkeit von der CGP 049090-Konzentration nach 24 h Inkubationszeit (Gesundkontrolle)

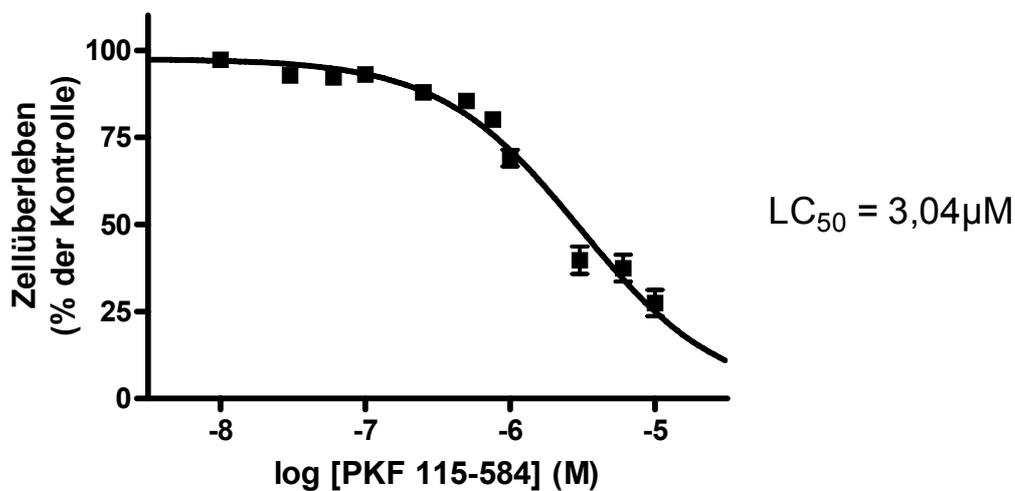


Abbildung 18: Darstellung des Zellüberlebens von gesunden Lymphozyten in Abhängigkeit von der PKF 115-584-Konzentration nach 24 h Inkubationszeit (Gesundkontrolle)

Die letalen Konzentrationen wurden ein wenig nach oben hin korrigiert. Wie man den Abbildungen 15 und 16 entnehmen kann, liegen die LC₅₀-Werte für B-

CLL-Zellen nach der Messung mit erhöhter Anzahl an Messpunkten für CGP 049090 bei 1,52 μM und für PKF 115-584 bei 1,35 μM .

Ebenfalls haben die LC_{50} -Werte der Gesundheitskontrollen höhere Werte angenommen, für CGP 049090 bedeutet dieses einen LC_{50} -Wert von 2,49 μM und für PKF 115-584 ein Wert von 3,04 μM .

Die LC_{50} -Werte der Gesundheitskontrolle ähnelten in beiden Versuchsreihen sehr den Werten der B-CLL-Proben. Jedoch ist aus bisherigen Studien (Lepourcelet M et al, 2004) die hohe Selektivität der beiden small molecule-Inhibitoren CGP 049090 und PKF 115-584 bekannt, welche mit unseren Versuchsergebnissen nicht übereinstimmte. Daraus schlussfolgerten wir, dass man mit dem ATP-Cell Viability-Assay® primäre B-CLL-Zellen und gesunde Lymphozyten nicht vergleichen kann. B-CLL-Zellen besitzen eingeschränkte Zellfunktionen und eine verminderte Proliferationsrate. Demnach liegt auch ein viel geringerer Grund-ATP-Level vor, als dies bei gesunden Zellen der Fall ist.

Um im Folgenden die Wirkung der small molecule-Inhibitoren auf B-CLL-Zellen bzw. Gesundblut unterscheiden zu können, wurde als Test zur Überlebensrate der DiSC-Assay benutzt. Hier dienen Entenerythrozyten als interner Standard, über die der relative Anteil der lebenden Zellen errechnet werden kann.

3.1.2.2. Messung mit dem DiSC-Assay

B-CLL-Zellen wurden mit Verdünnungsreihen der beiden Inhibitoren versetzt. Die Konzentrationen betragen 10 μM , 1 μM , 0,5 μM , 0,1 μM und 0,01 μM CGP 049090 bzw. PKF 115-584. Anschließend wurde der Ansatz 24 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und anschließend anhand des DiSC-Assays das Zellüberleben ermittelt.

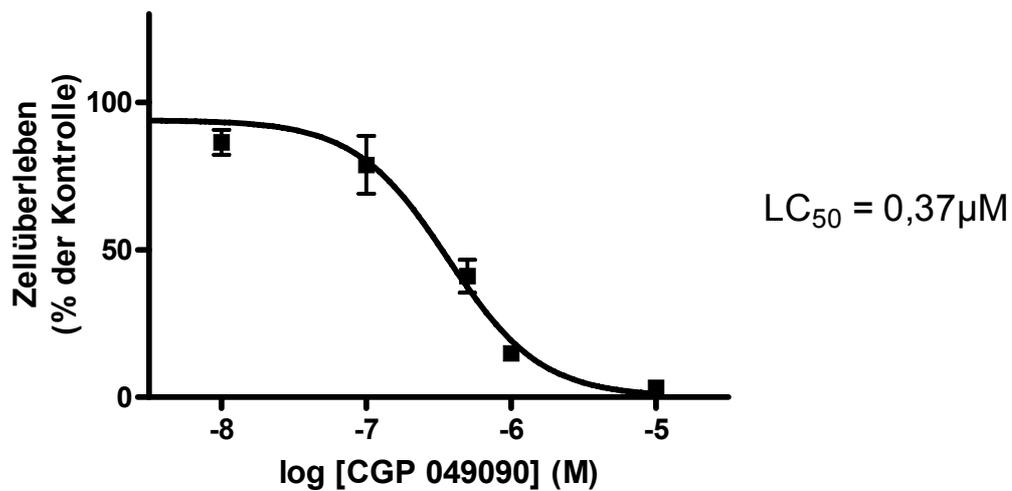


Abbildung 19: Darstellung des Zellüberlebens von B-CLL-Zellen in Abhängigkeit von der CGP 049090-Konzentration nach 24 h Inkubationszeit

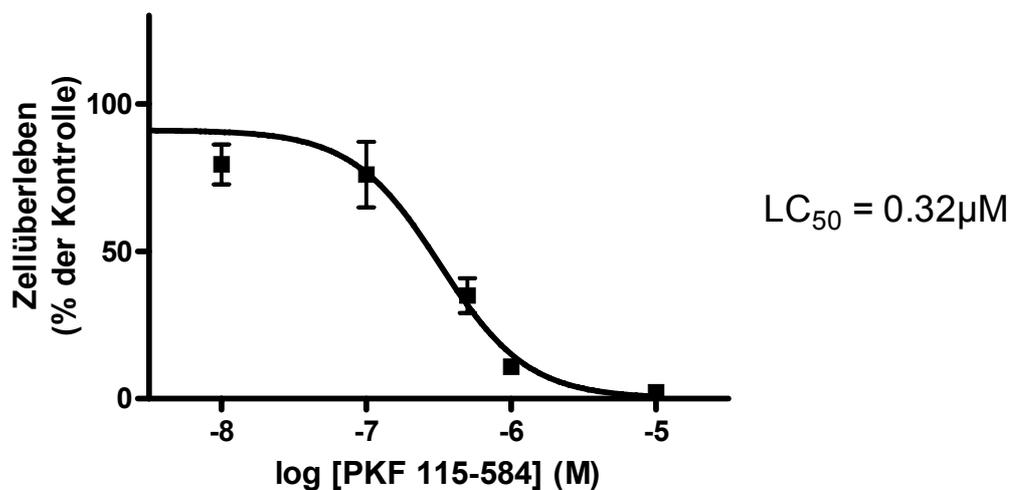


Abbildung 20: Darstellung des Zellüberlebens von B-CLL-Zellen in Abhängigkeit von der PKF 115-584-Konzentration nach 24 h Inkubationszeit

Zur Kontrolle wurde der DiSC-Assay unter gleichen Bedingungen mit Blut von gesunden Probanden durchgeführt.

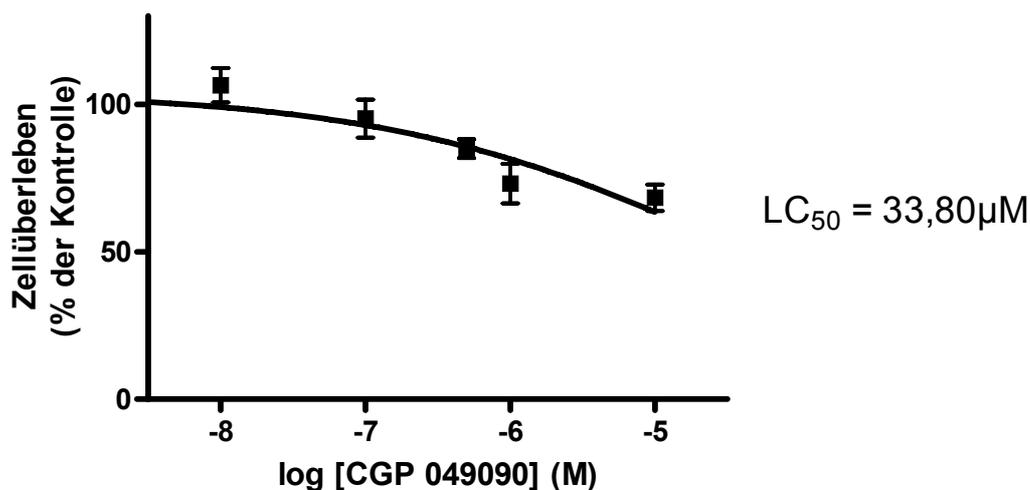


Abbildung 21: Darstellung des Zellüberlebens von gesunden Lymphozyten in Abhängigkeit von der CGP 049090-Konzentration nach 24 h Inkubationszeit (Gesundkontrolle)

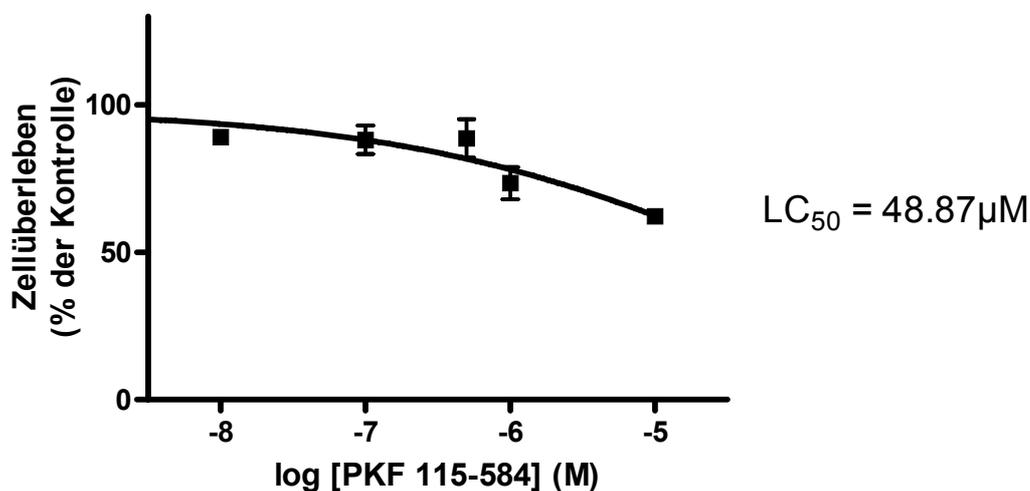


Abbildung 22: Darstellung des Zellüberlebens von gesunden Lymphozyten in Abhängigkeit von der PKF 115-584-Konzentration nach 24 h Inkubationszeit (Gesundkontrolle)

Wie man den Abbildungen 19 und 20 entnehmen kann, haben die Inhibitoren auf B-CLL-Zellen einen gleichen dosisabhängigen Effekt mit LC_{50} -Werten für CGP 049090 von $0,37 \mu\text{M}$ und für PKF 115-584 von $0,32 \mu\text{M}$. Zudem zeigen beide Inhibitoren nur eine geringe Zytotoxizität auf normale mononukleäre Blutzellen (siehe Abbildung 21 und 22), hier liegen die LC_{50} -Werte für CGP 049090 bei $33,80 \mu\text{M}$ und für PFK 115-584 bei $48,87 \mu\text{M}$. Dies sind jedoch nur theoretische Werte, da exakte LC_{50} -Werte nicht gemessen werden konnten. Bei der höchsten Konzentration – $10 \mu\text{M}$ –, die unter Versuchsbedingungen vorlag, trat kein 100%iger Zelltod ein.

Diese Ergebnisse bestätigen die bereits von anderen Arbeitsgruppen geäußerte Vermutung einer eingeschränkten Toxizität der Inhibitoren auf normale hämatopoetische Zellen. Diese Feststellung ist sehr entscheidend für die weitere Entwicklung der Inhibitoren als erfolgreiche Krebsmedikamente, um sich gegenüber den schweren Nebenwirkungen von Zytostatika durch ihre selektive Wirkweise und somit ihrem sehr eingeschränkten Nebenwirkungspotential einen Vorteil zu schaffen.

3.2. Induktion der Apoptose durch CGP 049090 und PKF 115-584

3.2.1. Untersuchungen zur Caspase 3/7-Induktion

Um genauer untersuchen zu können, wie der beobachtete Zelltod eingeleitet wurde und stattgefunden hat, wurde der Effekt der beiden Inhibitoren auf die Apoptose Induktion in B-CLL-Zellen untersucht.

