

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

**Microarray-definierte Identifizierung des
Lipidmetabolismus als neue Therapieoption in der
Chronischen Lymphatischen Leukämie –
spezifische Apoptoseinduktion durch den
Lipoproteinlipaseinhibitor Orlistat**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Janine Schwamb
aus Köln

Promoviert am 22. April 2009

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. J. Klosterkötter

1. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. C.-M. Wendtner

2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. P. Nürnberg

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 sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herrn Dr. med. C. P. Pallasch

Herrn Prof. Dr. med. C. M. Wendtner

Herrn Prof. Dr. med. J. L. Schultze

Herrn Prof. Dr. A. Ultsch

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 vorliegenden 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 1. September 2008

Janine Schwamb

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind von mir nach entsprechender Anleitung durch Herrn Dr. med. C. P. Pallasch im Labor der Arbeitsgruppe „Zelluläre Immuntherapie“ der Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln unter der Leitung von Prof. Dr. med. C. M. Wendtner, Kerpener Str. 62, 50937 Köln, durchgeführt worden.

Danksagung

Ich danke herzlich Herrn Prof. Dr. med. M. Hallek, dass er mir die Möglichkeit eröffnet hat, in seiner Klinik die für meine Promotion notwendigen Forschungen realisieren zu können.

Mein weiterer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. C.M. Wendtner für die Bereitstellung des Themas und dass er mir die Durchführung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglichte.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. med. C. Pallasch für die hilfsbereite und geduldige Einführung in die Thematik und Laboratoriumsmethoden, für die hervorragende Betreuung sowie für die ständige Bereitschaft, offenstehende Fragen mit mir zu diskutieren und zu klären.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. med. J.L. Schultze, Svenja Debey sowie Julia Claasen und Mirela Stecki für die Hilfe bei der Durchführung der Microarray-Genexpressionsanalyse. Ebenfalls bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des MTBTI der Universität zu Köln für ihre gern gewährte Hilfe.

Herrn Dr. A. Ultsch möchte ich herzlich für die Durchführung der bioinformatischen Auswertung danken.

Alexandra Schulz, Reinhild Brinker, Sonja Königs, Nadine Kutsch und Sabine Ulbrich gilt mein Dank für die angenehme und amüsante Arbeitsatmosphäre sowie für die fortwährende Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

*Für meine Familie, die mir jederzeit zur
Seite gestanden und mich unterstützt hat*

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	10
1 EINLEITUNG	15
1.1 Die chronische lymphatische Leukämie.....	15
1.1.1 Grundsätzliche Fakten	15
1.1.2 Stadieneinteilung der CLL nach Binet [8]	16
1.1.3 Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie	16
1.2 Prognostische Marker in der CLL	17
1.2.1 IgV _H -Hypermutation	17
1.2.2 Expression von CD38	18
1.2.3 Expression von ZAP-70	18
1.2.4 Zytogenetik	19
1.3 Der B-Zell-Rezeptor (BCR)	19
1.3.1 Aufbau und Struktur des B-Zell-Rezeptors.....	19
1.3.2 Intrazellulärer Signalweg nach Antigenbindung durch den BCR.....	21
1.3.3 Somatische Hypermutation	22
1.4 Bedeutung der Microarrays in der chronischen lymphatischen Leukämie	23
1.4.1 Genomweite Transkriptionsanalyse	23
1.4.2 Bedeutende Resultate von Microarray-Analysen in der CLL.....	23
1.4.3 Ziel der Microarray-Analyse in dieser Arbeit	24
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 Material	25
2.1.1 Geräte	25
2.1.2 Verbrauchsmaterial	27

2.1.3	Chemikalien, Bioreagenzien und fertig zum Gebrauch erhältliche Baukästen	28
2.1.4	Enzyme	30
2.1.5	Immunreagenzien, Proteine, Inhibitoren	30
2.1.6	Antibiotika	31
2.1.7	Antikörper.....	31
2.1.8	Primer, Nukleotide [71].....	32
2.1.9	Angesetzte Lösungen	33
2.1.10	Benutzte Software	36
2.2	Methoden.....	36
2.2.1	Patientenproben.....	36
2.2.2	Lymphozytenaufbereitung.....	37
2.2.2.1	Isolierung der Lymphozyten aus peripherem Blut.....	37
2.2.2.2	Immunomagnetische Isolierung von gesunden B-Lymphozyten (MACS)	38
2.2.2.3	Zellzählung	41
2.2.3	Durchflusszytometrische Messung (FACS).....	41
2.2.3.1	Messung der Expression von IgM, IgG, CD79a, CD79b.....	42
2.2.3.2	Messung der Expression von CD38.....	43
2.2.3.3	Intrazelluläre Messung von ZAP-70	43
2.2.3.4	Messung und Analyse apoptotischer Zellen	44
2.2.4	Stimulationen	45
2.2.4.1	Stimulation mit anti-IgM Immunobeads.....	45
2.2.4.2	Stimulation mit anti-IgA Immunobeads	46
2.2.5	Extraktion und Aufbereitung von Nukleinsäuren	46
2.2.5.1	RNA-Isolation.....	46
2.2.5.2	Extraktion genomischer DNA	48
2.2.5.3	cDNA-Synthese	49
2.2.6	Microarray-Genexpressionsanalyse.....	49
2.2.7	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	50
2.2.7.1	Bestimmung des IgV _H -Mutationsstatus.....	50
2.2.7.2	Agarose-Gel-Elektrophorese.....	51

2.2.7.3	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	52
2.2.7.4	Sequenzierungs-PCR	52
2.2.7.5	Auswertung der Sequenzen.....	53
2.2.7.6	Real-Time-PCR (RT-PCR).....	54
2.2.8	Zellkultur	55
2.2.9	Inhibition der Lipoproteinlipase (LPL).....	56
2.2.9.1	Behandlung der Zellen mit Orlistat.....	56
2.2.9.2	Behandlung der Zellen mit Orlistat und Fludarabin.....	56
2.2.9.3	Messung apoptotischer Zellen	57
2.2.9.4	Viabilitätsprüfung mittels XTT-Assay	57
2.2.10	Nachweis von Proteinen.....	58
2.2.10.1	Herstellung von Proteinlysaten	58
2.2.10.2	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	58
2.2.10.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen.....	59
2.2.10.4	Western Blot	60
2.2.11	Statistik.....	61
3	ERGEBNISSE.....	64
3.1	Patientendaten.....	64
3.1.1	Daten der Patienten der Microarray-Genexpressionsanalyse.....	64
3.1.2	Daten der Patienten der Orlistat-Behandlung	65
3.2	Microarray-Genexpressionsanalyse	67
3.3	Lipoproteinlipase (LPL).....	72
3.4	Einfluss von Orlistat auf CLL-Zellen	78
4	DISKUSSION.....	86
4.1	Microarray-Genexpressionsanalyse	86
4.2	Lipoproteinlipase (LPL).....	90

4.3	Einfluss von Orlistat auf CLL-Zellen	92
4.4	Ausblick.....	94
5	ZUSAMMENFASSUNG	96
6	SUMMARY	97
7	LITERATURVERZEICHNIS	98
8	ERKLÄRUNG ZU VORABVERÖFFENTLICHUNGEN.....	114
9	LEBENS LAUF	116

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Asp	Aspartin
BCR	B-Zell-Rezeptor
BLNK	B-cell linker-Protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	Circa
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA (komplementäre DNA)
C _H	Konstante Region der schweren Kette
CHOP	Cyclophosphamid+Doxorubicin+Vincristin+Prednison
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
COP	Cyclophosphamid+Vincristin+Prednison
COX-2	Cyclooxygenase 2
DAG	Diacylglycerin
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat

DOC1	Downregulated in ovarian cancer 1
DSCR1	Down syndrome candidate region 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Expressionsrate
Fab	Fragment antigen binding (variable Region von Immunglobulinen)
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAS	Fatty acid synthase (Fettsäuresynthase)
Fc	Fragment crystallizable (konstante Region von Immunglobulinen)
FC	Fludarabin+Cyclophosphamid
FCR	Fludarabin+Cyclophosphamid+Rituximab
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Flourescein Isothiocyanat
FOR	Forward (bei Vorwärtsprimern)
FR	Gerüstregion
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
G	Guanin
g	Gramm
GEF	Guanine-nucleotide exchange factors
Gly	Glycin
GO-Term	Gene Ontology-Term
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{dd}	Didestilliertes Wasser
HRP	Horse-radish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IC50	Halbmaximale Wirkkonzentration
ICE	Interleukin-1-β-converting enzyme
IER3	Immediate early response 3
IFN-γ	Interferon-gamma
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D

IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IgV _H	Variable Region der schweren Kette eines Immunglobulins
IL-1	Interleukin 1
IL-11	Interleukin 11
IP ₃	Inositrisphosphat
ITAMs	Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (Tyrosinaktivierungssequenzen von Immunrezeptoren)
IκBα	Inhibitor von NFκB
J _H	Joining (Verbindungs-) Element der schweren Kette
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LPL	Lipoproteinlipase
M	Mol
mA	Milliampère
MACS	Magnetisch-aktivierte Zellsortierung
MAP-Kinasen	Mitogenaktivierte Proteinkinasen
MDS	Multidimensionale Scaling-Analyse
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MYCN	V-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells (Kernfaktor aktivierter T- Zellen)
NFκB	Nuclear factor κB
nm	Nanometer

p	Kurzer Arm eines Chromosoms
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymerase
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PC5	Phycoerythrin cyanin 5
PCA	Principle component analysis
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PIP ₂	Phosphatidylinositibisphosphat
PLA2	Phospholipase A2
PLC (γ)	Phospholipase C (gamma)
PLD	Phospholipase D
pmol	Pikomolar
q	Langer Arm eines Chromosoms
REV	Reverse (bei Rückwärtsprimern)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time-PCR
s.o.	Siehe oben
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht)
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffer saline (Tris-Pufferlösung)
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin

TGF- β	Transforming growth factor β (Transformierender Wachstumsfaktor- β)
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
u.a.	Unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
V _H	Variable Region der schweren Kette
VLDL	Very-low-density-lipoproteins
Wnt	Wingless-type MMTV integration site family (-Signalweg)
ZAP-70	70-kD zeta-assoziiertes Protein

1 Einleitung

1.1 Die chronische lymphatische Leukämie

1.1.1 Grundsätzliche Fakten

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL), ein niedrigmalignes leukämisch verlaufendes B-Zell-Lymphom, stellt die häufigste Leukämieform der westlichen Welt dar mit zunehmender Häufigkeit in Industrieländern [11][13][105]. Die Inzidenz liegt bei 3 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr, wobei Männer fast doppelt so häufig betroffen sind wie Frauen. Erfahrungsgemäß erkranken eher ältere Menschen im Alter von 65-70 Jahren an dieser Leukämieform, obwohl mittlerweile bereits ein Drittel der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung jünger als 60 Jahre sind [11]. Die Krankheit zeigt eine sehr heterogene Verlaufsform mit fast völlig symptomlosen bis hin zu schwersten, therapiepflichtigen Verläufen [11].

Die Biologie der CLL ist durch eine Apoptosedysregulation charakterisiert mit der Folge, dass sich CLL-Zellen nicht dem programmierten Zelltod unterziehen [13][123]. Vielmehr kommt es zu einer klonalen Expansion und letztlich einer Akkumulation von monoklonalen B-Zellen (die entweder die Leichtkette κ oder λ exprimieren = Leichtkettenrestriktion) in peripheren Lymphorganen, Knochenmark und peripherem Blut [12][58]. Die Akkumulation der malignen Zellen ist hauptsächlich auf den oben erwähnten Apoptosedefekt zurückzuführen (Arretierung der CLL-Lymphozyten in der G_0 /frühen G_1 -Phase des Zellzyklus) [12], jedoch auch auf eine gesteigerte Zellteilung [19].

Als Oberflächenmarker für die CLL-Zellen sind besonders kennzeichnend CD5, CD19 und CD23 [12][13].

1.1.2 Stadieneinteilung der CLL nach Binet [8]

Stadium	Anzahl befallener Lymphknotenregionen	Hämoglobin (g/dl)	Thrombozyten (/ μ l)	mediane Überlebenszeit (Jahre)
A	< 3	> 10,0	normal	> 10
B	\geq 3	> 10,0	normal	7
C	irrelevant	< 10,0	< 100.000	2

1.1.3 Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie

Patienten, die sich im Binet-Stadium A befinden oder im Stadium B ohne entsprechende Symptomatik werden nicht therapiert, sondern in regelmäßigen Abständen einer Verlaufskontrolle unterzogen. Symptomatische Patienten im Binet-Stadium B (starke B-Symptome, Beschwerden durch große Lymphome, Hepato-/Splenomegalie) und alle Patienten im Stadium C bedürfen einer geeigneten Therapie, wobei bislang keine kurativen Therapieansätze existieren.

Das Purinanalogon Fludarabin stellt eine Standardoption in der Behandlung der CLL dar. Es kann sowohl als Primärtherapie als auch bei vorbehandelten Patienten angewendet werden [122].

Des Weiteren kommen – entweder als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Zytostatika – monoklonale Antikörper zur Anwendung, wie Rituximab (anti-CD20-Antikörper) oder Alemtuzumab (anti-CD52-Antikörper), welche gegen spezifische Oberflächenantigene gerichtet sind und über unterschiedliche Wirkmechanismen die CLL-Zellen abtöten [40].

Ein bedeutendes Schema und erste Wahl in der Behandlung der CLL ist jedoch eine Kombination aus Fludarabin plus Cyclophosphamid (FC-Protokoll). In diesem Zusammenhang wurde herausgefunden, dass die alleinige Gabe von Fludarabin der Kombination aus Fludarabin und Cyclophosphamid deutlich unterlegen war [28]; auch bei vorbehandelten Patienten zeigte das FC-Protokoll gute Ansprechraten [91]. Durch Hinzunahme von Rituximab zum FC-Protokoll (FCR) zeigten sich vielversprechende Behandlungserfolge sowohl in der Primärtherapie [55] als auch bei bereits behandelten Patienten [124][125].

1.2 Prognostische Marker in der CLL

Die chronische lymphatische Leukämie weist bekanntlich eine starke Heterogenität auf. Aufgrunddessen und um den klinischen Verlauf und die Therapiebedürftigkeit der Patienten abschätzen zu können, wurde nach geeigneten Prognosefaktoren gesucht, die im Folgenden dargestellt werden.

1.2.1 IgV_H-Hypermutation

In den IgV_H-Genen (Gene der variablen Region der schweren Kette von Immunglobulinen) der B- und CLL-Zellen finden nach Antigenkontakt somatische Hypermutationen statt. Dabei wird angenommen, dass mutierte CLL-Zellen von postgerminalen Zentrumszellen, unmutierte hingegen von prägerminalen Zentrumszellen abstammen [11]. Studien konnten jedoch zeigen, dass CLL-Zellen ein gemeinsames und gleichartiges Genexpressionsprofil aufweisen, und zwar unabhängig vom IgV_H-Mutationsstatus, was auf einen gemeinsamen Transformationsmechanismus oder einen Zellursprung hindeutet. Trotz allem konnte in diesen Studien aber auch eine limitierte Anzahl an Genen identifiziert werden, deren unterschiedliche Expression dennoch mit dem IgV_H-Status korrelierte und folglich für eine Vorhersage von CLL-Subtypen (mutiert versus unmutiert) herangezogen werden konnte [59][104].

Jeweils unabhängig vom Binet-Stadium zeigen CLL-Patienten mit einem unmutierten IgV_H-Hypermutationsstatus eine schnellere Krankheitsprogression und eine ungünstige Prognose, während Patienten mit mutierten IgV_H-Genen (50% aller CLL-Fälle) eine geringere Progression und eine deutlich bessere Prognose vorweisen [23][43][113]. Laut einer Studie lag die mittlere Überlebenszeit für Patienten im Binet-Stadium A mit unmutiertem IgV_H bei 79 Monaten, während Patienten mit mutiertem IgV_H eine durchschnittliche Überlebensrate von 152 Monaten erreichten [62].

Letztlich konnte dargelegt werden, dass, basierend auf dem Hypermutationsstatus der IgV_H-Gene, die CLL in 2 Untergruppen (mutiert versus unmutiert) mit jeweils unterschiedlichen klinischen Verläufen unterteilt werden kann [23][43].

1.2.2 Expression von CD38

Die Expression von CD38 wird ebenfalls als prognostischer Faktor genutzt. Patienten mit CD38-positiven CLL-Zellen weisen eine schlechtere Prognose auf als solche mit CD38-negativen Zellen [23][51]. Bisher ist jedoch nicht vollständig sicher, ob die CD38-Expression im Verlauf der Erkrankung konstant bleibt [44]. Aktuell konnte außerdem dargelegt werden, dass CD38-positive CLL-Zellen proliferieren, was u.a. zur schlechteren Prognose beiträgt [22]. Des Weiteren liegt eine Korrelation zum IgV_H-Mutationsstatus vor, d.h. CD38-positive Patienten besitzen unmutierte IgV_H-Gene, während CD38-Negativität auf einen mutierten IgV_H-Status hindeutet [23].

1.2.3 Expression von ZAP-70

Ein ebenfalls gängiger Prognosefaktor in der CLL stellt das 70-kD zeta-assoziierte Protein (ZAP-70) dar. Es ist ein Mitglied der Syk-ZAP-70-Proteintyrosinkinase-Familie und wird normalerweise in gesunden T-Zellen und natürlichen Killerzellen exprimiert, wo es die Signalgebung durch den T-Zell-Rezeptor initiiert [16]. CLL-Zellen exprimieren das Protein ZAP-70 unterschiedlich stark. In diesem Zusammenhang konnte in Studien demonstriert werden, dass ZAP-70 in der CLL zu einer verstärkten Signalgebung durch den B-Zell-Rezeptor beiträgt, unabhängig von IgV_H-Mutationen [18]. Die erhöhte Expression des Proteins deutet auf einen eher ungünstigen klinischen Verlauf hin und ist zudem meist mit einem unmutierten IgV_H-Mutationsstatus assoziiert [126], welcher ebenfalls eine schlechte Prognose vorhersagt [23][43]. Demzufolge kann die ZAP-70-Expression als Surrogatmarker für den IgV_H-Mutationsstatus herangezogen werden [21]. Im Vergleich zu diesem muss man jedoch anmerken, dass ZAP-70 eine stärkere Voraussagekraft bezüglich Krankheitsprogression und Therapienotwendigkeit aufweist [103].

1.2.4 Zytogenetik

Neben den bereits erwähnten Prognoseparametern gibt es weitere Indikatoren in der CLL, die eine ungünstige Entwicklung und schnellere Progression der Erkrankung voraussagen. Dazu zählen eine Lymphozytenverdopplungszeit von weniger als 12 Monaten, ein erhöhtes LDH im Serum, eine vermehrte Konzentration an β 2-Mikroglobulin, eine gesteigerte Serumthymidinkinaseaktivität (> 10 U/l), erhöhte Spiegel an löslichem CD23 im Serum sowie ein diffuses oder nicht-noduläres Knochenmarkinfiltrationsmuster [41][42][80][135].

Daneben werden aber auch Aberrationen in der molekularen Zytogenetik als Prognosefaktoren genutzt: Während sich sowohl ein normaler Karyotyp als auch eine Deletion 13q14 günstig auf den klinischen Verlauf auswirken, führt eine Trisomie 12, eine Deletion 11q22-23 (mit nachfolgend erniedrigter Expression des ATM-Gens) sowie eine Deletion 17p13.1 (mit anschließend reduzierter Expression des p53-Gens) zu einer schlechten Prognose [25]. Ebenfalls mit einem ungünstigen und aggressiven Krankheitsverlauf assoziiert sind chromosomale Translokationen [73].

1.3 Der B-Zell-Rezeptor (BCR)

1.3.1 Aufbau und Struktur des B-Zell-Rezeptors

B-Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche einen sogenannten B-Zell-Rezeptor (BCR), der spezifisch Antigene erkennen und binden kann. Dieser Rezeptor stellt ein Immunglobulinmolekül dar, welches in der Zellmembran verankert ist [121]. Ein solches Immunglobulinmolekül besteht aus insgesamt 4 Polypeptidketten: 2 leichte Ketten (25 kD, IgL – light chains) sowie 2 schwere Ketten (50 kD, IgH – heavy chains) werden durch Disulfidbrücken zusammengehalten. Die schweren und leichten Ketten sind in einem Molekül jeweils identisch, so dass 2 gleichartige Antigenbindungsstellen entstehen. Es lassen sich 2 Typen von leichten Ketten unterscheiden, λ und κ ($\kappa : \lambda = 2:1$). Demgegenüber existieren 5 Klassen von schweren Ketten: μ (IgM), δ (IgD), γ (IgG), α (IgA), ϵ (IgE). Sie bestimmen den Isotyp und somit auch die funktionelle Aktivität der Immunglo-

buline [52]. In der CLL wird meistens der IgM- und IgD-Subtyp von Immunglobulinen als BCR auf der Zelloberfläche schwach exprimiert [13].

Jede der 4 Polypeptidketten in einem Immunglobulinmolekül besitzt jeweils eine variable (V-Domäne) und eine konstante (C-Domäne) Region. Die konstanten Regionen der schweren Kette werden dabei in 3 Domänen (C_{H1-3}) unterteilt. Dabei bilden die kompletten leichten Ketten mit dem variablen Teil sowie der C_{H1} -Domäne der schweren Kette das Fab-Fragment (Fab = fragment antigen binding), das die Antigenbindungsstelle enthält. Die konstanten Domänen C_{H2} - C_{H3} der beiden schweren Ketten formen den Teil des Rezeptors, der in der Zellmembran fixiert ist; er wird auch als Fc-Fragment (fragment crystallizable) bezeichnet [52].

Der variable Bereich wird nochmals unterteilt in wenig variierende Gerüstregionen (framework regions) sowie hypervariable Regionen, welche für die Antigen-spezifität verantwortlich sind und zugleich die zum Antigen komplementäre Bindungsstelle bilden. Entsprechend werden diese Abschnitte auch als komplementaritätsbestimmende Regionen bezeichnet [52] (Abb. 1).

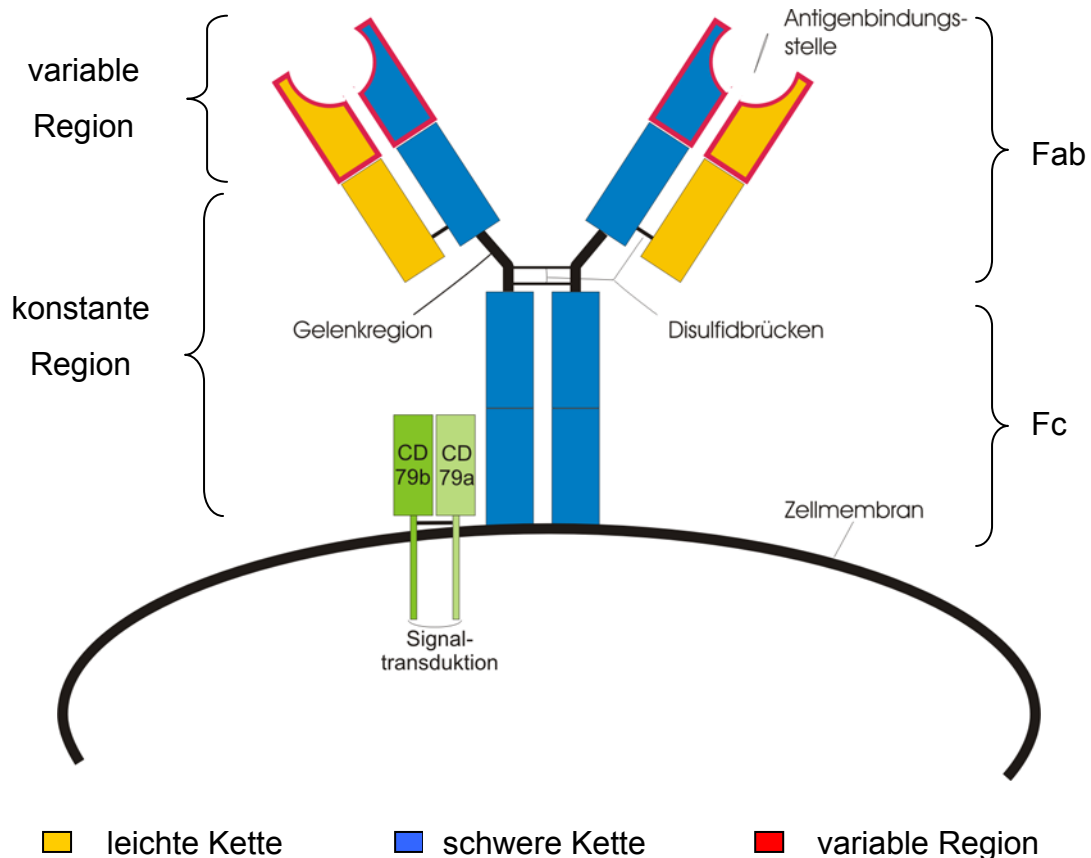


Abb. 1: Aufbau des B-Zell-Rezeptors (BCR): Der BCR ist ein Immunglobulinmolekül, welches in der Zellmembran verankert ist. Er besteht aus 2 leichten und 2 schweren Ketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Jede der 4 Polypeptidketten besitzt eine variable und eine konstante Region; die konstanten Regionen der schweren Kette werden dabei in 3 Domänen (C_H1-3) unterteilt. Die leichte Kette bildet mit der variablen Region und der C_H1 -Domäne der schweren Kette das Fab-Fragment mit der Antigenbindungsstelle, die konstanten Domänen C_H2-3 der schweren Ketten bilden das Fc-Fragment.

1.3.2 Intrazellulärer Signalweg nach Antigenbindung durch den BCR

Der intrazelluläre Signalweg der B-Zellen wird durch Bindung eines zum BCR komplementären Antigens gestartet. Es kommt dadurch zu einer Quervernetzung des Rezeptors, wodurch die Src-Tyrosinkinasen Blk, Fyn und Lyn aktiviert werden. Diese sind nun in der Lage, die ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activations motifs) an der zytosmatischen Seite von CD79a und b zu phosphorylieren, so dass anschließend die Syk-Tyrosinkinase an das phospho-

rylierte CD79b binden kann und aktiviert wird. Mithilfe von Syk können nun weitere Moleküle aktiviert werden, wie CD19, BLNK (b-cell linker-Protein) oder GEF (guanine-nucleotide exchange factors). BLNK rekrutiert Tec-Kinasen, welche nachfolgend Phospholipase C- γ (PLC- γ) aktivieren. Die zuletzt genannte Lipase spaltet Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃). DAG zusammen mit Kalzium führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase C, die letztlich den Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert. Demgegenüber setzt IP₃ intrazelluläres Kalzium frei, wodurch die Phosphatase Calcineurin und durch diese wiederum der Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activated T-cells) aktiviert werden. Eine weitere Möglichkeit, Transkriptionsfaktoren zu aktivieren, wird durch GEFs vermittelt, die zu einer Aktivierung kleiner G-Proteine wie Ras führen. Diese GTP-bindenden Proteine setzen die MAP-Kinasen-Kaskaden in Gang; aktivierte MAP-Kinasen (mitogenaktivierte Proteinkinasen) können dann im Kern entsprechende Transkriptionsfaktoren aktivieren. Im speziellen Fall der von Ras aktivierten Kinase-Kaskade kommt es zu einer Aktivierung von Fos, einem Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1.

Zusammenfassend führt also die Bindung eines Antigens durch den BCR über verschiedene Signalwege zu einer Aktivierung einzelner Transkriptionsfaktoren, die letztlich spezifisch Gene regulieren. [52]

1.3.3 Somatische Hypermutation

Im Zusammenhang mit den prognostischen Faktoren wurde bereits der Begriff der somatischen Hypermutation erwähnt. Dabei handelt es sich um Punktmutationen in den variablen Regionen der schweren und leichten Kette, so dass ein mutierter BCR auf der Oberfläche exprimiert wird [94][97]. Durch die somatische Hypermutation kommt es zu einer gesteigerten Affinität des Rezeptors zu dem passenden Antigen; mutierte Zellen werden bezüglich verstärkter Antigenbindung entsprechend positiv selektiert [27][129]. Die Anzahl der Punktmutationen ist im Vergleich zu der spontanen Mutationsrate um ein Vielfaches erhöht. Darüber hinaus finden sie bevorzugt in bestimmten Berei-

chen, sogenannten hotspots, statt [6][97]. In der CLL spielt die somatische Hypermuation im Hinblick auf die Prognose eine bedeutende Rolle (vgl. 1.2.1 IgV_H-Hypermuation).

1.4 Bedeutung der Microarrays in der chronischen lymphatischen Leukämie

1.4.1 Genomweite Transkriptionsanalyse

Die Technologie der Microarrays ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung von mehreren individuellen Proben in Hinblick auf eine unterschiedliche Expression verschiedener Gene genomweit. Dazu muss zunächst RNA aus den zu untersuchenden Proben isoliert werden, die zu cDNA umgeschrieben wird (reverse Transkription und anschließende Synthese zu Doppelstrang-cDNA). Nach erfolgter *in vitro* Transkription zu biotynlierter cRNA kann diese auf einen Chip, in diesem Fall auf den Illumina WG6 Bead Chip (> 46.000 Transkripte; Illumina, San Diego, CA, USA) aufgetragen und hybridisiert werden. Dabei verbinden sich die cRNA-Teile mit der jeweiligen komplementären DNA (DNA-Sequenzen aus bekannten Genen) auf dem Chip. Durch Markierung der cRNA mit einem Farbstoff lassen sich mittels Fluoreszenzsignal die genauen Positionen und Intensitäten der verbundenen cRNA/DNA-Sequenzen durch einen Laser identifizieren und anschließend dekodieren.

