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

Zur prognostischen Bedeutung und möglichen Regulation des Transkriptionsfaktors LEF1 sowie des extrazellulären Matrixproteins Fibromodulin bei der chronischen lymphatischen Leukämie

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

> vorgelegt von Felix Erdfelder aus Siegburg

promoviert am 7. März 2012

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. Th. Krieg

- 1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. med. K.-A. Kreuzer
- 2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. M. Krönke

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 Manuskripts bekam ich freundlichste Unterstützung von Herrn Privatdozent Dr. med. Karl-Anton Kreuzer.

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.

Köln, den 14. 4. 2011

Die vorliegende Arbeit sowie alle dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurde im Labor für molekulare Hämatologie und Onkologie der Klinik I für Innere Medizin des Klinikums der Universität zu Köln vom Oktober 2007 bis März 2011 unter Betreuung von Herrn Privatdozent Dr. med. Karl-Anton Kreuzer von mir selbst durchgeführt. Die immunphänotypischen Daten (Zap70 und CD38), der Prozentsatz an Lymphozyten im Differentialblutbild sowie Daten zu Binet-Stadien und der Behandlungsbedürftigkeit der Patienten wurden in anonymisierter Form vom Routinelabor für Hämatologie und Onkologie der Klinik I für Innere Medizin zur Verfügung gestellt.

Danksagungen

Mein Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. med. Karl-Anton Kreuzer für die Betreuung bei der Planung des experimentellen Vorgehens sowie der Publikationen und insbesondere für die Unterstützung bei der Umsetzung eigener Ideen.

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Michael Hallek danke ich für die Möglichkeit, dass ich in der Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln die vorliegende Forschungsarbeit durchführen konnte.

Ich danke Iris Gehrke, Magdalena Hertweck, Regina Razavi, Rajesh Kumar, Julian Paesler, Alexandra Filipovich, Alexandros Liakos, Lukas Peiffer, Birgit Poetzsch, Simon Poll-Wolbeck, Christina Schmidt und Sabrina Uhrmacher für ein ausgesprochen angenehmes und kollegiales Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt meinem Vater für dessen liebevolle Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Chronische lymphatische Leukämie (CLL)	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Klinische Manifestation	1
1.1.1 Epidemiologie	4
1.1.4 Pathogenese	5
1.1.5 Prognose der CLL	10
1.1.6 Diagnose der CLL	13
1.1.7 Therapie der CLL	14
1.2 Lymphoid enhancer-binding factor 1	17
1.2.1 Physiologisches Vorkommen und Funktion von LEF1	17
1.2.2 LEF1 in der CLL und anderen neoplastischen Erkrankungen	17
1.3 Fibromodulin	19
1.3.1 Physiologisches Vorkommen und Funktion von Fibromodulin	19
1.3.2 Fibromodulin bei der CLL	20
1.3.3 Therapeutische und prognostische Bedeutung von Fibromodulin in o	der CLL 20
1.4 Zielsetzung und Hypothese dieser Arbeit	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Verbrauchsmaterial	
2.1.2 Chemikalien	
2.1.3 Geräte	23
2.1.4 Zellkultur-Materialien	25
2.1.4. Primäre Zellen	27
2.1.5 Puffer und Lösungen	27
2.1.6 Komplette Labor-Kits	29
2.1.7 Primer	
2.1.8 Plasmide und small interfering ribonuclein acids (siRNAs)	31
2.1.9 Software	31
2.2 Methoden	32
2.2.1 Aufbereitung primärer Zellen	