B-CLL-Zellen wurden mit $10 \mu\text{M}$ CGP 049090 bzw. PKF 115-584 versetzt und unterschiedlich lange inkubiert. Zur Kontrolle diente 0,2% DMSO. Um die genaue Zeit der Apoptose-Induktion zu erfassen, wurde nach 2, 4, 6 und 8 Stunden die Caspase 3/7-Aktivität gemessen. Es wurde Probenmaterial von 3 unterschiedlichen B-CLL-Patienten verwendet.

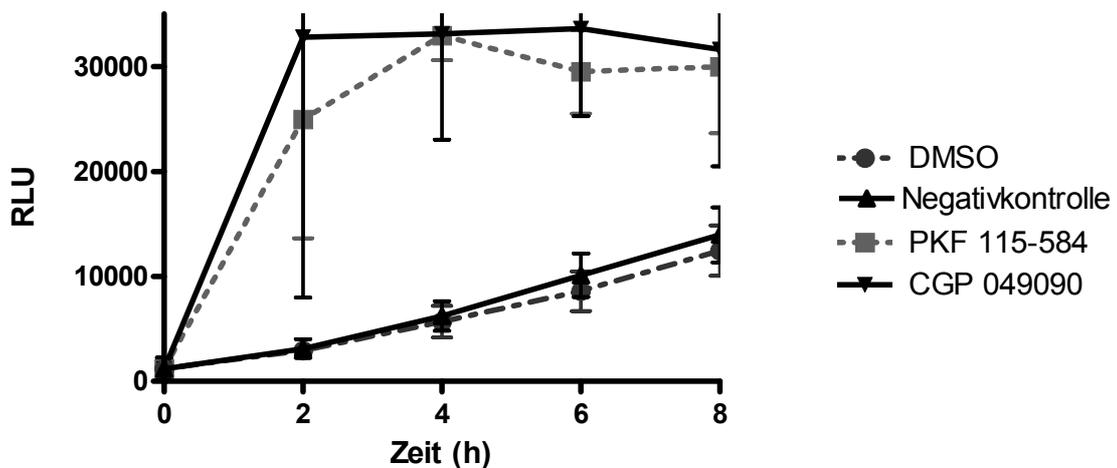


Abbildung 23: Zeitabhängiger Verlauf der Caspase 3/7 Aktivität in primären B-CLL-Zellen nach Inkubation mit 10 µM PKF 115-584 oder CGP 049090

Beide Inhibitoren zeigten einen signifikanten Anstieg der Caspase 3- und Caspase 7-Aktivität im Vergleich zu der DMSO- und Negativkontrolle. Obwohl jeder pro B-CLL-Patient stattgefundenen Versuchsdurchgang eine eigene Kinetik zeigte, worauf die relativ großen Standardabweichungen herzuführen waren, konnte zusammenfassend in Abbildung 23 gezeigt werden, dass die Caspase-Level nach Inhibitoren-Inkubation sehr schnell anstiegen, nach 8 h schon ihren Höhepunkt erreicht hatten und danach die Level wieder sanken.

3.2.2. Untersuchung zur Induktion der Spaltung von PARP

Um einen weiteren Beweis für die apoptotische Wirkweise der small molecule-Inhibitoren zu erlangen, wurde die Expression des 85 kDa großen PARP-Fragmentes untersucht.

PARP (Poly-ADP-Ribose-polymerase 1) ist ein 116 kDa großes Kern-Enzym. Es katalysiert den Transfer der ADP-Ribose-Einheiten von NAD⁺ zu einer Vielzahl von Kernproteinen wie z.B. Topoisomerase, Histone und PARP selbst. Eine erhöhte katalytische Aktivität von PARP liegt in Zellen vor, deren DNA zer-

stört wurde. PARP ist ein Ziel der durch Apoptose hervorgerufenen Caspase-Aktivität.

Während der Apoptose wird das intakte PARP Enzym (116 kDa) in zwei 85 kDa und 25 kDa große Fragmente zerschnitten. Dieser Prozess trennt die N-terminale DNA-Bindungsdomäne des Enzyms von der C-ständigen katalytischen Domäne, was zum Verlust der PARP-Funktionen führt. Obwohl die Rolle des PARPs im Zusammenhang mit Apoptose noch nicht genau geklärt werden konnte, wird das Zerschneiden von PARP als ein Zeichen der Apoptose angesehen.

B-CLL-Zellen wurden mit 10 μ M CGP 049090 bzw. PKF 115-584 versetzt und für 6 h sowie 24 h inkubiert. Nach durchgeführter Zellyse wurden die Proteine auf ein Gel aufgetragen, eine Elektrophorese gestartet und anschließend ein Western Blot und Immunoblot durchgeführt, um die Proteinbanden detektieren zu können.

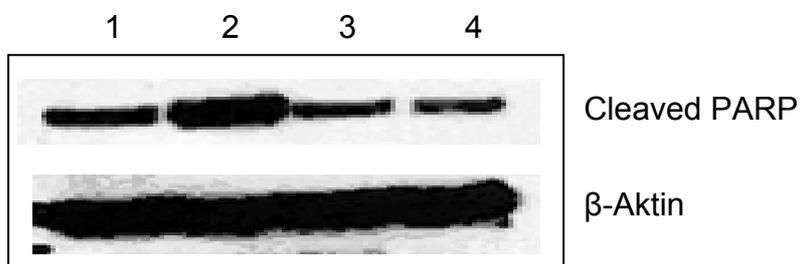


Abbildung 24: Expression des PARP-Fragmentes in primären B-CLL-Zellen nach 6-stündiger Inkubationszeit mit PKF 115-584 oder CGP 049090

1: PKF 115-584 10 μ M, 2: CGP 049090 10 μ M, 3: DMSO 0,2%, 4: unbehandelte Kontrolle

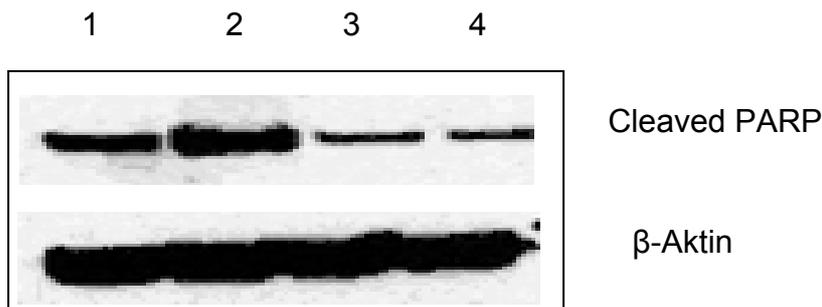


Abbildung 25: Expression des PARP-Fragmentes in primären B-CLL-Zellen nach 24-stündiger Inkubationszeit mit PKF 115-584 oder CGP 049090

1: PKF 115-584 10 μM, 2: CGP 049090 10 μM, 3: DMSO 0,2%, 4: unbehandelte Kontrolle

Die Ergebnisse (siehe Abbildungen 24 und 25) zeigen einen deutlichen Anstieg des PARP-Fragmentes nach Inkubation mit den Inhibitoren. Dieser Anstieg ist bei CGP 049090 noch stärker zu verzeichnen als bei PKF 115-584. Die beiden Kontrollbanden hingegen sind sehr dünn, hier hat nur wenig spontane Apoptose stattgefunden.

Wie der Auswertung der Caspase-Daten schon zu entnehmen ist, wirken die Inhibitoren sehr schnell. Schon nach 6h lässt sich deutlich erkennen, dass Apoptose stattgefunden hat.

3.2.3. Untersuchungen zur Induktion der DNA-Fragmentierung

Wie bereits herausgefunden wurde, reagieren die beiden Inhibitoren zelltoxisch. Für eine Zelle gibt es zwei Möglichkeiten, in den Zelltod geschickt zu werden: durch Nekrose und – wie in unserem Fall vermutet – durch Apoptose.

Während der Apoptose kommt es zu einer typischen DNA-Fragmentierung. Um die Vermutung der apoptotischen Wirkweise der small molecule-Inhibitoren bestätigen zu können, erwarten wir in diesem Versuch die durch die Apoptose fragmentierte DNA in Form einer Leiter im Agarosegel nachweisen zu können.

Primäre B-CLL-Zellen wurden 24 h mit 5 μ M CGP 049090 bzw. PKF 115-584 behandelt, die DNA extrahiert und auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 1,5h bei 75V durchgeführt.

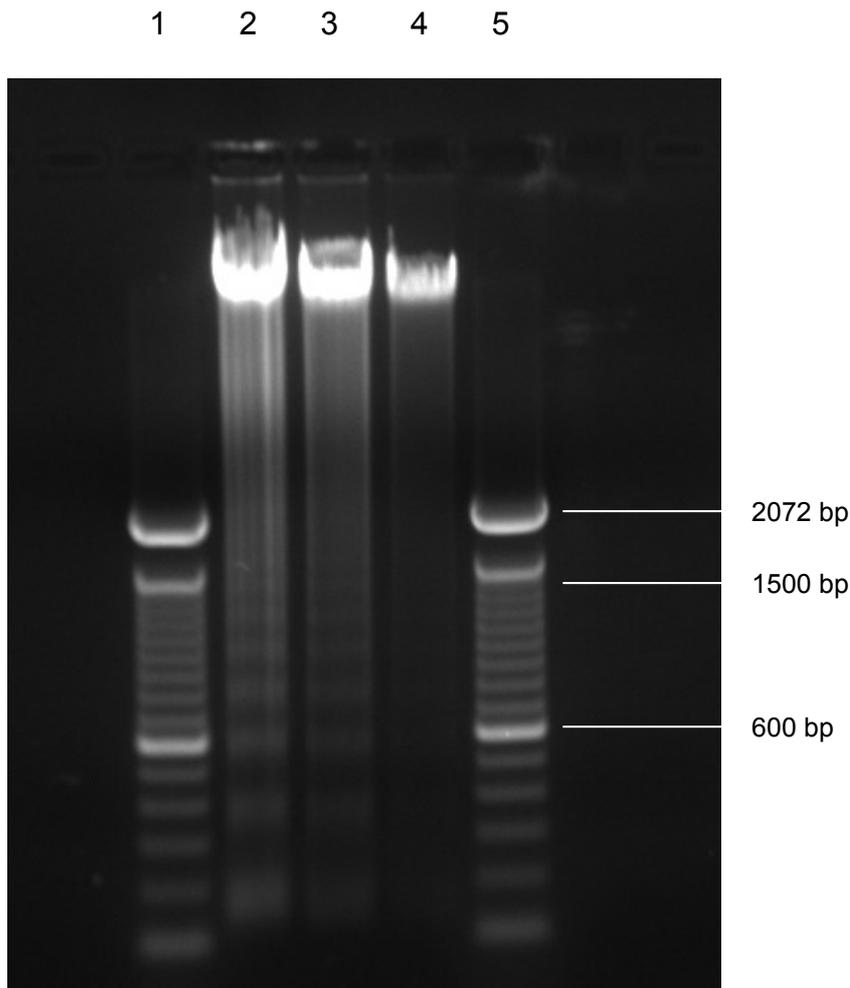


Abbildung 26: DNA-Leiter nach Inkubation mit PKF 115-584 und CGP 049090 in primären B-CLL-Zellen

Bande 1 und 5: DNA-Leiter, Bande 2: PKF 115-584 5 μ M, Bande 3: CGP 049090 5 μ M, Bande 4: DMSO 0,1%

3.3. Untersuchungen zur Veränderung des Expressionsverhalten von CTNNB1 und LEF1 durch CGP 049090 und PKF 115-584

3.3.1 Expression von CTNNB1 nach Induktion der B-CLL-Zellen mit dem GSK-3 β -Inhibitor SB 216763

CGP 049090 und PKF 115-584 inhibieren den CTNNB1/LEF1-Komplex. Wir wollten untersuchen, ob aus diesem Grund auch die nachfolgende Expression der LEF1-Zielproteine SURV, C-MYC und CCND1 in primären B-CLL-Zellen reduziert wird. Dies testeten wir wie in 2.7. beschrieben per Immunoblotting. Doch die Blots zeigten nur sehr schwache Banden, so dass die Daten vermuten ließen, dass die in Kultur genommenen primären B-CLL-Zellen den WNT-Signalweg ausschalteten.

Deshalb behandelten wir zuerst die B-CLL-Zellen mit dem GSK-3 β -Inhibitor SB 216763 für 24 h in einer Konzentration von 5 μ M.

CTNNB1 wird durch GSK-3 β phosphoryliert und so für den Abbau durch Ubiquitin markiert. Durch die Inhibition des GSK-3 β steigt die Konzentration von unphosphoryliertem CTNNB1 im Zytoplasma, es diffundiert in den Nukleus und kann dort den TCF/LEF1-Komplex aktivieren. Dies hat die Transkription der LEF1-Zielgene zur Folge. Zudem verbessert die Inkubation von B-CLL-Zellen mit dem GSK-3 β -Inhibitor bis zu einer Konzentration von 7 μ M das Überleben der Zellkultur [Lu et al., 2004].