1.4.2 Bedeutende Resultate von Microarray-Analysen in der CLL

Mithilfe der Microarray-Technologie konnten in den letzten Jahren grundlegende Charakteristika in der CLL aufgedeckt werden. So z.B. zeigten Genexpressionsanalysen, dass sich IgV_H-mutierte gegenüber IgV_H-unmutierten CLL-Zellen durch die Expression in einigen 100 Genen unterscheiden [59][104]. Dies führte zu der Identifizierung des Proteins ZAP-70, welches u.a. die beiden CLL-Subtypen mit deutlich erhöhten Expressionswerten in IgV_H-unmutierten Fällen differenzieren konnte [104]. Auch in einer weiteren Studie war ZAP-70

das beste und eindeutigste Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden CLL-Subtypen (mutiert versus unmutiert) [126].

Neben ZAP-70 wurden auch die Gene LPL (Lipoproteinlipase) und ADAM29 bzw. die LPL/ADAM29-Ratio mittels Microarrays als neue prognostische Faktoren in der CLL und als potentielle Differenzierungsmöglichkeiten zwischen IgV_H-mutierten und -unmutierten Typen identifiziert [93].

Die zunehmende Anwendung der Microarray-Technologie in der Analyse von Genexpressionsprofilen durch verschiedenste Arbeitsgruppen zeigt die zentrale Bedeutung dieser Methode und bietet zudem die Möglichkeit, prognostische Faktoren, spezifische Targets (z.B. Fibromodulin als ein Tumor-assoziiertes Antigen [72]) und Pathways in der CLL aufzudecken und darzustellen.

1.4.3 Ziel der Microarray-Analyse in dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurde eine Microarray-Genexpressionsanalyse von CLL-Zellen (n=8) und gesunden Spenderzellen (n=5) als physiologisches Korrelat durchgeführt, wobei sowohl ein Teil der CLL- als auch der gesunden Zellen BCR-stimuliert wurden, während der Rest der beiden Gruppen BCR-unstimuliert verblieb. Ziel war es, mithilfe der Microarray-Analyse relevant durch die BCR-Stimulation regulierte Gene, Gengruppen oder gar Pfade bzw. Signalwege in der CLL zu identifizieren und nachfolgend mögliche Schlussfolgerungen zu ziehen und Hypothesen aufzustellen. Darüber hinaus ist es ebenfalls möglich, mittels Microarrays potentielle therapeutische Agenzien für die CLL in Hinblick auf ihre Wirksamkeit zu prüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammern	Subcell GT, Bio Rad, Hercules, CA, USA
Analysenwaage	BL310, Sartorius, Göttingen, D
Autoklav	Varioklav, Oberschleißheim, D
Begasungsbrutschrank	Heraeus, Hanau, D
Durchflusszytometer	FACS Canto, BD, Heidelberg, D
Eismaschine	Scotsman, Vernon Hills, IL, USA
Elektroblot Apparatur	MiniTrans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio Rad, Hercules, CA, USA
ELISA-Reader	Dynatech MR 5000, Ashford, UK
ELISA-Reader	SLT Labinstrument, Crailsheim, D
Filmkassetten	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England, UK
Handstückzähler	IVO, Villingen-Schwenningen, D
Kipproller	Stuart ‚SRT1‘, Barloworld Scientific, Staffordshire, UK
Kühlschrank (4 °C)	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, D
Kühltruhe (-20 °C)	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, D
Kühltruhe (-80 °C)	Heraeus, Hanau, D
MACS-Multisort-Ständer und - Magneten	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Magnetrührer	MR3001, Heidolph, Schwabach, D
Mikroliterpipetten	Gilson, Middleton, WI, USA
Mikroskop	‚SM Lux‘, Leitz, Wetzlar, D
Mikroskop	‚Telaval 31‘, Zeiss, Oberkochen, D
Mikrowellengerät	Continent, D
Multipette	‚HandyStep‘, Brand, Wertheim, D

Nanodrop	'ND-1000', Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA
Neubauer-Zell-Zählkammer	Brand, Wertheim, D
PCR-Maschine	,'T3 Thermocycler', Biometra, Göttingen, D
pH-Meter	,'646', Knick, Berlin, D
Photometer	BioPhotometer U1.32', Eppendorf, Hamburg, D
Pipettierhilfe (elektrisch)	,'accu-jet', Brand, Wertheim, D
Polyacrylamid-Gelelektrophoresekammern	,'P&DS', Owl Separation Systems, Portsmouth, NH, USA
Röntgenfilmentwicklermaschine	,'CURIX 60', AGFA, Köln, D
RT-PCR-Maschine	,'Lightcycler 1.5', Roche, Grenzach-Wyhlen, D
Schüttler	UniEquip, 'UNITWIST', München, D
Schweißgerät	,'Coniform 300', Joisten + Kettenbaum, Bergisch Gladbach, D
Spannungsgeber	'PowerPac 300', BioRad, Hercules, CA, USA; Pharmacia, Wien, A
Sterilbank	Microflow; clanLAF VFR1206GS, DK
Thermomixer	,'Thermomixer comfort', Eppendorf, Hamburg, D
Thermo-Schüttelschrank	,'innova 4230', New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Ultraschall (Becken)	'Sonorex TK 52', Bandelin, Berlin, D
UV-Transiluminator	MWG-Biotech, Ebersberg, D
Vortexer	'Vortex-Genie2', SCIENTIFIC INDUSTRIES, Bohemia, NY, USA
Wasserbad	P-D Industriegesellschaft mbH, Dresden, D
Zentrifugen (Rotoren)	- Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg, D - Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg, D - Centrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg, D

- Minifuge T, Heraeus, Hanau, D
- JG-ME, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
- Varifuge RF, Heraeus, Hanau, D

2.1.2 Verbrauchsmaterial

6-Loch-Platten	Nunc, Wiesbaden, D
12-Loch-Platten	Nunc, Wiesbaden, D
96-Loch-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Deckgläser	Thermo electron corporation , Waltham, MA, USA
Einwegpipettenspitzen	Brand, Wertheim, D; Sarstedt, Nümbrecht, D
Einwegpipettenspitzen (gestopft)	ART Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA
Einwegskalpell	Feather Safety Razor Co., Japan
Eppendorf, Hamburg, D- Reaktionsgefäße (1,5 ml + 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D; Sarstedt, Nümbrecht, D
FACS-Röhrchen (5 ml, Rundboden)	BD Falcon, Erembodegem, B
Falcon-Reaktionsgefäße (15 ml + 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Gewebekulturflaschen (25 cm ² + 75 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Latex-Handschuhe	Meditrade ‚Gentle Skin‘, Kiefersfelden, D
LightCycler-Kapillaren (20 µl)	Roche, Grenzach-Wyhlen, D
MACS-Säulen (LS, MS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Nitril-Handschuhe (puderfrei)	Meditrade ‚Nitril 3000‘, Kiefersfelden, D
Nitrocellulosemembran	‚Hybond‘, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England, UK
Parafilm	American National Can, Chicago, IL, USA
PCR-Gefäße (einzeln und 8er-Reihe)	Brand, Wertheim, D
Perfusor-Spritze (50 ml)	Braun, Wertheim, D

Photometerküvetten	Sarstedt, Nümbrecht, D; Eppendorf, Hamburg, D
Röntgenfilme	,Hyperfilm ECL', Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England, UK
serologische Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sterilfilter (0,20 µm)	,Sartolab – P20', Sartorius, Göttingen, D
Tücher (Kimwipes)	Kimberly-Clark, Forchheim, D
Zellsieb (40 µm Nylon)	BD Falcon ,cell strainer', Erembodegem, B

2.1.3 Chemikalien, Bioreagenzien und fertig zum Gebrauch erhältliche Baukästen

2 mM dNTP Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Agarose	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA,
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Sigma, Steinheim, D
Annexin V Binding Buffer, 10x Concentrate	BD Biosciences, Erembodegem, B
β-Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol)	ROTH, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	ROTH, Karlsruhe, D
BSA (Albumin)	Biomol, Hamburg, D
cDNA-Synthese Kit	Roche, Grenzach-Wyhlen, D
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche, Grenzach-Wyhlen, D
CellWash (für FACS)	BD Biosciences, Erembodegem, B
Chloroform	Merck, Darmstadt, D
Desoxycholsäure-Natriumsalz	ROTH, Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	ROTH, Karlsruhe, D
Dinatriumhydrogenphosphat	ROTH, Karlsruhe, D
ECLTM Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England, UK
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	ROTH, Karlsruhe, D

Essigsäure	ROTH, Karlsruhe, D
Ethanol (99,8%)	ROTH, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid	ROTH, Karlsruhe, D
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, S
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Glycerin	ROTH, Karlsruhe, D
Glycin	ROTH, Karlsruhe, D
HEPES	Sigma, Steinheim, D
High Fidelity PCR-Puffer+MgCl ₂ 10x (#K 0192)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Igepal CA-630	Sigma, Steinheim, D
IMDM-Medium	Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Isopropanol/2-Propanol	ROTH, Karlsruhe, D
Kaliumchlorid	ROTH, Karlsruhe, D
Kaliumdihydrogenphosphat	ROTH, Karlsruhe, D
Methanol	ROTH, Karlsruhe, D
Milchpulver (fettarm)	ROTH, Karlsruhe, D
Natriumazid	Sigma, Steinheim, D
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
PageBlue-Staining Solution (Coomassie)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
PBS (D-PBS)	Gibco (Invitrogen), Paisley, Scotland, UK
PCR Aufreinigungskit (Purification Kit)	Qiagen, Hilden, D
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	ROTH, Karlsruhe, D
Polyacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	ROTH, Karlsruhe, D
Proteinkonzentrationsbestimmungs- Kit [Roti-Quant Universal-Reagenz (1+2)]	ROTH, Karlsruhe, D
RNA-Aufreinigungs-Kit	Qiagen, Hilden, D
RosetteSep – Human B-Cell	StemCell Technologies Inc, Vancouver,

Enrichment Cocktail, Catalog# 15064	Canada
RPMI 1640 + L-Glutamin	Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
RT-PCR TaqMan Master Kit	Roche, Grenzach-Wyhlen, D
SDS ultrapure	ROTH, Karlsruhe, D
TEMED	ROTH, Karlsruhe, D
TE-Puffer	Qiagen, Hilden, D
Tris-Base	ROTH, Karlsruhe, D
Triton X-100	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England, UK
Trizol	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Tween-20 (Polysorbat 20)	Caelo, Hilden, D
Wasser, steril	Braun, Melsungen, D; Fermentas, St. Leon-Rot, D
Zellfixierung (CellFIX)	BD Biosciences, Erembodegem, B
Zellpermeabilisierungs-Kit (Fix & Perm)	Caltag Laboratories, Hamburg, D

2.1.4 Enzyme

BigDye Terminator, v3.1 Cycle, Sequencing RR-100	AB, Foster City, CA, USA
HighFidelity PCR Enzyme Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, D

2.1.5 Immunreagenzien, Proteine, Inhibitoren

7-AAD	BD Biosciences, Erembodegem, B
Albumin Fraktion V (Art. Nr. T844.1) als Proteinstandard	ROTH, Karlsruhe, D
Annexin V-APC/ -FITC	BD Biosciences, Erembodegem, B
Anti-PE MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
CD 27 MicroBeads (human)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
CD5 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Fludarabin (Fludara)	Schering, Berlin, D

Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder Plus #SM 0328	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Immunobead Rabbit Anti-human IgA	IrvineScientific, Santa Ana, CA, USA
Immunobead Rabbit Anti-human IgM	IrvineScientific, Santa Ana, CA, USA
6x Loading Dye (#R 0611)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
MultiSort CD19 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
MultiSort Release Reagent	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
MultiSort Stop Reagent	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
O'Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder #SM 1148	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Orlistat	Sigma, Steinheim, D
PageRuler™ Prestained Protein Ladder #SM 0671	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Protease-Inhibitoren	Roche, Mannheim, D

2.1.6 Antibiotika

Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
-------------------------	-------------------------------

2.1.7 Antikörper

Anti-human/mouse ZAP 70-Alexa Fluor 488 conj.	Caltag, Burlingame, CA, USA
APC mouse anti-human CD5	BD Biosciences, Erembodegem, B
APC Mouse IgG1	BD Biosciences, Erembodegem, B
FITC mouse anti-human CD27	BD Biosciences, Erembodegem, B
FITC mouse anti-human CD38	BD Biosciences, Erembodegem, B
FITC mouse anti-human IgG	BD Biosciences, Erembodegem, B
FITC mouse anti-human IgM	BD Biosciences, Erembodegem, B
IgG1 (Mouse)-PC5	Immunotech, Marseille, F
IgG2b (Mouse)-FITC	Immunotech, Marseille, F
Mouse IgG1-Alexa Fluor 488 conj.	Caltag, Burlingame, CA, USA
Mouse IgG1-PE	Immunotech, Marseille, F

PE mouse anti-human CD3	BD Biosciences, Erembodegem, B
PE mouse anti-human CD5	BD Biosciences, Erembodegem, B
PE mouse anti-human CD79a	BD Biosciences, Erembodegem, B
PE mouse anti-human CD79b	BD Biosciences, Erembodegem, B
PE-Cy5 (PC5) mouse anti-human CD19	Immunotech, Marseille, F
Polyclonal Goat anti-rabbit Immunoglobulins/HRP	DAKO A/S, DK
rabbit anti-human PARP-Antikörper	NEB, Ipswich, MA, USA

2.1.8 Primer, Nukleotide [71]

2 mM dNTP Mix		Fermentas, St. Leon-Rot, D
J _H -Primer 2	5'-ACC-TGA-GGA-GAC-GGT-GAC-CAG-GGT-3'	biomers.net
J _H -consensus	3'-CCA-GTG-GCA-GAG-GAG-TCC-ATT-C-5'	biomers.net
V _H 1-FR1	5'-GGC-CTC-AGT-GAA-GGT-CTC-CTG-CAA-G-3'	biomers.net
V _H 2-FR1	5'-GTC-TGG-TCC-TAC-GCT-GGT-GAA-ACC-C-3'	biomers.net
V _H 3-FR1	5'-CTG-GGG-GGT-CCC-TGA-GAC-TCT-CCT-G-3'	biomers.net
V _H 4-FR1	5'-CTT-CGG-AGA-CCC-TGT-CCC-TCA-CCT-G-3'	biomers.net
V _H 5-FR1	5'-CGG-GGA-GTC-TCT-GAA-GAT-CTC-CTG-T-3'	biomers.net
V _H 6-FR1	5'-TCG-CAG-ACC-CTC-TCA-CTC-ACC-TGT-G-3'	biomers.net
β2M-FOR	5'-TTC-TGG-CCT-GGA-GGC-TAT-C-3'	biomers.net
β2M-REV	5'-TCA-GGA-AAT-TTG-ACT-TTC-CAT-TC-3'	biomers.net
LPL-FOR	5'-GTG-GCC-GAG-AGT-GAG-AAC-AT-3'	biomers.net
LPL-REV	5'-GAA-GGA-GTA-GGT-CTT-ATT-TGT-GGA-A-3'	biomers.net
UPL-Probe #42	Roche, Grenzach-Wyhlen, D	
UPL-Probe #13	Roche, Grenzach-Wyhlen, D	

2.1.9 Angesetzte Lösungen

EDTA (200 nM):

EDTA

mit H₂O auf gewünschtes Volumen auffüllen

pH mit NaOH auf 8,0 einstellen

Ladepuffer (10x) für Agarose-Gelelektrophorese:

20 µl 50x TAE

700 µl Glycerin

einige Kristalle Bromphenolblau

200 µl 200 nM EDTA (pH 8,0)

80 µl H₂O_{dd}

wurde zur Benutzung mit H₂O_{dd} 1:1 auf 5x herunterverdünnt

Laufpuffer:

für 2 l: 6,06 g Tris ultra (Base)

28,8 g Glycin

20 ml 10x SDS

auf 2 l mit H₂O_{dd} auffüllen

MACS-Puffer:

D-PBS

0,5 % BSA

2 mM EDTA

wurde vor Gebrauch sterilfiltriert und anschließend bei 4 °C gelagert

PBS (10x):

1,37 M NaCl

81 mM Na₂HPO₄

27 mM KCl

14,7 mM KH_2PO_4

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ auf gewünschtes Volumen auffüllen

wurde zur Benutzung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ auf 1x herunterverdünnt

PMSF (100 mM):

Isopropanol

EDTA

Lagerung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$

Probenpuffer für SDS-Gelelektrophorese [64]:

62,5 mM Tris-Base

25 % Glycerin

2 % SDS

0,01 % Bromphenolblau

mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ auf gewünschtes Volumen auffüllen

auf pH 6,8 einstellen

RIPA-Lysepuffer:

50 mM Tris pH 7,5

0,15 M NaCl

1 % Igepal CA-630

0,5 % DOC Desoxycholsäure-Natriumsalz

0,1 % SDS (10x)

1 mM PMSF

0,5 % Protease-Inhibitor

Sammelgelpuffer:

1 M Tris

auf pH 6,8 einstellen

TAE (50x):

2 M Tris-Base

1 M Essigsäure

0,1 M EDTA

mit H₂O_{dd} auf gewünschtes Volumen auffüllen

mit Essigsäure pH auf 8,3 einstellen

wurde zur Benutzung mit H₂O_{dd} auf 1x herunterverdünnt

TBS (10x):

1,37 M NaCl

100 nM Tris-Base

mit H₂O_{dd} auf gewünschtes Volumen auffüllen

wurde mit HCl auf pH 7,3 eingestellt

wurde zur Benutzung mit H₂O_{dd} auf 1x herunterverdünnt

Transferpuffer:

für 2 l: 6,06 g Tris ultra (Base)

28,8 g Glycin

1600 ml H₂O_{dd}

400 ml Methanol

Trenngelpuffer:

1 M Tris

auf pH 8,8 einstellen

2.1.10 Benutzte Software

Adobe Acrobat Reader 5.0

BD FACSDiva Software Version 4.1.2

Bead Studio (Illumina) Version 1.4.0.2

BiNGO (www.psb.ugent.be/cbd/papers/BiNGO/)

BioCapt MW Version 11.01

BioRag (Bioresource for array genes) bei www.biorag.org (Programm: Pathway Miner)

Chromas Lite 2.0

CoreDRAW 10

dChip 2005

Endnote 9

Gene Ontology Datenbank AmiGO (<http://www.geneontology.org>)

GenMapp Version 2.0

IgBLAST-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>)

LightCycler Software 4.05

Microsoft Office 2003

Sequencing-Analysis Version 3.4

SigmaPlot 2001 für Windows Version 7.0

SPSS 12.0G für Windows Version 12.0.1

2.2 Methoden

2.2.1 Patientenproben

In diese Untersuchung wurden Patienten der Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln, die sowohl die diagnostischen als auch die immunphänotypischen Kriterien einer CLL erfüllten, eingeschlossen. Es wurden lediglich Patienten ausgewählt, die entweder unbehandelt waren oder 6 Monate zuvor keine Chemotherapie erhielten. Die entnommenen Blutproben wurden unverzüglich im frischen Zustand weiterverarbeitet.

Die Untersuchung wurde von der Ethikkommission der Universität zu Köln genehmigt, und der Einschluss in dieses Experiment bzw. die Verwendung der Proben erfolgte nach informiertem Einverständnis der Patienten und Probanden entsprechend der Deklaration von Helsinki. Detaillierte Daten zu den Patienten sind im Kapitel „Ergebnisse“ unter 3.1 aufgelistet.

2.2.2 Lymphozytenaufbereitung

2.2.2.1 Isolierung der Lymphozyten aus peripherem Blut

Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte aus mindestens 20 ml peripherem, heparinisierem Vollblut von CLL-Patienten sowie von Leukozytenkonzentraten (buffy coats) gesunder Spender. Die frisch entnommenen Blutproben wurden unverzüglich mit B-RosetteSep (Human B Cell Enrichment Cocktail = humaner B-Zell-Anreicherungscocktail; StemCell Technologies Inc, Vancouver, Canada) 20 min bei Raumtemperatur inkubiert (50 µl B-RosetteSep/ml Blut) und anschließend der Dichte-Gradienten-Zentrifugation mittels Ficoll (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, S) zugeführt, um die B-Zellen der jeweiligen Probe anzureichern. Hintergrund dieser Methode sind Quervernetzungen von unerwünschten Zellen – hervorgerufen durch die spezielle Antikörpermischung – mit Erythrozyten zu Immunorosetten. Dadurch steigt die Dichte der nun gebundenen unerwünschten Zellen, so dass diese sich bei der Dichte-Gradienten-Zentrifugation zusammen mit freien Erythrozyten als Pellet am Boden absetzen. Erwünschte Zellen, in diesem Fall also Lymphozyten, werden nicht durch die Antikörpermischung gebunden und können somit als angereicherte Population in der Interphase zwischen Plasma und Ficoll-Medium gesammelt werden.

Darüber hinaus wurden auch PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) hergestellt, indem zu dem peripheren Blut kein B-RosetteSep hinzugefügt wurde und somit mittels der Dichte-Gradienten-Zentrifugation neben Lymphozyten auch weitere mononukleare Zellen isoliert wurden.

Die weitere Isolierung der CLL-Zellen, der normalen B-Zellen sowie der PBMCs erfolgte in gleicher Weise: Bevor das mit B-RosetteSep inkubierte Blut der

Dichte-Gradienten-Zentrifugation zugeführt werden konnte, musste es zunächst im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt werden. Das verdünnte Blut wurde anschließend vorsichtig auf das Ficoll-Medium gegeben, zentrifugiert (2300 rpm, 30 min, RT, keine Bremse) und folglich in die einzelnen Blutbestandteile aufgetrennt. Die in der Interphase befindlichen Lymphozyten wurden mittels Pipette abgehoben, mit PBS gewaschen (10 min, 1200 rpm) und in 20 ml IMDM-Medium resuspendiert.

2.2.2.2 Immunomagnetische Isolierung von gesunden B-Lymphozyten (MACS)

Um neben CLL-Zellen auch physiologische Kontrollen zu erhalten, um diese nachfolgend mit Ergebnissen der CLL vergleichen zu können, wurden aus Leukozytenkonzentraten (buffy coats) gesunde B-Lymphozyten mithilfe des MACS-Systems immunomagnetisch isoliert. In diesem Fall fand eine Zellsortierung nach CD5- und CD19-positiven Zellpopulationen statt. Darüber hinaus wurden auch CD27-positive Zellen sortiert.

Das Prinzip der magnetischen Zellsortierung besteht in einer Kopplung von magnetischen Beads an Antikörper einer bestimmten Spezifität. Sie binden an das entsprechende gewünschte Oberflächenantigen und werden anschließend auf eine Säule geladen, die sich in einem magnetischen Feld befindet. Die magnetisch-markierten Zellen bleiben in der Säule zurück, während die unmarkierten Zellen einfach hindurchfließen. Entnimmt man die Säule dem magnetischen Feld, so können die gewünschten Zellen eluiert werden. Dieser Vorgang kann nacheinander für verschiedene Zellfraktionen ausgeführt werden.

Der Beginn bestand zuerst in der Isolierung der Lymphozyten aus den Leukozytenkonzentraten mithilfe der Dichte-Gradienten-Zentrifugation. Die Schritte wurden analog ausgeführt wie unter 2.2.2.1 beschrieben. Abweichend hiervon wurde kein B-RosetteSep verwendet und die isolierten Lymphozyten am Ende nicht in IMDM-Medium, sondern in MACS-Puffer resuspendiert.

Anschließend erfolgte eine Zellzählung (s. 2.2.2.3), wobei hier eine 1:100-Verdünnung mit Trypanblau vorgenommen wurde. Außerdem wurde eine FACS-Analyse (s. 2.2.3) durchgeführt, bei der CD27-FITC-, CD5-PE-, CD19-PC5- und

Annexin V-APC-Antikörper (in entsprechendem Annexin V-Bindungspuffer) eingesetzt wurden. Bezogen auf die jeweilige Zellzahl und den Anteil CD5/CD19-positiver Zellen wurde die Auswahl der buffy coats getroffen, mit denen die MACS-Zellsortierung durchgeführt werden sollte.

Das MACS-Protokoll begann mit dem magnetischen Labeln der Zellen in Suspension. Dazu wurden die Zellen in PBS gewaschen (10 min, 1200 rpm) und in 2 ml MACS-Puffer resuspendiert. Um die Zellen nun magnetisch zu markieren (labeln), wurden 300 µl MACS CD19 MultiSort MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) zugegeben, parallel dazu der primäre Antikörper 60 µl CD5-PE (BD Biosciences, Erembodegem, B). Das Gemisch wurde 25 min auf dem Rollenmischer bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein Waschgang mit PBS und Resuspendieren in 4 ml MACS-Puffer.

Der nächste Schritt war die magnetische Separation von CD19 mit MACS. Nach Einsetzen der LS-Säule in den Magneten und Spülen der Säule mit 3 ml MACS-Puffer wurden zweimal 2 ml der Probe auf die Säule gegeben und anschließend gewaschen. Der Durchfluss, also die nicht markierten, negativen Zellen, wurden jeweils verworfen. Die LS-Säule wurde danach in ein 15 ml-Falcon überführt und mit 5 ml MACS-Puffer beladen. Mithilfe eines Spritzenkolbens konnte die positive CD19-markierte Fraktion aus der Säule ausgespült werden. Um eine noch höhere Reinheit zu erhalten, wurde die CD19-positive Fraktion erneut in gleicher Weise auf eine vorbereitete (gespülte) LS-Säule beladen, gewaschen, der Durchfluss verworfen und die positive CD19-Population wie eben beschrieben eluiert. Es folgte ein weiterer Waschgang mit PBS, und die Zellen wurden in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert.

Das weitere Vorgehen bestand in der Entfernung der MACS CD19 MultiSort MicroBeads. Infolgedessen wurden die CD19-sortierten Zellen mit 20 µl MACS MultiSort Release Reagenz (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) pro ml Zellsuspension für 10 min bei 4 °C inkubiert. Das Release Reagenz diente dazu, die MultiSort MicroBeads von der positiv sortierten Zellfraktion enzymatisch zu trennen. Jeweils 500 µl der Probe wurden zweimal auf eine vorbereitete MS-Säule (= 3. Säule) gegeben und nachfolgend mit dreimal 500 µl MACS-Puffer gewaschen. Der Durchfluss wurde jedes Mal im gleichen Falcon gesammelt;

mit ihm wurde auch weitergearbeitet. Zunächst wurden die Zellen wieder gezählt, mit CD19-PC5 gefärbt und per FACS analysiert. Nachdem die Zellen dann mit PBS gewaschen und in 150 µl MACS-Puffer resuspendiert waren, konnte mit der Inkubation (15 min, 4 °C) der Probe mit 90 µl MACS MultiSort Stopp Reagenz (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) und 60 µl Anti-PE MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) fortgefahren werden. Das Multi-Sort Stopp Reagenz hatte dabei die Aufgabe, die Reaktion, verursacht durch das Release Reagenz, zu stoppen. Die Anti-PE MicroBeads dagegen verbanden sich mit PE-konjugierten Antikörpern, also mit CD5-PE, und markierten diese somit magnetisch. Es wurde erneut mit PBS gewaschen und die Zellen dann in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert.

Als nächste Maßnahme schloss sich die magnetische Separation von CD5 mit MACS an. Ähnlich wie bei der CD19-Sortierung wurde eine MS-Säule in den Magneten eingesetzt und vorbereitend mit 500 µl MACS-Puffer gespült. 500 µl der Probe und anschließend dreimal 500 µl MACS-Puffer wurden auf die Säule gegeben, wobei diesmal der Durchfluss in einem 15 ml-Falcon A gesammelt wurde. Die Säule wurde anschließend in ein neues 15 ml-Falcon B überführt und mit 1 ml MACS-Puffer beladen. Mithilfe eines Spritzenkolbens konnte die CD5-positive Zellfraktion eluiert werden, die hinterher gezählt und per FACS (mit CD5-PE nachgefärbt) gemessen wurde. Sowohl der nicht-gelabelte Durchfluss aus Falcon A als auch die positiv selektierte Population aus Falcon B wurden mit PBS gewaschen. Die Zellen aus Falcon A wurden in 160 µl MACS-Puffer resuspendiert, während die CD5/CD19-positiven Zellen in 1 ml IMDM und 10% FCS resuspendiert wurden und nun für nachfolgende Stimulationen und Verfahren zur Verfügung standen. Die Reinheit der sortierten Zellpopulation wurde anhand der Durchflusszytometrie beurteilt und betrug normalerweise mehr als 80% CD5/CD19-positive Zellen.

Die letzte Handlung bei diesem MACS-Protokoll war das magnetische Labeln und die magnetische Separation von CD27. Die im Falcon A enthaltene Probe wurde 15 min bei 4 °C mit 40 µl CD27 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) inkubiert, danach gewaschen und in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die weitere Prozedur erfolgte in gleicher Weise wie bei CD5. Der

ungelabelte Durchfluss wurde ebenfalls als CD27-negative Fraktion gesammelt, derweil die markierten Zellen als CD27-positive Population gezählt und der FACS-Analyse (mit CD27-FITC-Antikörper) unterzogen wurden. Beide Zellpopulationen wurden nach einem letzten Waschgang mit PBS abschließend jeweils in 1 ml IMDM-Medium und 10% FCS resuspendiert.