2.2.2 Zellkultur	33
2.2.3 Bestimmung der Zellkonzentration in einer Zellsuspension	33
2.2.4 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen	
2.2.5 Proteinbiochemische Methoden	34
2.2.6. Molekulargenetische Methoden	37
2.2.7 Statistik	42
3 Ergebnisse	43
3.1 Expression von LEF1 und Fibromodulin in der CLL	43
3.1.1 Untersuchung der Fibromodulin-Expression in CLL-Zellen im Ver	gleich zu
gesunden B-Zellen	43
3.1.2 Untersuchung der LEF1-Expression in CLL-Zellen im Vergleich zu ges Zellen	sunden B- 44
3.2 Korrelation der Wnt-Transkriptionsfaktoren LEF1 und TCF4	mit Fi-
bromodulin in primären CLL-Zellen	46
3.2.1 Korrelation von LEF1 und Fibromodulin in primären CLL-Zellen	46
3.2.2 Assoziation von LEF1 und Fibromodulin im LEF1 Median-Split	47
3.2.3 Korrelation von LEF1 und TCF4 in primären CLL-Zellen	48
3.2.4 Korrelation von TCF4 und Fibromodulin in primären CLL-Zellen	48
3.3 Effekt einer LEF1-Überexpression auf die Fibromodulin-Expression	on einer
Wnt-Signalkaskade-negativen Ziellinie	49
3.3.1 Transfektion von Hela-Zellen mit einem LEF1-Überexpressions-plasmid	49
3.3.2 LEF1-mRNA-Expression transfizierter Hela-Zellen	49
3.3.3 LEF1-Protein-Expression transfizierter Hela-Zellen	50
3.3.4 Expression von Fibromodulin und bekannter LEF1-Zielgene in transfizie	rten Hela-
Zellen	51
3.4 Effekt einer LEF1-Hemmung auf die Fibromodulin-Expression	primärer
CLL-Zellen und einer CLL-ähnlichen Zelllinie	52
3.5 Assoziation von Fibromodulin mit prognostischen Markern, der T	umorlast
und dem Krankheitsstadium	55
3.5.1 Assoziation von Fibromodulin mit dem Anteil ZAP70-positiver Zellen	56
3.5.2 Assoziation von Fibromodulin mit dem Anteil CD38-positiver Zellen	57
3.5.3 Assoziation von Fibromodulin mit der Tumorlast	58
3.5.4 Assoziation der Fibromodulin-Expression mit der Schwere der Erkrankung	g und dem
Krankheitsstadium	58
3.6 Assoziation von LEF1 mit prognostischen Markern, der Tumor	last und
dem Krankheitsstadium	60
3.6.1 Assoziation von LEF1 mit dem Anteil ZAP70-positiver Zellen	60
3.6.2 Assoziation von LEF1 mit dem Anteil CD38-positiver Zellen	61

3.6.3 Assoziation der LEF1-Expression mit der Tumorlast	62
3.6.4 Assoziation von LEF1 mit der Schwere der Erkrankung und dem Krankheitss	tadium
	64
3.7 ROC-Kurven zur Diskriminierung zwischen behandlungsbedürftige	n und
nicht behandlungsbedürftigen CLL-Patienten	65
1 Diskussion	68
4.1 Überevpression von Eibromodulin in der CLL	
4.1 Oberexpression von Fibromodulin in der CLL	00
4.2 Oberexpression von LEFT in der CLL	09
4.3 Korrelation der Wht-Transkriptionstaktoren LEF1 und TCF4	, mit
Fibromodulin in primaren CLL-Zellen	69
4.3.1 Korrelation von LEF1 und Fibromodulin in primären CLL-Zellen	69
4.3.2 Korrelation von LEF1, TCF4 und Fibromodulin in primären CLL-Zellen	70
4.4 Gezielte Uberexpression von LEF1 in Hela-Zellen	70
4.5 Gezielte Hemmung von LEF1 in JVM3- und primären CLL-Zellen	71
4.6 Assoziation von Fibromodulin mit prognostischen Markern, der Tum	orlast
und dem Krankheitsstadium	72
4.7 Assoziation von LEF1 mit prognostischen Markern, der Tumorlas	t und
dem Krankheitsstadium	74
4.7.1 Assoziation von LEF1 mit ZAP70 und CD38	74
4.7.2 Assoziation von LEF1 mit der Tumorlast	75
4.7.3 Assoziation von LEF1 mit dem Krankheitsstadium und der Therapiebedü	ftigkeit
von CLL-Patienten	76
4.8 LEF1 als mögliches therapeutisches Ziel	76
4.9 Ausblick	77
4.9.1 Regulation der Fibromodulin-Expression in der CLL	78
4.9.2 LEF1 als therapeutisches Ziel in der CLL	79
4.9.3 LEF1 als prognostischer Marker	79
4.9.4 Fibromodulin als prognostischer Marker	81
5 Zusammenfassung	83
6 Literaturverzeichnis	84
7 Vorabveröffentlichung von Ergebnissen	103
8 Anhang: Abbildungsverzeichnis	104
9 Lebenslauf	106