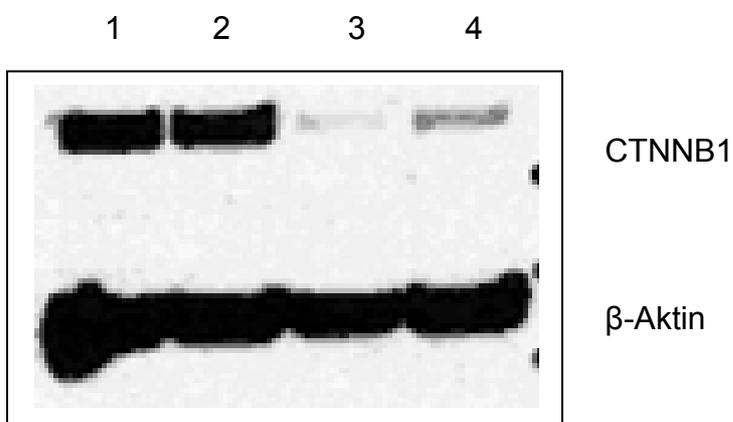


Abbildung 27: Expression von CTNNB1 in primären B-CLL-Zellen nach Inkubation mit SB 216763

1: SB 216763 5 μ M, 2: SB 216763 5 μ M + 0,01 mM ATP, 3: DMSO 0,1%, 4: unbehandelte Kontrolle

Man kann eindeutig erkennen, dass nach einer Inkubation mit dem GSK-3 β -Inhibitor die Menge an unphosphoryliertem CTNNB1 erhöht und somit der WNT-Signalweg wieder aktiviert ist.

3.3.2. Veränderung der Expression von CTNNB1 nach Inkubation mit CGP 049090 und PKF 115-584

Nach der SB 216763-Inkubation über 24 h mit 5 μ M des GSK-3 β -Inhibitors wurden die small molecule-Inhibitoren in Konzentrationen von 5 und 10 μ M zu dem Ansatz gegeben und für weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurde wie in 2.7. beschrieben die Western Blots durchgeführt und Immunoblots angefertigt.

Wie in den Abbildungen 28-30 zu sehen, lagen nach der small molecule-Inhibitor-Inkubation verringerte CTNNB1-Levels vor. Durch die PKF 115-584-Inkubation wurden die CTNNB1-Levels stärker herunterreguliert als durch CGP 049090-Inkubation. Jedoch spielten hier die zwei unterschiedlichen Konzentrationen keine Rolle, sowohl 5 μ M als auch bei 10 μ M waren wirksam.

Die Bande 3 spiegelt die Kontrolle wider; hier wurden die Zellen nur mit dem GSK-3 β -Inhibitor inkubiert. Da dieser den WNT-Signalweg der in Kultur genommenen B-CLL-Zellen wieder anregte, sieht man hier die stärkste Bande. Im Gegensatz dazu lassen sich bei 4 und 5 nur ganz schwach Banden erkennen. Hier wurden die B-CLL-Zellen nur mit DMSO und Medium behandelt, jedoch ohne SB 216763-Zusatz, so dass hier in den Zellen der WNT-Signalweg nicht mehr aktiv war.

Von nun an wurde als Kontrolle immer die SB 216763-Inkubation gewählt.

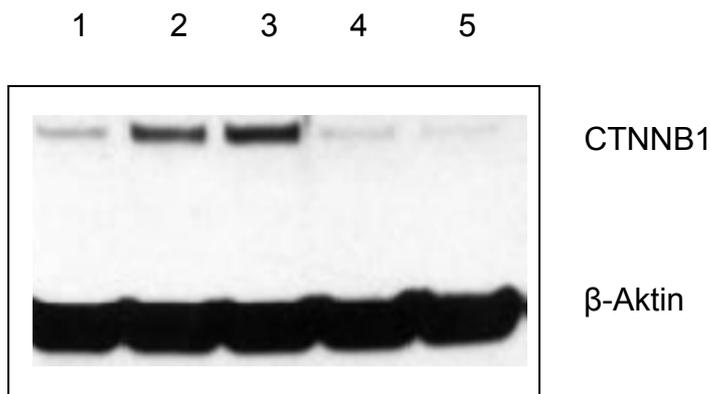


Abbildung 28: Expression von CTNNB1 in primären B-CLL-Zellen nach Inkubation mit 5 μ M PKF 115-584 und CGP 049090

1: SB 216763+ PKF 5 μ M, 2: SB 216763 + CGP 5 μ M, 3: SB 216763, 4: DMSO 0,1%, 5: unbehandelte Kontrolle

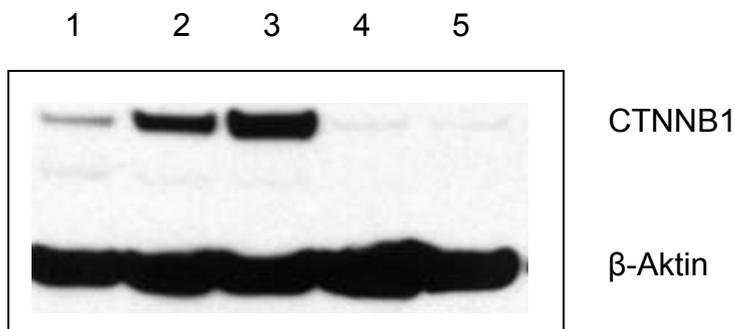


Abbildung 29: Expression von CTNNB1 in primären B-CLL-Zellen nach Inkubation mit 5 μ M PKF 115-584 und CGP 049090

1: SB 216763 + PKF 5 μ M, 2: SB 216763 + CGP 5 μ M, 3: SB 216763, 4: DMSO 0,1%, 5: unbehandelte Kontrolle

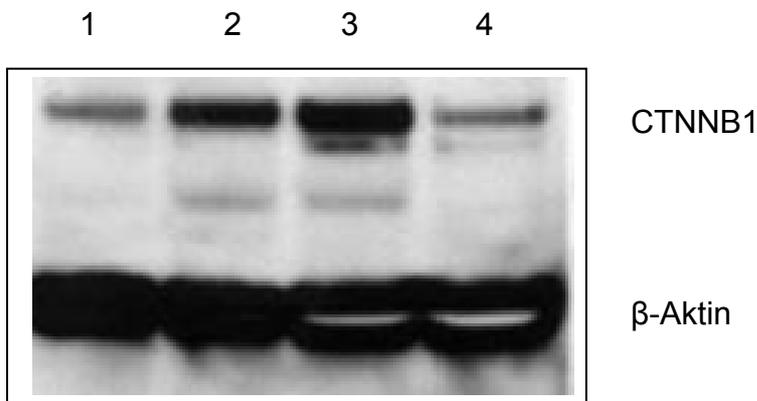


Abbildung 30: Expression von CTNNB1 in primären B-CLL-Zellen nach Inkubation mit 5 µM PKF 115-584 und CGP 049090

1: SB 216763+ PKF 10 µM, 2: SB 216763 + CGP 10 µM, 3: SB 216763, 4: DMSO 0,2%

3.3.3. Veränderung der Expression von LEF1 nach Inkubation mit CGP 049090 und PKF 115-584

Die Expression von LEF1 war geblockt; dies wurde sowohl von CGP 049090 als auch von PKF 115-584 in einer Konzentration von 10 µM verursacht. Jedoch waren alle auf dem Immunoblot erhaltenen Banden relativ schwach; dies ist womöglich ein Hinweis auf eine geringe Proteinmenge in den B-CLL-Zellen.

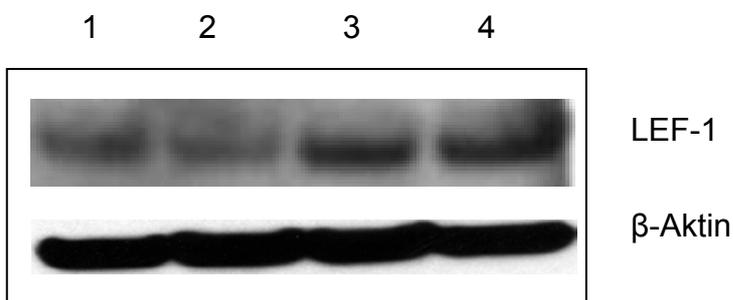


Abbildung 31: Expression von LEF1 in primären B-CLL-Zellen nach Inkubation mit 10 µM PKF 115-584 und CGP 049090

1: SB 216763 + PKF 10 μ M, 2: SB 216763 + CGP 10 μ M, 3: SB 216763, 4: DMSO 0,2%

3.4. Veränderung der Immunexpression der LEF1-Zielproteine nach Inkubation mit CGP 049090 und PKF 115-584

Nach der SB 216763-Inkubation über 24 h mit 5 μ M des GSK-3 β -Inhibitors wurden die small molecule-Inhibitoren in Konzentrationen von 5 und 10 μ M zu dem Ansatz gegeben und für weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurde wie in 2.7. beschrieben die Western Blots durchgeführt und Immunoblots angefertigt.

3.4.1. Veränderung der C-MYC-Expression

Die Expression des TCF/LEF1-Zielgen C-MYC wurde gemindert. Besonders wirksam war der Inhibitor PKF 115-584, der noch stärker die Expression unterdrückte als CGP 049090. Wieder reichte eine Konzentration von 5 μ M der Inhibitoren aus, um einen Effekt sehen zu können.

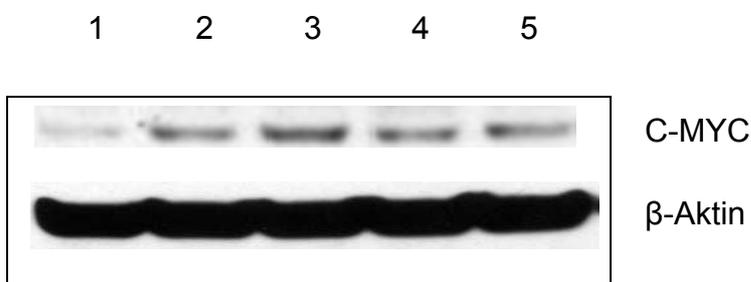


Abbildung 32: Expression von C-MYC in primären B-CLL-Zellen nach Inkubation mit 5 μ M PKF 115-584 und CGP 049090

1: SB 216763 + PKF 5 μ M, 2: SB 216763+ CGP 5 μ M, 3: SB 216763, 4: DMSO 0,1%

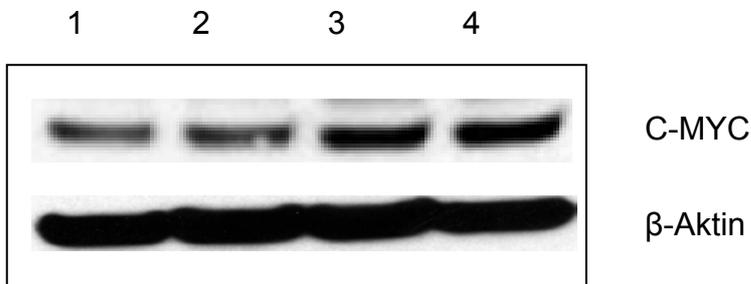


Abbildung 33: Expression von C-MYC in primären B-CLL-Zellen nach Inkubation mit 10 μ M PKF 115-584 und CGP 049090

1: SB 216763 + PKF 10 μ M, 2: SB 216763+ CGP 10 μ M, 3: SB 216763, 4: DMSO 0,2%

3.4.2. Veränderung der CCND1-Expression

Auch die Expression des zweiten Zielgens des TCF/LEF1-Komplexes wurde in der Expression unterdrückt. Erneut ist der stärkere Effekt beim PKF 115-584 zu beobachten. Wieder reichte eine Konzentration von 5 μ M aus, um einen Effekt zu erzielen.

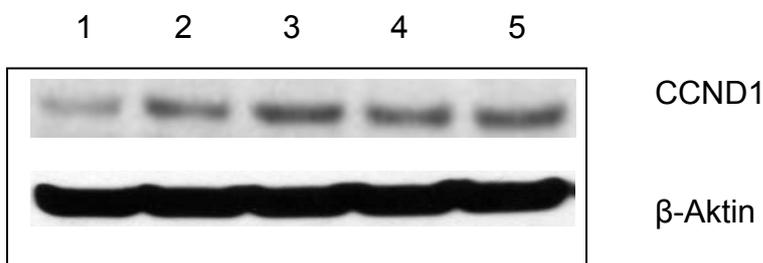


Abbildung 34: Expression von CCND1 in primären B-CLL-Zellen nach Inkubation mit 5 μ M PKF 115-584 und CGP 049090

1: SB 216763 + PKF 5 μ M, 2: SB 216763 + CGP 5 μ M, 3: SB 216763, 4: DMSO 0,1%, 5: unbehandelte Kontrolle

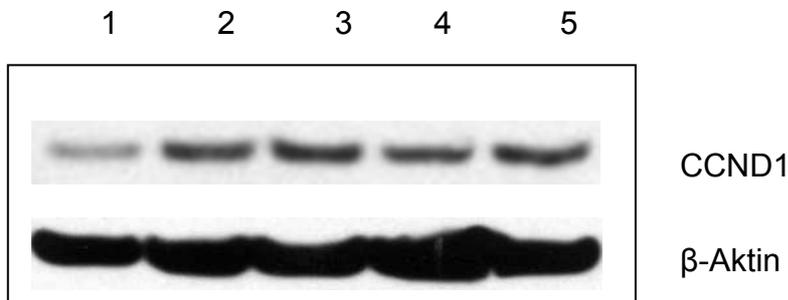


Abbildung 35: Expression von CCND1 in primären B-CLL-Zellen nach Inkubation mit 5 μM PKF 115-584 und CGP 049090

1: SB 216763 + PKF 5 μM, 2: SB 216763 + CGP 5 μM, 3: SB 216763, 4: DMSO 0,1%, 5: unbehandelte Kontrolle

3.4.3. Veränderung der SURV-Expression

Es ist uns nicht gelungen, auf einem Immunoblot die SURV-Expression nachzuweisen, weder in der unbehandelten Kontrolle noch nach Behandlung mit SB 216367- oder nach Inhibitor-Inkubation

Das Protein hat eine Größe von 17 kDa. Jedoch konnten wir Banden in zwei anderen Größenordnungen detektieren. Zum einen lag eine Bande bei 34 kDa; dies könnte auf einen Dimer hinweisen. In anderen Fällen war eine Bande in dem Bereich von ca. 85 kDa zu sehen. Diese Banden stimmten darin überein, dass sie ein schwächeres Erscheinen nach PKF 115-584- und CGP 049090-Inkubation zeigten. Häufig jedoch konnte auch kein einziges Signal detektiert werden, trotz Verwendung von sowohl ECL-Lösung als auch der stärkeren Luminogen-Lösung.