2.2.2.3 Zellzählung

Die Zählung der Zellen erfolgte mithilfe der Neubauer-Zählkammer, wodurch sich die Zellzahl pro Volumeneinheit bestimmen lässt. 10 μ l der Zellsuspension wurden mit 90 μ l Trypanblau verdünnt (1:10); anschließend wurden 10 μ l der Probe auf die Kammer aufgetragen. Hintergrund ist, dass durch Trypanblau nur tote Zellen gefärbt werden, während lebende Zellen ungefärbt bleiben. Nach Auszählung der Quadranten (nur lebende, ungefärbte Zellen wurden gezählt) konnte die Zellzahl nach folgender Formel berechnet werden:

10 (für Trypanblauverdünnung) \times 10^4 (Kammerkonstante) \times Mittelwert der ausgezählten Zellen pro Quadrant = Zellzahl pro ml Probe.

2.2.3 Durchflusszytometrische Messung (FACS)

Die Durchflusszytometrie bzw. die FACS-Analyse (Fluorescence activated cell sorting) funktioniert nach dem Grundprinzip, dass einzelne Zellen einen Laserstrahl passieren und währenddessen ein für die Zellen charakteristisches Streulicht emittieren. Von Bedeutung sind dabei das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter), welches durch Beugung des Lichtes hervorgerufen wird und die Zellgröße widerspiegelt, sowie das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter) als Maß für die Granularität der Zelle, das aus der Brechung des Lichtes resultiert. Durch Markierung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern können sie nach weiteren Kriterien geordnet werden.

Für eine durchflusszytometrische Messung war eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen pro Ansatz notwendig. Eine entsprechende Menge der in IMDM gelösten Zellsuspension wurde in FACS-Röhrchen gegeben und mit 2 ml BD CellWash 10 min bei 1200 rpm gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen

anschließend mit entsprechenden Antikörpern inkubiert. Mit dem FACS Canto Durchflusszytometer (BD, Heidelberg, D) war es möglich, 4 Färbungen gleichzeitig in einem Ansatz auszuführen und zu analysieren. Aufgrund überlappender Emissionsspektren wurde eine Kompensation für die jeweiligen Antikörper mit der BD FACSDiva Software Version 4.1.2 durchgeführt. Zur Färbung wurden PE-, FITC-, APC- und PC5-markierte Oberflächenantikörper verwendet. Eine Färbung mit CD5-APC und CD19-PC5 wurde grundsätzlich mitgeführt, um die Zellen als CLL-Population definieren zu können; eine CD5/CD19-positive Zellfraktion entsprach dabei der CLL-Population. Nach Zugabe von je 3 µl pro Antikörper, bei 4 verschiedenen Antikörpern also ein Volumen von insgesamt 12 µl, wurden die Zellen durch Vortexen mit der Antikörpermischung vermischt und bei 4 °C 10 min lichtgeschützt inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschgang mit BD CellWash (10 min, 1200 rpm); der Überstand wurde erneut verworfen und die Zellen in 500 µl BD CellWash gevortext und resuspendiert. Die Proben wurden danach unverzüglich mit dem FACS Canto Durchflusszytometer gemessen. Die Population der Lymphozyten konnte über das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC, SSC) bestimmt und daraufhin weiter charakterisiert werden. Pro Ansatz wurde eine Zellzahl von 30.000 Zellen gemessen und mit der FACSDiva Software analysiert.

Bei durchflusszytometrischen Messungen ist es von großer Bedeutung, Isotypkontrollen durchzuführen; zum einen, um die Hintergrund-Fluoreszenz korrekt zu definieren und zum anderen, um unspezifische Bindungen auszuschließen bzw. zu differenzieren. In diesem Fall wurde bei jeder Messung ein Isotyp-Ansatz, gefärbt mit IgG1-PC5-, PE Mouse IgG1-, APC Mouse IgG1- und Mouse IgG2b-FITC-Antikörpern (je 3 µl pro Antikörper), mitgeführt. Die Herstellung der Isotyp-Kontrolle wurde analog zu dem gerade beschriebenen Protokoll ausgeführt.

2.2.3.1 Messung der Expression von IgM, IgG, CD79a, CD79b

Auf der Oberfläche von CLL-Zellen wird hauptsächlich der IgM- und IgD-Subtyp von Immunglobulinen als B-Zell-Rezeptor (BCR) exprimiert [13]. Auf die Frage hin, ob die Patienten positiv auf IgM und somit mögliche Kandidaten für eine

BCR-Stimulation waren, wurde dessen Expression durchflusszytometrisch untersucht. Gleichmaßen wurde die IgG-Expression auf der Oberfläche der CLL-Zellen analysiert. Neben der Evaluation der Immunglobulinexpression wurde auch die Expression von CD79a (Ig α) und CD79b (Ig β) überprüft, 2 mit der schweren Kette des Immunglobulinmoleküls nichtkovalent verbundene Proteine, die wesentlich am Beginn des BCR-Signalweges beteiligt sind.

Die Markierung der genannten Moleküle mit Antikörpern wurde wie unter 2.2.3 beschrieben durchgeführt. Die verwendeten Antikörper waren IgM-FITC, IgG-FITC, CD79a-PE sowie CD79b-PE. Es wurden ebenfalls 3 μ l pro Antikörper pro Probenansatz eingesetzt.

2.2.3.2 Messung der Expression von CD38

CD38, als ein prognostischer Marker in der CLL und vergesellschaftet mit einer ungünstigen Prognose [23][51], wurde auf seine Expression hin mit einem FITC-markierten Antikörper durchflusszytometrisch wie unter 2.2.3 veranschaulicht untersucht. Dabei wurde der prozentuale Anteil der CD38-positiven Zellen in der CD5/CD19-positiven und somit CLL-definierenden Zellfraktion ermittelt.

Um die Vierfachfärbung pro Ansatz zu vervollständigen (s.o.), wurde außerdem eine CD3-PE-Markierung vorgenommen.

2.2.3.3 Intrazelluläre Messung von ZAP-70

Die Messung des Proteins ZAP-70, ebenfalls ein prognostischer Marker in der CLL und mit einer schlechteren Prognose assoziiert [126], erfolgte intrazellulär mithilfe der FACS-Analyse und erforderte zusätzliche Arbeitsschritte und Färbungen.

Nach Isolierung der Lymphozyten wurde zunächst eine Färbung mit 3 Oberflächenantikörpern (je 3 μ l pro Antikörper) durchgeführt. Dabei handelte es sich um CD3-PE, CD5-APC und CD19-PC5. Parallel dazu wurde ein Ansatz mit Isotypen angesetzt, um unspezifische Bindungen zu differenzieren und die Hintergrund-Fluoreszenz zu definieren. Als Antikörper für die Isotyp-Kontrolle wurden je 3 μ l IgG1-PC5, PE Mouse IgG₁ und APC Mouse IgG₁ verwendet. Die

beiden Ansätze wurden 10 min lichtgeschützt bei 4 °C inkubiert und anschließend mit 2 ml BD CellWash gewaschen (10 min, 1200 rpm). Nachfolgend wurden die Zellen mit dem Fix & Perm Kit (Caltag Laboratories, Hamburg, D) behandelt, d.h. zuerst erfolgte eine Fixierung der Zellen mit je 100 µl pro Ansatz Fixations-Medium A für 10 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschgang mit 2 ml BD CellWash fand die Permeabilisation mithilfe des Permeabilisations-Mediums B (100 µl pro Ansatz) statt, und ohne weitere Inkubation oder Waschung konnten 5 µl des anti-ZAP-70-Alexa Fluor 488-Antikörpers zur Probe bzw. 5 µl des Mouse-IgG1-Alexa Fluor 488-Antikörpers zum Isotyp-Ansatz zugegeben werden. Die Zellen wurden lichtgeschützt 10 min bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert, erneut mit 2 ml BD CellWash gewaschen und schließlich in 500 µl BD CellWash resuspendiert. Unmittelbar danach schloss sich die FACS-Messung an. Der hier verwendete Farbstoff Alexa Fluor 488 wird bei 488 nm angeregt und zeigt ein Emissionsmaximum bei 519 nm, ebenso wie FITC.

Ähnlich wie bei CD38 wurde auch hier der prozentuale Anteil der ZAP-70 positiven Zellen in der CD5/CD19-positiven Zellfraktion bestimmt. Patienten, die mehr als 20% ZAP-70-positive Zellen aufwiesen, wurden als ZAP-70-positiv erachtet.

2.2.3.4 Messung und Analyse apoptotischer Zellen

Eine Möglichkeit, apoptotische oder gänzlich tote Zellen zu analysieren, war ebenfalls die FACS-Analyse. Dabei wurde das 35-36 kD große Protein Annexin V eingesetzt, welches mit dem Farbstoff FITC markiert war. Hintergrund dieser Methode ist, dass Annexin V kalziumabhängig und spezifisch an Phosphatidylserin bindet, welches in einer frühen Phase der Apoptose von der Zytoplasmaseite nach außen transportiert wird. Darüber hinaus kann Annexin V auch in nekrotische und damit permeable Zellen eindringen und dort binden [119][120]. Neben Annexin V wurde 7-AAD zur Viabilitätsfärbung (7-Amino-Actinomycin D) verwendet. 7-AAD ist ein DNA-Farbstoff, der nicht in der Lage ist, die Zellmembran von vitalen oder frühapoptotischen Zellen zu durchbrechen, da diese Zellen weiterhin ihre Membranintegrität besitzen. Im Gegensatz dazu haben

spätapoptotische bzw. tote Zellen diese Membranintegrität verloren und sind somit durchlässig für 7-AAD, werden folglich angefärbt und können durchflusszytometrisch erfasst werden. Der Vorteil von 7-AAD gegenüber Propidiumiodid (PI), ein weiterer Farbstoff zur Viabilitätsprüfung, ist der mögliche Einsatz in einer Zweifarben-Analyse zusammen mit PE- oder FITC-markierten monoklonalen Antikörpern ohne bedeutende spektrale Überlappung zwischen 7-AAD und PE- bzw. FITC-Fluoreszenzemissionen.

Bei der FACS-Messung entsprach die Annexin V/7-AAD-negative Population vitalen Zellen. Annexin V-positive, aber 7-AAD-negative Zellen waren frühapoptotisch, während die Annexin V/7-AAD-positive Zellfraktion spätapoptotisch oder schon vollkommen tot waren.

Für die Analyse wurde der 10x Annexin V Bindungspuffer mit sterilem Wasser 1:10 verdünnt. Je nach Höhe der eingesetzten Zellzahl wurden 150 - 500 μ l 1x Annexin V Bindungspuffer mit 5 μ l Annexin V-FITC und 10 μ l 7-ADD (PC5-Kanal) versetzt und die gewaschenen Zellen in diesem Gemisch resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5-10 min lichtgeschützt bei 4 °C erfolgte ohne Verzögerung die FACS-Messung. Kleine Zellfragmente wurden bei der auf FSC und SSC basierten Analyse durch ein Gate ausgeschlossen.

2.2.4 Stimulationen

2.2.4.1 Stimulation mit anti-IgM Immunobeads

Für eine Stimulation mit anti-IgM-Immunobeads wurden pro Well einer 6-Loch-Platte je nach vorhandener Zellzahl der Probe $1-2 \times 10^7$ Zellen eingesetzt, die mit 10% FCS und einer entsprechenden Menge IMDM-Medium auf ein Gesamtvolumen von 2 ml pro Well aufgefüllt wurde. Anschließend wurden in jedes Well 100 μ l rabbit anti-human-IgM Immunobeads (IrvineScientific, Santa Ana, CA, USA) zugegeben. Parallel dazu wurden jeweils Negativkontrollen ohne Stimulation mitgeführt. Die Proben wurden dann bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre gelagert. Nach 3, 24 und 48 Stunden wurden Proben entnommen und als Pellets und in Trizol für spätere Western-Blots und RNA-Extraktion bei -80 °C eingefroren; ein Teil der Proben wurde außerdem umgehend durchfluss-

zytometrisch untersucht. Zur besseren Vergleichsmöglichkeit wurde zu Beginn ebenfalls ein 0-Stunden-Wert entnommen.

2.2.4.2 Stimulation mit anti-IgA Immunobeads

Um eine weitere Art von Negativkontrolle zu erhalten, wurde neben der anti-IgM-Stimulation eine Stimulation mit rabbit anti-human-IgA Immunobeads (IrvineScientific, Santa Ana, CA, USA) ausgeführt. Die Durchführung erfolgte in gleicher Weise wie unter 2.2.4.1. beschrieben.

2.2.5 Extraktion und Aufbereitung von Nukleinsäuren

2.2.5.1 RNA-Isolation

Die Isolierung von reiner, intakter RNA war ein wesentlicher und wichtiger Bestandteil für die spätere Microarray-Genexpressionsanalyse. Eine Schwierigkeit bei dieser Methode stellen die Ribonucleasen (RNasen) dar, sehr stabile und aktive Enzyme, welche RNA zerschneiden/denaturieren. Diese Enzyme benötigen keine Kofaktoren für ihre Aktivierung und sind darüber hinaus in der Lage, nach einer Denaturierung wieder zu renaturieren. Daher ist es essenziell, die RNA-Isolation unter möglichst RNase-freien oder -denaturierenden Bedingungen durchzuführen.

Die Isolierung der RNA erfolgte aus sowohl anti-IgM stimulierten als auch unstimulierten Proben, deren B-Zellen entweder per B-RosetteSep oder per MACS-System sortiert waren. Eine RNA-Isolation fand außerdem bei PBMCs statt. Wie oben bereits erwähnt, wurden die Zellen zuvor in 1 ml Trizol je 1×10^7 Zellen lysiert und konnten danach gegebenenfalls bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren werden. An die Lyse schloss sich dann die eigentliche Extraktion an, indem 0,2 ml Chloroform pro ml Trizol zugegeben wurden. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 3 min bei Raumtemperatur erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min, wodurch die obere wässrige Phase mit RNA in ein neues Eppendorfgefäß überführt werden konnte. Bei diesem Schritt war es sehr wichtig, den Kontakt mit der in der Interphase befindlichen DNA zu vermeiden. Anschließend wurden 0,5 ml Isopropanol (pro eingesetztem ml Trizol) beige-

mischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm und 4 °C für nun 30 min pelletierte die RNA am Boden des Eppendorfgefäßes aus. Nach vorsichtiger Entfernung des Überstandes wurde das RNA-Pellet zweimal mit 1 ml 80%igem Ethanol (pro ml Trizol) gewaschen (13.000 rpm, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde jeweils verworfen, die RNA getrocknet (vollständige Trocknung wurde vermieden) und dann mit 200 µl RNase-freiem Wasser bei 55 °C (für 5-10 min) wieder gelöst. Die weitere Aufreinigung der RNA fand mit dem RNeasy MinElute Cleanup Kit von Qiagen (Hilden, D) statt; alle Schritte wurden bei Raumtemperatur ausgeführt. Der Probe wurden zunächst 700 µl RLT-Puffer (mit β-Mercaptoethanol versetzt) und anschließend 500 µl 96-100%iges Ethanol beigemischt. 700 µl der Probe wurden auf eine RNeasy MiniElute-Säule (spin column, welches eine Silikat-Gel-Membran enthält) gegeben, die sich in einem 2 ml-Sammelröhrchen (collection tube) befand, und bei über 10.000 rpm für 15 sec zentrifugiert; der Durchfluss wurde verworfen. War das ursprüngliche Probenvolumen größer als 700 µl, musste der Vorgang in gleicher Weise und in den gleichen Röhrchen erneut durchgeführt werden. Die RNeasy MiniElute-Säule wurde daraufhin in ein neues 2 ml-Sammelröhrchen überführt, mit 500 µl RPE-Puffer versehen und 15 sec bei über 10.000 rpm zentrifugiert, um die Säule zu waschen. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Nach Zugabe von 500 µl 80%igem Ethanol und einer weiteren Zentrifugation für nun 2 min bei über 10.000 rpm (Verwurf des Durchflusses) zur Trocknung der Membran konnte die Säule in ein neues 2 ml-Sammelröhrchen transferiert werden. Bei diesem Schritt war es wichtig, ein versehentliches Übertragen von Ethanol zu vermeiden, um die Elution von RNA nicht zu beeinträchtigen. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit geöffnetem Röhrchen bei maximaler Geschwindigkeit für 5 min (Verwurf des Durchflusses), um die Silikat-Membran zu trocknen, denn verbleibendes Ethanol hätte mit nachfolgenden Reaktionen interagieren können. Zur eigentlichen RNA-Elution musste die Säule in ein sauberes 1,5 ml-Sammelröhrchen gegeben und mit 14 µl RNase-freiem Wasser versetzt werden. Bei diesem Schritt war es von Bedeutung, das Wasser direkt auf das Zentrum der Membran aufzutragen und nicht etwa an die Wand der Säule. Durch eine letzte

Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min wurde die RNA dann letztlich in den Überstand eluiert.

Die RNA-Konzentration der jeweiligen Probe wurde in einer 1:50 Verdünnung mit TE-Puffer photometrisch bestimmt.

Die Qualität der RNA konnte mit einer Gel-Elektrophorese und anschließender Ethidiumbromid-Färbung überprüft werden. Dabei sollten 2 scharf abgegrenzte Banden sichtbar werden: eine für die 28S ribosomale RNA (~5kb) mit einer zweifachen Intensität gegenüber der anderen Bande für die 18S ribosomale RNA (~2kb). Sollte es dagegen zu einer diffusen Verteilung oder gar bis zu einer vollständigen Auflösung des Bandenmusters kommen, ist es wahrscheinlich, dass während der Isolierung eine Degradierung der RNA stattgefunden hat.

2.2.5.2 Extraktion genomischer DNA

Parallel zu Isolierung der RNA aus Trizol-lysiertem Zellmaterial konnte die DNA der CLL-Patienten für spätere IgV_H-Mutationsanalysen extrahiert werden.

Nach Abtrennen der wässrigen Phase zur RNA-Isolation (s. o.) wurde zur verbleibenden organischen Phase 0,3 ml 100%iges Ethanol pro ml Trizol (eingesetzte Anfangsmenge zur Zellyse: s. o.) gegeben, und das Gemisch musste nach kurzem Mixen 2-3 min bei Raumtemperatur ruhen. Es folgte eine Zentrifugation bei 4600 rpm und 4 °C für 5 min, und der Überstand wurde anschließend verworfen. Es schloss sich ein Waschschriff an, indem das Pellet in 1 ml 0,1 M Natriumcitrat in 10%igem Ethanol gelöst und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Der Zentrifugations- und Waschgang wiederholte sich, und es fand letztlich noch eine weitere Zentrifugation statt (4600 rpm, 4 °C, 5 min). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 1,5 ml 75%igem Ethanol 10-20 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend gewaschen (4600 rpm, 4 °C, 5 min) und der Überstand verworfen. Die DNA konnte nun bei geöffnetem Eppendorfgefäß 5-10 min getrocknet und daraufhin mit 600 µl 8 mM Natronlauge (evtl. bei 60 °C) wieder angelöst werden. Um den pH zu adjustieren, wurden 93,5 µl 0,1 M HEPES und zuletzt 65 µl 10 mM EDTA beigegeben.

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch in einer Verdünnung von 1:50 oder 10:40 in TE-Puffer gemessen und konnte danach bei -20 °C gelagert werden.

2.2.5.3 cDNA-Synthese

Die Herstellung von cDNA aus RNA war für spätere Real-Time-PCRs notwendig, da sich mithilfe der cDNA in der RT-PCR mRNA-Transkripte darstellen lassen.

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis ausgeführt. Zunächst wurden 1 µg RNA mit 1 µl Anchored-oligo(dT)₁₈-Primer zusammengegeben. Die Menge an der zu pipettierender RNA errechnete sich aus der photometrisch gemessenen Konzentration (Einheit der Konzentration: µg/µl). Zu Primer und RNA musste dann so viel an Wasser (PCR-Grad) hinzugefügt werden, bis ein Gesamtvolumen von 13 µl erreicht war. Das Gemisch wurde bei 65 °C für 10 min inkubiert und danach sofort wieder auf Eis gelagert. Der zuletzt genannte Arbeitsschritt denaturierte mögliche vorhandene sekundäre RNA-Strukturen. Als nächstes wurden 4 µl Transkriptor RT Reaktionspuffer, 0,5 µl Protektor RNase Inhibitor, 2 µl Deoxynukleotid-Mix und 0,5 µl Transkriptor Reverse Transkriptase beigegeben, und alles wurde 30 min bei 55 °C inkubiert (eigentlicher cDNA-Synthese-Prozess). Ein nachfolgendes Erhitzen der Probe auf 85 °C für 5 min war notwendig, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren und damit die Reaktion zu stoppen. Die Proben konnten danach bei -20 °C gelagert werden. Die cDNA-Synthese erfolgte mithilfe des cDNA-Synthese-Kits der Firma Roche nach Protokoll des Herstellers.

2.2.6 Microarray-Genexpressionsanalyse

Für die Durchführung von Genexpressionsanalysen mithilfe von Microarrays musste zunächst RNA aus den entsprechenden Zellen (BCR-stimulierte und unstimulierte CLL-Zellen und gesunde Spenderzellen), wie unter 2.2.5.1 dargestellt, isoliert werden. Die Hybridisierung der Microarrays erfolgte durch Julia Claasen, Mirela Stecki und Svenja Debey (Molekulare Tumorbologie und Tumormunologie, Klinik I für Innere Medizin, Universität zu Köln). Für

Microarray-Analysen war eine Menge von 100 ng totaler RNA notwendig. Es erfolgte daraufhin eine reverse Transkription in cDNA, eine Synthese des zweiten Stranges zur Doppelstrang-cDNA und zuletzt eine *in vitro* Transkription zu biotynilierter cRNA. Diese konnte dann auf den Illumina WG6 Bead Chip (Illumina, San Diego, CA, USA) aufgetragen und hybridisiert werden. Der eingesetzte Chip enthält mehr als 46.000 Transkripte und ermöglicht zudem eine parallele Untersuchung von 6 individuellen Proben. Nach Hybridisierung wurde Streptavidin-Cy3 hinzugegeben, welches an das Biotin der cRNA band und somit die cRNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Cy3 = Carbocyanin 3) markierte. Es folgte ein Waschgang, bei dem nicht gebundene cRNA abgewaschen wurde. Abschließend konnte der Chip gescannt und dekodiert werden.

Um eine anhaltende Qualität zu sichern und diese zu kontrollieren, wurden ferner Gelelektrophoresen der primären RNA und der cRNA durchgeführt.

2.2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine schnelle, einfache und sensitive enzymatische *in vitro*-Prozedur zur exponentiellen Amplifizierung eines spezifischen Produktes bestimmter Größe und Sequenz [81].

Während der PCR werden nacheinander verschiedene Temperaturniveaus erreicht, die zu einer Denaturierung der DNA (94-95 °C), zu einem Anlagern der Primer (47-61 °C) und letztlich zu einer DNA-Synthese (68-72 °C) führen. Diese Temperaturebenen werden pro Zyklus in der genannten Reihenfolge durchlaufen.

2.2.7.1 Bestimmung des IgV_H-Mutationsstatus

Zur Feststellung des IgV_H-Mutationsstatus wurde eine Polymerase-Ketten-Reaktion mit der genomischen DNA der CLL-Patienten durchgeführt. Dazu wurden 6 V_H-spezifische Primer (V_H-FR1-Primer, biomers.net) als auch ein J_H-Consensus-Primer (biomers.net) verwendet. Alle Primer wurden jeweils in einer Konzentration von 20 pmol benutzt. Pro Reaktionsansatz wurde jeweils nur einer der 6 verschiedenen V_H-FR1-Primer eingesetzt, während sich der J_H-

Consensus-Primer in jedem Ansatz befand. Zusätzlich zu den einzelnen Primern kamen pro Reaktionsansatz als weitere Reagenzien 5 µl 10x PCR-Puffer mit MgCl₂ (Fermentas), 5 µl 2 mM dNTP-Mix, 0,5 µl High-Fidelity PCR-Enzyme-Mix (Fermentas) und 0,1-0,5 µg der jeweiligen DNA-Probe sowie eine entsprechende Menge H₂O_{dd} hinzu, um den Ansatz auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufzufüllen. Alle Schritte wurden jeweils auf Eis ausgeführt.

Zum Ausschluss von möglichen Kontaminationen wurde jedes Mal eine Negativkontrolle mitgeführt, die mit Ausnahme der DNA alle oben genannten Komponenten einschließlich der 6 V_H-FR1-Primer enthielt.

Die eigentliche PCR wurde mit einem Biometra ‚T3 Thermocycler‘ nach folgendem Protokoll ausgeführt:

15 min	95 °C	} 35 Zyklen
30 sec	95 °C	
30 sec	60 °C	
30 sec	72 °C	
7 min	72 °C	

2.2.7.2 Agarose-Gel-Elektrophorese

Um die PCR auszuwerten, wurde eine Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurde zunächst ein 2%iges Agarose-Gel hergestellt, indem 2 g Agarose in 100 ml 1x TAE gelöst und anschließend ca. 2-3 min erhitzt wurden. Nach kurzem Abkühlen wurden 10 µl Ethidiumbromid (10 µl auf 100 ml TAE) hinzugefügt, und das Gel konnte in die entsprechende vorbereitete Form gegossen werden. Ethidiumbromid, ein Fluorochrom, welches in die DNA-Helix hineininterkaliert, diente dabei der Färbung des Gels, um die einzelnen DNA-Fragmente mittels UV-Licht sichtbar zu machen.

Bevor das Gel beladen werden konnte, mussten 25 µl des PCR-Ansatzes vorab mit 5 µl 6x Loading Dye (Fermentas) versetzt werden. Neben den einzelnen Proben wurde in eine separate Geltasche 10 µl eines Markers (Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder Plus, #SM 0328, Fermentas) als Längenstandard aufgetra-

gen, um die DNA-Fragmente der Größe nach zuordnen zu können. Als Laufpuffer diente ebenfalls 1x TAE. Die Gel-Elektrophorese fand bei 150 mA und 90 V statt, bis eine ausreichende Aufspaltung in die DNA-Fragmente sichtbar war. Die Auswertung und Bilddokumentation erfolgte mithilfe des Programms BioCaptMW Version 11.01. Lediglich die Ansätze, in denen eine Produktbildung erkennbar war, wurden aufgereinigt (s. 2.2.7.3) und nachfolgend sequenziert (s. 2.2.7.4).

2.2.7.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte fand mithilfe des QIAquick PCR Purification Kits von Qiagen (Hilden, D) statt.

Dabei wurden 5 Volumen PB-Puffer zu 1 Volumen des entsprechenden PCR-Ansatzes gegeben und das Gemisch auf eine QIAquick-Säule (spin column, welches eine Silikat-Gel-Membran enthält) aufgetragen, die sich wiederum in einem 2 ml-Sammelröhrchen befand. Um die DNA zu binden, erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 30-60 sec; der Durchfluss wurde verworfen. Als nächstes schloss sich ein Waschschrift an, indem 0,75 ml PE-Puffer (mit 96-100%igem Ethanol versetzt) hinzugegeben und bei 13.000 rpm für 30-60 sec zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde erneut verworfen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 1 min. Hierbei war es von Bedeutung, den Durchfluss vor dieser zusätzlichen Zentrifugation zu verwerfen, da ansonsten restliches Ethanol aus dem PE-Puffer nicht komplett entfernt würde. Die QIAquick-Säule wurde daraufhin in ein steriles 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Um die DNA zu eluieren, wurden 50 µl Wasser (pH zwischen 7,0-8,5) in die Mitte der Silikat-Membran aufgetragen; die Säule ruhte danach für 1 min. Anschließend erfolgte eine letzte Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min. Die DNA konnte nun bei -20 °C gelagert werden.

2.2.7.4 Sequenzierungs-PCR

Zur Vorbereitung der zu sequenzierenden Proben wurde das BigDye Terminator Cycle Sequencing System der Firma Applied Biosystems ver-

wendet. Als Primer wurde der J_H-Primer 2 (biomers.net) in einer Konzentration von 20 pmol eingesetzt. Jeder Reaktionsansatz wurde wie folgt befüllt: 8 µl Ready-Reaction-Mix (= BigDye Terminator, v3.1 Cycle, Sequencing RR-100) (eine fertige Reaktionslösung des BigDye Terminator Cycle Sequencing Systems, die alle notwendigen Reagenzien bereits enthält), 1,6 µl J_H-Primer 2, 3-10 ng DNA des aufgereinigten PCR-Produktes sowie eine entsprechende Menge Wasser, um den Ansatz auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufzufüllen. Die Sequenzierungs-PCR wurde ebenfalls mit dem Biometra ‚T3 Thermocycler‘ mit nachfolgendem Protokoll durchgeführt:

1 min	95 °C	} 25 Zyklen
10 sec	95 °C	
5 sec	50 °C	
4 min	60 °C	
	4 °C	

2.2.7.5 Auswertung der Sequenzen

Die Sequenzierung wurde vom Gentechnischen Institut der Universität zu Köln mithilfe eines ABI 3730 sequencer durchgeführt. Die vom Sequenzierautomaten ermittelten Rohdaten wurden mit der Auswertungssoftware Sequencing-Analysis Version 3.4 prozessiert. Einzelne Vergleiche zwischen den erhaltenen Sequenzen und denen der verschiedenen Keimbahn-IgV_H-Gene wurden mit der IgBLAST-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>) ausgeführt. Auf diese Weise konnte die der Sequenz am nächsten verwandte Keimbahnsequenz und – durch den Vergleich mit dieser – die Anzahl und Verteilung der Mutationen im entsprechenden VDJ-Rearrangement der Patientenprobe ermittelt werden. Bei einer Sequenzabweichung von mehr als 2% von den entsprechenden Keimbahn-Genen wurden die V_H-Gene als mutiert bezeichnet.