Abkürzungsverzeichnis

ABL	Abelson protoonkogene
ATM	Ataxia telangiectasia-mutated
BAFF	B cell activating factor
BCL2	B cell lymphoma 2
CCND1	Cyclin-D1
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Copy desoxyribonucleinacid
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
DMSO.	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic mobility shift assays
EtBr	Ethidiumbromid
FKS	Fötales Kälberserum
GFP	Green fluorescent protein
HCL	Salzsäure
IAPs	Inhibitors of apoptosis proteins
lg	Immunoglobulin
IGVH	Immunoglobulin heavy-chain variable-region
IL	Interleukin
LEF1	Lymphoid enhancer-binding factor 1
microRNA	Micro ribonuclein acid
mRNA	Messenger ribonuclein acid
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase chain reaction
RER	Relative Expressionsrate
ROC	Receiver Operating Characteristic
SCF	Stem cell factor
siRNA	Small interfering ribonuclein acid
TCF	T-cell factor
TCL1	T-cell leukemia 1
TGF-β	Transforming growth factor-β
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
ZAP70	Zeta-chain-associated protein kinase

1 Einleitung

1.1 Chronische lymphatische Leukämie (CLL)

1.1.1 Definition

Die 2008 überarbeitete WHO-Klassifikation für Tumore lymphatischen Gewebes (4. Auflage) definiert die chronische lymphatische Leukämie (CLL) als B-Zell-Neoplasie mit monoklonalen CD19, CD5 und CD23-positiven Lymphozyten. Darüber hinaus müssen die Beteiligung von extramedullären Geweben oder mindestens 5×10^9 /L CLL-Zellen im peripheren Blut vorliegen. Die WHO-Klassifikation betrachtet dabei die CLL und das small lymphocytic lymphoma als unterschiedliche Manifestationen der gleichen Erkrankung ^(142,101). Der "International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia" verlangt für die Diagnose der CLL ebenfalls mindestens 5×10^9 /L monoklonale B-Zellen im peripheren Blut für mindestens 3 Monate und definiert das small lymphocytic lymphocytic lymphoma als Lymphom mit CLL-Phänotyp und der Beteiligung von extramedullären Geweben sowie weniger als 5×10^9 /L monoklonalen B-Zellen im peripheren Blut ⁽⁸¹⁾.

1.1.2 Klinische Manifestation

1.1.2.1 Symptome vor Diagnosestellung

Die subjektiv empfunden Symptomatik von CLL-Patienten vor Diagnosestellung ist meist uncharakteristisch. Die ersten Symptome sind in der Regel Lymphknotenschwellungen sowie Abgeschlagenheit und Leistungsminderung. Etwa ein Viertel der Patienten hat gehäuft fieberhafte Infekte. Sehr häufig berichten die Patienten über Gewichtsverlust und Schweißneigung. Einige Patienten berichten von abdominellen Schmerzen, welche meist Folge einer Splenomegalie oder mesenterialer Lymphome sind ⁽¹³⁸⁾. Ein erheblicher Anteil der CLL-Diagnosen, je nach Studie 31-80%, wird in frühen, asymptomatischen Stadien bei Routineuntersuchungen gestellt ^(58,129,121).