Um einen defekten SURV-Antikörper auszuschließen, wurde vom Santa Cruz-Antikörper auf den RD-Antikörper gewechselt. Dies brachte jedoch keine neuen Erkenntnisse.

Zur Kontrolle der Unversehrtheit der SURV-Antikörper benutzten wir MEC1-Zellen. Hierbei funktionierten beide Antikörper problemlos und gaben ein scharfes Signal bei 17 kDa.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, neue Wege in der B-CLL-Therapie zu finden, die spezifischer in die Pathogenese eingreifen und neue Möglichkeiten zu der bisher vorherrschenden Zytostatikatherapie zu bieten. Hierzu arbeiteten wir mit den beiden small molecule-Inhibitoren PKF 115-584 und CGP 049090.

Ursachen von Tumorerkrankungen sind erworbene und vererbte genetische Mutationen. Diese betreffen Gene, deren Produkte Elemente der physiologischen Regulation des Zellzyklus und Differenzierung sind. Identifiziert wurden zahlreiche dieser Gene zunächst als Bestandteile des Genoms onkogener Retroviren, woher die Bezeichnung „Onkogene“ stammt. Wegweisend für das Verständnis der Mechanismen neoplastischer Transformationsprozesse war die Entdeckung, dass normale Zellen Homologe zu diesen viralen Onkogenen enthalten und dass diese Gene in natürlich vorkommenden humanen Tumoren mutiert sein können. Alle bislang bekannten Onkogene kodieren entweder für Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktor-rezeptoren, Elemente der Signaltransduktion oder für Transkriptionsfaktoren. Folge der Onkogen-Aktivierung ist in den allermeisten Fällen eine unkontrollierte, persistierende Proliferation der Zelle.

Die zelluläre Proliferation wird überwiegend durch extrazelluläre Signale gesteuert, die den Eintritt in die G₀- und G₁-Phase des Zellzyklus determinieren. Exogene Signale leiten aber nicht nur bestimmte Phasen des proliferativen Zellzyklus ein, sondern sie bewirken auch die Induktion der Zellelimination durch den apoptotischen Zelltod. Die homöostatische Balance zwischen Proliferation und Zelltod ist in jedem Organismus durch genetische Mechanismen exakt geregelt. Die mutationsbedingte Fehlsteuerung der Proliferationskontrolle ist die Ursache der Tumorentstehung, vor allem wenn die apoptotische Elimination genomgeschädigter Zellen versagt und dadurch diese mutierten Zellen ungehindert proliferieren können. So stören nahezu alle Onkogenprodukte die normale Regulation der Signalübertragung bzw. deren Genaktivität.

In der zellulären Signaltransduktion laufen schrittweise folgende funktionellen Wirkmechanismen nacheinander ab:

- Erkennung/ Bindung des Signalmoleküls an der Zelloberfläche
- Internalisierung des Signals
- Transmission des Signals durch das Zytoplasma
- Eintritt des Signals in den Zellkern
- Signalbedingte Modulation von Genaktivitäten

Die molekularen Mechanismen der Genregulation sind außerordentlich komplex. So werden beispielsweise bei der mitogenen Aktivierung des G₀/G₁-Überganges ruhender Zellen innerhalb weniger Minuten 80-100 verschiedenen Gene transkriptionell aktiviert. Die dabei synthetisierten Proteine regulieren nachfolgend das genau determinierte intrinsische Programm der Zellzyklusprogression.

Ein zunehmend besseres Verständnis der Prozesse der Signaltransduktion ist die Voraussetzung für weitere Einblicke in die Ursachen der Tumorentstehung und stellt die Basis für die Entwicklung von innovativen molekularen Therapien in der Hämato-Onkologie dar.

Eine Reihe von molekularbiologischen Untersuchungen der letzten Jahre belegte, dass Defekte in der durch Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) vermittelten zellulären Signaltransduktion für die maligne Transformation sowie für die Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps eine ganz entscheidende Rolle spielen. Aus der Kenntnis der kritischen Bedeutung dieser Signaltransduktions-kaskaden bei malignen Erkrankungen leitete sich mit der Entwicklung von innovativen Signaltransduktionsinhibitoren (z.B. Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren) das Konzept einer zielgerichteten Tumortherapie ab.

Das Prinzip der Signaltransduktionsinhibitoren (STI) wird im Folgenden kurz erläutert: Als Signaltransduktionsinhibitor bezeichnet man Substanzen, die mit wichtigen zellulären Signaltransduktionswegen interferieren bzw. diese hemmen. Wenn z.B. ein extrazellulärer Wachstumsfaktor auf den entsprechenden Rezeptor an der Zelloberfläche trifft, wird das entsprechende Signal in das Zell-

innere weitergeleitet. Das geschieht in der Weise, dass der Rezeptor seine intrazellulär gelegene Konfiguration ändert und dadurch andere intrazellulär gelegene Proteine aktiviert. Diese wiederum aktivieren andere Proteine, und so setzt sich die Signalübertragung weiter fort. Ein Endpunkt der Aktivierung kann z.B. die Aktivierung oder auch Deaktivierung eines Gens sein.

Spezifische Signaltransduktionsinhibitoren, insbesondere Tyrosinkinase-Inhibitoren gelten als „Medikamente der Zukunft“. Bei vielen Erkrankungen, insbesondere bei vielen Krebserkrankungen ist inzwischen bekannt, dass sie auf gestörten Signaltransduktionen beruhen, die z.B. bei Tumorzellen zur dauerhaften Aktivierung führen. Gelingt es, diese Signaltransduktion spezifisch zu hemmen, so hat man ein effektives Medikament zur Behandlung der Erkrankung. Das bekannteste Beispiel ist der Wirkstoff Imatinib (Handelsname Glivec®, früher unter dem Namen STI571 bekannt). Imatinib ist ein relativ spezifischer Inhibitor für die ABL-Tyrosinkinase. Beim Krankheitsbild der chronischen myeloischen Leukämie liegt eine dauerhafte Aktivierung dieser Kinase vor, die durch eine Chromosomentranslokation zustande kommt, bei der ABL mit einem anderen Gen BCR zu einem Gen BCR-ABL fusioniert ist. Imatinib ähnelt strukturell einem Adenosintriphosphat-Molekül. Durch Einbringen dieses „synthetischen“ Adenosintriphosphates kann die BCR-ABL-Tyrosinkinase keine Effektoren mehr aktivieren und somit in seiner Aktivität gehemmt werden.

Neben den Inhibitoren der BCR-ABL sind weitere nieder-molekulare Tyrosinkinase-Inhibitoren entwickelt worden, die überwiegend gegen den EGF (epidermal growth factor)-Rezeptor gerichtet sind, während in einigen Fällen auch eine Inhibition des PDGF (Platelet derived growth factor)- und des VEGF (Vascular endothelial growth factor)-Rezeptors erreicht werden konnte.

Die meisten dieser niedermolekularen Inhibitoren („small molecule-inhibitors“) basieren auf der Struktur der Phenylaminopyrimidine (wie auch Imatinib) oder gehören zur Gruppe der Quinazoline (z.B. Gefitinib) oder der Phenozone. Diese Substanzen sind meist kompetitive Inhibitoren von ATP an der Kinase-Domäne des Rezeptors. Die Blockade der RTK führt schließlich zu einem Zellzyklus-Arrest in der G₁-Phase mit abschließender Apoptose [Fry, 1999].

Neben den niedermolekularen RTK-Inhibitoren sind auch monoklonale Antikörper entwickelt worden, die ebenfalls zu einer selektiven Blockade des Rezeptors führen. Hierzu zählen z.B. Cetuxizumab, Trastuzumab oder Bevacizumab.

Einen bedeutenden Vorteil der small molecule-Inhibitoren gegenüber Zytostatika stellt ihr geringes Nebenwirkungspotential dar. Durch den selektiven Angriff der small molecule-Inhibitoren üben sie auf PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) keine toxische Wirkung aus. Da sie oral verfügbar sind, müssen Patienten nicht zeitaufwendige ambulante oder stationäre Klinikaufenthalte auf sich nehmen, wie dies bei der Verabreichung von Zytostatika der Fall ist, welche häufig nur als Infusion appliziert werden können. Beides indiziert die gute Compliance der small molecule-Inhibitoren.

Jedoch muss man die STIs auch kritisch betrachten. Es kann heute nicht mehr darum gehen, lediglich hochaktive und/oder -selektive Substanzen zu identifizieren, sondern es muss das Ziel sein, verwertbare Informationen von Wechselwirkungen dieser Substanzen mit der Zelle zu gewinnen. Insbesondere bei der Nutzung der Signaltransduktionskaskaden als pharmakologisches Target muss bedacht werden, dass bis heute etwa 36 verschiedene Wege der zellulären Signalsteuerung beschrieben worden sind – dabei ist nicht bekannt, wie viele weitere Kaskaden und Transmissionswege es in der Zelle gibt und wie diese mit dem komplexen Netzwerk der zellulären Signaltransduktion interferieren. Die isolierte Betrachtung der Zelle führt dazu, dass mögliche intrazelluläre Adaptionen mit kurz- oder mittelfristiger Umsteuerung des komplexen Ablaufs der Signalflüsse nur unzureichend erfasst werden; auch über Langzeitwirkungen ist bisher noch nichts bekannt. Zudem sind molekularpharmakologische Probleme der Selektivität („tumor targeting“) oder die Bereitstellung („delivery“) der neuen Substanzen an den Angriffspunkten unterschätzt worden.

Im Zusammenhang mit den Signaltransduktionsinhibitoren ist es essentiell, prädiktive Faktoren für die Selektivität von Patienten mit hoher Ansprechwahrscheinlichkeit gegenüber diesen Substanzen zu identifizieren (z.B. die HER-2/neu-Testung bei Patientinnen mit Mammakarzinom vor der Trastuzumab-

Therapie). Es mag sein, dass die isolierte Analyse einzelner Proteine der Signaltransduktionskaskaden nicht immer sinnvoll ist, um eine Sensibilität gegenüber einer spezifischen Therapie vorherzusagen. Vielmehr wird nur die Analyse von Veränderungen von vernetzten Signaltransduktions-kaskaden eine Identifizierung von sensiblen Patienten erlauben. In diesem Zusammenhang werden moderne molekularbiologische Methoden wie die DNA-Gen-Array-Technologie in der Diagnostik zunehmend an Bedeutung gewinnen.

Abschließend kann noch einmal betont werden, dass die Möglichkeit in der Krebstherapie, spezifisch in eine Signalkaskade einzugreifen, bereits durch die Tyrosinkinase-Inhibitoren, speziell Imatinib bei der Chronischen myeloischen Leukämie (CML) aufgegriffen wurde. Diese haben sich bereits als hoch effektive antineoplastische Wirkstoffe in vivo auf dem Markt etabliert.

Mutationen in verschiedenen Bereichen der WNT-Signalkaskade und somit eine dauerhafte Aktivierung dieser konnte bereits in mehreren Krebserkrankungen wie z.B. auch Leukämie festgestellt werden [Khan et al., 2006]. Zuletzt wurde auch ein Zusammenhang zwischen CLL und einem dauerhaft aktiviertem WNT-Signalweg gefunden [Lu et al., 2004].

Anhand unserer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die beiden small molecule-Inhibitoren CGP 049090 und PKF 115-584 selektiv den apoptotischen Zelltod in B-CLL-Zellen induzieren. Dies konnten wir sowohl durch die DNA-Fragmentierung als auch durch die stark erhöhte Expression des PARP-Fragmentes in den behandelten B-CLL-Zellen zeigen. Des Weiteren detektieren wir eine Erhöhung der Apoptosemarker Caspase-3 und -7. Dieser Caspaseanstieg fand bei allen Proben schon nach 2 h statt, jedoch waren hier die Unterschiede relativ hoch, was die genauen Caspase-Aktivitätswerte und den genauen Zeitpunkt des Anstiegs betraf. Gleichzeitig mit dem apoptotischen Zelltod konnte eine Herunterregulierung der bekannten LEF1-Zielgene beobachtet werden.