2.2.7.6 Real-Time-PCR (RT-PCR)

Mithilfe der Real-Time-PCR und anschließender relativer Quantifizierung war es möglich, die Expression von Lipoproteinlipase (LPL) bei CLL-Patienten und bei gesunden Spendern quantitativ zu untersuchen. Als geeignete Referenz wurde das Housekeeping-Gen β 2-Mikroglobulin (β 2M) angesehen, da es eine gleichbleibende Expression in Lymphozyten aufweist und stabil auf mRNA-Niveau ist. Im Serum dagegen ist es durch Zellzerfall eher variabel und deshalb prognostisch relevant bei verschiedenen Entitäten. Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde in diesem Fall nicht als Housekeeping-Gen verwendet, weil es zu stark in Lymphozyten reguliert wird.

Alle Schritte zur Vorbereitung der Proben wurden mithilfe des TaqMan Master Kits von Roche (Grenzach-Wyhlen, D) und auf Eis ausgeführt. Als optimale Verdünnung der cDNA diente eine 1:100-Verdünnung. Der verwendete Kalibrator war ein sogenannter Mischkalibrator bestehend aus verschiedenen stimulierten und unstimulierten cDNAs unterschiedlicher Patienten (ZAP-70-positive, ZAP-70-negative), ebenfalls in einer 1:100-Verdünnung. Außerdem wurde grundsätzlich eine Negativkontrolle in Form einer Wasserprobe mitgeführt. Alle Ansätze wurden jeweils zusammen mit einem Replikat durchgeführt. Für jede einzelne Probe wurde folgender RT-PCR-Mix hergestellt: 10,4 μ l Wasser (PCR-Grad), 0,2 μ l 20 μ M Forward Primer, 0,2 μ l 20 μ M Reverse Primer, 0,2 μ l Universal Probe Library probe (UPL-Sonde) und 4 μ l des 5-fach konzentrierten LightCycler TaqMan Master Mixes. Dieser RT-PCR-Mix (insgesamt 15 μ l) wurde daraufhin mit 5 μ l der entsprechenden verdünnten cDNA oder mit 5 μ l Wasser bzw. Kalibrator in spezielle LightCycler-Kapillaren zusammengeführt und bei 3000 rpm für 5 sec zentrifugiert. Die nun fertigen Proben wurden umgehend mit der RT-PCR-Maschine (Lightcycler 1.5', Roche, Grenzach-Wyhlen, D) gemessen.

Die Basensequenzen der Forward und Reverse Primer für LPL und β 2M (biomers.net) sind unter 2.1.8 aufgelistet. Für β 2M wurde die Universal Probe Library probe #42 (Roche, Grenzach-Wyhlen, D) (s. 2.1.8) und für LPL die Universal Probe Library probe #13 (Roche, Grenzach-Wyhlen, D) (s. 2.1.8) verwendet. Der eingesetzte LightCycler TaqMan Master ist ein bereits fertiger

Mix, der eine sogenannte FastStart Polymerase enthält, die für einen schnellen Start der PCR verantwortlich ist. Dies verbessert die Spezifität und Sensitivität der PCR durch Verminderung der Bildung von unspezifischen Amplifikationsprodukten.

Die RT-PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Denaturierung	10 min	95 °C	} 55 Zyklen
	10 sec	95 °C	
Quantifizierung	30 sec	60 °C	
	1 sec	72 °C	
Herunterkühlen	30 sec	40 °C	

Zum Nachweis der PCR-Produkte und zur Kontrolle der RT-PCR wurde eine Agarose-Gel-Elektrophorese mit 2%igem Agarose-Gel angeschlossen (Herstellung und weitere Durchführung s. 2.2.7.2). Die Proben wurden jeweils mit 4 µl 5x Ladepuffer vermischt. Als Marker diente 9 µl des O'Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder (#SM 1148, Fermentas).

Die gewonnenen Daten wurden mit der LightCycler Software 4.05 in Form einer relativen Quantifizierung ausgewertet, so dass man sehen konnte, inwieweit LPL bei stimulierten und unstimulierten CLL-Proben und bei gesunden Spendern reguliert wurde.

2.2.8 Zellkultur

Alle Prozeduren, die Sterilität erforderten, wurden unter einer Sterilbank mit sterilen Gebrauchsmaterialien und Lösungen bzw. Chemikalien durchgeführt.

2.2.9 Inhibition der Lipoproteinlipase (LPL)

2.2.9.1 Behandlung der Zellen mit Orlistat

Die CLL-Zellen wurden wie unter 2.2.2.1 beschrieben aus peripherem Blut isoliert und in IMDM-Medium resuspendiert. In Abhängigkeit der Zellzahl der einzelnen CLL-Proben wurde eine entsprechende Menge der Zellsuspension auf eine 6-Loch-Platte aufgetragen, so dass 1×10^7 Zellen pro Well bei einem Gesamtvolumen von 2 ml pro Well enthalten waren. Bei denjenigen CLL-Patienten, die IgM-positiv waren, wurde bei einem Teil der Zellsuspension eine BCR-Stimulation mit anti-IgM-Immunebeads durchgeführt, während die restliche Zellsuspension im nativen Zustand verblieb. Der Inhibitor Orlistat (Sigma, Steinheim, D) wurde zunächst in einem 100 mM Stock in DMSO gelöst und anschließend in einer Verdünnungsreihe von 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M und 100 μ M Orlistat zu den nativen als auch BCR-stimulierten Zellen gegeben. Als Negativkontrolle wurde DMSO ohne Zugabe von Orlistat genutzt. Die effektive DMSO-Konzentration in allen behandelten Proben war immer 0,1%. Die Zellen wurden daraufhin bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden jeweils Proben für nachfolgende FACS-Messungen (s. 2.2.9.3) entnommen. Der Einfluss von Orlistat auf gesunde Spenderzellen wurde in gleicher Weise überprüft.

2.2.9.2 Behandlung der Zellen mit Orlistat und Fludarabin

Zusätzlich zu der Verdünnungsreihe mit Orlistat wurden die Zellen mit Fludarabin, einem gängigen Chemotherapeutikum in der CLL [28][29], behandelt. Dazu wurde Fludarabin (Schering, Berlin, D) zunächst in Wasser gelöst. Zum einen wurden 10 μ M Fludarabin zu der Zellsuspension (ebenfalls 1×10^7 Zellen pro Well bei Gesamtvolumen von 2 ml pro Well), zum anderen eine Kombination aus 10 μ M Fludarabin und 20 μ M Orlistat zu der Zellsuspension gegeben. Die Zellen wurden ebenso bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert und FACS-Proben nach 24, 48 und 72 Stunden entnommen.

2.2.9.3 Messung apoptotischer Zellen

Die mit Orlistat bzw. Fludarabin inkubierten entnommenen Proben nach 24, 48 und 72 Stunden wurden mit Annexin V-FITC/7-AAD wie unter 2.2.3.4 dargestellt gefärbt und umgehend der FACS-Analyse zugeführt. Es wurde jeweils der Anteil vitaler, apoptotischer und gänzlich toter Zellen bestimmt. Darüber hinaus wurden die Zellen auch im nativen Zustand (ohne Stimulation oder Orlistat-Behandlung) durch ein 0-Stunden-FACS mit Annexin V-FITC/7-AAD-Färbung analysiert, um einen Ausgangswert und eine Vergleichsmöglichkeit mit den zu späteren Zeitpunkten durchgeführten FACS-Messungen zu bekommen.

2.2.9.4 Viabilitätsprüfung mittels XTT-Assay

Neben der FACS-Messung von apoptotischen Zellen wurden XTT-Assays mithilfe des Zellproliferations-Kits II von Roche (Grenzach-Wyhlen, D) zur Viabilitätsprüfung und zur Beurteilung des Orlistat- und Fludarabin-Einflusses auf die Zellen durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen XTT-basierten kolorimetrischen Test für eine nicht-radioaktive Quantifizierung von Zellproliferation und -viabilität. Hintergrund dieser Methode ist die Spaltung von gelbem Tetrazoliumsalz XTT in den orangefarbenen Farbstoff Formazan durch das Enzym mitochondriale Dehydrogenase in lebenden metabolisch aktiven Zellen. Der Farbstoff Formazan ist löslich in wässrigen Lösungen und kann daher mithilfe eines ELISA-Readers spektrometrisch quantifiziert werden. Je mehr lebende Zellen in der Probe vorhanden sind, desto mehr Enzymaktivität liegt vor und desto mehr Farbstoff wird umgesetzt.

Die Durchführung des XTT-Assays fand in einer 96-Loch-Platte mit 1×10^6 Zellen pro Well und einem Volumen von 100 μ l Zellsuspension (in IMDM-Medium) pro Well statt. Als Negativkontrolle wurden mehrere Wells lediglich mit IMDM-Medium und als Positivkontrolle einige Wells mit einer Lyse-Lösung (Triton X-100, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England, UK) befüllt. Es folgte zunächst eine Inkubation für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂. Daraufhin wurden 50 μ l des XTT Labeling-Mixes (bestehend aus 50 μ l XTT Labeling-Reagenz und 1 μ l Elektronkopplungs-Reagenz) pro Well hinzugegeben. Nach einer weiteren

Inkubationsphase für 12-24 h bei 37 °C konnten die Proben mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450-500 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen und somit die lebenden Zellen quantifiziert werden.

2.2.10 Nachweis von Proteinen

2.2.10.1 Herstellung von Proteinlysaten

Die bei -80 °C eingefrorenen Zellpellets aus Patientenmaterial wurden auf Eis aufgetaut und in 0,5 ml RIPA-Lysepuffer resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und dann in 15 ml-Falcons überführt. Die Proben wurden anschließend mit Ultraschall (15 sec bei voller Leistung, auf Eis) behandelt, um die Pellets vollständig zu lösen. Der durch die Ultraschallbehandlung eventuell entstandene Schaum wurde kurz herunterzentrifugiert, und die Konzentration der Proteinlysate konnte daraufhin bestimmt werden (s. 2.2.10.2), um äquivalente Mengen an Protein bei nachfolgenden Western Blots einsetzen zu können. Die Proteinlysate konnten später bei -80 °C gelagert werden.

2.2.10.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinlysate wurde mithilfe des Roti[®]-Quant universal Kits (ROTH, Karlsruhe, D) durchgeführt. Grundlage dieser Methode ist eine Biuret-Reaktion, die mit einer kolorimetrischen Enhancer-Reaktion gekoppelt ist. Dabei werden Kupfer²⁺-Ionen des im Kit enthaltenen Reagenzes 2 zu Kupfer⁺-Ionen reduziert. Die entstehende Farbauscheidung der kupferspezifischen Enhancer-Reaktion ist dabei direkt proportional zur Proteinkonzentration. Die gebildeten Kupferkomplexe haben ihr Absorptionsmaximum bei 503 nm. Zu beachten ist allerdings, dass diese Reaktion keinen eigentlichen Endpunkt hat, sondern bei Raumtemperatur langsam weiter läuft.

Zu Beginn wurde eine Verdünnungsreihe eines Proteinstandards angesetzt, um die Proteinmenge der Lysate durch Vergleich mit den bekannten Konzentrationen des Standards bestimmen zu können. Der Proteinstandard (Stocklösung: 2 mg/ml) wurde in folgenden Verdünnungsschritten angesetzt: 0, 50, 100, 150,

200, 250, 500, 1000, 1500 und 2000 µg/ml. Die Verdünnung erfolgte jeweils mit RIPA-Puffer. Jeweils 50 µl der einzelnen Verdünnungsstufen wurden dreimal auf eine 96-Loch-Platte aufgetragen.

Anschließend wurden die eigentlichen Proben im Verhältnis 1:4 mit RIPA-Puffer verdünnt und mit einem Volumen von ebenfalls 50 µl pro Well auf die Platte aufgetragen.

Zuletzt wurde eine Arbeitslösung hergestellt, indem 15 Teile von Reagenz 1 mit einem Teil Reagenz 2 (Roti[®]-Quant universal Reagenz 1+2, ROTH, Karlsruhe, D) vermischt wurden. 100 µl dieser Arbeitslösung wurden zu jeder Probe und Standard-Verdünnung hinzugegeben.

Die Mikrotiterplatte inkubierte daraufhin 30 min bei 37 °C. Anschließend erfolgte umgehend die photometrische Messung mittels ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 492 nm.

2.2.10.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen

Für die Vorbereitung der Proben wurde ein Probenpuffer (1/6 des Probenvolumens Puffer pro Reaktionsansatz) zu jeder Probe hinzugegeben. Der Probenpuffer, hergestellt nach Lämmli [64], enthielt unter anderem SDS (Natriumdodecylsulfat), ein anionisches Detergens, welches die Eigenladung der Proteine überdeckt und diese somit eine konstante negative Ladung relativ zu ihrem molekularen Gewicht erhalten. Durch die negative Ladung wandern die Proteine bei der Gelelektrophorese zur Anode und werden ihrer Größe nach aufgetrennt, wobei kleine Proteine schneller durch das Gel laufen und große Proteine eher zurückgehalten werden. Nach Zugabe des Probenpuffers wurden die Proben bei 95 °C für 5 min erhitzt, um die Proteine zu denaturieren, indem Sekundär- und Tertiärstrukturen aufgebrochen wurden. Durch Zugabe von β-Mercaptoethanol wurden zusätzlich Disulfidbrücken gespalten.

Zur Auftrennung der Proteine wurde ein 10%iges Trenngel auf Polyacrylamidbasis verwendet. Die Herstellung des Trenn- und Sammelgels erfolgte nach folgendem Schema:

	Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
H ₂ O _{dd}	2,5 ml	1,75 ml
Trenngelpuffer*	1,5 ml	---
Sammelgelpuffer	---	0,31 ml
10% SDS	---	25 µl
30% Polyacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	2 ml	0,42 ml
10% APS	40 µl	12,5 µl
TEMED	4 µl	2,5 µl

* 1,5M Tris pH 8,8; 0,4% SDS

Die Gele wurden mit einer Proteinmenge von 20 µg beladen. Darüber hinaus wurde ein Marker (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder #SM 0671, Fermentas) zur Bestimmung der Proteingröße aufgetragen. Als Laufpuffer diente ein SDS-haltiges Tris-Glycin-System. Die Gel-Elektrophorese wurde bei 200 V für ca. 1,5 Stunden durchgeführt.

2.2.10.4 Western Blot

Die Proteine wurden nach der SDS-PAGE mittels des Wet-Blot-Verfahrens auf eine Nitrocellulosemembran transferiert [116]. Die Membran wurde dazu auf Größe des Gels zurechtgeschnitten und zuerst 1 min in Transferpuffer (enthält 3,03 g Tris-HCl) getränkt. 2 Schwämme und 6 Blätter Whatman 3MM Filterpapier wurden ebenfalls mit Transferpuffer durchfeuchtet. Unter Berücksichtigung, dass weder Apparatur noch einzelne Materialien zu trocken wurden, sondern immer ausreichend in Transferpuffer getränkt waren, konnte der Blot dann folgendermaßen zusammengesetzt werden:

- 1) Kunststoffgitter
- 2) Schwamm
- 3) 3 Blätter Whatman 3MM Filterpapier
- 4) Gel

- 5) Nitrocellulosemembran
- 6) 3 Blätter Whatman 3MM Filterpapier
- 7) Schwamm
- 8) Kunststoffgitter

So entstand eine Art fest verschlossenes „Sandwich“, welches nachfolgend mit der Gelseite zur Kathode und der Membranseite zu Anode zeigend in die Blotkammer eingesetzt wurde. Die Kammer war ebenso mit Transferpuffer gefüllt, und der Blot erfolgte schließlich bei 80 V und 4 °C (im Kühlraum) für ca. 1 Stunde. Anschließend wurde die Membran zunächst für 1 Stunde mit 5% Magermilch (5% Magermilchpulver in 1x TBS-Tween (0,5% Tween 20)) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und danach dreimalig je 10 min mit einer TBS-Tween-Waschlösung (0,5% Tween 20 in 1x TBS) gewaschen, um die Hintergrundbildung zu verringern. Es folgte schließlich die Inkubation über Nacht bei 4 °C auf dem Rollenmischer mit dem in einer 1:1000-Verdünnung vorliegenden monoklonalen rabbit anti-human PARP Antikörper (NEB, Ipswich, MA, USA) (=primärer Antikörper) in 5% Magermilch. Nach weiteren 3 10-minütigen Waschgängen mit TBS-Tween konnte die Membran mit dem sekundären Antikörper (Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunglobulins/HRP, DAKO) für 30 min auf dem Rollenmischer bei Raumtemperatur inkubiert werden. Der sekundäre Antikörper lag in einer Verdünnung von 1:2000 (mit TBS-Tween verdünnt) vor. Nach einem letzten Waschgang (dreimal je 10 min mit TBS-Tween) der Membran erfolgte die Detektion der Proteinbanden durch Chemilumineszenz mittels des ECLTM Western Blotting Detektionsreagenzes von Amersham Biosciences und nachfolgender Belichtung von Röntgenfilmen in einer Röntgenkassette. Die Filme wurden schlussendlich in einer AGFA Curix 60 Entwicklermaschine entwickelt.

2.2.11 Statistik

Die statistische und bioinformatische Auswertung wurde von Prof. Dr. A. Ultsch (Forschungsgruppe für Datenbionik, Fachbereich für Mathematik und

Informatik, Philipps-Universität Marburg) und Dr. med. C. P. Pallasch (Labor für zelluläre Immuntherapie, Klinik I für Innere Medizin, Universität zu Köln) durchgeführt.

Zur Auswertung der Microarray-Genexpressionsanalyse wurden die log₂ Expressionswerte der Illumina Whole Genome Bead Chip Array-Daten verwendet. Um verschiedene Arrays miteinander vergleichen zu können, wurde für jeden Array eine z-Transformation angewendet. Dabei wählte man die Parameter der z-Transformation so aus, dass die Verteilung der nicht exprimierten Transkripte (nicht exprimierte Gene) auf eine Standardnormalverteilung abgebildet wurde. Man nennt diese Transformation Unit-Transformation (u-Transformation). Die Verteilung der exprimierten Gene ($z > 1$) wurde als log normalverteilt analysiert und konnte anschließend durch eine log-Transformation normalisiert werden. Des Weiteren wurde der hierarchische Clustering Algorithmus nach Ward mit einer Distanz-Korrelation zwischen CLL-Proben und Kontrollen verwendet (Abb. 8A). Die gleiche Distanzmessung wurde in der multidimensionalen Scaling-Analyse (MDS) angewendet, welche die Entfernungen der 78 Gene in einen zweidimensionalen Raum projiziert (Abb. 8B). Ferner wurden der Mittelwert und die Varianz für einen 2-Gruppen t-Test berechnet. Diese Statistik wurde eingesetzt, um die verschiedenen exprimierten Gene zu identifizieren (Abb. 9).

Die Dosis-Wirkungskurve wurde durch das Programm SigmaPlot 2001 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) angefertigt. Ein p von $\leq 0,05$ wurde als signifikant erachtet. Weitere statistische Auswertungen wurden mit der Software SPSS 12.0G durchgeführt. Die IC₅₀-Werte (halbmaximale Wirkkonzentration) von Orlistat wurden dagegen mithilfe der Hill-Gleichung ($y = y^0 + (ax^b)/(c^b + x^b)$) bestimmt.

Die weitere bioinformatische Analyse wurde mittels verschiedener Software durchgeführt.

Für eine Extraktion der entsprechenden Daten wurde zum einen das Programm dChip 2005 und zum anderen das Bead Studio von Illumina (Version 1.4.0.2) verwendet.

Die funktionelle Analyse wurde dagegen mithilfe der Software BiNGO (www.psb.ugent.be/cbd/papers/BiNGO/), GenMapp Version 2.0 und BioRag

(www.biorag.org; Programm: Pathway Miner) durchgeführt. Bei diesen zuletzt genannten 3 Programmen wurden jeweils die Gruppen signifikant differentiell exprimierter Gene eingegeben und eine funktionelle und signifikante Zuordnung zu zellulären Funktionen versucht.

3 Ergebnisse

3.1 Patientendaten

3.1.1 Daten der Patienten der Microarray-Genexpressionsanalyse

Pat.-Nr	Alter	IgV _H	ZAP-70	CD38	Binet	Bisherige Therapie
6204	48	u	p	p	C	Chlorambucil (05)
6215	87	m	n	n.v.	B	multiple Chlorambucil-Zyklen (zuletzt bis 03 mit 8 Zyklen)
6252	56	m	n	n.v.	C	Chlorambucil; Fludarabin+Rituximab (00-01)=> CR; 4xFludarabin+Alemtuzumab (02)=> PR
6271	66	u	p	p	B	multiple Zyklen Chlorambucil; 6xFC (05-06)
6426	65	u	n	n.v.	B	unbehandelt
6432	66	m	n	n	B	unbehandelt
6450	77	u	p	p	A	unbehandelt
6540	72	m	n	n	C	Fludarabin (01); Rituximab (01); Chlorambucil+Prednison (03); 3xR- CHOP (04); Progress CLL: Bendamustin (05) (mit Dosisreduktion)

Pat.-Nr. = Patientenummer; u = unmutiert; m = mutiert; p = positiv; n = negativ; n.v. = nicht vorhanden; CR = komplette Remission; PR = partielle Remission; FC = Fludarabin + Cyclophosphamid; R-CHOP = Rituximab + Cyclophosphamid + Doxorubicin + Vincristin + Prednison

3.1.2 Daten der Patienten der Orlistat-Behandlung

Pat.-Nr	Alter	IgV _H	ZAP-70	CD38	Binet	Bisherige Therapie
7543	n.v.	m	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
7559 =8169	68	n.v.	p	p	C	intermittierend Chlorambucil (01-04); 11xChlorambucil (05)=> nur geringes Ansprechen=> Therapiestopp=> PR; Progress mit Thrombozytopenie + Anämie (06); FC (06) (dosisreduziert 50%)
7567	64	m	p	n.v.	A	unbehandelt
7677	62	m	n	n.v.	B	unbehandelt
7739	68	n.v.	p	n.v.	C	Fludarabin+Rituximab (98) (CLL2C)=> CR; 1. Rezidiv: 6xFludarabin+Alemtuzumab (01-02)=> CR; 2. Rezidiv (Befall aller LK- Stationen+B-Symptome +Splenomegalie+hämatopoetische Insuffizienz): 6xR-CHOP (04)=> PR; TACI-Ak (05)=> NC; Cyclophosphamidvorphase (06); 1D09C3 (Studie)
7803	n.v.	u	n	n.v.	n.v.	n.v.
7837	42	m	n	n	A	unbehandelt
7974	58	m	n.v.	n.v.	B	1xChlorambucil+Prednison (91); 6xCOP (91-92)=> PR; 6xCOP (97- 98)=> PR; 3xFC (02) (3.Zyklus 50%)=> AIHA; 2xCHOP ohne Vincristin (04); 4xR-CHOP ohne Vincristin (04-05)=> PR; 3xBendamustin (05) (3.Zyklus 50%); TACI-Fc5 (05); Cyclophosphamidvorphase (06); 1D09C3 (06)
7980	62	n.v.	n	n	C	experimentelle Therapie mit Lu-177- markierten Somatostatinanaloga (Lutetium-177-Octreatatid) (05)=> PR
7986	61	u	p	p	B	unbehandelt

7992	66	m	n	n	B	unbehandelt
8035	69	n.v.	p	n.v.	A	unbehandelt
8068 =8158	80	n.v.	n	n	B	Chlorambucil (02-03)=> Abbruch wegen progredienter Anämie; progrediente Leukozytose unter lokaler Steroidinfiltrationstherapie (04); Chlorambucil (06)
8074	64	m	n	n	A	unbehandelt
8080	74	n.v.	p	p	B	unbehandelt
8081	69	n.v.	n	n	C	8xChlorambucil (01)=> Abbruch wegen Thrombozytopenie
8082	50	m	n	n	B	unbehandelt
8130	74	n.v.	p	n.v.	n.v.	n.v.
8153	63	m	n	n.v.	B	SDX-101 (02)=> PR; 6xFC (CLL4) (02)=> CR
8154	56	m	n	n.v.	C	Chlorambucil; Fludarabin+Rituximab (00-01)=> CR; 4xFludarabin+Alemtuzumab (02)=> PR
8157	57	n.v.	n	n.v.	B	Cyclophosphamid oral 7d (03); 1xFC (03); 3xFC+Rituximab (03)=> PR; Stammzellmobilisierung mit GCSF=> keine Mobilisierung (03)
8163	69	n.v.	n.v.	n.v.	C	4xFludarabin (94); 4xFludarabin+Chlorambucil (98); Chlorambucil bei Progress (04-05); 1xFludarabin (05) mit Autoimmunhämolyse=> hochdosierte Steroide; 4xR-CHOP (CLL2G) (05)
8164	87	m	n	n.v.	B	multiple Chlorambucil-Zyklen (zuletzt bis 03 mit 8 Zyklen)
8174	n.v.	n.v.	n	n.v.	n.v.	n.v.
8175	82	m	n	n.v.	C	12xChlorambucil (02-03); Chlorambucil (03-04)
8176	64	n.v.	p	p	C	8xChlorambucil (95); 6xFMD (97-98); 8xRituximab (98-02); 6xCHOP (02); Fludarabin+Alemtuzumab (04); TACI-Studie

Pat.-Nr.: Patientenummer; u = unmutiert; m = mutiert; p = positiv; n = negativ; n.v. = nicht vorhanden; d = Tage; LK = Lymphknoten; Ak = Antikörper; CR = komplette Remission; PR = partielle Remission; NC = No change (Stillstand); AIHA = autoimmunhämolytische Anämie; FC = Fludarabin + Cyclophosphamid; CHOP = Cyclophosphamid + Doxorubicin + Vincristin + Prednison; R-CHOP = Rituximab + Cyclophosphamid + Doxorubicin + Vincristin + Prednison; COP = Cyclophosphamid + Vincristin + Prednison; GCSF = Granulozyten koloniestimulierender Faktor; FMD = Fludarabin + Mitoxantron + Dexamethason; TACI = TACI-Immunglobulin (bindet an lösliche Proteine BlyS und APRIL); SDX-101 = R-Enantiomer von Etodolac; 1D09C3 = monoklonaler Antikörper (MHC-II-Antikörper)

3.2 Microarray-Genexpressionsanalyse

Der B-Zell-Rezeptor (BCR) der CLL-Zellen spielt eine wichtige Rolle in der chronischen lymphatischen Leukämie und im Signalweg dieser Zellen [112]. Aus diesem Grund wurde eine Microarray-Analyse durchgeführt, in der die Genexpressionsprofile von CLL-Zellen (n=8) mit gesunden CD5-positiven B-Zellen (n=5) als physiologische Kontrolle verglichen und durch BCR-Stimulation signifikant regulierte Gene identifiziert wurden. Nach Aufreinigung der Zellen wurde die BCR-Stimulation vollzogen, indem sowohl die gesunden als auch die CLL-Zellen 3 Stunden mit rabbit anti-human-IgM-Immunebeads (IrvineScientific, Santa Ana, CA, USA) inkubiert wurden. Darüber hinaus fand eine Stimulation mit rabbit anti-human-IgA-Immunebeads (IrvineScientific, Santa Ana, CA, USA) statt, die als Negativkontrolle diente, oder die Zellen verblieben unbehandelt im Kulturmedium. Die Stimulation mit rabbit-anti-human-IgA-Immunebeads diente dabei als Negativkontrolle, da auf der Oberfläche der CLL-Zellen nicht IgA, sondern hauptsächlich der IgM- und IgD-Subtyp von Immunglobulinen als BCR exprimiert wird [13]. Nach entsprechender Inkubation erfolgte die Isolierung der RNA aus den stimulierten und unstimulierten Zellen, welche nach hinreichender Aufbereitung dem Illumina Whole Genome Bead Chip Array (Illumina, San Diego, CA, USA), der mehr als 46.000 Gene beinhaltet, zugeführt werden konnte.

Als ein Ergebnis dieser Microarray-Analyse zeigte sich zunächst, dass die anti-IgA-stimulierten Proben ein sehr ähnliches Genexpressionsprofil zu den unstimulierten Negativkontrollen aufwiesen. Dagegen wurden in gesunden CD5-

positiven B-Zellen 510 Gene und in CLL-Zellen 531 Gene gefunden, die signifikant durch die BCR-Stimulation reguliert wurden. Beim Vergleich dieser beiden zuvor genannten Gruppen ergab sich eine Schnittmenge von 276 Genen, die signifikant sowohl in gesunden als auch in CLL-Zellen reguliert waren, d.h., diese 276 Gene waren in beiden Zellpopulationen identisch reguliert. 234 Gene wurden hingegen spezifisch nur in gesunden CD5-positiven B-Zellen reguliert und 255 Gene ausschließlich in CLL-Zellen (Abb. 2).