1.1.2.2 Symptome bei Diagnosestellung

Leitsymptome bei Diagnosestellung sind die Lymphozytose, Lymphknotenschwellungen sowie Spleno- und Hepatomegalie.

Etwa 70-80% der Patienten weisen Lymphknotenschwellungen bei der Diagnose auf ^(88,90,41), welche am häufigsten zervikal, axillär und inguinal lokalisiert sind. Bei der Palpation imponieren die befallenen Lymphknoten in der Regel hart, nicht druckschmerzhaft und subkutan verschieblich ⁽¹³⁸⁾. Bei 54-75% der Patienten liegt bei Diagnosestellung eine Splenomegalie ⁽¹⁷⁷⁾ und bei etwa 45-75% eine Hepatomegalie vor ^(14,148). Außerdem berichtet etwa ein Fünftel der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung über eine B-Symptomatik ⁽¹³⁸⁾.

1.1.2.3 Komplikationen

Gastrointestinaltrakt:

Bei Hepatosplenomegalie kann es durch Kompression des Magens zu einem "small stomach syndrom" mit abdominellem Drückgefühl und Appetitlosigkeit kommen ⁽¹⁴¹⁾. In Autopsiepräparaten weisen die Wände des Gastrointestinaltraktes in allen Fällen mikroskopische und in 9-15% der Fälle makroskopisch sichtbare Infiltrationen vor allem der Mukosa und Submukosa auf. Diese Infiltrationen können zu Durchfällen, Hämorrhagien und Malabsorption führen ⁽⁸⁸⁾. Im Bereich des Ileums können polypöse Infiltrationen zur "Pseu-dopolyposis lymphatica ilei" und Ileus-Komplikationen führen ⁽¹⁸¹⁾. Die Infiltrationen können auch Ulzerationen und in Verbindung mit der Immundefizienz Perforationen und Phlegmonen im Gastrointestinaltrakt zur Folge haben ⁽¹⁷⁷⁾.

Sekundärneoplasien:

Viele Studien beschreiben eine erhöhte Inzidenz von Sekundärneoplasien bei CLL-Patienten, darunter Karzinome der Haut ^(120,77), der Lunge ^(77,123), der Niere ⁽¹²³⁾ sowie Sarkome ⁽¹²³⁾ und Neoplasien des Zentralnervensystems ⁽⁹⁷⁾. Ferner sind Transformationen der CLL in Non-Hodgkin-Lymphome (3% der Fälle), in Hodgkin-Lymphome (0,5% der Fälle) und in Plasmozytome (0,1% der Fälle) beschrieben worden ⁽¹⁸⁹⁾. Außerdem kommt es in etwa 3% der Fälle zu einer sogenannten Richter-Transformation mit rapidem Wachstum der malignen Zellen und plötzlicher Verschlechterung des Allgemeinzustandes des Patienten ⁽¹⁶¹⁾.

Autoimmunerkrankungen:

Etwa 5-37% der Patienten entwickeln im Laufe der Erkrankung eine autoimmunhämolytische Anämie ^(6,42,46,88,141,138). Des Weiteren tritt bei 6-36% der Patienten eine "pure red cell anaemia" auf ^(24 zitiert nach 138).

Herz:

In seltenen Fällen sind Infiltrationen des Perikards mit ausgeprägten Perikardergüssen beschrieben worden ⁽¹²⁾.

Lunge:

Bei ausgeprägter hilärer und mediastinaler Lymphknotenschwellung kann es zu Atelektasen durch Bronchuskompression kommen ⁽²⁴⁾. Darüber hinaus treten Lungeninfarkte und in ca. 17-40% der Fälle ^(88,109) meist einseitige Pleuraergüsse auf.

Urogenitaltrakt:

Es finden sich in 60-70% der Fälle lymphatische Infiltrationen der Niere ⁽⁸⁸⁾. Diese können zu Kompression der Glomeruli und hypoxischen Tubulusschädigungen führen. In 15-20% der Fälle kommt es zu einer Hämaturie ⁽⁹⁰⁾.