Diese beiden Tatsachen unterstützen die Hypothese, dass die beobachtete zytotoxische Wirkung der beiden Substanzen speziell durch die Unterdrückung der LEF1-Transkription vermittelt wird. Schon in vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der WNT/CTNNB1/LEF1-Signalweg in B-CLL-Zellen sehr stark hochreguliert ist [Howe et al., 2006]. Zudem ist bereits nachgewiesen worden, dass die beiden small molecule-Inhibitoren den CTNNB1/LEF1-Komplex unterbinden können und dass durch die Behandlung von HCT116 Zellen, einer Darmkrebszelllinie, mit den beiden Inhibitoren die Expression der CTNNB1/LEF1-Zielgene C-MYC und CCND1 aufgehoben wird [Lepourcelet et al., 2004].

Wichtig ist bei dem Vorgang der Angriffspunkt in der WNT-Signalkaskade, der hier relativ weit am Ende der Signalkaskade liegt. Es wäre nicht zweckdienlich, den WNT-Signalweg zu einem früheren Zeitpunkt zu hemmen. Dies würde die komplette Signalkaskade unterbinden und hätte nicht absehbare Folgen. Denn

der WNT-Signalweg steht in einem komplexen Zusammenhang mit anderen Signalkaskaden, die alle voneinander abhängig sind.

Von den LEF1-Zielgenen spielt SURV eine signifikante Rolle in der B-CLL-Pathogenese, indem es die maligne Proliferation durch Apoptose kontrolliert [Granziero et al., 2001]. Während der fetalen Entwicklung im Menschen wird SURV reichlich exprimiert, es ist jedoch kaum im erwachsenen Gewebe vorhanden [Tamm et al., 1998]. Untersuchungen zu Unterschieden im Genexpressionsverhalten zwischen normalen und Tumorzellen konnten deutlich machen, dass SURV zu den Genen gehört, die am konstantesten in Tumorzellen überexprimiert werden. Tatsächlich wird SURV reichlich in transformierten Zelllinien und in vielen menschlichen Krebsarten wie z.B. in Hämoblastosen exprimiert [Nakagawa et al., 2004].

Unsere Ergebnisse stimmen jedoch nicht mit den vorhandenen Erkenntnissen überein. Es war uns nicht möglich, SURV in B-CLL-Zellen zu detektieren. Dagegen war eine SURV-Expression sowohl in MEC-Zelllinien als auch in primären AML-Zellen gut nachweisbar. Das widerlegt die Vermutung, dass die verwendeten Antikörper nicht funktioniert haben. Da man bei unseren Western Blots Banden bei 34kDa sowie bei 81kDa entdecken konnte, besteht die Annahme, dass SURV als Dimer bzw. Komplex vorlag.

Es ist bekannt, dass der WNT-Signalweg *in vivo* aktiver ist als *in vitro*, da *in vitro* das entscheidende WNT-Signal zur fortdauernden Aktivierung fehlt. Die Arbeitsgruppe um Luu testete bereits die Kultivierung von B-CLL-Zellen in Anwesenheit von WNT3, um den WNT-Signalweg auch *in vitro* aufrechtzuerhalten [Luu et al., 2004]. Dies könnte eine Möglichkeit darstellen, die Konzentration an SURV zu erhöhen und somit die vermutete SURV-Expression in B-CLL-Zellen detektieren zu können.

Ein weiteres Zielgen des CTNNB1/LEF1-Komplexes stellt CCND1 dar. In unseren Versuchen bewirkte die Inkubation der B-CLL-Zellen mit den beiden small molecule-Inhibitoren eine stark verminderte Expression dieses Zielgenes. Doch im Gegensatz zu SURV und C-MYC wird CCND1 als weniger wichtig für die B-

CLL-Proliferation und die blockierte Apoptose bei der B-CLL betrachtet. Diese Hypothese muss jedoch mit gewisser Vorsicht interpretiert werden. In Arbeiten über die Bedeutung des CCND1 bezüglich Darmkrebs ist nachgewiesen worden, dass obwohl das CCND1-Gen nicht im menschlichen Darmkrebs amplifiziert war, die CCND1-Expression in über 30% der Fälle bei menschlichen Adenokarzinomen und in adenomatösen Polypen im Darm erhöht war. Die Expression von anti-sense-CCND1-mRNA hob das Wachstum von SW480-Darmkrebszellen in nackten Mäusen auf, wie in Studien gezeigt werden konnte. Dies weist wiederum auf die kritische Rolle von CCND1 in der Tumorgenese hin [Luu et al., 2004]. Wegen mehrfacher RNA-Varianten und Protein-Isoformen sind CCND1-Experimente offenkundig schwer auszuwerten. Dies z.B. zeigen vor kurzem durchgeführte Versuche an Mantelzell-Lymphom-Zellen (MCL-Zellen), die durch eine sehr starke CCND1-Expression charakterisiert sind. Hier konnte demonstriert werden, dass trotz detektierbarer RNA die hoch-onkogene CCND1b-Protein-Variante nicht erfasst werden konnte, als normale Standard-Antikörper gegen CCND1 gerichtet verwendet wurden. Nur die weniger onkogene CCND1a-Protein-Variante war detektierbar. Weiterhin konnte in dieser Versuchsreihe bewiesen werden, dass neben den bei 33 kDa exprimierten CCND1-Varianten sowohl in MCL-Zellen als auch in CLL-Zellen, die als Kontrolle dienten, ein Protein bei 35 kDa mit dem CCND1-Antikörper detektiert werden konnte. Dieses stellte sich aber nach einigen Untersuchungen als kein CCND1-Protein heraus [Marzec et al., 2006].

Demzufolge muss im Zusammenhang mit unserer Untersuchung die CCND1-Herunterregulierung als ein Hinweis für die LEF1-Hemmung betrachtet werden. Es kann jedoch keine Aussage in Bezug auf seine funktionale Relevanz getätigt werden.

Des Weiteren zählt C-MYC zu den Zielgenen des CTNNB1/LEF1-Komplexes. Während C-MYC überexprimiert wird, ruht die Mehrzahl der akkumulierten B-CLL-Zellen in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus und weist eine lange Lebensdauer auf. Im Gegensatz zu diesem in vivo-Verhalten gehen die Zellen sehr schnell den programmierten Zelltod ein, wenn sie ex vivo kultiviert werden. Diese Er-

kenntnisse unterstützen die Hypothese, dass C-MYC gleichzeitig sowohl das Zellwachstum als auch die Apoptose induziert und reguliert. Die exakte Rolle von C-MYC in der Pathogenese der B-CLL ist noch nicht geklärt. Bisher konnte gezeigt werden, dass eine C-MYC-Überexpression mit einer schlechten Prognose einhergeht sowie die Resistenz von B-CLL-Zellen zur Folge hat, in die wegen DNA-Schädigung induzierte Apoptose zu gehen [Vallat et al., 2003; Nagy et al., 2003]. Demgegenüber ist sowohl die CCND1- als auch die C-MYC-mRNA-Expression stark reduziert, wenn die B-CLL-Zellen doch in den programmierten Zelltod gehen [Plate et al., 2000].

Unsere Untersuchungen konnten diese Beobachtungen im Zusammenhang mit den selektiven Inhibitoren des CTNNB1/LEF1-Signalweges reproduzieren. Die Immunoblots wiesen verminderte Expressionslevel des Proteins C-MYC nach Inkubation mit den beiden small molecule-Inhibitoren auf. Jedoch werden weitere Studien nötig sein, um die Rolle von C-MYC im nachfolgenden apoptotischen Signalweg in der B-CLL aufzudecken. Eine Klärung könnte in der zurzeit diskutierten Interaktion zwischen C-MYC und MAX zu finden sein, die zwingend für die DNA-Bindung von C-MYC sowie der Initiierung seiner proliferativen und anti-apoptotischen Aktivität ist [Mo et al. 2006]. In diesem Zusammenhang wurde eine Versuchsreihe gestartet, in der das unterschiedliche mRNA-Expressionsverhalten von C-MYC und MAX sowohl in B-CLL-Zellen als auch in gesunden PBMC mittels RT-PCR (real time-Polymerasekettenreaktion) gemessen wurde. Jedoch waren die ersten erzielten Ergebnisse nicht aussagekräftig, da keine Unterschiede im Expressionsverhalten von C-MYC und MAX zwischen B-CLL-Zellen und PBMCs festzustellen waren. Weitere Versuche sind mit dem speziellen C-MYC-Inhibitor 10058-F4 geplant, der spezifisch die C-MYC/MAX-Interaktion hemmt. Bereits veröffentlichte Ergebnisse einer Studie zeigen, dass 10058-F4 in einer AML-Zelllinie sowie in primären AML-Zellen mit dem C-MYC/MAX-Komplex interagiert und in Folge dessen das Zellwachstum der leukämischen Zellen inhibiert sowie sie in Apoptose schickt [Huang et al., 2006].

Bis jetzt ist die Funktion der WNT/CTNNB1/LEF1-Signalkaskade in der physiologischen sowie der malignen Hämatopoese noch nicht vollständig aufgedeckt.

LEF1-Knockout Mäuse zeigten zahlreiche nicht-hämatopoetische Defekte wie fehlende Zähne, Brustdrüsen und Behaarung während der Organentstehung und starben kurz nach ihrer Geburt. Keine offensichtlichen Mängel traten bei der lymphozytischen Zellpopulation auf [Van Genderen et al., 1994]. Jedoch ruft die Tatsache, dass LEF1 in entwickelnden B- und T-Zellen exprimiert wird, die Vermutung hervor, dass die WNT-Signalkaskade die Proliferation und/oder die Differenzierung der lymphozytischen Zellen regulieren könnte. Auf die Fragestellung hin brachte Studie von Reya et al. die Erkenntnis, dass bei LEF1-Knockout-Mäusen die Abwesenheit von LEF1 zu einer erniedrigten Proliferation und einer erhöhten Apoptoserate in Pro-B-Zellen führt. Ferner konnte gezeigt werden, dass lösliche WNT-Proteine direkt auf pro-B-Zellen einwirken und ihren Eintritt in den Zellzyklus und die Zellproliferation initiieren, während bei nichtvorhandenem LEF1-Stimulus die Fähigkeit der pro-B-Zellen auf das WNT-Signal zu reagieren beeinträchtigt wird [Reya et al., 2000].

In einer weiteren Studie von Skokowa et al. wurde über die besondere Bedeutung von LEF1 für die Granulopoese berichtet [Skokowa et al., 2006]. Es konnte demonstriert werden, dass LEF1 die Proliferation, das Überleben und die Differenzierung der Granulozyten-Progenitor-Zellen vermittelt. Die LEF1-Expression wurde bei durch „angeborene Neutropenie“ arretierten Promyelozyten stark unterdrückt. Dies resultierte in einer fehlerhaften Expression der LEF1-Zielgene CCND1, C-MYC und SURV. Im Gegensatz wiesen gesunde Probanden sehr hohe LEF1-Expressionslevel in Promyelozyten auf. Obwohl diese Daten veranschaulichen, dass Komponenten des WNT-Signalweges, speziell LEF1, in einem bestimmten Stadium für beides, sowohl Lymphopoese als auch Granulopoese wichtig sind, wurde die bisher als entscheidend angenommene Funktion des CTNNB1 in diesem Prozess unter physiologischen Bedingungen noch nicht direkt getestet. Untersuchungen brachten die überraschende Erkenntnis, dass eine CTNNB1-Inaktivierung in Knochenmarks-Progenitor-Zellen zu keiner feststellbaren Störung bei der Hämatopoese oder Lymphopoese geführt hat [Cobas et al., 2004].

Trotz der bleibenden Fragen kann gemutmaßt werden, dass LEF1 die Kriterien für ein relativ spezifisches Ziel in der B-CLL-Therapie erfüllt. Wir konnten in un-

seren Experimenten nachweisen, dass sowohl die Expression von LEF1 selbst als auch von seinen Zielgenen C-MYC und CCND1 durch die Wirkung der beiden small molecule-Inhibitoren PKF 115-584 und CGP 049090 stark reduziert wurde. Dieser Effekt trat spezifisch in B-CLL-Zellen auf, während die Inhibitoren kaum Einfluss auf PBMCs genommen haben.

Prinzipiell ist unser Ansatz nicht gänzlich neu, da schon gezeigt werden konnte, dass eine GSK-3 β -Hemmung durch SB 216763 das Überleben von B-CLL-Zellen verlängerte, während sich eine Behandlung mit Etodolac in der Hemmung der WNT/CTNNB1/LEF1-Signalkaskade mit anschließender erhöhter Apoptoserate in B-CLL-Zellen *in vitro* äußerte [Lu et al., 2004]. Jedoch muss beachtet werden, dass sehr hohe Etodolac-Mengen nötig waren ($IC_{50} > 250 \mu M$), um die gewünschte Wirkung zu erzielen. Bei dieser Tatsache ist es fraglich, ob diese Konzentrationen *in vivo* erreicht werden können, ohne signifikante Toxizitäten hervorzurufen. Zwar führt der selektive COX2-Hemmer Etodolac nur in sehr schwach ausgeprägter Form zu Magen- und Darmulcera, da diese therapielimitierende Nebenwirkung speziell durch eine COX1-Hemmung verursacht wird. Doch seit einigen Jahren ist eine weitere unerwünschte Arzneimittelwirkung bekannt geworden, die speziell durch die Gruppe der COXIBE ausgelöst wird, wozu man auch Etodolac zählen kann. Die spezifische COX2-Hemmung dieser Klasse führt zur Hemmung des Prostacyclins, das vasodilatierend wirkt und die Thrombozytenaggregation hemmt. Des Weiteren fördert es die Bildung von Thromboxan A₂, das die entgegengesetzten Wirkungen zeigt, nämlich zur Vasokonstriktion führt und die Thrombozytenaggregation steigert. Durch diesen Mechanismus kommt es bei Einnahme von selektiven COX2-Hemmern zur Zunahme thromboembolischer Ereignisse. Deshalb überrascht es nicht, nachdem zudem in klinischen Studien über R-Etodolac zur Behandlung der B-CLL enttäuschende Ergebnisse erzielt wurden, dass in den letzten Jahren keine weiteren klinischen Studien zu dieser Theorie veröffentlicht wurden.