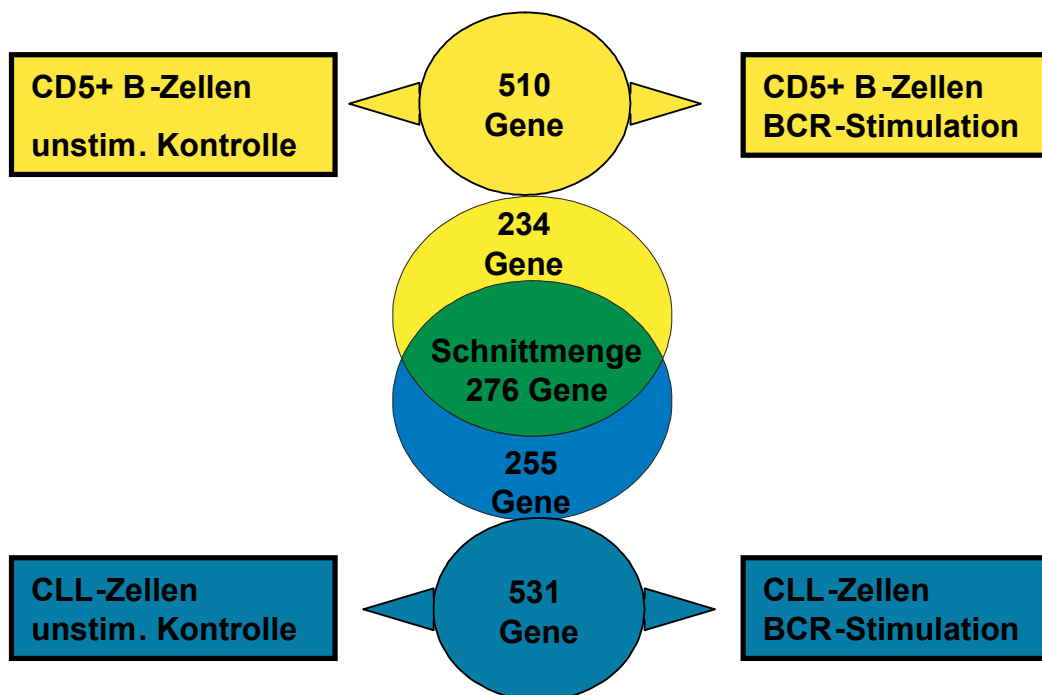


Abb. 2: Vergleich der durch B-Zell-Rezeptor-Stimulation regulierten Gene in gesunden und CLL-Zellen

Die Abbildung vergleicht die Genexpressionsprofile von CD5-positiven B-Zellen (n=5) und CLL-Zellen (n=8) aus der Microarray-Analyse und identifiziert die signifikant durch die B-Zell-Rezeptor-Stimulation (3 h mit rabbit anti-human-IgM-Immuno-beads) regulierten Gene. Dabei wurden 510 Gene bei gesunden CD5-positiven B-Zellen und 531 Gene bei CLL-Zellen durch die BCR-Stimulation signifikant reguliert. Von den 510 Genen wurden 234 spezifisch in CD5-positiven B-Zellen und von den 531 Genen spezifisch 255 Gene in der CLL reguliert. Darüber hinaus ergab sich eine Schnittmenge von 276 Genen, die sowohl in CLL-Zellen als auch in CD5-positiven B-Zellen identisch reguliert waren.

In Abbildung 3 sieht man ein hierarchisches Clustering, das einen graphischen Überblick über die verschiedenen exprimierten Gene gibt. Eine Blaufärbung steht dabei für eine Herunterregulation von Genen, rot für eine Heraufregulation; weiß bedeutet, dass keine signifikante Regulation stattgefunden hat.

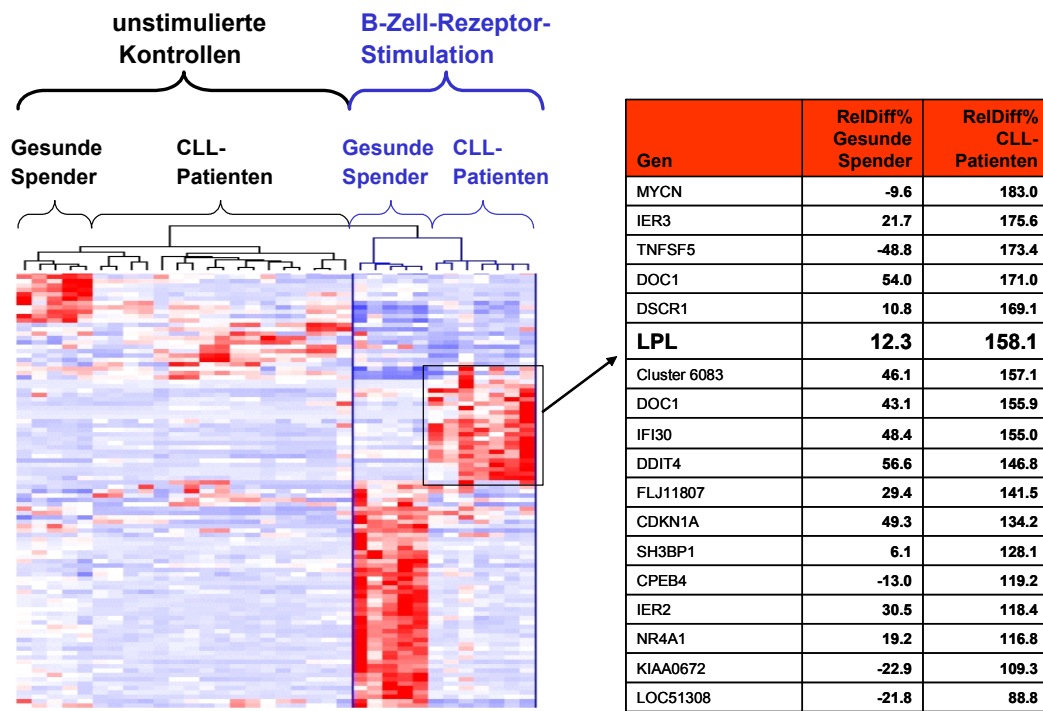


Abb. 3: Heatmap mit zugehörigem Clustering beruhend auf Ergebnissen der Microarray-Genexpressionsanalyse (rot = Hochregulation; blau = Herunterregulation; weiß = keine signifikante Regulation): Deutlich erkennbar ist eine heraufregulierte Gruppe von Genen bei BCR-stimulierten CLL-Patienten. Die Tabelle gibt die entsprechend regulierten Gene aus dieser Gruppe wieder und zeigt zudem die errechneten Werte der relativen Differenz in Prozent (Formel: $200 \cdot \frac{(E-B)}{(E+B)}$); Schwelle bei <80%-Punkte Differenz) für gesunde Spender und CLL-Patienten. Ein heraufreguliertes und bedeutendes Gen war dabei der prognostische Marker Lipoproteinlipase (LPL).

In der Abbildung kann man deutlich eine rot gefärbte und damit hochregulierte Gruppe von Genen erkennen, die ausschließlich nach BCR-Stimulation nur in CLL-Patienten heraufreguliert wurde. Diese Gruppe beinhaltet die am höchsten signifikant regulierten Gene aus der Fraktion der 255 Gene, die ausschließlich in CLL-Zellen reguliert wurden (vgl. blauer Kreis in Abb. 2). Die signifikanteste

Regulation dieser Gene fand sich dabei für MYCN, aber v.a. auch für Lipoproteinlipase (LPL) als ein prognostischer Marker in der CLL. Es wurde die relative Differenz in Prozent errechnet (angewandte Formel: $200 \cdot ((E-B)/(E+B))$); die Schwelle wurde bei >80%-Punkte Differenz festgesetzt. Für LPL lag die relative Differenz bei 158,1%, d.h., LPL war in stimulierten CLL-Zellen 158,1% höher reguliert als in unstimulierten CLL-Zellen.

Basierend auf den bisher dargestellten Ergebnissen sind weitere Analysen zur funktionellen Bedeutung der Genexpressionsprofile gemacht worden. Mithilfe der Online-Datenbank BioRag (Bioresource for array genes) auf www.biorag.org wurden die Resultate der Abbildungen 4 und 5 generiert. Mithilfe dieser Datenbank ist es möglich, Cluster auf der Basis von funktionellen Informationen von Genen und Proteinen zu analysieren. Sie bedient sich dabei 3 verschiedener Datenbanken, die Informationen zu den Funktionen der Proteine gespeichert haben. Alle Angaben beruhen auf publizierten Daten (GenMapp, KEGG und Biocarta). Somit lässt sich sowohl eine Überrepräsentation von Genen in bestimmten Pathways, als auch eine funktionelle Verknüpfung von den signifikant regulierten Genen untereinander herstellen.

Nachfolgend sind solche Verknüpfungen für gesunde CD5-positive B-Zellen und CLL-Zellen in einer Netzwerkanalyse demonstriert (Abb. 4 und 5). Grün unterlegte Symbole stehen für eine Herunterregulation von Genen und rot gefärbte Kreise für eine Heraufregulation. In gesunden CD5-positiven B-Zellen wurden nach dreistündiger BCR-Stimulation hauptsächlich Gene des Zellzyklus, des MAP-Kinase-, des TGF- β -Signalweges sowie einige Gene des Aminosäure- und Nukleotidmetabolismus reguliert (Abb. 4).

Gesunde CD5-positive B-Zellen

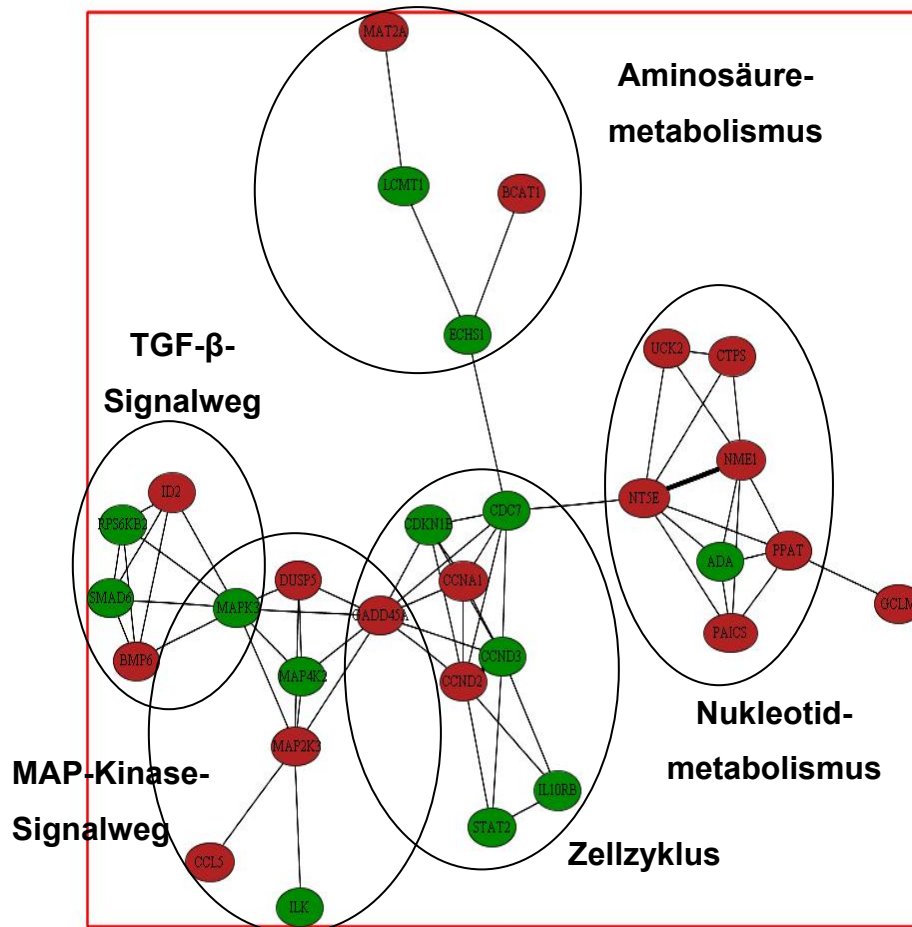


Abb. 4: Netzwerkanalyse der Genexpressionsprofile von gesunden CD5-positiven B-Zellen nach dreistündiger BCR-Stimulation mithilfe der Online-Datenbank BioRag (grün = Herunterregulation; rot = Heraufregulation).

In CLL-Zellen wurden nach BCR-Stimulation ebenfalls Gene des MAP-Kinase-Signalweges überwiegend heraufreguliert. Ferner konnten Genregulationen im Phosphoinositol-, im Wnt-Signalweg sowie im Glykosphingolipidmetabolismus nachgewiesen werden. Letzteres wurde in Bezug auf die Cluster-Abbildung erwähnt, so dass auch mit dieser Analyseverfahren gezeigt werden konnte, dass LPL – als Bestandteil des Glykosphingolipidmetabolismus – in der CLL heraufreguliert wurde (Abb. 5) und darüber hinaus eine zentrale Stellung in dieser Netzwerkanalyse einnimmt.

CLL-Zellen

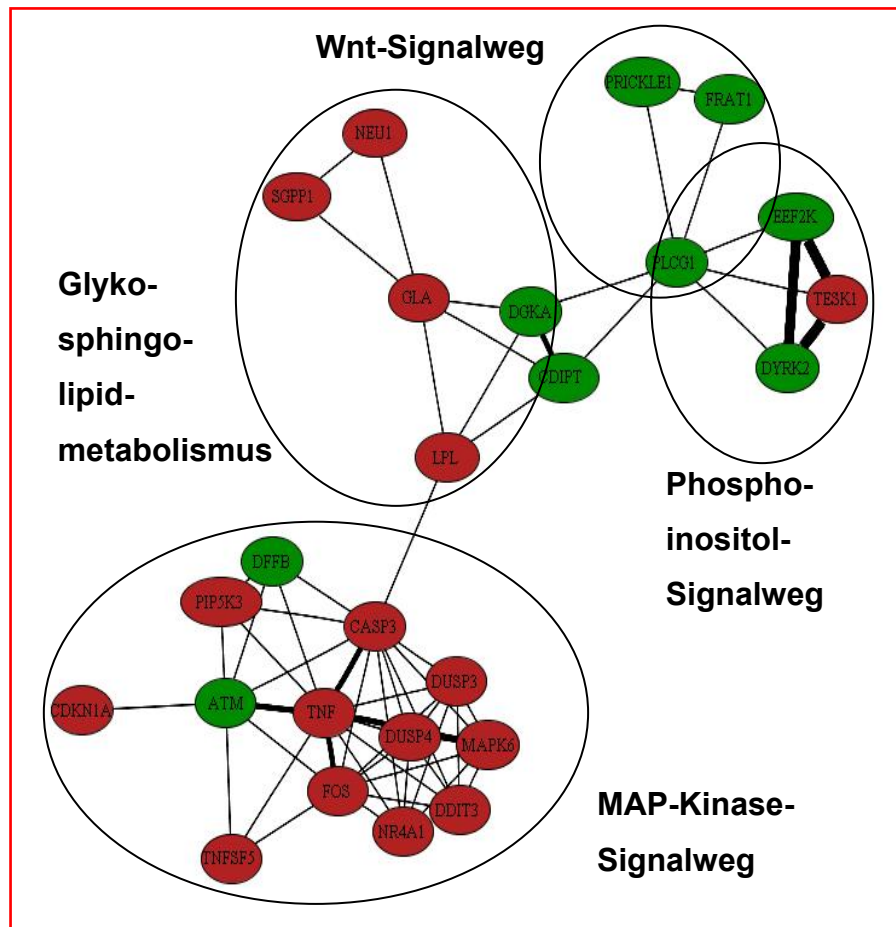


Abb. 5: Netzwerkanalyse der Genexpressionsprofile von CLL-Zellen nach dreistündiger BCR-Stimulation mithilfe der Online-Datenbank BioRag (grün = Herunterregulation; rot = Heraufregulation). Auffallend ist die Heraufregulation von Lipoproteinlipase (LPL) im Rahmen des Glykosphingolipidmetabolismus.

3.3 Lipoproteinlipase (LPL)

Lipoproteinlipase ist ein prognostischer Faktor in der chronischen lymphatischen Leukämie, dessen erhöhte Expression mit einem unmutierten IgV_H-Mutationsstatus und einer ungünstigen Prognose einhergeht [45][89][93][118]. Des Weiteren nimmt LPL eine zentrale Rolle im Lipidmetabolismus und -transport ein [75][102].

LPL wurde als CLL-spezifisch [45][93] und als ein von der BCR-Stimulation abhängiges Gen identifiziert. Basierend auf den Ergebnissen der Microarray-Ana-

lysen stellte sich heraus, dass sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten gesunden CD5-positiven Spenderzellen keine LPL-Expression verzeichnet werden konnte. In unstimulierten CLL-Zellen hingegen konnte eine deutliche Expression von LPL ausschließlich in IgV_H-unmutierten Fällen gefunden werden, während die IgV_H-mutierten CLL-Proben kein LPL exprimierten. Diese Tatsache erfüllte auf der einen Seite die Kriterien eines prognostischen Markers, auf der anderen Seite bestätigte sie die Daten aus vorangegangenen Publikationen, dass LPL in IgV_H-unmutierter CLL exprimiert wird [45][93]. Nach BCR-Stimulation fand dagegen eine deutliche Induktion von LPL statt, und zwar in IgV_H-unmutierten und nun auch in IgV_H-mutierten CLL-Patienten sowie in primär LPL-negativen Patienten (Abb. 6).

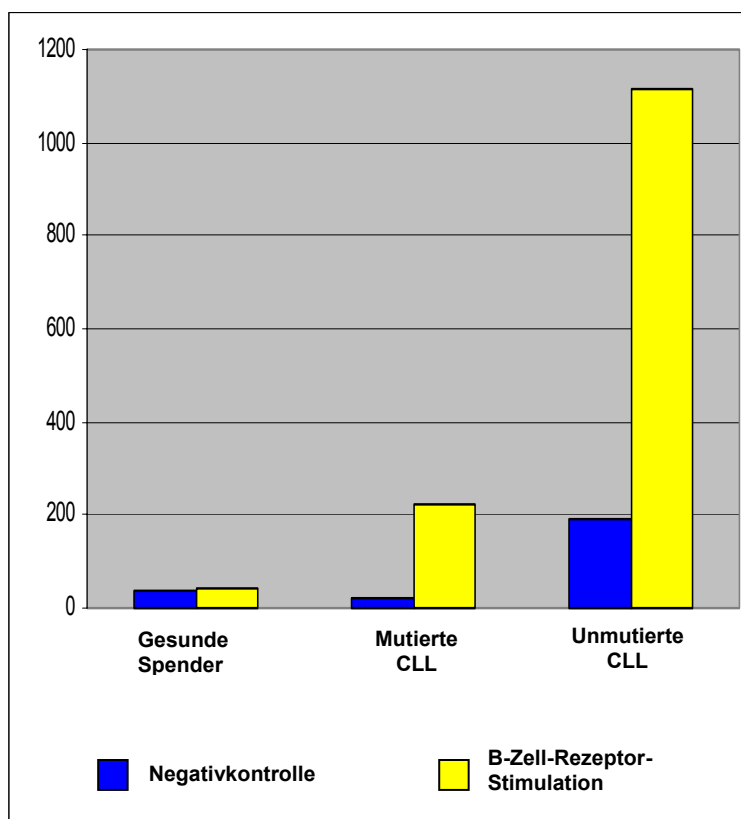


Abb. 6: LPL-Expression in gesunden Spendern, IgV_H-mutierten und -unmutierten CLL-Patienten mit und ohne BCR-Stimulation basierend auf Daten der Microarray-Genexpressionsanalyse: In gesunden B-Zellen wurde keine LPL-Expression festgestellt, weder bei unstimulierten noch bei BCR-stimulierten Proben. Bei unstimulierten CLL-Zellen wurde lediglich bei unmutierten Proben eine LPL-Expression ermittelt. Nach BCR-Stimulation dagegen konnte sowohl bei IgV_H-unmutierten als auch bei -mutierten CLL-Zellen eine deutliche LPL-Induktion erzielt werden.

Die Feststellung der LPL-Induktion durch BCR-Stimulation, gewonnen anhand der auf Microarray-basierenden Expressionsdaten, wurde durch eine weitere Methode, der Real-Time-PCR mit anschließender relativer Quantifizierung von LPL, validiert. Dabei zeigte sich analog zu den zuvor gewonnenen Daten, dass in CD5-positiven gesunden B-Zellen (n=9) keine signifikante Expression von LPL zu verzeichnen war, weder in unstimulierten Zellen (mediane Expressionsrate (ER) 0,3) noch in stimulierten Proben (mediane ER 0,58; $p > 0,05$). In CLL-Zellen (n=28) sah man dagegen – wie nach entsprechender dreistündiger BCR-Stimulation erwartet – einen signifikanten Anstieg der LPL-Expression (mediane ER 0,21 versus 14,59; $p < 0,01$). Unterschied man die CLL-Proben ferner in IgV_H-unmutierte (n=11) und -mutierte (n=17) Fälle, so konnte man bei IgV_H-unmutierten unstimulierten CLL-Patienten bereits eine deutliche LPL-Expression feststellen, die nach BCR-Stimulation um den Faktor 4,75 gesteigert werden konnte (mediane ER 3,2 versus 15,23; $p < 0,05$). IgV_H-mutierte unstimulierte CLL-Zellen zeigten dagegen kaum eine LPL-Expression (mediane ER 0,08), während sich nach BCR-Stimulation eine ausgeprägte LPL-Induktion erzielen ließ (mediane ER 7,87; $p < 0,01$) (Abb. 7).

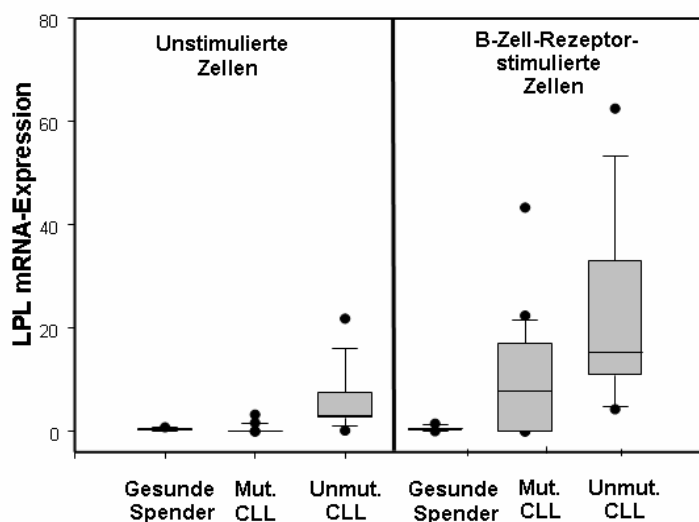


Abb. 7: Analyse der LPL-Expression mit Real-Time-PCR und relativer Quantifizierung:

Es wurden dazu gesunde CD5-positive Spenderzellen (n=9), IgV_H-mutierte (n=17) und IgV_H-unmutierte (n=11) CLL-Proben sowohl im nativen Zustand als auch nach dreistündiger BCR-Stimulation untersucht. In nativen, unstimulierten Proben konnte lediglich bei IgV_H-unmutierten CLL-Zellen eine LPL-

Expression festgestellt werden. Nach BCR-Stimulation war eine LPL-Induktion in IgV_H-mutierten CLL-Proben ($p < 0,01$) und eine weitere Verstärkung der LPL-Expression in unmutierten CLL-Zellen ($p < 0,05$) zu verzeichnen; in gesunden Spenderzellen kam es auch nach BCR-Stimulation zu keiner LPL-Induktion.

Wie die bisherigen dargestellten Resultate zeigen, nimmt LPL eine wichtige Stellung in der CLL ein, indem sie durch den B-Zell-Rezeptor reguliert wird. Bei IgV_H-mutierten und -unmutierten CLL-Patienten, die eine BCR-Stimulation erfuhren, konnte eine Heraufregulation von LPL nachgewiesen werden, während gesunde Spenderzellen keine LPL-Expression vorwiesen.

Neben dieser quantitativen Analyse von LPL wurde eine funktionelle Untersuchung der Genexpression basierend auf der Gene Ontology Datenbank AmiGO (www.geneontology.org) durchgeführt. Das Konzept hinter Gene Ontology besteht darin, dass Genprodukte in verschiedenen Datenbanken beschrieben werden und es möglich ist, Gene und Proteine auf der Basis ihrer gemeinsamen Biologie daraus abzufragen. Die Darstellung bzw. Sortierung erfolgt dabei anhand von 3 unabhängigen, strukturierten Begriffen (Ontologien), die mit den Genprodukten assoziiert und speziesunabhängig sind: Der biologische Prozess (zu dem das Genprodukt beiträgt), die molekulare Funktion des Gens und die zelluläre Komponente (d.h., an welchem Zellort das Genprodukt aktiv ist). Die von den verschiedenen zusammenwirkenden Datenbanken benutzten GO-Terms, die wiederum in einem dynamischen Netzwerk verknüpft sind und nach denen die Gene anhand ihrer funktionellen Zusammengehörigkeit oder ihrer Gensequenzen zugeordnet sind, vereinfachen den Abruf [4].

In dieser Analyse wurde der GO-Term GO:0016298 verwendet, der 78 Gene enthielt, die mit Lipaseaktivität assoziiert waren.

Zunächst wurde eine hierarchische Cluster-Analyse mit Genen ausgeführt (Prof. Dr. A. Ultsch, Forschungsgruppe für Datenbionik, Fachbereich für Mathematik und Informatik, Philipps-Universität Marburg), die im oben erwähnten Lipaseaktivität-definierenden GO-Term beinhaltet waren. Diese Analyse verglich die Genexpression der durch Lipaseaktivität definierten Gene von nativen (n=8) und BCR-stimulierten (n=8) CLL-Zellen und von gesunden unstimulierten (n=5) und BCR-stimulierten (n=5) CD5-positive B-Zellen. Wie in Abbildung 8A deutlich zu erkennen ist, war es möglich, mithilfe des Lipaseaktivität-definierenden GO-Terms CLL-Zellen von gesunden B-Zellen zu unterscheiden. Das Ergebnis wurde mit einer weiteren Methode, der multidimensionalen Scaling-Analyse (MDS) von Lipaseaktivität-assoziierten Genexpressionsdaten-

sets (Prof. Dr. A. Ultsch, Philipps-Universität Marburg), bestätigt. Auch hier konnten CLL-Zellen von gesunden CD5-positiven B-Zellen anhand von Lipaseaktivität separiert werden (Abb. 8B). Die Resultate aus den beiden genannten Methoden waren jeweils unabhängig vom Einfluss der BCR-Stimulation.

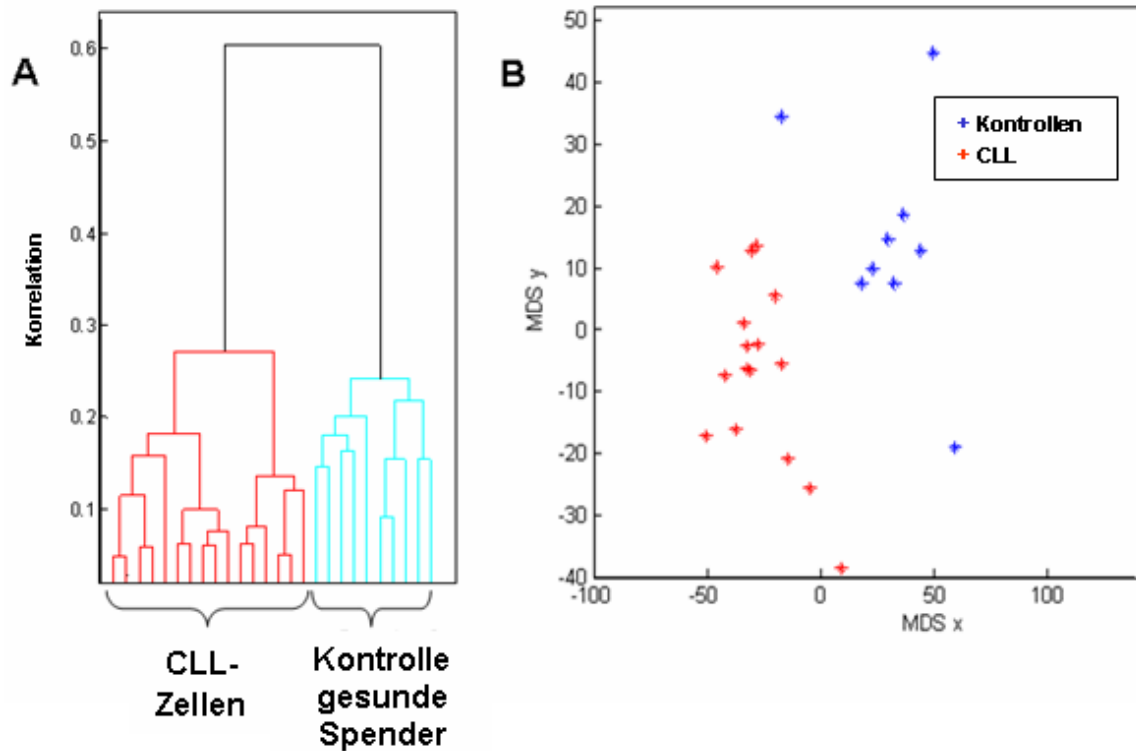


Abb. 8: (A) Hierarchische Cluster-Analyse mit Genen, die im GO-Term 0016298 (=Lipaseaktivität) beinhaltet waren. Es wurden dabei die Genexpressionsprofile – bezogen auf Lipaseaktivität – von nativen (n=8) und BCR-stimulierten (n=8) CLL-Proben und von gesunden unstimulierten (n=5) und BCR-stimulierten (n=5) CD5-positiven B-Zellen verglichen. (B) Multidimensionale Scaling-Analyse (MDS) von Lipaseaktivitäts-assoziierten Genexpressionsdatensets.

Mit beiden Methoden konnte gezeigt werden, dass sich CLL-Zellen von gesunden CD5-positiven B-Zellen anhand von Lipaseaktivität unterscheiden lassen.

In Abbildung 9 (Prof. Dr. A. Ultsch, Forschungsgruppe für Datenbionik, Fachbereich für Mathematik und Informatik, Philipps-Universität Marburg)

werden 21 Gene aus der Gruppe der 78 durch Lipaseaktivität definierten Gene dargestellt, die am signifikantesten den Unterschied zwischen gesunden und CLL-Zellen aufzeigen (Principle component analysis, PCA). Die Abbildung basiert erneut auf Daten der Microarray-Analyse. Rechtsseitig der violetten Linie besteht eine Signifikanz der Genexpression, während linksseitig nur eine unsichere Expression nachgewiesen werden kann. Die 21 aufgezeigten Gene waren diejenigen, die am stärksten signifikant reguliert und die zudem als die wichtigsten Komponenten für eine unterschiedliche Expression in CLL und gesunden CD5-positiven B-Zellen angesehen wurden. 20 der 21 Gene wurden dabei in der CLL überexprimiert. Ein auffällig reguliertes Gen war LPL (siehe lange rote Linie), womit erneut bewiesen werden konnte, dass LPL in der CLL aber nicht in gesunden B-Zellen heraufreguliert wird.