Neurologische Komplikationen:

Infiltrationen und Blutungen können eine Vielzahl von zentralnervösen Symptomen von Kopfschmerzen bis zum Koma hervorrufen ⁽⁹⁰⁾. Relativ häufig kommt es zu zentralen Fazialisparese ⁽⁸⁸⁾ und in etwa 20% der Fälle treten Störungen der akustischen Wahrnehmung auf ⁽⁹⁰⁾.

Infektionen:

Viele Faktoren beeinflussen die Immunantwort bei CLL-Patienten. In erster Linie dürfte die Immundefizienz durch die krankheitsbedingte Hypogammalobulinämie und Granulozytopenie sowie durch die immunsuppressiv wirksame Therapie mit Zytostatika und Steroiden bedingt sein ⁽¹³⁸⁾. Infektionen bei CLL-Patienten treten vor allem im Bereich der Atemwege auf ^(180,4). Komplikationen durch Infektionen treten in etwa 60-80% der Fälle auf ^(2,28,131,132,180). In 60-73% der Fälle versterben die Patienten an infektiösen Komplikationen ^(100,88).

1.1.1 Epidemiologie

1.1.3.1 Alter- und Geschlechtsverteilung

Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwa 65 Jahren ^(64,47,10,128) und die Inzidenz nimmt mit steigendem Alter deutlich zu ⁽⁶³⁾. Viele Studien ermittelten eine erhöhte Inzidenz der CLL bei Männern ^(119,26,113,144,10). Des Weiteren zeigen Frauen mit CLL ein signifikant besseres Ansprechen auf Therapien ⁽¹⁰⁾ und haben eine längere Überlebenszeit als Männer ^(25,10).

1.1.3.2 Inzidenz und geographische Verteilung

In der westlichen Welt macht die CLL etwa 30% aller Leukämien aus. Die Inzidenzraten liegen zwischen 1,5 und 4,2 pro 100.000 Einwohnern ^(64,47,10,63,128). In Asien hingegen macht die CLL nur etwa 2-3% aller Leukämien aus ⁽⁶³⁾. Auch Asiaten, die nach Amerika emigriert sind, haben immer noch eine deutlich niedrigere CLL-Inzidenz ⁽¹³⁶⁾.