Es ist in unserer Arbeit zu beachten, dass CGP 049090 und PKF 115-584 ihre Wirkung im submikromolekularen Bereich ausübten (LC_{50} -Werte von $0,37 \mu M$

für CGP 040909 und 0,32 μM für PKF 115-584). Da bei beiden Inhibitoren eine Autofluoreszenz vorlag, konnten wir die Versuche zur Messung des Zellüberlebens nicht am FACS Array durchführen. Bei dieser Methode wird mit fluoreszierenden Markern gearbeitet. Durch die Eigenfluoreszenz von PKF 115-584 und CGP 040909 wären die Messdaten verfälscht worden. Somit mussten wir uns für das aufwendigere DiSC-Assay entscheiden. Zur Dosis-Wirkungs-Messung benutzen wir zuerst das ATP-Assay, das die metabolische Aktivität der Zellen ermittelt, die durch den ATP-Anteil der Zellen gemessen wird. Verminderte zelluläre ATP-Level korrelieren mit einer verringerten Zellproliferation und einem verringerten Zellüberleben [Crouch et al., 1993]. Jedoch um die zytotoxische Wirkung zwischen gesunden PBMCs und B-CLL-Zellen unterscheiden zu können, muss man beachten, dass unterschiedliche Zelltypen einen unterschiedlichen Metabolismus aufweisen. Während das ATP-Assay gewählt werden kann, um Zellen mit gleicher metabolischer Aktivität zu vergleichen, darf es nicht zur Gegenüberstellung der Wirkungen auf Zelltypen mit größeren Unterschieden in ihrer metabolischen Aktivität benutzt werden, wie dies z.B. bei uns im Vergleich der Lymphozyten von gesunden Probanden und von B-CLL-Patienten der Fall war. Wegen dieser Tatsache wählten wir den DiSC-Assay, um die Zytotoxizität von behandelten B-CLL-Zellen und unbehandelte Zellen von gesunden Probanden vergleichen zu können. Der DiSC-Assay besitzt gegenüber dem ATP-Assay als Zellüberlebenstest den Vorteil, dass er den tatsächlichen Zelltod misst und nicht nur die verminderte metabolische Aktivität durch Ermittlung des zellulären ATP-Gehalts. Die Resultate ermittelt durch den DiSC-Assay zeigten, dass normale PBMCs in den angegebenen Dosen nicht-signifikant beeinflusst wurden. Jedoch ist es fraglich, ob die Inhibitoren in Hinblick auf weniger differenzierte und proliferierende hämatopoetischen Zellen oder auf andere Gewebe ein toxisches Potential besitzen.

In einer kürzlich erschienenen Studie von Chen et al. wurde die Pharmakokinetik und der Metabolismus von CALPHOSTIN C untersucht, welches struktidentisch zu PKF 115-584 ist [Chen et al., 1999]. Hier berichteten die Autoren, dass i.p.-Administration von 40mg/kg Körpergewicht in CD1 Mäusen thera-

peutisch relevante Plasmalevel ($C_{\max} = 2.9 \mu\text{M}$) ergaben. Weiterhin wurden während eines Zeitraums von 30 Tagen nach Administration keine toxischen Anzeichen oder Todesfälle bei den Tieren beobachtet. Die Arbeitsgruppe um Sukhdeo untersuchte die Effektivität von PKF 115-584 auf Multiple Myeloma-Zellen. Für die in vivo-Versuche verwendeten sie ein Xenograft-Mausmodell entsprechend des menschlichen Multiplen Myeloms. Die SCID-Mäuse erhielten 0.16 mg/kg PKF 115-584 jeden zweiten Tag per i.p.-Injektion. Das Überleben der PKF 115-584 behandelten Mäuse war im Gegensatz zur Kontrollgruppe signifikant verlängert; zusätzlich entwickelten die behandelten Mäuse weniger Metastasen [Sukhdeo et al., 2007].

In unserer Gruppe wurde ebenfalls ein in vivo-Versuch gestartet. Eine kleine Kohorte an Mäusen wurde täglich mit CGP049090 and PFK115-584 jeweils in der Dosierung von 50mg/kg Körpergewicht 14 Tage lang behandelt. Auch hier konnten keine schwerwiegenden systemischen Vergiftungen entdeckt werden (Daten nicht publiziert). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass beide small molecule-Inhibitoren in Dosierungen, die ausreichend sind, um B-CLL-Zellen in vivo zu töten, gut vertragen werden.

Wie in mehreren unabhängigen in vitro-Versuchen bereits gezeigt, konnten wir bestätigen, dass die beiden Substanzen PKF 115-584 und CGP 049090 den CTNNB1/LEF1-Komplex spezifisch trennen, somit die Expression von C-MYC und CCND1 stark antagonisieren und Apoptose initiieren [Luu et al., 2004]. Jedoch ist der genaue Mechanismus der Trennung des CTNNB1/LEF1-Komplexes noch nicht geklärt.

Die Arbeitsgruppen um Poy und Lepourcelet [Poy et al., 2001] haben sich mit dem Mechanismus der Bindung von CTNNB1 an LEF1 genauer beschäftigt. Sie fanden heraus, dass der CTNNB1/LEF1-Komplex eine hydrophobe Tasche zwischen den Armadillo-Wiederholungen besitzt. Wenn sich ein hydrophober Stoff in diese Tasche einlagert, könnte dieser als Keil fungieren und die LEF1 Bindungsfläche am CTNNB1 zerstören. Die beiden small molecule-Inhibitoren besitzen stark hydrophobe Eigenschaften. So kann vermutet werden, dass sie sich in diese hydrophoben Taschen einlagern und so die 3D-Struktur des

CTNNB1 verändern. Dadurch bedingt kann schließlich LEF1 nicht mehr mit CTNNB1 interagieren. Die Wirkweise wäre somit relativ unspezifisch und nur auf das lipophile Grundgerüst zurückzuführen. Die Tatsache, dass in der Versuchsreihe von Lepourcelet [Lepourcelet et al., 2004] nur die drei der sechs möglichen Substanzen die CTNNB1-Spiegel senken konnten, die alle das gleiche hydrophobe Grundgerüst – einen Perylenchinon – besaßen, stellt zur Diskussion, dass auch die dreidimensionale Struktur der Verbindungen für die sterische Blockade des CTNNB1/LEF1-Komplex essentiell sein kann.

Als limitierenden Faktor unserer Arbeit kann die Heterogenität der B-CLL festgehalten werden. Das verwendete Patientenmaterial beschränkte sich nicht auf bestimmte B-CLLs mit den gleichen molekulargenetischen Voraussetzungen. Es wurde also bei unseren Versuchen kein Unterschied gemacht, ob eine besonders aggressive Form der B-CLL vorlag oder eine mit nur wenigen adaptierten Zellen. Weiterhin konnten wir nur selten Material von unbehandelten Patienten verwenden. Meistens arbeiteten wir mit Blutproben von Patienten, die sich schon einer Chemotherapie unterzogen hatten.

Aus pharmazeutischer Sicht betrachtet besitzen die beiden small molecule-Inhibitoren einige Vorteile. Zum einen werden sie über Esterasen und unabhängig von Cytochrom P450 metabolisiert. Der Metabolismus vieler Arzneimittel verläuft über das Cytochrom P450 System. Die gleichzeitige Einnahme mehrerer Arzneimittel, die über das System abgebaut werden, kann so häufig zu teils gefährlichen Interaktionen führen, da diese die Enzymtätigkeit entweder induzieren oder inhibieren. Dies hat Schwankungen im Wirkstoffspiegel der jeweiligen Arzneimittel zur Folge, so dass der Patient entweder eine toxische Konzentration erreicht oder die Konzentration unter die nötige Wirkgrenze sinkt. Ein weiterer Vorteil liegt in einem deutlich geringeren Nebenwirkungspotential, verglichen mit der herkömmlichen Zytostatika-Therapie. Dies ist durch den selektiven Angriff der STIs begründet. In unseren Versuchen übten sie keine toxische Wirkung auf PBMCs aus, jedoch beeinflussten sie stark das Überleben der B-CLL-Zellen.

Die starke Lipophilie der beiden small molecule-Inhibitoren könnte Probleme bei der Resorption und Distribution des Wirkstoffs im Organismus zur Folge haben. Durch ihre Lipophilie erscheint es recht wahrscheinlich, dass sich die Verbindungen in lipophilen Geweben wie etwa der Leber und nicht am gewünschten Zielort, dem Blut anreichern. Um dies zu unterbinden, könnte der Wirkstoff mikroverkapselt werden. Durch diese Mizellentechnik wird der Wirkstoff ins lipophile Innere einer Mizelle angereichert. Die Mizelle selbst ist jedoch nach außen hydrophil veranlagt, so dass sie sich eher im hydrophilen Blut verteilt. Dieses Verfahren wurde beispielsweise bei dem Immunsuppressivum Ciclosporin angewandt, das sich als Fertigarzneimittel unter dem Namen Sandimmun Optoral® auf dem Markt befindet. Diese Technologie bringt als Vorteile eine bessere Resorbierbarkeit, ein gleichmäßigeres Resorptionsprofil und bessere systemische Verfügbarkeit mit sich. Jedoch ist für die Konzentration eines Arzneistoffes im Blut auch die Proteinkonzentration im Blutplasma mitentscheidend, an die der Arzneistoff entweder binden oder in gelöster Form vorliegen kann.

Bei den in vivo-Versuchen, die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, wurde als Lösungsvermittler Cremophor EL benutzt. Die Handelsbezeichnung Cremophor steht für chemisch unterschiedliche polyethylenoxylierte, nichtioni-

sche O/W-Emulgatoren und Solubilisatoren. Speziell Cremophor EL ist ein Umsetzungsprodukt von Rizinusöl (1 Mol) mit Ethylenoxid (35 Mol) und stellt ein Gemisch aus ca. 83% eher hydrophoben Verbindungen (meist Polyoxyethylenglycerolricinoleat und nicht umgesetztes Rizinusöl) sowie aus ca. 17% hydrophilen Verbindungen (Polyoxyethylenglycerol und Polyethylenglykol) dar. Cremophor EL wirkt als Solubilisator, d.h. er nimmt die schwerlösliche lipophile Substanz ins Mizellinnere molekulardispers auf. Cremophor EL als Lösungsvermittler hilft, dass die schwerlösliche Substanz leichter absorbiert wird und erhöht so ihre Effektivität.

Als wesentlicher Nachteil dieser Substanz ist ihre hohe Nebenwirkungsrate zu sehen, die speziell nach parenteraler Applikationen von Lösungen, die Cremophor EL enthalten, auftreten. Dazu zählen Überempfindlichkeitsreaktionen, Nephrotoxizität und Neurotoxizität. Cremophor EL übt auch einen Einfluss auf die Funktion von Endothel und der Gefäßmuskulatur aus und verursacht Vasodilatation und Hypotonie [Friedland et al., 1993]. Zudem kann seine parenterale Applikation einen anaphylaktischen Schock auslösen, der zum Tode führen kann. Dies konnte nach oraler Administration eines Präparates, das Cremophor EL enthielt, nicht beobachtet werden. Als Beispiel hierfür kann man die Paclitaxel-Infusionslösung angeben, die sich mit Cremophor EL als Lösungsvermittler auf dem Markt befindet. Um die schweren allergischen Reaktionen zu vermeiden, muss vor der Verabreichung der Paclitaxel-Infusionslösung eine Prämedikation mit Corticosteroiden, Antihistaminika und H₂-Antagonisten erfolgen, um die Gefahr des anaphylaktischen Schocks zu reduzieren [Weiss et al., 1990]. Diesbezüglich muss in der Zukunft noch weiter geforscht werden, um Alternativen der weniger toxischen Lösungsvermittlung zu suchen.

Fasst man unsere Daten zusammen, kann festgestellt werden, dass CGP 049090 und PKF 115-584 als potentielle anti-Krebs-Wirkstoffe der B-CLL-Therapie angesehen werden können. Weitere Studien sind jedoch nötig, um die Rolle der Inhibitoren im molekularen Signalweg der Apoptose-Induktion sowie ihre spezifische Wirksamkeit in der WNT-Signalkaskade zu erläutern, die für

diese Inhibitoren eine Zukunft in der B-CLL-Therapie bestätigen würden. Jeder dieser Inhibitoren muss selektiv mit dem Komplex interagieren, ohne andere wichtige Komplexe mit CTNNB1 zu zerstören. Schließlich ist es notwendig, die oben erwähnten Ergebnisse in klinische Relevanz zu bringen. Dafür müssen zusätzliche Experimente mit den small molecule-Inhibitoren in passenden Maus-Modellen für die B-CLL in vivo durchgeführt werden, um die Ergebnisse weiterhin kritisch einzuordnen.