Über LPL hinaus wurden noch weitere Gene mit Phospholipaseaktivität überexprimiert. So z.B. eine Gruppe von 7 Genen, die Phospholipase A2-Enzyme waren oder Homologien zu Phospholipase A2 (PLA2) zeigten. Dazu zählten Phospholipase A2 gamma (PLA2G4C), Phospholipase A2 Gruppe IIF (PLA2G2F), Phospholipase A2 Gruppe IIE (PLA2G2E), LEP14 und LEP13, PATE sowie Adiponutrin. Des Weiteren wurden 5 Gene hochreguliert, die eine Assoziation zu Phospholipase C aufwiesen, so u.a. Phospholipase C beta 1 (PLCB1), Phospholipase C beta 2 (PLCB2), der Bradykinin-Rezeptor B2 und das Genprodukt von KIAA0450. Die letzte bedeutende Gruppe an überexprimierten Genen war mit Phospholipase D-Aktivität verknüpft und enthielt das Gen Phospholipase D2 (PLD2) sowie das Gen für den Calcitonin-Rezeptor (s. Abb. 9).

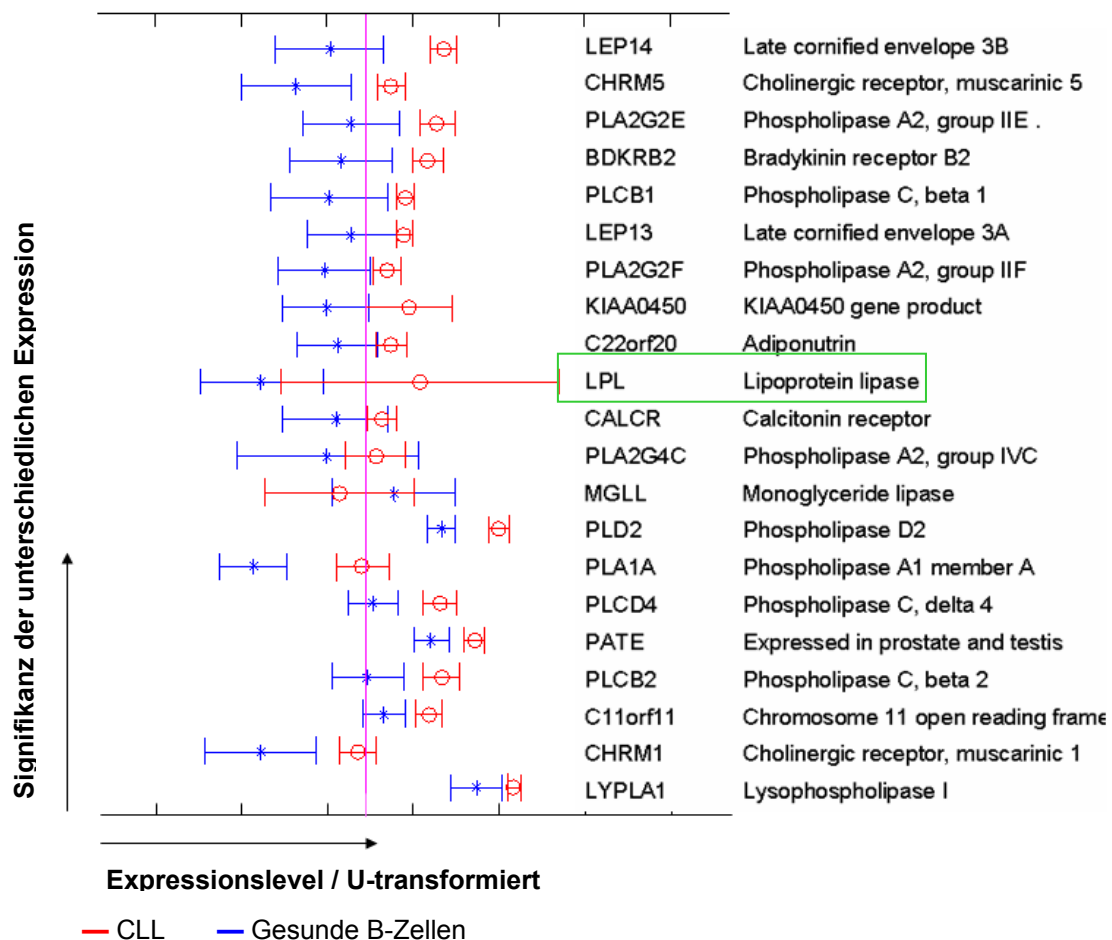


Abb. 9: Principle component analysis: 21 mit Lipaseaktivität assoziierte Gene, die am stärksten signifikant reguliert und als die wichtigsten Komponenten für eine unterschiedliche Expression in CLL und gesunden B-Zellen angesehen wurden (Daten basierend auf Microarray-Analyse). Rechts der violetten Linie liegt eine Signifikanz vor, links der Linie dagegen nur eine unsichere Expression.

3.4 Einfluss von Orlistat auf CLL-Zellen

Die bisher demonstrierten Ergebnisse deuten auf eine Überexpression von Lipasen, und im Speziellen von Lipoproteinlipase, in der chronischen lymphatischen Leukämie hin. Als Nächstes wurde nun versucht, diese Lipasen mit einem entsprechenden Inhibitor zu hemmen. Als Inhibitor wurde Orlistat (=Tetrahydrolipstatin) verwendet, der eine Vielzahl von Lipasen inhibieren kann [9][74]. Orlistat wird erfolgreich in der Adipositas therapie eingesetzt und besitzt

für diese Indikation eine Zulassung. Orlistat inhibiert im gastrointestinalen Trakt Lipasen und reduziert somit die Absorption von Fett [49]. Darüber hinaus konnte in einer anderen Studie nachgewiesen werden, dass Orlistat ein effektiver Hemmstoff für LPL ist [68].

Zunächst wurden CLL-Zellen aus Patientenblut (n=12) frisch isoliert und anschließend 24 Stunden mit ansteigenden Konzentrationen von Orlistat (1 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , 100 μM) (Sigma, Steinheim, D) inkubiert. Die Viabilität der Zellen wurde anhand von XTT-Assays überprüft. Die Induktion von Apoptose wurde dagegen durch eine Annexin V-FITC/7-AAD durchflusszytometrische Messung (FACS) beurteilt, wobei Annexin V/7-AAD-negative Zellen als lebend erachtet wurden und Annexin V/7-AAD-positive als tot. Zum Vergleich wurde eine gleiche Behandlung mit CD5-positiven gesunden B-Zellen und mit gesunden unsortierten PBMCs durchgeführt. Es konnte bei dieser Untersuchung festgestellt werden, dass Orlistat zu einer spezifischen und konzentrationsabhängigen Apoptoseinduktion bzw. Zelltod in CLL-Zellen führte, wohingegen z.B. in gesunden unsortierten PBMCs bei 100 μM Orlistat nur eine leichte Zytotoxizität zu verzeichnen war mit 13,1% Annexin V-positiven und damit apoptotischen Zellen. Mittels FACS-Messung konnte in CLL-Zellen eine halbmaximale Wirkkonzentration (IC₅₀) für Orlistat von 2,35 μM nach 24-stündiger Inkubation ermittelt werden (nach 48 Stunden Orlistat-Inkubation: IC₅₀ = 1,58 μM). Mithilfe des XTT-Assays ergab sich eine ähnliche IC₅₀ von 5,48 μM nach 24 Stunden Orlistat-Inkubation. Bei Errechnung der halbmaximalen Wirkkonzentration von gesunden B-Zellen (n=6) auf der Basis von FACS-Messungen fand sich ein signifikant höherer Wert von 148,5 μM (Abb. 10).

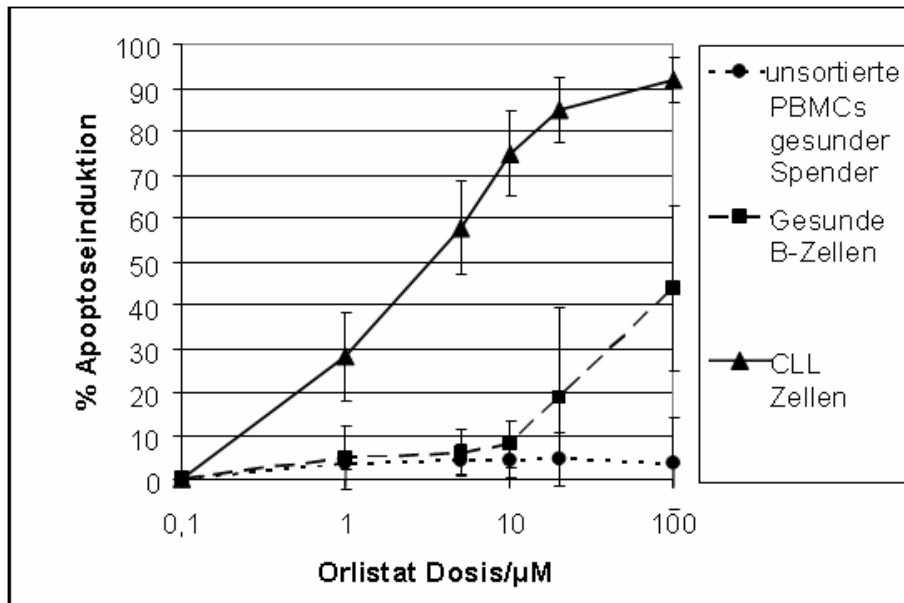


Abb. 10: Bestimmung der halbmaximalen Wirkkonzentration (IC₅₀) von Orlistat in CLL-Zellen, gesunden unsortierten PBMCs und gesunden B-Spenderzellen nach 24-stündiger Orlistat-Inkubation; die Apoptoseinduktion wurde mittels Annexin V-FITC/7-AAD FACS-Messung ermittelt: Für CLL-Zellen (n=12) wurde eine IC₅₀ von 2,35 µM Orlistat zur Apoptoseinduktion identifiziert. Die berechnete IC₅₀ für gesunde B-Zellen (n=6) war mit 148,5 µM Orlistat signifikant höher. In gesunden PBMCs wurde hingegen nur eine leichte Zytotoxizität auf Orlistat verzeichnet.

Die Apoptoseinduktion von CLL-Zellen durch Orlistat wurde neben der Annexin V-FITC/7-AAD-FACS-Analyse auch durch Immunoblotting belegt. Bei diesem Verfahren wird PARP in seiner vollen Länge (=116 kD) bzw. gespaltenes PARP (=89 kD) mithilfe eines monoklonalen rabbit anti-human PARP Antikörpers (NEB, Ipswich, MA, USA) nachgewiesen. Hintergrund dieser Methode ist, dass PARP, eine im Kern befindliche Poly(ADP-Ribose) Polymerase, wahrscheinlich notwendig ist für DNA-Reparaturen [107]. Das Enzym wird *in vitro* durch einige Proteasen bzw. Caspasen mit Eigenschaften von ICE (interleukin-1-β-converting enzyme) gespalten [20][66] und ist *in vivo* eines der Hauptangriffsziele von Caspase 3 [88][115]. Die Spaltung erfolgt im menschlichen PARP zwischen Asp214 und Gly215, wodurch die Amino-terminale DNA-Bindungsdomäne (24 kD) von der Carboxy-terminalen katalytischen Domäne (89 kD) getrennt wird [66][88]. Dieses 89 kD große PARP-Fragment wird dann mittels Anti-

körper nachgewiesen und dient damit als Marker für Apoptose. Die Spaltung des PARP während der Apoptose versichert somit die Vollständigkeit und Irreversibilität dieses Prozesses [92].

CLL-Zellen wurden nun 24 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen von Orlistat (1 bis 100 μM) inkubiert. Es wurden eine 24h-DMSO-Negativkontrolle mitgeführt sowie CLL-Proben, die keine Behandlung erfuhren. Als Ergebnis dieses Immunoblots zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt der Orlistat-Behandlung auf die Spaltung des Enzyms PARP. Eine vollständige Spaltung von PARP mit Nachweis des 89 kD großen Fragmentes erfolgte bei einer Dosierung von 100 μM Orlistat in allen 3 analysierten CLL-Proben, wodurch die Apoptoseinduktion durch Orlistat auch mit diesem Verfahren bestätigt werden konnte. Die zum Vergleich mitbehandelten gesunden B-Lymphozyten zeigten dagegen keine Orlistat-spezifische Spaltung des Enzyms PARP (Abb. 11).

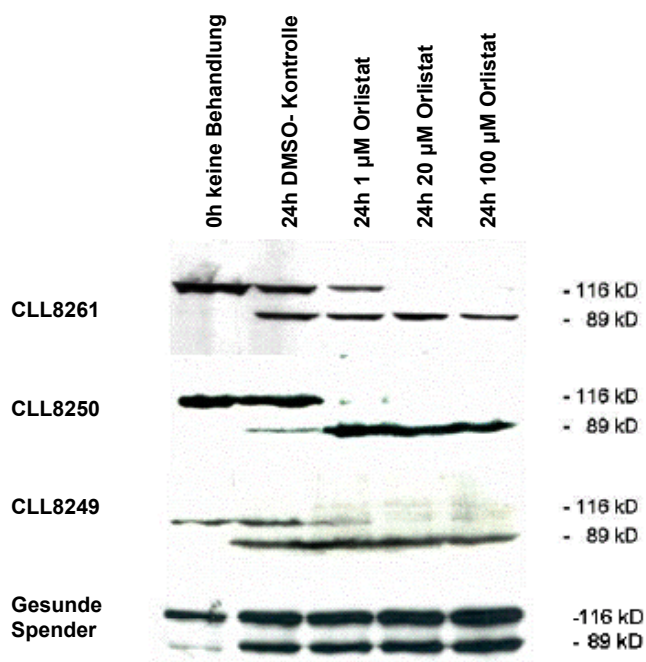


Abb. 11: Immunoblotting mit Untersuchung auf gespaltenes PARP: CLL-Proben bzw. gesunde B-Spenderzellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen von Orlistat (1 μM , 20 μM , 100 μM) für 24 h inkubiert; außerdem wurde eine 24h-DMSO-Negativkontrolle sowie ein Ausgangswert (0 h) ohne jegliche Behandlung mitgeführt. Die Zellen wurden lysiert und gleiche Proteinkonzentrationen im Western Blot eingesetzt. Eine vollständige Spaltung von PARP mit Nachweis des 89 kD-Fragmentes durch den anti-PARP-Antikörper erfolgte in CLL-

Zellen bei einer Konzentration von 100 μM Orlistat. In gesunden Spenderzellen konnte hingegen keine Orlistat-spezifische PARP-Spaltung nachgewiesen werden.

Aufgrund der oben erwähnten Feststellung, dass LPL durch Stimulation des B-Zell-Rezeptors heraufreguliert wird, schloss sich als nächstes eine Untersu-

chung bezüglich der Reaktion auf Orlistat von BCR-stimulierten CLL-Zellen gegen native CLL-Zellen an. Die Zellen in den zu vergleichenden Gruppen wurden jeweils mit 20 μM und mit 100 μM Orlistat für 24 Stunden inkubiert; zudem wurde eine DMSO-Negativkontrolle mitgeführt. Die Induktion von Apoptose und der Anteil lebender Zellen wurden durch Annexin V-FITC/7-AAD-FACS-Messung ermittelt. Wie aus Abbildung 12 zu entnehmen ist, war der Anteil der apoptotischen Zellen bei BCR-stimulierten CLL-Zellen deutlich geringer, und zwar in beiden Dosierungen, während native CLL-Zellen weiterhin eine eindeutige Apoptoseinduktion zeigten: BCR-stimulierte Zellen wiesen bei einer Behandlung mit 20 μM Orlistat eine Rate von 44,2% lebenden Zellen auf, wohingegen sich bei nativen unstimulierten Zellen 24,2% vitale Zellen nachweisen ließen ($n=18$; $p<0,001$). Bei Anwendung einer höheren Konzentration von 100 μM Orlistat traten bei unstimulierten Zellen 13,9% lebende Zellen gegenüber 37,2% bei BCR-stimulierten CLL-Zellen ($n=18$; $p=0,001$) auf.

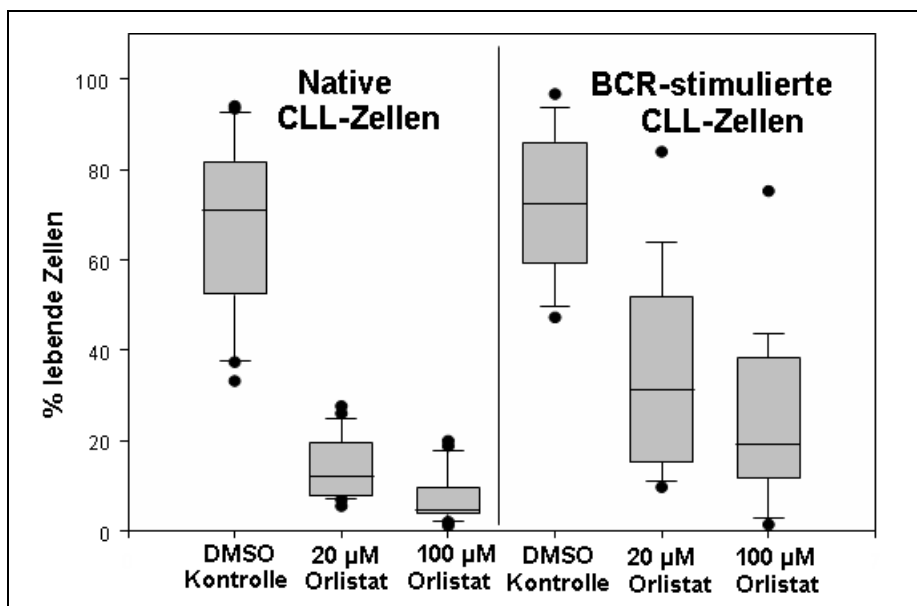


Abb. 12: Einfluss der BCR-Stimulation auf die Orlistat-Zytotoxizität: Native und BCR-stimulierte CLL-Zellen wurden mit DMSO als Negativkontrolle, 20 μM und 100 μM Orlistat 24 h inkubiert und die lebenden Zellen mittels Annexin V-FITC/7-AAD-FACS gemessen. BCR-stimulierte Proben zeigten in beiden Dosierungen signifikant weniger Apoptoseinduktion durch Orlistat als native CLL-Zellen ($p<0,001$; $p=0,001$).

Neben dem Einfluss des B-Zell-Rezeptors auf die Orlistat-Sensitivität wurde diesbezüglich auch die Bedeutung von einigen prognostischen Faktoren in der CLL – das Binet-Stadium, der ZAP-70-Status sowie der IgV_H-Hypermutationsstatus – überprüft. Nach 24-stündiger Inkubation von CLL-Zellen von Patienten im Stadium Binet A (n=6), Binet B (n=7) und Binet C (n=8) mit 20 µM Orlistat wurde kein signifikanter Unterschied bezüglich der Zytotoxizität von Orlistat gesehen: Bei Patienten mit Stadium Binet A konnten 68,5% apoptotische Zellen verzeichnet werden, bei Binet B-Patienten 66,0%, und Patienten im Stadium Binet C zeigten 55,0% Apoptoseinduktion (Abb. 13A).

In einem Vergleich von ZAP-70-positiven (n=7) mit ZAP-70-negativen Patienten (n=16) bei einer Behandlung mit 20 µM Orlistat für 24 Stunden konnte zwar eine leicht erhöhte Orlistat-Sensitivität bei ZAP-70-positiven Patienten beobachtet werden (63,7% apoptotische Zellen bei ZAP-70-positiven Patienten versus 55,7% Apoptoseinduktion bei ZAP-70-negativen Patienten), jedoch lag für diesen geringen Unterschied keine Signifikanz vor (Abb. 13B).

Ähnliche Ergebnisse stellten sich auch bei IgV_H-mutierten und -unmutierten Patienten ein; es gab auch hier keinen Unterschied in der Orlistat-Sensitivität.

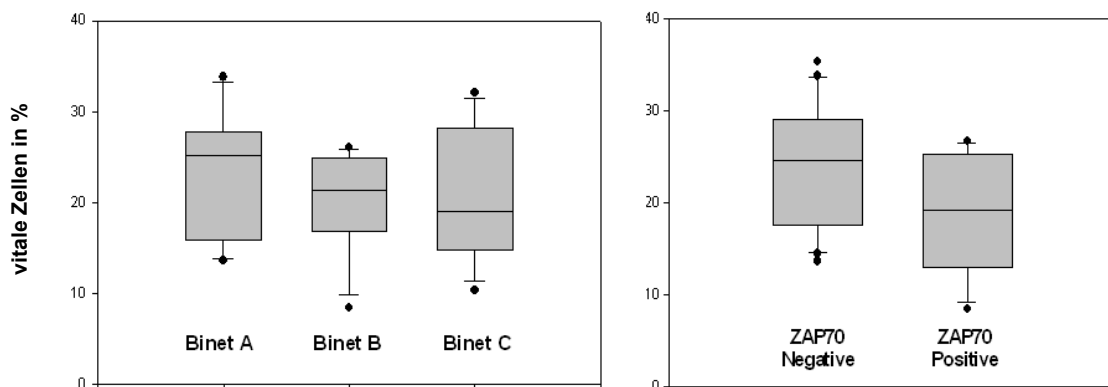
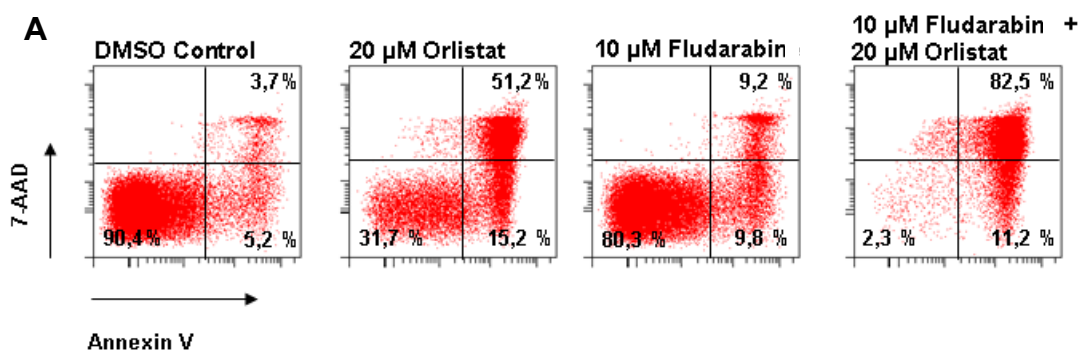


Abb. 13: Einfluss von prognostischen Faktoren auf die Orlistat-Sensitivität: (A) CLL-Zellen von Patienten im Binet-Stadium A (n=6), B (n=7) und C (n=8) wurden 24 h mit 20 µM Orlistat inkubiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Orlistat-Zytotoxizität in den 3 Gruppen. (B) Nach 24-stündiger Inkubation von CLL-Zellen von ZAP-70-positiven (n=7) und ZAP-70-negativen (n=16) Patienten mit 20 µM Orlistat konnte für ZAP-70-positive Zellen zwar eine leicht erhöhte Orlistat-Sensitivität festgestellt werden, jedoch mit fehlender Signifikanz.

Zusätzlich zu den bisher durchgeführten Experimenten mit Orlistat wurde eine weitere Untersuchung angeschlossen, in der die zytotoxische Wirkung von Orlistat mit der von Fludarabin, einem gängigen Chemotherapeutikum in der Behandlung der CLL [28][29], verglichen wurde. Frisch isolierte CLL-Zellen (n=7) wurden mit DMSO als Negativkontrolle, mit 20 μ M Orlistat, 10 μ M Fludarabin (Schering, Berlin, D) und mit einer Kombination aus 20 μ M Orlistat und 10 μ M Fludarabin inkubiert. Nach 48 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen mit Annexin V-FITC/7-AAD gefärbt und es erfolgte umgehend eine FACS-Messung zur Apoptoseanalyse.

Es stellte sich heraus, dass nach einer alleinigen Behandlung mit Orlistat 68,9% apoptotische CLL-Zellen, mit Fludarabin 41,0%, apoptotische Zellen zu verzeichnen waren, wohingegen bei einer Kombination aus Orlistat und Fludarabin bei 89,5% der CLL-Zellen Apoptose induziert wurde. Die Zahl an apoptotischen Zellen war signifikant erhöht im Vergleich zu der alleinigen Verwendung von Orlistat ($p=0,003$). Insofern konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus 20 μ M Orlistat und 10 μ M Fludarabin additive zytotoxische Effekte in der CLL aufweist (Abb 14B). Exemplarisch ist in Abbildung 14A eine FACS-Messung herausgegriffen, in der ebenfalls deutlich zu erkennen ist, dass Orlistat mit Fludarabin kombiniert additiv zytotoxisch wirkt (82,5% Apoptose versus 51,2% Apoptose bei 20 μ M Orlistat bzw. 9,2% bei 10 μ M Fludarabin).



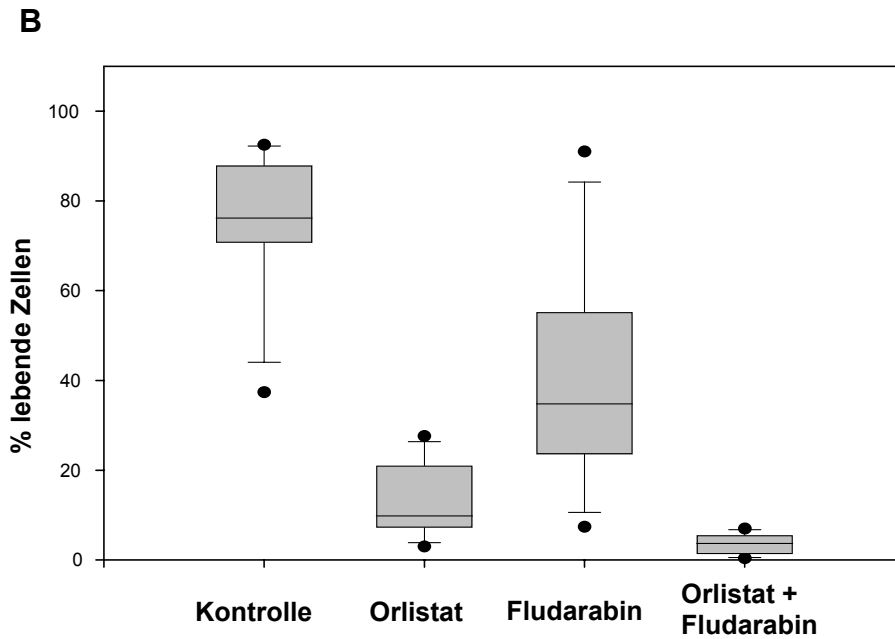


Abb. 14: (A) Exemplarische Darstellung einer Annexin V-FITC/7-AAD durchflusszytometrischen Apoptose-Messung: Frisch isolierte CLL-Zellen wurden 48 h mit DMSO als Negativkontrolle, 20 μM Orlistat, 10 μM Fludarabin und einer Kombination aus 20 μM Orlistat und 10 μM Fludarabin inkubiert. **(B) Darstellung der zytotoxischen Wirkung von Orlistat, Fludarabin und der Kombination** aus beiden basierend auf Daten der Annexin V-FITC/7-AAD FACS-Messungen (CLL: $n=7$; $p=0,003$).

In beiden Abbildungen ist deutlich zu erkennen, dass Orlistat und Fludarabin kombiniert im Vergleich zu einer alleinigen Orlistat-Behandlung additive zytotoxische Effekte aufweisen.

4 Diskussion

4.1 Microarray-Genexpressionsanalyse

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist die häufigste Leukämieform in der westlichen Welt [13] und zeigt zudem einen sehr heterogenen Krankheitsverlauf [11]. In diesem Zusammenhang hat die Microarray-Technik zunehmend an Bedeutung gewonnen, um Genexpressionsprofile von CLL- und gesunden Zellen zu analysieren. Diese Methode ermöglicht die Identifizierung prognostischer Faktoren als auch das Entdecken möglicher Angriffspunkte für eine Therapie, da für die Behandlung der CLL bisher immer noch keine kurativen Therapieansätze existieren.

Trotz vorangegangener Microarray-Analysen zur chronischen lymphatischen Leukämie wurde diese Erkrankung bisher nicht unter funktionellen Aspekten bezüglich des B-Zell-Rezeptors (BCR) bzw. der BCR-Stimulation untersucht. Dementsprechend wurden Microarrays (Illumina Whole Genome Bead Chip Array, San Diego, CA, USA) mit CLL-Zellen (n=8) und CD5-positiven B-Zellen (n=5) durchgeführt, um die Genexpressionsprofile von BCR-stimulierten (3 h mit anti-human-IgM-Immunobeads) mit unstimulierten Proben zu vergleichen.

Durch den BCR-Stimulus wurde sowohl in gesunden als auch in CLL-Zellen jeweils eine Reihe von Genen reguliert (s. Abb. 2 und 3), wobei in der CLL folgende Gene besonders stark heraufreguliert wurden und nachfolgend kurz charakterisiert werden: MYCN, DOC1, IER3, DSCR1 sowie LPL.