1.1.4 Pathogenese

1.1.4.1 Funktionelle Aspekte der Zell-Akkumulation und Mikroumgebung

Zur Akkumulation der CLL-Zellen kommt es weniger durch erhöhte Proliferation als durch Apoptoseresistenz und verlängertes Überleben. Dieser Effekt geht in normalen Zellkulturen sehr schnell verloren. Dort beginnen die CLL-Zellen innerhalb von Stunden, in Apoptose zu gehen⁽³⁷⁾. Daher scheint die Invivo-Umgebung ein wesentlicher Faktor zu sein, welcher die Apoptoseresistenz und die Akkumulation von CLL-Zellen im menschlichen Körper erst ermöglicht. Die CLL-Zellen schaffen sich im Knochenmark und befallenen Lymphknoten ihre eigene Mikroumgebung, die ihre Proliferation und ihr Überleben sichert. Entscheidend dabei sind auch nicht-neoplastische Zellen wie T-Zellen, Stroma-Zellen⁽²¹⁾, "nurse-like cells" und follikulär dendritische Zellen ⁽²⁹⁾. Die "nurse-like cells" entwickeln sich durch die Interaktion mit CLL-Zellen aus Cluster of differentiation 14 (CD14) positiven Monozyten und schützen die CLL-Zellen vor Apoptose ⁽¹⁷⁹⁾. CLL-Zellen exprimieren die Integrine CD49d/CD11a und CD11b/CD18, welche mit CD54 und CD106 auf Stroma-Zellen interagieren und einen überlebensverlängernden Effekt auf die CLL-Zellen haben ⁽¹⁴⁹⁾. Die Stroma-Zellen produzieren darüber hinaus die Interleukine IL-6, IL-7, IL-10 sowie den Transforming growth factor β (TGF- β), den Stem cell factor (SCF) und den Vascular endothelial growth factor (VEGF) und gehen so eine komplexe Interaktion mit den CLL-Zellen ein ⁽⁶⁷⁾. Die CLL-Zellen selbst sekretieren unter anderem den proliferationsinduzierenden Liganden APRIL und den B-cell activating factor (BAFF) und schützen sich auf diese Weise selbst in einer autokrinen Schleife vor Apoptose ⁽¹⁰⁵⁾. In Lymphknoten und in geringerem Maße im Knochenmark formen die CLL-Zellen sogenannte pseudofollikuläre Proliferationszentren, welche bei keinem anderen Lymphom auftreten (195). In diesen pseudofollikulären Proliferationszentren finden sich neben nicht-malignen Zellen auch CLL-Zellen mit blastenähnlichem Phänotyp, welche positiv für den Proliferationsmarker Ki67 sind ^(75,70). Daher wird vermutet, dass die pseudofollikulären Proliferationszentren das Hauptkompartiment für die Proliferation der neoplastischen Zellen bei der CLL sind. Innerhalb und um die pseudofollikuläre Proliferationszentren kommt eine große Zahl CD3positiver T-Zellen vor, von denen die meisten ebenfalls CD40L- und CD4positiv sind ⁽⁷⁵⁾. Diese Zellen stimulieren die CLL-Zellen durch die Interaktion von CD40 und CD40L und wirken synergistisch mit dem B-Zell-Rezeptor-Stimulus ⁽⁶⁹⁾. Außerdem werden in pseudofollikuläre Proliferationszentren spezifisch große Mengen des Apoptose-Caspasen-Inhibitors Survivin exprimiert ⁽⁷⁵⁾.

1.1.4.2 Genetische Ursachen

Etwa 80% der CLL-Fälle weisen typische genetische Aberrationen auf. Diese Aberrationen haben Einfluss auf Prognose und Verlauf der Erkrankung (siehe 1.1.5.3.2).

Die 13q14-Deletion tritt mit etwa 55% am häufigsten auf ⁽⁴⁹⁾. Die pathogenetische Bedeutung dieser Deletion liegt wahrscheinlich in dem Verlust der Mikroribonukleinsäure-Gene (microRNAs) mir-15a und mir-16-1. Ziele dieser microRNAs sind vermutlich antiapoptotische Proteine wie T-cell-leukemia 1 (TCL1) und B-cell-lymphoma 2 (BCL2), die durch die Deletion dann vermehrt exprimiert werden ^(23,22). Außerdem fanden Mertens et al. Hinweise, dass durch diese Deletion ein epigenetischer Tumorsupressor-Regulator-Mechanismus betroffen sein könnte ⁽¹²⁴⁾.

In etwa 25% der Fälle tritt eine 11q22-q23-Deletion bei CLL-Patienten auf ⁽¹⁹⁵⁾. In dieser Region liegt das Ataxia-telangiectasia-mutated-Gen (ATM). In etwa einem Drittel der Deletionsfälle sind beide Allele dieses Gens betroffen ⁽⁵⁾. ATM spielt eine zentrale Rollen in der zellulären Reaktion auf DNS-Doppelstrangbrüche. Ein Mangel führt zum Ataxie-Telangiektasie-Syndrom mit einer Prädisposition für lymphatische Erkrankungen, genomischer Instabilität und hoher Sensitivität gegenüber ionisierenden Strahlen ⁽¹¹²⁾. Kalla et al. konnten weiterhin zeigen, dass der Ubiquitin-abhängige Apoptoseregulator Cullin 5 in Patienten mit 11q-Deletion nur vermindert exprimiert wird ⁽¹⁰⁴⁾.