5. Zusammenfassung

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass die beiden strukturverwandten small molecule-Inhibitoren CGP 049090 und PKF 115-584 in Kolonkarzinom-Zellen effektiv den WNT/CTNNB1/LEF1-Signalweg inhibieren. Zudem ist bekannt, dass LEF1 in der B-CLL (B-Zell Chronische lymphatische Leukämie) überexprimiert wird. Dadurch lautet unsere Annahme, dass diese beiden Substanzen CGP 049090 und PKF 115-584 eine bedeutende Rolle in der B-CLL-Therapie spielen können.

Um dies zu testen, wurden die Auswirkungen des inhibitorischen Effekts der beiden small-molecule Inhibitoren CGP 049090 und PKF 115-584 auf die WNT/CTNNB1/LEF1-Signalkaskade in der B-CLL untersucht. Primäre B-CLL-Zellen sowie mononukleäre Zellen von gesunden Probanden wurden mit verschiedenen Konzentrationen beider Substanzen versetzt und über 24 h inkubiert. Das Zellüberleben wurde anhand des ATP-Assays und des Differential Staining Cytotoxicity Assays (DiSC-Assay) bestimmt. Mit Hilfe des Caspase-3/7-Assays, der PARP-Freisetzung und der DNA-Fragmentierung wurde das apoptotische Verhalten der Zellen überwacht. Auf dem Protein-Level analysierten wir die Expression der bekannten Zielgene des WNT/CTNNB1/LEF1-Signalweges mit Hilfe von Western Blots.

Die Ergebnisse zeigten, dass beide small molecule-Inhibitoren einen dosisabhängigen Zelltod mit LC_{50} -Werten von $0,37 \mu\text{M}$ (CGP 049090) und $0,32 \mu\text{M}$ (PKF 115-584) in primären B-CLL-Zellen induzieren. Dagegen wurden die mononukleären Zellen nicht geschädigt; hier lagen die LC_{50} -Werte mit $33,80 \mu\text{M}$ (CGP 049090) und $48,87 \mu\text{M}$ (PKF 115-584) deutlich höher. Eine stattfindende Apoptose konnte in B-CLL-Zellen schon nach 6-stündiger Inkubation mit CGP 049090 und PKF 115-584 nachgewiesen werden. Die abschließende Untersuchung auf Proteinebene zeigte ein verringertes Vorkommen der CTNNB1/LEF1 Zielproteine C-MYC und CCND1 nach Inkubation mit den small molecule-Inhibitoren. Auch die Proteinmenge von CTNNB1 und LEF1 wurde gemindert.

Da schon in früheren *in vivo*-Studien für PKF 115-584 in Mäusen keine systemische Toxizität nachgewiesen werden konnte, deutet das günstige Nebenwirkungsprofil zusammen mit unseren Ergebnissen darauf hin, dass die beiden Substanzen CGP 049090 und PFF 115-584 durch ihre gezielte Inhibition des CTNNB1/LEF1-Komplexes innerhalb der WNT-Signalkaskade mögliche neue Wirkstoffe für die B-CLL-Therapie darstellen.

6. Literaturverzeichnis

1. Adachi S, Leoni LM, Carson DA, Nakahata T. Apoptosis induced by molecular targeting therapy in hematological malignancies. *Acta Haematol* 2004; 111(1-2): 107-123.
2. Andritsos L, Khoury H. Chronic lymphocytic leukemia. *Curr Treat Options Oncol* 2002; 3: 225-231.
3. Aoki M, Hecht A, Kruse U, Kemler R, Vogt PK. Nuclear endpoint of Wnt signaling: neoplastic transformation induced by transactivating lymphoid-enhancing factor-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(1): 139-144.
4. Bannerji R, Byrd JC. Update on the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Oncol* 2000; 12(1): 22-29.
5. Bates S, Rowan S, Vousden KH. Characterisation of human cyclin G1 and G2: DNA damage inducible genes , *Oncogene* 1996; 13(5): 1103-1109.
6. Begemann H, Rastetter J, Kaboth W. *Klinische Hämatologie*. Stuttgart 1970: Thieme.
7. Behari J, Zeng G, Otruba W, Thompson MD, Muller P, Micsenyi A, Sekhon SS, Leoni L, Monga SP. R-etodolac decreases beta-catenin levels along with survival and proliferation of hepatoma cells. *J Hepatol* 2007; 46(5): 849-857.
8. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996; 382(6592): 638-642.
9. Bergmann MA, Goebeler ME, Herold M, Emmerich B, Wilhelm M, Ruelfs C, Boening L, Hallek MJ; German CLL Study Group. Efficacy of bendamustine in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: results of a phase I/II study of the German CLL Study Group. *Haematol* 2005; 90(19): 1357-1364.
10. Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000; 103(2): 311-320.
11. Blackwood EM, Eisenmann RN. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 1991; 251: 1211-1217.

12. Bosch F, Ferrer A, Lopez-Guillermo A, Gine E, Bellosillo B, Villamor N, Colomer D, Cobo F, Perales M, Esteve J, Altes A, Besalduch J, Ribera JM, Monserrat E; For the GELCAB (Grup per l'Estudi dels Limfomes a Catalunya i Balears). Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in the treatment of the resistant or relapsed chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2002; 119(4): 976-984.
13. Brandon C, Eisenberg LM, Eisenberg CA. WNT signaling modulates the diversification of hematopoietic cells. *Blood* 2000; 96(13): 4132-4141.
14. Byrd JC, Rai K, Peterson BL, Appelbaum FR, Morrison VA, Kolitz JE, Shepherd L, Hines JD, Schiffer CA, Larson RA. The addition of Rituximab to Fludarabine may prolong progression-free survival and overall survival in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: an updated retrospective comparative analysis of CALGB9712 and CALGB9011. *Blood* 2005; 109(1): 49-53.
15. Chen CL, Tai HL, Zhu DM, Uckun FM. Pharmacokinetic features and metabolism of calphostin C, a naturally occurring perylenequinone with antileukemic activity. *Pharm Res* 1999; 16(7): 1003-1009.
16. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, Kipps TJ. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signalling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100(13): 4609-4614.
17. Cobas M, Wilson A, Ernst B, Mancini SJ, MacDonald HR, Kemler R, Radtke F. Beta-catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. *J Exp Med* 2004; 199(2): 221-229.
18. 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 Leukemias. *N Engl J Med* 2003; 348: 1746-1775.
19. Crouch SP, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1993; 160(1):81-8.
20. 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 prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1840-1847.

21. Danilov AV, Danilova OV, Klein AK, Huber BT. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Mol Med* 2006; 6(6): 665-675.
22. De Pinho RA, Schreiber-Agus N, Alt FW. Myc family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res* 1991; 47:1-47.
23. Derksen PW, Tjin E, Meijer HP, Klok MD, MacGillavry HD, van Oers Mh, Lokhorst HM, Bloem AC, Clevers H, Nusse R, van der Neut R, Spaargaren M, Pals St. Illegitimate Wnt signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells. *Proc Natl Sci USA* 2004; 101(16): 6122-6127.
24. Dighiero G, Travade P, Chevret S, Fenaux P, Chastang C, Binet JL. The French Cooperative Group on CLL: B-cell chronic lymphocyte leukemia: present status and future directions. *Blood* 1991; 78: 1901-1914.
25. Dighiero G, Maloum K, Desablens B, Cazin B, Navarro M, Leblay R, Leporrier M, Jaubert J, Lepeu G, Dreyfus B, Binet JL, Travade P. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1998; 338(21): 1506-1514.
26. Döhner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemia. *Blood* 1995; 85: 1580-1589.
27. Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, Fischer K, Hunstein W, Lichter P. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 1997; 89: 2516-2522.
28. Döhner H, Stilgenbauer S, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med* 1999; 77: 266-281.
29. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia (2000), *N. Engl. J. Med.* 2000; 343: 1910-1916.
30. Dosen G, Tenstad E, Nygren MK, Stubberud H, Funderud S, Rian E. Wnt expression and canonical Wnt signaling in human bone marrow B lymphopoiesis. *BMC Immunology* 2006; 7(13): 1-17.

31. Dreger P, Montserrat E. Autologous and allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002; 16(6): 985-992.
32. Escudier SM, Pereira-Leahy JM, Drach JW, Weier HU, Goodacre Am, Cork MA, Trujillo JM, Keating MJ, Andreeff M. Fluorescence in situ hybridization and cytogenetic studies of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993; 81: 2702-2707.
33. Faderl S, Keating MJ, Do KA, Liang SY, Kantarjian HM, O'Brien S, Garcia-Manero G, Manshouri T, Albitar M. Expression profile of 11 proteins and their prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia* 2002; 16(6): 1045-1052.
34. Faguet GB. Chronic lymphocytic leukemia: an updated review. *J Clin Oncol.* 1994; 12: 1974-1990.
35. Friedland D, Gorman G, Treat J. Hypersensitivity reactions from taxol and etoposide. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(24): 2036.
36. Fry DW. Inhibition of the epidermal growth factor receptor family of tyrosine kinases as an approach to cancer chemotherapy: progression from reversible to irreversible inhibitors. *Pharmacol Therapeutics* 1999; 82: 207-218.
37. Giannopoulos K, Li L, Bojarska-Junak A, Rolinski J, Dmoszynska A, Hus I, Greiner J, Renner C, Döhner H, Schmitt M. Expression of RHAMM/CD 168 an dother tumor-associated antigens in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Oncol* 2006; 29(1): 95-103.
38. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1653(1): 1-24.
39. 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* 2001; 97: 2777-2783.
40. Hallek M, Schmitt B, Wilhelm M, Busch R, Krober A, Fostitsch HP, Sezer O, Herold M, Knauf W, Wendtner CM, Kuse R, Freund M, Franke A, Schriever F, Nerl C, Döhner H, Thiel E, Hiddemann W, Brittinger G, Emmerich B; German Chronic Lymphocytic Leukaemia Study Group. Fludarabine plus cyclophosphamide is an efficient treatment for advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL): results of a phase II study of the German CLL Study Group. *Br J Haematol* 2001; 114(2): 342-348.

41. Hallek M, Emmerich B. Chronische lymphatische Leukämie. Bremen 2005: Uni-Med.
42. 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* 1999; 94: 1848-1854.
43. Hamblin TJ. Achieving optimal outcomes in chronic lymphocytic leukemia. *Drugs* 2001; 61: 593-611.
44. Han T, Henderson ES, Emrich LJ, Sandberg AA. Prognostic significance in B-cell chronic lymphocytic leukemia: an update. *Semin Hematol* 1987; 24: 257-263.
45. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of the c-Myc as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281: 1509-1512.
46. Hovanes K, Li TW, Munguia JE, Truong T, Milovanovic T, Lawrence Marsh J, Holcombe RF, Waterman ML. B-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat Genet* 2001; 28(1): 53-57.
47. Howe D, Bromidge T. Variation of LEF-1 mRNA expression in low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk. Res.* 2006; 30(1): 29-32.
48. Houlston RS, Catovsky D, Yuille MR. Genetic susceptibility to chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002; 16: 1008-1014.
49. Huang MJ, Cheng YC, Liu CR, Lin S, Liu HE. A small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, induces cell-cycle arrest, apoptosis, and myeloid differentiation of human acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* 2006; 34(11): 1480-1489.
50. Imbert A, Eelkema R, Jordan S, Feiner H, Cowin P. Delta N89 β -catenin induces precocious development, differentiation, and neoplasia in mammary gland. *J Cell Biol* 2001; 153(3): 555-568.
51. Janssens N, Janicot M, Perera T. The Wnt-dependent signaling pathways as target in oncology drug discovery. *Invest New Drugs* 2006; 24(4): 263-280.
52. Jelinek DF, Tschumper RC, Stolovitzky GA, Iturria SJ, Tu Y, Lepre J, Shah N, Kay NE. Identification of global gene expression signature of B-CLL leukemia. *Mol Cancer Res* 2003; 1(5): 346-361.

53. Johnson S, Smith AG, Loffler H, Osby E, Juliusson G, Emmerich B, Wyld PJ, Hiddemann W. Multicentre prospective randomised trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (CAP) for treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukaemia. The French Cooperative Group on CLL. *Lancet* 1996; 347(9013): 1432-1438.
54. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, Parker AC, Castoldi GL, Guneo A, Knuutila S. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med* 1990; 323: 720-724.
55. Kalil N, Cheson BD. Chronic lymphocytic leukemia. *Oncologist* 1999; 4: 352-369.
56. Keating MJ, Kantarjian H, Talpaz M, Redman J, Koller C, Barlogie B, Velasquez W, Plunkett W, Freireich EJ, McCredie KB. Fludarabine: a new agent with major activity against chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1989; 74(1): 19-25.
57. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, Lerner S, Plunkett W, Giles F, Andreeff M, Cortes J, Faderl S, Thomas D, Koller C, Wierda W, Detry MA, Lynn A, Kantarjian H. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005; 23(18): 4079-4088.
58. Khan NI, Bendall LJ. Role of Wnt signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Histol Histopathol* 2006; 21: 761-774.
59. Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin in Hematol* 2000; 7(4): 223-234.
60. Klein U, Tu YH, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, Freedman A, Inghirami G, Cro L, Baldini L, Neri A, Califano A, Dalla-Favera R. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia levels reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001; 194: 1625-1638.
61. Leparrier M, Chevret S, Cazin B, Boudjerra N, Feugier P, Desablens B, Rapp MJ, Jaubert J, Autrand C, Divine M, Dreyfus B, Maloum K, Travade P, Dighiero G, Binet JL, Chastang C; French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. Randomized comparison of fludarabine, CAP, and CHOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood* 2001; 98(8): 2319-2325.