MYCN gehört der Familie der MYC-Onkogene an [109] und stellt einen Transkriptionsfaktor dar mit sowohl transkriptional aktivierenden (vorliegend als MYCN/Max-Heterodimer) als auch mit repressiven Eigenschaften (als Heterodimer an negative Kofaktoren gebunden) [37][106][111]. MYCN ist an verschiedenen Funktionen bzw. Aspekten der normalen und onkogenen Zellphysiologie beteiligt, wie Proliferation, Regulation des Zellzyklus, Apoptose und genomische Instabilität [30][87][111]. Darüber hinaus wird seine Expression als prognostischer Marker beim Neuroblastom genutzt, wobei eine erhöhte Expres-

sion mit einer ungünstigen Prognose und einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium assoziiert ist [10][109].

DOC1 stellt eine Untereinheit des Anaphase-Promoting-Komplexes (APC, eine Ubiquitin-Protein-Ligase) dar [63]. APC katalysiert die Ubiquitinierung von Cyclinen [57], was nachfolgend zu ihrer Proteolyse [50] und zu der Beendigung der Mitose führt [85][90]; DOC1 trägt dabei u.a. zur Substraterkennung bei [15][98].

Das Gen IER3 (= immediate early response 3) ist unter verschiedenen Synonymen wie IEX-1, Dif-2 oder gly96 bekannt. Es ist ein durch Stress induzierbares Gen [17][60][100][108] und spielt in diesem Zusammenhang eine bedeutende Rolle im Überleben der Zellen [35][79][127]. So schützt IER3 *in vivo* aktivierte T-Zellen vor Apoptose und führt somit zu einer verlängerten Immunantwort nach Antigenstimulation. Außerdem kann es auch zu einer Lupus-ähnlichen Autoimmunerkrankung und T-Zell-Lymphomen in Mäusen prädisponieren [110][130][131]. Die Überexpression dieses Gens kann entweder zu einer Verstärkung oder zu einer Unterdrückung der Apoptose führen, je nachdem welche Art von Stress vorliegt [110].

Zuletzt zu nennen ist das Gen DSCR1 (= Down syndrome candidate region 1), dessen Genprodukt ein endogener Calcineurin-Inhibitor ist [34][56]. Es hemmt zudem die Expression von Genen, die in der Entzündungsreaktion involviert sind und lässt demzufolge auf anti-inflammatorische Eigenschaften schließen [56]. Unterstützt wird diese Annahme durch die Verstärkung der Stabilität des I κ B α -Proteins durch DSCR1, welches NF κ B abschwächt bzw. hemmt. NF κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der u.a. für die Induktion des Enzyms Cyclooxygenase 2 (COX-2) verantwortlich ist [56]. Aufgrund der Inhibition dieses Transkriptionsfaktors durch das I κ B α -Protein kann die Bildung von entzündungsverstärkenden Prostaglandinen durch COX-2 nicht mehr bewerkstelligt werden.

Im Vergleich zu gesunden CD5-positiven B-Zellen wurde, neben den gerade beschriebenen Genen, in der CLL nach dreistündiger BCR-Stimulation ein weiteres bedeutsames Gen überexprimiert, die Lipoproteinlipase (LPL) (s. Abb. 3 und 6). LPL stellt ein zentrales Enzym in der Hydrolyse von Triacylglycerolkomponenten der Chylomikrone und very-low-density-lipoproteins (VLDL) dar

[36][75][102]. Dadurch werden periphere unterliegende Gewebe mit Fettsäuren versorgt [102]. LPL wird normalerweise von Adipozyten, Makrophagen, Herz- und Skelettmuskelzellen produziert und sezerniert [7][75][93][102] und ist an die Oberfläche von Endothelzellen und CLL-Zellen gebunden [7]. Dagegen ist es nicht in aufgereinigten T- oder B-Zellen nachweisbar [24].

Die Auswertung der durchgeführten Microarray-Analyse ergab eine Heraufregulation von Lipasen und Phospholipasen in CLL-Proben nach BCR-Stimulation im Vergleich zu gesunden Kontrollzellen. Durch weitere Untersuchung mithilfe der Gene Ontology Datenbank AmiGO konnte eine Sammlung von 78 Genen identifiziert werden, die durch den GO-Term „Lipaseaktivität“ definiert war [4] und folglich Lipase- und Lipaseaktivität-assoziierte Gene enthielt, welche verlässlich und signifikant zwischen gesunden und CLL-Zellen unterscheiden konnten (s. Abb. 8A und 8B).

Der Lipidmetabolismus nimmt eine bedeutende und bisher wohl unterschätzte Stellung in der chronischen lymphatischen Leukämie ein. Unterstützt wird diese Hypothese durch eine weitere Studie, die belegen konnte, dass die Phosphomonoesterkonzentrationen in CLL-Zellen gegenüber gesunden Spenderzellen erhöht waren. Die Menge der Zwischenprodukte war dabei erhöht, während sich der Anteil der Phospholipid-Vorläuferprodukte verringerte. Dadurch wurde zum einen die Bedeutung des Fettsäuremetabolismus in der CLL aufgezeigt und zum anderen vermutet, dass in der CLL eine verlängerte Aktivierung des Phospholipidmetabolismus besteht [32]. Die Tatsache, dass Phosphomonoester Abbauprodukte der Phospholipasen sind und, wie oben bereits erwähnt, in der CLL erhöht waren, gab den Anlass, die Genexpressionsanalyse in funktioneller Hinsicht zu untersuchen.

Bei Analyse des Microarray-Datensatzes wurden 21 signifikante Gene aus den 78 Genen des Lipaseaktivität-definierten GO-Terms identifiziert, welche nachweislich die bedeutsamsten Bestandteile für eine unterschiedlich hohe Expression und für eine funktionale Verschiedenheit in der CLL und gesunden Kontrollzellen waren (Principle component analysis, PCA) (s. Abb. 9). 7 dieser Gene gehörten dabei der Familie der Phospholipase A2 (PLA2) an. So z.B. setzen Phospholipase A2 gamma (PLA2G4C), Phospholipase Gruppe IIF

(PLA2G2F) und Phospholipase Gruppe IIE (PLA2G2E) Arachidonsäure aus Phospholipiden frei [83][84][117]. Bei den Genen LEP14 und LEP13 wird ebenfalls eine PLA2-Aktivität vermutet [70] und das Gen PATE trägt ein mutmaßliches PLA2-Muster am Carboxylende [5]. Bei Adiponutrin (Synonym: patatin-like phospholipase domain-containing protein 3), ein kalziumunabhängiges Protein mit einer homologen Patatin-Domäne in seiner Sequenz, kann ebenfalls eine PLA2-Aktivität nachgewiesen werden [53]. Zusammenfassend kann man also für die Familie der Phospholipase A2 festhalten, dass sie eine Gruppe darstellt mit Unterteilung in sekretorische (sPLA2), zytosolische (cPLA2) und kalziumunabhängige (iPLA2) Enzyme. Sie hat die wesentliche Funktion, die Hydrolyse der sn-2-Position von Membranglycerophospholipiden zu katalysieren, um somit Arachidonsäure als auch Lysophospholipide freizusetzen [82]. Darüber hinaus korreliert die Menge der zytoplasmatischen PLA2 mit Apoptose [26] und spielt eine wichtige Rolle in der Erhaltung des Phospholipidmembranaufbaus unter verschiedensten Bedingungen, wie z.B. oxidativer Stress [3].

In weiteren 5 der 21 Gene konnte eine Beziehung zu Phospholipase C (PLC) nachgewiesen werden, welche sowohl ein bedeutendes Enzym im intrazellulären Signalweg von B-Zellen darstellt, als auch im durch BCR-Stimulation ausgelösten Signalweg in der CLL [99]. Die Überexpression dieser 5 Gene lässt dabei auf eine mögliche Aktivierung eines solchen Ablaufs in der CLL schließen. 2 dieser Gene waren zunächst Phospholipase C-beta 1 (PLCB1), welches die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Inositol-1,4,5-trisphosphat und Diacylglycerol katalysiert, ein Schlüsselschritt in der intrazellulären Weitergabe von zahlreichen extrazellulären Signalen [14]. Das zweite Gen Phospholipase C-beta 2 (PLCB2) bevorzugt bei der hydrolytischen Spaltung als Substrat Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat gegenüber Phosphatidylinositol [96]. Ein weiteres hochreguliertes Gen war der B2-Bradykininrezeptor, der direkt mit Phospholipase C interagiert [47] und zudem mitogene Reize bietet [38]. Bei dem in der CLL überexprimierten Gen KIAA0450, auch bekannt als Phospholipase C-eta2, konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um ein PLC-Isoenzym handelt [134]. Für KIAA0450 wird

ebenfalls vermutet, dass es *in silico* eine katalytische Untereinheit von Phospholipase C bildet.

Zuletzt wurden noch 2 Gene aus der Fraktion der 21 Gene identifiziert, die eine Aktivität von Phospholipase D (PLD) aufwiesen. So zum einen Phospholipase D2 (PLD2), welche u.a. die hydrolytische Spaltung von Phosphatidylcholin zu Phosphatidinsäure und Cholin katalysiert [54] und in der CLL überexprimiert wurde. Daneben konnte in Studien gezeigt werden, dass PLD2 einerseits in Krebszelllinien (S1P₃-CHO-Zellen, Brustkrebszelllinie MDA-MB-231) Apoptose verhindert [128][133], was erneut eine Verbindung zwischen Apoptose und dem Lipidmetabolismus schafft. PLD2 verstärkt andererseits den Syk-vermittelten Signalweg in Mastzellen [67] und trägt dadurch analog in CLL-Zellen möglicherweise zu einer gesteigerten BCR-Signalübertragung durch Syk bei. Zum anderen wurde auch das Gen für den Calcitonin-Rezeptor hochreguliert, der in der Lage ist, Phospholipase D zu aktivieren [86].

4.2 Lipoproteinlipase (LPL)

Lipoproteinlipase wird als prognostischer Marker in der CLL verwendet, wobei eine erhöhte Expression auf eine eher ungünstige Prognose hindeutet. Dies wiederum stimmt mit Studien überein, die belegen konnten, dass eine gesteigerte LPL-Expression in der CLL mit einem unmutierten IgV_H-Hypermutationsstatus assoziiert ist [45][89][93][118]. Dieser geht ebenfalls mit einem schlechten klinischen Krankheitsverlauf einher [23][43]. Zudem hat LPL eine bessere prognostische Aussagekraft in der CLL als die Expression des Proteins ZAP-70 [93][118], ein ebenfalls verwendeter Prognosefaktor in der chronischen lymphatischen Leukämie.

Durch die Ergebnisse der durchgeführten Microarray-Analyse und nachfolgender Validierung durch Real-Time-PCR konnte eindeutig gezeigt werden, dass sich LPL durch Stimulation des BCR in sowohl IgV_H-unmutierten als auch IgV_H-mutierten CLL-Proben induzieren lässt. Dies lässt auf eine mögliche Beteiligung von Reaktionswegen des Lipidmetabolismus in der Pathogenese der CLL schließen. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass unmutierte CLL-

Zellen einen autoreaktiven BCR aufweisen [46] und dass ZAP-70, als ein Marker für einen unmutierten Status in der CLL [21][126], zu einer verstärkten Signalübertragung durch den BCR beiträgt [18]. Unter Berücksichtigung der aufgeführten Daten muss *in vivo* von einer Antigen-getriggerten, über den BCR-Signalweg induzierten Expression von LPL ausgegangen werden. So findet man auf der einen Seite eine erhöhte Expression von LPL *in vivo* fast ausschließlich in IgV_H-unmutierten CLL-Zellen [45][89][93][118], die, wie eben erwähnt, mit einer Autoreaktivität des BCR verknüpft sind [46]. Auf der anderen Seite konnte deutlich die Induktion von LPL durch BCR-Stimulation *ex vivo* veranschaulicht werden. Die Betrachtung der LPL-Reaktion auf den BCR-Stimulus lässt offenbar auf eine grundlegende Bedeutung in der Pathogenese der CLL schließen. Eine weitere Hypothese ist zudem, dass im Mikromilieu der malignen Zellen ein permanenter BCR-Stimulus existiert, begünstigt durch den autoreaktiven BCR in IgV_H-unmutierten CLL-Zellen.

Weitere regulatorische Einflüsse auf LPL stellen die Zytokine dar. In einer Studie mit einer Makrophagenzelllinie konnte eine Reduktion der LPL-Expression durch IL-11, TNF- α , IFN- γ und IL-1 nachgewiesen werden [33][114]. Ferner wurde das Hormon Leptin identifiziert, welches bei Makrophagen durch oxidativen Stress und Proteinkinase C-abhängige Reaktionswege zu einer Steigerung der LPL-Expression führt [69]. Bisher liegen keine Daten zur transkriptionalen Induktion oder Regulation von LPL vor, da die Stimulation des BCR bisher nicht als LPL-induzierend erachtet wurde. Dennoch müssen gewisse Mechanismen für eine CLL-spezifische Induktion der LPL-Transkription existieren, da gezeigt werden konnte, dass sich in gesunden B-Zellen durch BCR-Stimulation kein LPL induzieren lässt und somit die LPL-Expression eine Besonderheit von CLL-Zellen darstellt. Bisher ist noch wenig über Mechanismen bekannt, die der Induktion der LPL-Transkription nachfolgen. Eine Studie identifizierte jedoch eine IFN- γ -sensible STAT1-Bindungsstelle am LPL-Promoter, die bei entsprechender Besetzung mit STAT1 zu einer durch IFN- γ vermittelten Hemmung der LPL-Expression führt [48]. Die funktionale Rolle von LPL in der CLL ist weitestgehend unklar. Dennoch stellt LPL in der CLL durch seine Expression in IgV_H-mu-

tierten als auch unmutierten Patienten bei entsprechendem BCR-Stimulus ein mögliches therapeutisches Angriffsziel dar.

4.3 Einfluss von Orlistat auf CLL-Zellen

Aufgrund der Tatsache, dass in der CLL zahlreiche Lipaseaktivität-assoziierte Gene reguliert wurden und dass sich im Besonderen LPL in IgV_H-unmutierten und -mutierten CLL-Proben induzieren ließ, wurde nach einem geeigneten Inhibitor gesucht, der in der Lage ist, Lipasen zu hemmen und somit die CLL-Zellen anzugreifen.

Orlistat (=Tetrahydrolipstatin) ist ein bereits für die Adipositas-therapie zugelassenes Medikament, welches in diesem Zusammenhang im gastrointestinalen Trakt Lipasen inhibiert und folglich die Fettabsorption verringert [49]. Es ist imstande, eine Vielzahl von Lipasen zu hemmen, wozu u.a. auch gastrische und pankreatische Lipasen zählen [9][74]. Darüber hinaus konnte für Orlistat nachgewiesen werden, dass es LPL effektiv hemmen kann [68] und zudem auch Phospholipasen [65][78] sowie die Phospholipase A2 [31] inhibiert. Mit diesem Hintergrund kam Orlistat als möglicher Hemmstoff in Frage.

Bei Anwendung von Orlistat auf CLL-Zellen konnte mit einer halbmaximalen Wirkkonzentration (IC₅₀) von 2,35 µM Apoptose induziert werden, während in gesunden unsortierten PBMCs ein geringerer Effekt beobachtet wurde. In aufgereinigten B-Zellen von gesunden Spendern wurde eine wesentlich höhere IC₅₀ von 148,5 µM ermittelt.

Eine Frage, die als nächstes im Zusammenhang mit Orlistat aufkommt, ist die Wirkungsweise dieses Lipaseinhibitors bei CLL-Zellen. In der PC-3-Prostatakrebszelllinie konnte z.B. gezeigt werden, dass Orlistat die Fettsäuresynthese (FAS) inhibieren konnte [61]. Ähnliches wurde auch für die Brustkrebszelllinie SK-Br3 beschrieben [76]. Die Beeinflussung beider Krebszelllinien durch Orlistat wurde dabei jeweils auf eine Überexpression der Fettsäuresynthese (FAS) zurückgeführt, die daraufhin entsprechend inhibiert wurde [77]. Für die CLL kommt dieser Mechanismus jedoch nicht in Frage. Aus dem Datensatz der Microarray-Analyse ist ersichtlich, dass die Fettsäuresynthese (FAS) in CLL-

Zellen nicht signifikant exprimiert wurde. Darüber hinaus zeigten weitere Untersuchungen mit dem FAS-Inhibitor C75, dass dieser nur minimale spezifische Effekte auf CLL-Zellen hatte [95].

Es lassen sich mehrere Hypothesen bezüglich der zytotoxischen Wirkung von Orlistat gegenüber CLL-Proben aufstellen. Erstens könnte Orlistat die Energiezufuhr bzw. -versorgung der CLL-Zellen reduzieren, indem es LPL inhibiert und somit die Hydrolyse von Lipiden und anschließende Aufnahme der Fettsäuren hemmt. Zweitens besteht die Möglichkeit, dass einzelne Überlebenssignale in den CLL-Zellen durch Unterbrechung verschiedener intrazellulärer Phospholipase-abhängiger Signalwege durch den Lipaseinhibitor beeinträchtigt werden. Zuletzt könnte Orlistat durch Hemmung der Phospholipase A2 die Membranstabilität verringern und die Zelle somit in die Apoptose bringen. Mit großer Sicherheit existiert nicht nur ein einzelner, sondern eher ein vielschichtiger Mechanismus, der in der CLL zur Apoptoseinduktion durch den Lipaseinhibitor Orlistat führt.

Bei Vergleich der Zytotoxizität von Orlistat bezüglich nativer und BCR-stimulierter CLL-Zellen fiel eine deutlich verminderte Apoptoserate bei BCR-stimulierten Proben in beiden Dosierungen (20 μM , 100 μM) auf. Somit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des B-Zell-Rezeptors die Zytotoxizität von Orlistat zum Teil inhibiert. Eine mögliche Hypothese dafür ist eine Kompensation des Orlistateffektes durch BCR-Stimulation hervorgerufenes, neu induziertes LPL. Ein anderer Erklärungsansatz besteht in der Aktivierung von alternativen, Lipase-unabhängigen Signalwegen, die ein Überleben der CLL-Zelle fördern, so dass Orlistat nicht vollständig die BCR-vermittelten Effekte ausschaltet. Selbstverständlich müssen weitere Studien durchgeführt werden, um die einzelnen metabolischen Veränderungen durch Orlistat sowie dessen genaue Wirkungsweise in der CLL-Zelle besser verstehen zu können.

Orlistat ist ein für die Adipositas therapie bereits zugelassenes Medikament und zeigt bei oraler Gabe nur geringe Nebenwirkungen, die hauptsächlich den Magen-Darm-Trakt betreffen [2]. Darüber hinaus ist selbst bei einer Überdosierung mit Orlistat die systemische Absorption beim Menschen extrem gering. Folglich sind kaum systemische Nebenwirkungen, wie etwa eine Hemmung von

systemischen Lipasen oder eine Akkumulation des Medikamentes im Plasma, zu erwarten [132]. Auch extreme Überdosierungen beim Tiermodell wiesen keine zytotoxischen oder karzinogenen Effekte durch Orlistat auf [1].

Der Vergleich der Wirkungsweise von Orlistat mit der von Fludarabin, einem gängigen und häufig angewandten Chemotherapeutikum in der CLL-Therapie [28][29], zeigte additive zytotoxische Effekte, sobald Orlistat mit Fludarabin kombiniert eingesetzt wurde.

Die Substanz Fludarabin ist ein Purinanalogen, welches sowohl die DNA-Polymerase als auch die Ribonukleotid-Reduktase hemmt [11][39]. Es wirkt als ein Antimetabolit im Nucleosidmetabolismus [122] und verhindert somit die Reparatur von DNA-Schäden, die z.B. durch das Alkylanz Cyclophosphamid hervorgerufen werden können [101][122]. Bisher wurde für Fludarabin keine Beteiligung bzw. Wechselwirkung mit dem Lipidmetabolismus geschildert. Die beobachtete additive Wirkung von Orlistat und Fludarabin auf CLL-Zellen *in vitro* könnte auf einer von einem Lipid-unabhängigen Signalweg ausgehenden Apoptoseinduktion beruhen. Sicherlich sollten weitere Kombinationen von Orlistat mit anderen chemotherapeutischen Substanzen hinsichtlich ihrer apoptotischen Wirkung getestet und letztlich auch *in vivo* erprobt werden. Dies kann neue vielversprechende Therapieansätze in der CLL schaffen.

4.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit demonstrierten Ergebnisse und daraus gezogenen Schlussfolgerungen lassen auf eine bedeutende Rolle des Lipidmetabolismus in der CLL schließen, sowohl in Bezug auf die Pathophysiologie als auch im Hinblick auf die Möglichkeit eines potentiellen Angriffzieles in der Behandlung dieser Erkrankung. Dabei stellen auf den Lipidmetabolismus abgestimmte Therapieansätze, die mit bereits etablierten und zugelassenen Medikamenten kombiniert werden, eine sinnvolle und vielversprechende Option dar.

In dieser Arbeit wurde der Lipaseinhibitor Orlistat als ein geeignetes Medikament zur möglichen Therapie der CLL identifiziert. Es induzierte in CLL-Zellen

spezifisch Apoptose und Zelltod und zeigte zudem additive zytotoxische Effekte mit dem Chemotherapeutikum Fludarabin.

Selbstverständlich müssen solche Therapiekonzepte und -kombinationen zunächst in entsprechenden Tiermodellen getestet werden. Aufgründessen sind *in vivo*-Versuche mit dem TCL1-Mausmodell geplant. Die Mäuse entwickeln durch das TCL1-Transgen ein niedrigmalignes B-Non-Hodgkin-Lymphom, welches eine starke Ähnlichkeit zur CLL zeigt. Neben den ausführlichen Untersuchungen im Tiermodell ist es sicherlich von großer Bedeutung, den genauen Mechanismus der LPL-Hemmung durch Orlistat zu ergründen. Auch die einzelnen metabolischen Auswirkungen von Orlistat müssen umfassend charakterisiert sowie weitere Kombinationen mit verschiedenen Chemotherapeutika, Kinaseinhibitoren, als auch mit anderweitigen additiven Hemmstoffen getestet werden. Ziel ist es letztendlich, Orlistat – als neue Therapieoption in der CLL – systemisch beim Patienten als Phase I/II-Studien in der Klinik anzuwenden.

5 Zusammenfassung

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL), ein niedrigmalignes leukämisch verlaufendes B-Zell-Lymphom, ist durch eine Apoptosedysregulation charakterisiert, welche typischerweise zu einer Apoptoseresistenz in CLL-Zellen führt. Bisher ist jedoch wenig über den Lipidmetabolismus bzw. lipidabhängige Signalwege in der CLL bekannt. Unter diesem Gesichtspunkt wurde eine Microarray-Genexpressionsanalyse mit nativen und B-Zell-Rezeptor-stimulierten CLL-Zellen (n=8) im Vergleich zu gesunden CD5-positiven Spenderzellen (n=5) durchgeführt. Bei dieser Analyse wurde eine signifikante Überexpression von Lipasen und Phospholipasen in der CLL festgestellt. Insbesondere konnte eine erhöhte Expression des prognostischen Markers Lipoproteinlipase (LPL) in CLL-, jedoch nicht in gesunden CD5-positiven B-Zellen durch Stimulation des B-Zell-Rezeptors nachgewiesen werden.

Der Einsatz des Lipaseinhibitors Orlistat (=Tetrahydrolipstatin) führte bei entsprechender Inkubation mit primären CLL-Zellen (n=26) zu einer Apoptoseinduktion. Für CLL-Zellen wurde eine halbmaximale Wirkkonzentration (IC₅₀) von 2,35 µM ermittelt, während gesunde CD5-positive B-Zellen eine deutlich höhere IC₅₀ von 148,5 µM für Orlistat aufwiesen. In gesunden PBMCs wurde dagegen keine Apoptose durch Orlistat induziert (p<0,001). Die Stimulation des B-Zell-Rezeptors führte zu einer signifikanten Apoptosereduktion in CLL-Zellen im Vergleich zu unstimulierten nativen Proben. Bei Kombination von Orlistat mit dem Purinanalogon Fludarabin zeigte sich in primären CLL-Zellen eine deutlich gesteigerte Zytotoxizität (p=0,003).

Abschließend zusammengefasst spielt der Lipidmetabolismus in der Pathogenese der CLL eine bedeutende und bisher unterschätzte Rolle und bietet zudem durch Anwendung des Lipaseinhibitors Orlistat ein mögliches Angriffsziel in der Therapie der CLL.

6 Summary

Microarray defined identification of lipid metabolism as a new therapeutic option in chronic lymphocytic leukemia – specific induction of apoptosis by the lipoprotein lipase inhibitor orlistat

Chronic lymphocytic leukemia (CLL), a low-malignant leukemic-proceeding B-cell lymphoma, is characterized by a dysregulation of apoptosis which typically leads to apoptosis resistance in CLL cells. So far, little is known about lipid metabolism and lipid dependent signaling pathways in CLL. Focusing on that, a microarray gene expression analysis was performed using native and B-cell receptor stimulated CLL cells (n=8) compared to healthy CD5-positive donor cells (n=5). In this analysis, a significant overexpression of lipases and phospholipases was found in CLL cells. In particular, a high expression of the prognostic factor lipoprotein lipase (LPL) was demonstrated for CLL but not for healthy CD5-positive B-cells through stimulation of the B-cell receptor.

After appropriate incubation with primary CLL cells (n=26), the application of the lipase inhibitor orlistat (=tetrahydrolipstatin) resulted in an apoptosis induction. A half maximal dose (IC₅₀) of 2,35 µM was determined for CLL cells while healthy CD5-positive B-cells showed a considerably higher IC₅₀ of 148,5 µM of orlistat. In contrast to that, no apoptosis was induced by orlistat in healthy PBMCs (p<0,001). The stimulation of the B-cell receptor caused a significant reduction of apoptosis in CLL cells in comparison to unstimulated native samples. When combining orlistat with the purine analogue fludarabine, a notably enhanced cytotoxicity was identified in primary CLL cells (p=0,003).

In summary, the lipid metabolism plays an important and so far underestimated role in the CLL pathogenesis and moreover, offers a potential target in the therapy of CLL by the use of the lipase inhibitor orlistat.

7 Literaturverzeichnis

1. *FDA hearing protocol.*
2. Acharya, N.V., L.V. Wilton, and S.A. Shakir, *Safety profile of orlistat: results of a prescription-event monitoring study.* Int J Obes (Lond), 2006. **30**(11): p. 1645-52.
3. Asai, K., T. Hirabayashi, T. Houjou, N. Uozumi, R. Taguchi, and T. Shimizu, *Human group IVC phospholipase A2 (cPLA2gamma). Roles in the membrane remodeling and activation induced by oxidative stress.* J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8809-14.
4. Ashburner, M., C.A. Ball, J.A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J.M. Cherry, A.P. Davis, K. Dolinski, S.S. Dwight, J.T. Eppig, M.A. Harris, D.P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J.C. Matese, J.E. Richardson, M. Ringwald, G.M. Rubin, and G. Sherlock, *Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium.* Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 25-9.
5. Bera, T.K., R. Maitra, C. Iavarone, G. Salvatore, V. Kumar, J.J. Vincent, B.K. Sathyanarayana, P. Duray, B.K. Lee, and I. Pastan, *PATE, a gene expressed in prostate cancer, normal prostate, and testis, identified by a functional genomic approach.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(5): p. 3058-63.
6. Betz, A.G., M.S. Neuberger, and C. Milstein, *Discriminating intrinsic and antigen-selected mutational hotspots in immunoglobulin V genes.* Immunol Today, 1993. **14**(8): p. 405-11.
7. Bilban, M., D. Heintel, T. Scharl, T. Woelfel, M.M. Auer, E. Porpaczy, B. Kainz, A. Krober, V.J. Carey, M. Shehata, C. Zielinski, W. Pickl, S. Stilgenbauer, A. Gaiger, O. Wagner, and U. Jager, *Deregulated expression of fat and muscle genes in B-cell chronic lymphocytic leukemia with high lipoprotein lipase expression.* Leukemia, 2006. **20**(6): p. 1080-8.

8. Binet, J.L., A. Auquier, G. Dighiero, C. Chastang, H. Piguet, J. Goasguen, G. Vaugier, G. Potron, P. Colona, F. Oberling, M. Thomas, G. Tchernia, C. Jacquillat, P. Boivin, C. Lesty, M.T. Duault, M. Monconduit, S. Belabbes, and F. Gremy, *A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis*. *Cancer*, 1981. **48**(1): p. 198-206.
9. Borgstrom, B., *Mode of action of tetrahydrolipstatin: a derivative of the naturally occurring lipase inhibitor lipstatin*. *Biochim Biophys Acta*, 1988. **962**(3): p. 308-16.
10. Brodeur, G.M., R.C. Seeger, M. Schwab, H.E. Varmus, and J.M. Bishop, *Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage*. *Science*, 1984. **224**(4653): p. 1121-4.
11. Byrd, J.C., S. Stilgenbauer, and I.W. Flinn, *Chronic lymphocytic leukemia*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2004: p. 163-83.
12. Caligaris-Cappio, F., *Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia*. *Br J Haematol*, 2003. **123**(3): p. 380-8.
13. Caligaris-Cappio, F. and T.J. Hamblin, *B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather*. *J Clin Oncol*, 1999. **17**(1): p. 399-408.
14. Caricasole, A., C. Sala, R. Roncarati, E. Formenti, and G.C. Terstappen, *Cloning and characterization of the human phosphoinositide-specific phospholipase C-beta 1 (PLC beta 1)*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1517**(1): p. 63-72.
15. Carroll, C.W., M. Enquist-Newman, and D.O. Morgan, *The APC subunit Doc1 promotes recognition of the substrate destruction box*. *Curr Biol*, 2005. **15**(1): p. 11-8.
16. Chan, A.C., M. Iwashima, C.W. Turck, and A. Weiss, *ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain*. *Cell*, 1992. **71**(4): p. 649-62.

17. Charles, C.H., J.K. Yoon, J.S. Simske, and L.F. Lau, *Genomic structure, cDNA sequence, and expression of gly96, a growth factor-inducible immediate-early gene encoding a short-lived glycosylated protein*. *Oncogene*, 1993. **8**(3): p. 797-801.
18. Chen, L., G. Widhopf, L. Huynh, L. Rassenti, K.R. Rai, A. Weiss, and T.J. Kipps, *Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2002. **100**(13): p. 4609-14.
19. Chiorazzi, N., *Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2007. **20**(3): p. 399-413.
20. Cohen, G.M., *Caspases: the executioners of apoptosis*. *Biochem J*, 1997. **326 (Pt 1)**: p. 1-16.
21. Crespo, M., F. Bosch, N. Villamor, B. Bellosillo, D. Colomer, M. Rozman, S. Marce, A. Lopez-Guillermo, E. Campo, and E. Montserrat, *ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(18): p. 1764-75.
22. Damle, R.N., S. Temburni, C. Calissano, S. Yancopoulos, T. Banapour, C. Sison, S.L. Allen, K.R. Rai, and N. Chiorazzi, *CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells*. *Blood*, 2007. **110**(9): p. 3352-9.
23. Damle, R.N., T. Wasil, F. Fais, F. Ghiotto, A. Valetto, S.L. Allen, A. Buchbinder, D. Budman, K. Dittmar, J. Kolitz, S.M. Lichtman, P. Schulman, V.P. Vinciguerra, K.R. Rai, M. Ferrarini, and N. Chiorazzi, *Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 1999. **94**(6): p. 1840-7.
24. de Sanctis, J.B., I. Blanca, D. Radzioch, and N.E. Bianco, *Lipoprotein lipase expression in natural killer cells and its role in their cytotoxic activity*. *Immunology*, 1994. **83**(2): p. 232-9.

25. Dohner, H., S. Stilgenbauer, A. Benner, E. Leupolt, A. Krober, L. Bullinger, K. Dohner, M. Bentz, and P. Lichter, *Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2000. **343**(26): p. 1910-6.
26. Dong, M., M. Johnson, A. Rezaie, J.N. Ilesley, M. Nakanishi, M.M. Sanders, F. Forouhar, J. Levine, D.C. Montrose, C. Giardina, and D.W. Rosenberg, *Cytoplasmic phospholipase A2 levels correlate with apoptosis in human colon tumorigenesis*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(6): p. 2265-71.
27. Dorner, T., S.J. Foster, N.L. Farner, and P.E. Lipsky, *Somatic hypermutation of human immunoglobulin heavy chain genes: targeting of RGYW motifs on both DNA strands*. Eur J Immunol, 1998. **28**(10): p. 3384-96.
28. Eichhorst, B.F., R. Busch, G. Hopfinger, R. Pasold, M. Hensel, C. Steinbrecher, S. Siehl, U. Jager, M. Bergmann, S. Stilgenbauer, C. Schweighofer, C.M. Wendtner, H. Dohner, G. Brittinger, B. Emmerich, and M. Hallek, *Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2006. **107**(3): p. 885-91.
29. Elter, T., M. Hallek, and A. Engert, *Fludarabine in chronic lymphocytic leukaemia*. Expert Opin Pharmacother, 2006. **7**(12): p. 1641-51.
30. Felsher, D.W. and J.M. Bishop, *Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3940-4.
31. Filippatos, T.D., I.F. Gazi, E.N. Liberopoulos, V.G. Athyros, M.S. Elisaf, A.D. Tselepis, and D.N. Kiortsis, *The effect of orlistat and fenofibrate, alone or in combination, on small dense LDL and lipoprotein-associated phospholipase A(2) in obese patients with metabolic syndrome*. Atherosclerosis, 2006.
32. Franks, S.E., M.R. Smith, F. Arias-Mendoza, C. Shaller, K. Padavic-Shaller, F. Kappler, Y. Zhang, W.G. Negendank, and T.R. Brown, *Phosphomonoester concentrations differ between chronic lymphocytic*

- leukemia cells and normal human lymphocytes*. Leuk Res, 2002. **26**(10): p. 919-26.
33. Fried, S.K. and R. Zechner, *Cachectin/tumor necrosis factor decreases human adipose tissue lipoprotein lipase mRNA levels, synthesis, and activity*. J Lipid Res, 1989. **30**(12): p. 1917-23.
34. Fuentes, J.J., L. Genesca, T.J. Kingsbury, K.W. Cunningham, M. Perez-Riba, X. Estivill, and S. de la Luna, *DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(11): p. 1681-90.
35. Garcia, J., Y. Ye, V. Arranz, C. Letourneux, G. Pezeron, and F. Porteu, *IEX-1: a new ERK substrate involved in both ERK survival activity and ERK activation*. Embo J, 2002. **21**(19): p. 5151-63.
36. Goldberg, I.J., *Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis*. J Lipid Res, 1996. **37**(4): p. 693-707.
37. Grandori, C., S.M. Cowley, L.P. James, and R.N. Eisenman, *The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 653-99.
38. Greco, S., A. Muscella, M.G. Elia, S. Romano, C. Storelli, and S. Marsigliante, *Mitogenic signalling by B2 bradykinin receptor in epithelial breast cells*. J Cell Physiol, 2004. **201**(1): p. 84-96.
39. Grever, M.R., K.J. Kopecky, C.A. Coltman, J.C. Files, B.R. Greenberg, J.J. Hutton, R. Talley, D.D. Von Hoff, and S.P. Balcerzak, *Fludarabine monophosphate: a potentially useful agent in chronic lymphocytic leukemia*. Nouv Rev Fr Hematol, 1988. **30**(5-6): p. 457-9.
40. Hallek, M., M. Bergmann, G. Brittinger, H. Dohner, P. Dreger, M. Herold, G. Hopfinger, U. Jager, W. Knauf, C. Nerl, M. Rummel, B. Schmitt, C.M. Wendtner, and B. Emmerich, *[Chronic lymphatic leukemia. Current therapy concepts]*. Internist (Berl), 2002. **43**(10): p. 1245-54.
41. Hallek, M., I. Kuhn-Hallek, and B. Emmerich, *Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia, 1997. **11 Suppl 2**: p. S4-13.

42. Hallek, M., I. Langenmayer, C. Nerl, W. Knauf, H. Dietzfelbinger, D. Adorf, M. Ostwald, R. Busch, I. Kuhn-Hallek, E. Thiel, and B. Emmerich, *Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmoldering chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **93**(5): p. 1732-7.
43. Hamblin, T.J., Z. Davis, A. Gardiner, D.G. Oscier, and F.K. Stevenson, *Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1848-54.
44. Hamblin, T.J., J.A. Orchard, R.E. Ibbotson, Z. Davis, P.W. Thomas, F.K. Stevenson, and D.G. Oscier, *CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease*. Blood, 2002. **99**(3): p. 1023-9.
45. Heintel, D., D. Kienle, M. Shehata, A. Krober, E. Kroemer, I. Schwarzingler, D. Mitteregger, T. Le, A. Gleiss, C. Mannhalter, A. Chott, J. Schwarzmeier, C. Fonatsch, A. Gaiger, H. Dohner, S. Stilgenbauer, and U. Jager, *High expression of lipoprotein lipase in poor risk B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia, 2005. **19**(7): p. 1216-23.
46. Herve, M., K. Xu, Y.S. Ng, H. Wardemann, E. Albesiano, B.T. Messmer, N. Chiorazzi, and E. Meffre, *Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity*. J Clin Invest, 2005. **115**(6): p. 1636-43.
47. Hess, J.F., J.A. Borkowski, T. Macneil, G.Y. Stonesifer, J. Fraher, C.D. Strader, and R.W. Ransom, *Differential pharmacology of cloned human and mouse B2 bradykinin receptors*. Mol Pharmacol, 1994. **45**(1): p. 1-8.
48. Hogan, J.C. and J.M. Stephens, *STAT 1 binds to the LPL promoter in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **307**(2): p. 350-4.
49. Hvizdos, K.M. and A. Markham, *Orlistat: a review of its use in the management of obesity*. Drugs, 1999. **58**(4): p. 743-60.

50. Hwang, L.H. and A.W. Murray, *A novel yeast screen for mitotic arrest mutants identifies DOC1, a new gene involved in cyclin proteolysis*. Mol Biol Cell, 1997. **8**(10): p. 1877-87.
51. Ibrahim, S., M. Keating, K.A. Do, S. O'Brien, Y.O. Huh, I. Jilani, S. Lerner, H.M. Kantarjian, and M. Albitar, *CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2001. **98**(1): p. 181-6.
52. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M., *Immunologie*. 5. ed. 2002: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
53. Jenkins, C.M., D.J. Mancuso, W. Yan, H.F. Sims, B. Gibson, and R.W. Gross, *Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 48968-75.
54. Jenkins, G.M. and M.A. Frohman, *Phospholipase D: a lipid centric review*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(19-20): p. 2305-16.
55. Keating, M.J., S. O'Brien, M. Albitar, S. Lerner, W. Plunkett, F. Giles, M. Andreeff, J. Cortes, S. Faderl, D. Thomas, C. Koller, W. Wierda, M.A. Detry, A. Lynn, and H. Kantarjian, *Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia*. J Clin Oncol, 2005. **23**(18): p. 4079-88.
56. Kim, Y.S., K.O. Cho, H.J. Lee, S.Y. Kim, Y. Sato, and Y.J. Cho, *Down syndrome candidate region 1 increases the stability of the I κ B α protein: implications for its anti-inflammatory effects*. J Biol Chem, 2006. **281**(51): p. 39051-61.
57. King, R.W., J.M. Peters, S. Tugendreich, M. Rolfe, P. Hieter, and M.W. Kirschner, *A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B*. Cell, 1995. **81**(2): p. 279-88.
58. Kipps, T.J., *The CD5 B cell*. Adv Immunol, 1989. **47**: p. 117-85.

59. Klein, U., Y. Tu, G.A. Stolovitzky, M. Mattioli, G. Cattoretti, H. Husson, A. Freedman, G. Inghirami, L. Cro, L. Baldini, A. Neri, A. Califano, and R. Dalla-Favera, *Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells*. J Exp Med, 2001. **194**(11): p. 1625-38.
60. Kondratyev, A.D., K.N. Chung, and M.O. Jung, *Identification and characterization of a radiation-inducible glycosylated human early-response gene*. Cancer Res, 1996. **56**(7): p. 1498-502.
61. Kridel, S.J., F. Axelrod, N. Rozenkrantz, and J.W. Smith, *Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity*. Cancer Res, 2004. **64**(6): p. 2070-5.
62. Krober, A., T. Seiler, A. Benner, L. Bullinger, E. Bruckle, P. Lichter, H. Dohner, and S. Stilgenbauer, *V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2002. **100**(4): p. 1410-6.
63. Kurasawa, Y. and K. Todokoro, *Identification of human APC10/Doc1 as a subunit of anaphase promoting complex*. Oncogene, 1999. **18**(37): p. 5131-7.
64. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
65. Laine, J., S. Bourgoin, J. Bourassa, and J. Morisset, *Subcellular distribution and characterization of rat pancreatic phospholipase D isoforms*. Pancreas, 2000. **20**(4): p. 323-36.
66. Lazebnik, Y.A., S.H. Kaufmann, S. Desnoyers, G.G. Poirier, and W.C. Earnshaw, *Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE*. Nature, 1994. **371**(6495): p. 346-7.
67. Lee, J.H., Y.M. Kim, N.W. Kim, J.W. Kim, E. Her, B.K. Kim, J.H. Kim, S.H. Ryu, J.W. Park, D.W. Seo, J.W. Han, M.A. Beaven, and W.S. Choi, *Phospholipase D2 acts as an essential adaptor protein in the activation of Syk in antigen-stimulated mast cells*. Blood, 2006. **108**(3): p. 956-64.

68. Lookene, A., N. Skottova, and G. Olivecrona, *Interactions of lipoprotein lipase with the active-site inhibitor tetrahydrolipstatin (Orlistat)*. Eur J Biochem, 1994. **222**(2): p. 395-403.
69. Maingrette, F. and G. Renier, *Leptin increases lipoprotein lipase secretion by macrophages: involvement of oxidative stress and protein kinase C*. Diabetes, 2003. **52**(8): p. 2121-8.
70. Marshall, D., M.J. Hardman, K.M. Nield, and C. Byrne, *Differentially expressed late constituents of the epidermal cornified envelope*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(23): p. 13031-6.
71. Matthews, C., M. Catherwood, T.C. Morris, and H.D. Alexander, *Routine analysis of IgVH mutational status in CLL patients using BIOMED-2 standardized primers and protocols*. Leuk Lymphoma, 2004. **45**(9): p. 1899-904.
72. Mayr, C., D. Bund, M. Schlee, A. Moosmann, D.M. Kofler, M. Hallek, and C.M. Wendtner, *Fibromodulin as a novel tumor-associated antigen (TAA) in chronic lymphocytic leukemia (CLL), which allows expansion of specific CD8+ autologous T lymphocytes*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1566-73.
73. Mayr, C., M.R. Speicher, D.M. Kofler, R. Buhmann, J. Strehl, R. Busch, M. Hallek, and C.M. Wendtner, *Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2006. **107**(2): p. 742-51.
74. McNeely, W. and P. Benfield, *Orlistat*. Drugs, 1998. **56**(2): p. 241-9; discussion 250.
75. Mead, J.R., S.A. Irvine, and D.P. Ramji, *Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease*. J Mol Med, 2002. **80**(12): p. 753-69.
76. Menendez, J.A., L. Vellon, and R. Lupu, *Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (XenicalTM) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA3-mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene*. Ann Oncol, 2005. **16**(8): p. 1253-67.

77. Menendez, J.A., L. Vellon, I. Mehmi, B.P. Oza, S. Ropero, R. Colomer, and R. Lupu, *Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(29): p. 10715-20.
78. Migas, I. and D.L. Severson, *Diacylglycerols derived from membrane phospholipids are metabolized by lipases in A10 smooth muscle cells*. Am J Physiol, 1996. **271**(4 Pt 1): p. C1194-202.
79. Mittal, A., S. Papa, G. Franzoso, and R. Sen, *NF-kappaB-dependent regulation of the timing of activation-induced cell death of T lymphocytes*. J Immunol, 2006. **176**(4): p. 2183-9.
80. Montserrat, E., J. Sanchez-Bisono, N. Vinolas, and C. Rozman, *Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance*. Br J Haematol, 1986. **62**(3): p. 567-75.
81. Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich, *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. 1986. Biotechnology, 1992. **24**: p. 17-27.
82. Murakami, M. and I. Kudo, *Phospholipase A2*. J Biochem (Tokyo), 2002. **131**(3): p. 285-92.
83. Murakami, M., K. Yoshihara, S. Shimbara, G. Lambeau, M.H. Gelb, A.G. Singer, M. Sawada, N. Inagaki, H. Nagai, M. Ishihara, Y. Ishikawa, T. Ishii, and I. Kudo, *Cellular arachidonate-releasing function and inflammation-associated expression of group IIF secretory phospholipase A2*. J Biol Chem, 2002. **277**(21): p. 19145-55.
84. Murakami, M., K. Yoshihara, S. Shimbara, G. Lambeau, A. Singer, M.H. Gelb, M. Sawada, N. Inagaki, H. Nagai, and I. Kudo, *Arachidonate release and eicosanoid generation by group IIE phospholipase A(2)*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **292**(3): p. 689-96.
85. Murray, A.W. and M.W. Kirschner, *Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle*. Science, 1989. **246**(4930): p. 614-21.
86. Naro, F., M. Perez, S. Migliaccio, D.L. Galson, P. Orcel, A. Teti, and S.R. Goldring, *Phospholipase D- and protein kinase C isoenzyme-*

- dependent signal transduction pathways activated by the calcitonin receptor.* *Endocrinology*, 1998. **139**(7): p. 3241-8.
87. Nesbit, C.E., J.M. Tersak, and E.V. Prochownik, *MYC oncogenes and human neoplastic disease.* *Oncogene*, 1999. **18**(19): p. 3004-16.
88. Nicholson, D.W., A. Ali, N.A. Thornberry, J.P. Vaillancourt, C.K. Ding, M. Gallant, Y. Gareau, P.R. Griffin, M. Labelle, Y.A. Lazebnik, and et al., *Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis.* *Nature*, 1995. **376**(6535): p. 37-43.
89. Nuckel, H., A. Huttmann, L. Klein-Hitpass, R. Schroers, A. Fuhrer, L. Sellmann, U. Duhrsen, and J. Durig, *Lipoprotein lipase expression is a novel prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia.* *Leuk Lymphoma*, 2006. **47**(6): p. 1053-61.
90. Nurse, P., *Universal control mechanism regulating onset of M-phase.* *Nature*, 1990. **344**(6266): p. 503-8.
91. O'Brien, S.M., H.M. Kantarjian, J. Cortes, M. Beran, C.A. Koller, F.J. Giles, S. Lerner, and M. Keating, *Results of the fludarabine and cyclophosphamide combination regimen in chronic lymphocytic leukemia.* *J Clin Oncol*, 2001. **19**(5): p. 1414-20.
92. Oliver, F.J., G. de la Rubia, V. Rolli, M.C. Ruiz-Ruiz, G. de Murcia, and J.M. Murcia, *Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant.* *J Biol Chem*, 1998. **273**(50): p. 33533-9.
93. Opezzo, P., Y. Vasconcelos, C. Settegrana, D. Jeannel, F. Vuillier, M. Legarff-Tavernier, E.Y. Kimura, S. Bechet, G. Dumas, M. Brissard, H. Merle-Beral, M. Yamamoto, G. Dighiero, and F. Davi, *The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia.* *Blood*, 2005. **106**(2): p. 650-7.
94. Oscier, D.G., A. Thompsett, D. Zhu, and F.K. Stevenson, *Differential rates of somatic hypermutation in V(H) genes among subsets of chronic lymphocytic leukemia defined by chromosomal abnormalities.* *Blood*, 1997. **89**(11): p. 4153-60.

95. Pallasch, C.P., J. Schwamb, S. Konigs, A. Schulz, S. Debey, D. Kofler, J.L. Schultze, M. Hallek, A. Ultsch, and C.M. Wendtner, *Targeting lipid metabolism by the lipoprotein lipase inhibitor orlistat results in apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells*. *Leukemia*, 2008. **22**(3): p. 585-92.
96. Park, D., D.Y. Jhon, R. Kriz, J. Knopf, and S.G. Rhee, *Cloning, sequencing, expression, and Gq-independent activation of phospholipase C-beta 2*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(23): p. 16048-55.
97. Park, K., J. Kim, H.S. Kim, and H.S. Shin, *Isolated human germinal center centroblasts have an intact mismatch repair system*. *J Immunol*, 1998. **161**(11): p. 6128-32.
98. Passmore, L.A., E.A. McCormack, S.W. Au, A. Paul, K.R. Willison, J.W. Harper, and D. Barford, *Doc1 mediates the activity of the anaphase-promoting complex by contributing to substrate recognition*. *Embo J*, 2003. **22**(4): p. 786-96.
99. Petlickovski, A., L. Laurenti, X. Li, S. Marietti, P. Chiusolo, S. Sica, G. Leone, and D.G. Efremov, *Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells*. *Blood*, 2005. **105**(12): p. 4820-7.
100. Pietzsch, A., C. Buchler, C. Aslanidis, and G. Schmitz, *Identification and characterization of a novel monocyte/macrophage differentiation-dependent gene that is responsive to lipopolysaccharide, ceramide, and lysophosphatidylcholine*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **235**(1): p. 4-9.
101. Plunkett, W., V. Gandhi, P. Huang, L.E. Robertson, L.Y. Yang, V. Gregoire, E. Estey, and M.J. Keating, *Fludarabine: pharmacokinetics, mechanisms of action, and rationales for combination therapies*. *Semin Oncol*, 1993. **20**(5 Suppl 7): p. 2-12.
102. Preiss-Landl, K., R. Zimmermann, G. Hammerle, and R. Zechner, *Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism*. *Curr Opin Lipidol*, 2002. **13**(5): p. 471-81.

103. Rassenti, L.Z., L. Huynh, T.L. Toy, L. Chen, M.J. Keating, J.G. Gribben, D.S. Neuberg, I.W. Flinn, K.R. Rai, J.C. Byrd, N.E. Kay, A. Greaves, A. Weiss, and T.J. Kipps, *ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2004. **351**(9): p. 893-901.
104. Rosenwald, A., A.A. Alizadeh, G. Widhopf, R. Simon, R.E. Davis, X. Yu, L. Yang, O.K. Pickeral, L.Z. Rassenti, J. Powell, D. Botstein, J.C. Byrd, M.R. Grever, B.D. Cheson, N. Chiorazzi, W.H. Wilson, T.J. Kipps, P.O. Brown, and L.M. Staudt, *Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia*. J Exp Med, 2001. **194**(11): p. 1639-47.
105. Rozman, C. and E. Montserrat, *Chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 1995. **333**(16): p. 1052-7.
106. Sakamuro, D. and G.C. Prendergast, *New Myc-interacting proteins: a second Myc network emerges*. Oncogene, 1999. **18**(19): p. 2942-54.
107. Satoh, M.S. and T. Lindahl, *Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair*. Nature, 1992. **356**(6367): p. 356-8.
108. Schafer, H., P. Lettau, A. Trauzold, M. Banasch, and W.E. Schmidt, *Human PACAP response gene 1 (p22/PRG1): proliferation-associated expression in pancreatic carcinoma cells*. Pancreas, 1999. **18**(4): p. 378-84.
109. Schwab, M., *MYCN in neuronal tumours*. Cancer Lett, 2004. **204**(2): p. 179-87.
110. Shen, L., J. Guo, C. Santos-Berrios, and M.X. Wu, *Distinct domains for anti- and pro-apoptotic activities of IEX-1*. J Biol Chem, 2006. **281**(22): p. 15304-11.
111. Slack, A., Z. Chen, R. Tonelli, M. Pule, L. Hunt, A. Pession, and J.M. Shohet, *The p53 regulatory gene MDM2 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(3): p. 731-6.

112. Stevenson, F.K. and F. Caligaris-Cappio, *Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor*. Blood, 2004. **103**(12): p. 4389-95.
113. Stilgenbauer, S., L. Bullinger, P. Lichter, and H. Dohner, *Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course*. Leukemia, 2002. **16**(6): p. 993-1007.
114. Tengku-Muhammad, T.S., T.R. Hughes, A. Cryer, and D.P. Ramji, *Differential regulation of lipoprotein lipase in the macrophage J774.2 cell line by cytokines*. Cytokine, 1996. **8**(7): p. 525-33.
115. Tewari, M., L.T. Quan, K. O'Rourke, S. Desnoyers, Z. Zeng, D.R. Biedler, G.G. Poirier, G.S. Salvesen, and V.M. Dixit, *Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase*. Cell, 1995. **81**(5): p. 801-9.
116. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
117. Underwood, K.W., C. Song, R.W. Kriz, X.J. Chang, J.L. Knopf, and L.L. Lin, *A novel calcium-independent phospholipase A2, cPLA2-gamma, that is prenylated and contains homology to cPLA2*. J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 21926-32.
118. van't Veer, M.B., A.M. Brooijmans, A.W. Langerak, B. Verhaaf, C.S. Goudswaard, W.J. Graveland, K. van Lom, and P.J. Valk, *The predictive value of lipoprotein lipase for survival in chronic lymphocytic leukemia*. Haematologica, 2006. **91**(1): p. 56-63.
119. van Engeland, M., L.J. Nieland, F.C. Ramaekers, B. Schutte, and C.P. Reutelingsperger, *Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure*. Cytometry, 1998. **31**(1): p. 1-9.

120. Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger, *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V.* J Immunol Methods, 1995. **184**(1): p. 39-51.
121. Wang, L.D. and M.R. Clark, *B-cell antigen-receptor signalling in lymphocyte development.* Immunology, 2003. **110**(4): p. 411-20.
122. Wendtner, C.M., B.F. Eichhorst, and M.J. Hallek, *Advances in chemotherapy for chronic lymphocytic leukemia.* Semin Hematol, 2004. **41**(3): p. 224-33.
123. Wickremasinghe, R.G. and A.V. Hoffbrand, *Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies.* Blood, 1999. **93**(11): p. 3587-600.
124. Wierda, W., S. O'Brien, S. Faderl, A. Ferrajoli, X. Wang, K.A. Do, G. Garcia-Manero, D. Thomas, J. Cortes, F. Ravandi-Kashani, F. Giles, S. Lerner, H. Kantarjian, and M. Keating, *A retrospective comparison of three sequential groups of patients with Recurrent/Refractory chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine-based regimens.* Cancer, 2006. **106**(2): p. 337-45.
125. Wierda, W., S. O'Brien, S. Wen, S. Faderl, G. Garcia-Manero, D. Thomas, K.A. Do, J. Cortes, C. Koller, M. Beran, A. Ferrajoli, F. Giles, S. Lerner, M. Albitar, H. Kantarjian, and M. Keating, *Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia.* J Clin Oncol, 2005. **23**(18): p. 4070-8.
126. Wiestner, A., A. Rosenwald, T.S. Barry, G. Wright, R.E. Davis, S.E. Henrickson, H. Zhao, R.E. Ibbotson, J.A. Orchard, Z. Davis, M. Stetler-Stevenson, M. Raffeld, D.C. Arthur, G.E. Marti, W.H. Wilson, T.J. Hamblin, D.G. Oscier, and L.M. Staudt, *ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile.* Blood, 2003. **101**(12): p. 4944-51.

127. Wu, M.X., Z. Ao, K.V. Prasad, R. Wu, and S.F. Schlossman, *IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF-kappaB-mediated cell survival*. Science, 1998. **281**(5379): p. 998-1001.
128. Yamada, M., Y. Banno, Y. Takuwa, M. Koda, A. Hara, and Y. Nozawa, *Overexpression of phospholipase D prevents actinomycin D-induced apoptosis through potentiation of phosphoinositide 3-kinase signalling pathways in Chinese-hamster ovary cells*. Biochem J, 2004. **378**(Pt 2): p. 649-56.
129. Yankee, T.M. and E.A. Clark, *Signaling through the B cell antigen receptor in developing B cells*. Rev Immunogenet, 2000. **2**(2): p. 185-203.
130. Zhang, Y., M.J. Finegold, F. Porteu, P. Kanteti, and M.X. Wu, *Development of T-cell lymphomas in Emu-IEX-1 mice*. Oncogene, 2003. **22**(44): p. 6845-51.
131. Zhang, Y., S.F. Schlossman, R.A. Edwards, C.N. Ou, J. Gu, and M.X. Wu, *Impaired apoptosis, extended duration of immune responses, and a lupus-like autoimmune disease in IEX-1-transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 878-83.
132. Zhi, J., A.T. Melia, H. Eggers, R. Joly, and I.H. Patel, *Review of limited systemic absorption of orlistat, a lipase inhibitor, in healthy human volunteers*. J Clin Pharmacol, 1995. **35**(11): p. 1103-8.
133. Zhong, M., Y. Shen, Y. Zheng, T. Joseph, D. Jackson, and D.A. Foster, *Phospholipase D prevents apoptosis in v-Src-transformed rat fibroblasts and MDA-MB-231 breast cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **302**(3): p. 615-9.
134. Zhou, Y., M.R. Wing, J. Sondek, and T.K. Harden, *Molecular cloning and characterization of PLC-eta2*. Biochem J, 2005. **391**(Pt 3): p. 667-76.
135. Zwiebel, J.A. and B.D. Cheson, *Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognostic factors*. Semin Oncol, 1998. **25**(1): p. 42-59.

8 Erklärung zu Vorabveröffentlichungen

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:

- Christian P. Pallasch, Janine Schwamb, Sonja Königs, Alexandra Schulz, Svenja Debey, David Kofler, Joachim L. Schultze, Michael Hallek, Alfred Ultsch, Clemens-Martin Wendtner, „*Targeting lipid metabolism by the lipoprotein lipase inhibitor orlistat results in apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells*“, *Leukemia*, 2008, 22(3): p. 585-92
- Christian Phillip Pallasch, Alexandra Schulz, Nadine Kutsch, Janine Schwamb, Susanne Hagist, Hamid Kashkar, Alfred Ultsch, Claudia Wickenhauser, Michael Hallek, Clemens-Martin Wendtner, „*Overexpression of TOSO in CLL is triggered by B-cell receptor signaling and associated with progressive disease*“, *Blood*, 2008, in press

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

- „*Spezifische Zytotoxizität gegen chronische lymphatische Leukämie durch den Lipoprotein Lipase Inhibitor Orlistat*“ (Vortrag), Gemeinsame Jahrestagung der deutschen, österreichischen und schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, November 2006, Leipzig
- „*Vergleichende Untersuchung der Genexpressionsprofile der B-Zellrezeptorstimulation in CLL-Zellen und physiologischen CD5-positiven B-Lymphozyten*“ (Posterpräsentation), Gemeinsame Jahrestagung der deutschen, österreichischen und schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, November 2006, Leipzig
- „*Overexpression of lipases enables specific cytotoxicity by the lipase inhibitor orlistat in chronic lymphocytic leukemia cells*“ (Posterpräsentation), The American Society of Hematology, 48th Annual Meeting and Exposition, Dezember 2006, Orlando, Florida

- „*Targeting lipid metabolism by the lipoprotein lipase inhibitor orlistat results in apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells*“ (Vortrag), iwCLL, 12th International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia, September 2007, London, UK

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.