62. Lepourcelet M, Chen YN, France DS, Wang H, Crews P, Petersen F, Bruseo C, Wood AW, Shivdasani RA. Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/ β -catenin protein complex. *Cancer cell* 2004; 5(1): 91-102.
63. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998; 396: 580-584.
64. Löffler H, Rastetter J. Atlas der klinischen Hämatologie. Springer Verlag 1999: Berlin, Heidelberg, New York.
65. Lu D, Zhao Y, Tawatao R, Cottam HB, Sen M, Leoni LM, Kipps TJ, Corr M, Carson DA. Activation of the Wnt signaling pathway in CLL. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 3118-3123.
66. Luu HH, Zhang R, Haydon RC, Rayburn E, Kang Q, Si W, Park JK, Wang H, Peng Y, Jiang W, He TC. Wnt/ β -catenin signaling pathway as a novel cancer drug target. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4(8): 653-671.
67. Marzec M, Kasprzycka M, Lai R, Gladden AB, Wlodarski P, Tomczak E, Nowell P, Deprimo SE, Sadis S, Eck S, Schuster SJ, Diehl JA, Wasik MA. Mantle cell lymphoma cells express predominantly cyclin D1a isoform and are highly sensitive to selective inhibition of CDK4 kinase activity. *Blood* 2006; 108(5): 1744-1750.
68. Meinhardt G, Wendtner CM, Hallek M. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signaling pathways regulating cell growth and survival. *J Mol Med* 1999; 77: 282-293.
69. Mo H, Henriksson M. Identification of small molecules that induce apoptosis in a Myc-dependent manner and inhibit Myc-driven transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(16): 6344-6349.
70. Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H. XTcf-3 transcription factor mediates β -catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 1996; 86(3): 391-399.
71. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. Wnt and β -catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 2004; 5(9): 691-701.
72. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997; 275(5307): 1787-1790.

73. Nagy B, Lundan T, Larramendy ML, Aalto Y, Zhu Y, Niini T, Edgren H, Ferrer A, Vilpo J, Elonen E, Vettenranta K, Franssila K, Knuutila S. Abnormal expression of apoptosis-related genes in haematological malignancies: overexpression of Myc is poor prognostic sign in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 2003; 120: 434-441.
74. Nakagawa Y, Yamaguchi S, Hasegawa M, Nemoto T, Inoue M, Suzuki K, Hirokawa K, Kitagawa M. Differential expression of survivin in bone marrow cells from patients with acute lymphocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2004; 28(5): 487-494.
75. Nygren MK, Dosen G, Hystad ME, Stubberud H, Funderud S, Rian E. Wnt3A activates canonical Wnt signalling in acute lymphoblastic leukaemia (ALL) cells and inhibits the proliferation of B-ALL cell lines. *Br J Haematol* 2007; 136(3): 400-413.
76. Omer CA, Miller PJ, Diehl RE, Kral AM. Identification of Tcf4 residues involved in high-affinity beta-catenin binding. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256(3): 584-590.
77. Pangalis GA, Vassilakopoulos TP, Dimopoulou MN, Siakantaris MP, Kontopidou FN, Angelopoulou MK. B-chronic lymphocytic leukemia: practical aspects. *Hematol Oncol* 2002; 20: 103-146.
78. Paul JT, Henson ES, Mai S, Mushinski FJ, Cheang M, Gibson SB, Johnston JB. Cyclin D expression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2005; 46(9): 1275-1285.
79. Pavletic ZS, Arrowsmith ER, Bierman PJ, Goodman SA, Vose JM, Tarantolo Sr, Stein RS, Bociek G, Greer JP, Wu CD, Kollath JP, Weisenburger DD, Kessinger A, Wolff SN, Armitage JO, Bishop MR. Outcome of allogeneic stem cell transplantation for B cell chronic lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25(7): 717-722.
80. Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis – a look outside the nucleus. *Science* 2000; 287(5458): 1606-1609.
81. Pezzella F, Gatter KC, Mason DY, Bastard C, Duval C, Krajewski A, Tumer GE, Ross FM, Clark H, Jones DB. Bcl-2 protein expression in follicular lymphomas in absence of 14-18 translocation. *Lancet* 1990; 336: 1510-1511.
82. Plate JM, Petersen KS, Buckingham L, Shahidi H, Schofield CM. Gene expression in chronic lymphocytic leukemia B cells and changes during induction of apoptosis. *Exp Hematol* 2000; 28: 1214-1224.

-
83. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes & Development* 2000; 14(15): 1837-1851.
 84. Poy F, Lepourcelet M, Shivdasani RA, Eck MJ. Structure of a human Tcf4- β -catenin complex. *Nat Struct Biol* 2001; 8(12): 1053-1057.
 85. Preiß, Dornoff, Hagmann, Schmieder. Taschenbuch Onkologie 2006/07. Zuckschwerdt Verlag
 86. Qiang YW, Endo Y, Rubin JS, Rudikoff S. Wnt signaling in B-cell neoplasia. *Oncogene* 2003; 22(10): 1536-1545.
 87. Raphael B, Andersen JW, Silber R, Oken M, Moore D, Bennett J, Bonner H, Hahn R, Knospe WH, Mazza J. Comparison of chlorambucil and prednisone versus cyclophosphamide, vincristine, and prednisone as initial treatment for chronic lymphocytic leukemia: long-term follow-up of an Eastern cooperative Oncology Group randomized clinical trial. *J Clin Oncol*. 1991; 9(5): 770-776.
 88. Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, Botteman MF, Pashos CL. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocyte leukaemia. *Eur J Cancer Care* 2004; 13:279-287.
 89. Reed JC. Bcl-2 family proteins in regulation of apoptosis and chemoresistance in B-CLL. *Hematol Cell Ther* 1997; 39: 22-24.
 90. Reya T, O'Riordan M, Okamura R, Devaney E, Willert K, Nusse R, Grosschedl R. Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity* 2000; 13(1): 15-24.
 91. Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissmann IL. A role for WNT signaling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2003; 432:409-414.
 92. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005; 434(7035): 843-850.
 93. Rice PL, Kelloff J, Sullivan H, Driggers LJ, Beard KS, Kuwada S, Piazza G, Ahnen DJ. Sulindac metabolites induce caspase- and proteasome-dependent degradation of beta-catenin protein in human colon cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2003; 2(9): 885-892.
 94. Robak T. Therapy for chronic lymphocytic leukaemia with purine nucleoside analogues: facts and controversies. *Drugs Aging* 2005; 22(12): 983-1012.

95. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1995; 333: 1052-1057.
96. Rücker G, Neugebauer M, Willems GG. Instrumentelle pharmazeutische Analytik. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1992.
97. Rummel MJ, Kafer G, Pfreundschuh M, Jäger E, Reinhardt U, Mitrou PS, Hoelzer D, Bergmann L. Fludarabine and epirubicin in the treatment of chronic lymphocytic leukaemia: a German multicenter phase II study. *Ann Oncol* 1999; 10(2): 183-188.
98. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(10): 5522-5527.
99. Simon M, Grandage VL, Linch DC, Khwaja A. Constitutive activation of the Wnt/ β -catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia. *Oncogene* 2005; 24(14): 2410-2420.
100. Skokowa J, Cario G, Uenal M, Schambach A, Germeshausen M, Battmer K, Zeidler C, Lehmann U, Eder M, Baum C, Grosschedl R, Stanulla M, Scherr M, Welte K. LEF-1 is crucial for neutrophil granulopoiesis and its expression is severely reduced in congenital neutropenia. *Nat Med* 2006; 12(10): 1191-1197.
101. Stilgenbauer S, Liebisch P, James MR, Schroder M, Schlegelberger B, Fischer K, Bentz M, Lichter P, Döhner H. Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.3-923.1 in lymphoproliferative disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 11837-11841.
102. Stilgenbauer S, Bullinger L, Benner A, Wildenberger K, Bentz M, Döhner K, Ho AD, Lichter P, Döhner H. Incidence and clinical significance of 6q deletions in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 1331-1334.
103. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Döhner H, German CLL Study Group (GCLLSG). Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V_H gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia* 2002; 16(6): 993-1007.
104. Stilgenbauer S, Döhner H. Campath-1H-induced complete remission of chronic lymphocytic leukemia despite p53 gene mutation and resistance to chemotherapy. *N Engl J Med* 2002; 347(6): 452-453.
105. Sukhdeo K, Mani M, Zhang Y, Dutta J, Yasui H, Rooney MD, Carrasco DE, Zheng M, He H, Tai YT, Mitsiades C, Anderson KC, Carrasco DR. Targeting the beta-catenin/TCF transcriptional com-

- plex in the treatment of the multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(18): 7516-7521.
106. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD 95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Research* 1998; 58(23): 5315-5320.
107. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today* 1994; 15: 450-454
108. Thompson WJ, Piazza GA, Li H, Fetter J, Zhu B, Sperl G, Ahnen D, Pamukcu R. Exisulind induction of apoptosis involves guanosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase inhibition, protein kinase G activation, and attenuated beta-catenin. *Cancer Res* 2000; 60(13): 3338-3342.
109. Travis A, Amsterdam A, Belanger C, Grosschedl R. LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function. *Genes Dev* 1991; 5(5): 880-894.
110. Vallat L, Magdelenat H, Merle-Beral H, Masdehors P, Potocki de Montalk G, Davi F, Kruhoffer M, Sabatier L, Orntoft TF, Delic J. The resistance of B-CLL cells to DNA damage-induced apoptosis defined by DNA microarrays. *Blood* 2003; 101: 4598-5606.
111. Van Genderen C, Okamura RM, Farinas I, Quo RG, Parslow TG, Bruhn L, Grosschedl R. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev* 1994; 8(22): 2691-2703.
112. Vitale B, Martinis M, Antica M, Kusic B, Rabatic S, Gagro A, Kusec R, Jaksic B. Prolegomenon for chronic lymphocytic leukaemia. *Scand J Immunol* 2003; 58: 588-600.
113. Weiss RB, Donehower RC, Wiernik PH, Ohnuma T, Gralla RJ, Trump DL, Baker JR Jr, Van Echo DA, Von Hoff DD, Leyland-Jones B. Hypersensitivity reactions from taxol. *J Clin Oncol* 1990; 8(7): 1263-1268.
114. Wendtner CM, Eichhorst BF, Hallek MJ. Advances in chemotherapy for chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 2004; 41(3): 224-233.
115. Wendtner CM, Ritgen M, Schweighofer CD, Fingerle-Rowson G, Campe H, Jäger G, Eichhorst B, Busch R, Diem H, Engert A, Stilgenbauer S, Döhner H, Kneba M, Emmerich B, Hallek M; German CLL Study Group (GCLLSG). Consolidation with alemtuzumab in pa-

-
- tients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) in first remission – experience on safety and efficacy within a randomized multicenter phase III trial of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Leukemia* 2004; 18(6): 1093-1101.
116. Wierda WG, O'Brien SM. Initial therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006; 33: 202-209.
117. Winkler D, Döhner H, Stilgenbauer S. Genetics, gene expression, and target therapies in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Drug Targets* 2006; 7: 1313-1327.
118. Yee KWL, O'Brien SM. Chronic lymphocytic leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 2006; 81(8): 1105-1129.
119. Yuille MR, Matutes E, Marossy A, Hilditch B, Catovsky D, Houlston RS. Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *Br J Haematol* 2000; 109(4): 794-799.
120. Zhang T, Otevrel T, Gao ZQ, Ehrlich SM, Fields JZ, Boman BM. Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 8664-8667.
121. Zwiebel JA, Cheson BD. Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognostic factors. *Semin Oncol* 1998; 25: 42-59.

7. Vorabveröffentlichungen

1. Kumar Gandhirajan R, Staib P, Hempsch B, Minke K, Gehrke I, Schinköthe T, Plickert G, Schlösser A, Schmitt E, Hallek M, Kreuzer KA. Inhibition of β -Catenin/Lymphoid Enhancer-Binding Factor-1 Selectively Induce Apoptosis in B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. submitted

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Birgit Hemsch
Geburtsdatum	07. Februar 1980
Geburtsort	Düren
Konfession	Römisch-katholisch
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	ledig

Ausbildung

1986 – 1990	Grundschule "Im Pesch", Düren
1990 – 1999	Stiftisches Gymnasium, Düren Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
10/99 – 10/03	Studium der Pharmazie, Rheinische Friedrich-Wilhelm Universität Bonn
04/02	1. Staatsexamen Pharmazie, Bonn
10/03	2. Staatsexamen Pharmazie, Bonn
02/05	3. Staatsexamen Pharmazie, Düsseldorf
03/05	Approbation zur Apothekerin
seit 03/05	Promotionsstudium an der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

Berufliche Tätigkeit

01/04 – 06/04	Praktisches Jahr, University of Florida, USA
07/04 – 12/04	Praktisches Jahr, Adalbert-Apotheke, Aachen
04/05 – 09/07	Apothekerin in mehreren Kölner Apotheken in ununterbrochener Teilzeittätigkeit
seit 10/07	Clinical Supply Coordinator bei UCB/Schwarz Biosciences GmbH, Monheim

Köln, den

Birgit Hemsch