Deletionen des Bereichs 17p13 treten in 4-9% der CLL-Patienten auf ^(48,49,78,195). Die pathogenetische Bedeutung dieser Deletion liegt in dem Verlust des TP53-Gens, welches für den Tumorsuppressor p53 kodiert. In über 80%

der Patienten mit monoallelischer TP53-Deletion ist das verbleibende Allel mutiert und es kommt zu einem vollständigen Verlust der p53-Funktion ⁽¹⁹⁴⁾. Besonders bedeutsam ist, dass die Wirkung von Purinanaloga und anderer Zytostatika durch den Verlust der p53-Funktion deutlich herabgesetzt oder sogar aufgehoben wird ^(18,48,118,139,182,193,194).

Da Verwandte ersten Grades von CLL-Patienten ein etwa 7,5-fach erhöhtes Risiko haben, ebenfalls eine CLL zu entwickeln, liegt der Verdacht einer gewissen erblichen Prädisposition nahe ^(73,51). Di Bernardo et al. fanden in einer genom-weiten Analyse CLL-Risiko-Loci in den Banden 2q13, 2q37.1, 6p25.3, 11q24.1, 15q23 und 19q13.32. Dabei wies der Locus 6p25.3, welcher das Interferon-regulatory-factor-4-Gen umgibt, die stärkste Assoziation mit familiärer Häufung von CLL-Erkrankungen auf ⁽⁴⁵⁾.

1.1.4.3 Aberrante intrazelluläre Signalkaskaden

1.1.4.3.1 B-Zell-Rezeptor-Signalweg

Der B-Zell-Rezeptor besteht aus einem membrangebundenen Immunglobulin und einem CD79a/CD79b-Heterodimer ⁽¹⁸³⁾. Die Aktivierung des B-Zell-Rezeptors führt seinerseits zur Aktivierung von Tyrosinkinasen der Src-Familie (Blk, Fyn, und Lyn), erhöhter intrazellulärer Kalziumkonzentration und im Endeffekt zur Zellproliferation ^(191,17). CLL-Klone von geographisch und familiär unabhängigen Patienten weisen im Vergleich zu gesunden B-Zellen ein sehr eingeschränktes Repertoire von Immunoglobulin-heavy-chain variable-region-Genen (IGVH) auf ^(107,190). Über 20% der unabhängigen CLL-Fälle weisen stereotype Rezeptoren auf, wobei die Wahrscheinlichkeit, dass zwei unabhängige B-Zellen per Zufall den gleichen B-Zell-Rezeptor exprimieren, extrem gering ist ^(134,174). In vielen Fällen sind die von CLL-Zellen exprimierten Antiköper autoreaktiv (z.B. Rheumafaktor, anti-DNS- oder anti-Cardiolipin-Antikörper), haben molekulare Strukturen zum Ziel, die auf apoptotischen Zellen exprimiert werden, oder sie sind gegen häufige Bakterien gerichtet ^(174,125,94). Ein weiterer Aspekt, der für eine bedeutende Rolle von Autoantigenstimulationen in der Pathogenese der CLL spricht, ist, dass pseudofollikuläre Proliferationszentren außer bei der CLL nur bei Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis oder der multiplen Sklerose auftreten, jedoch bei keinem anderem Lymphom ^(176,38,68).

1.1.4.3.2 Wnt-Signalkaskade

Die Wnt-Signalkaskade hat ihre physiologische Bedeutung im Wesentlichen im Rahmen der Embryogenese, der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen sowie der Proliferation in der frühen Stadien der B-Zell-Entwicklung ^(106,158,159). Die Signalkaskade wird aktiviert durch die Bindung von Wnt-Proteinen an den Frizzled-Rezeptor und dessen Korezeptor LDLreceptor-related-protein 5 oder 6. Dies führt zur Aktivierung eines Mitgliedes der Dishevelled-Proteinfamilie, welches dann den β-Catenin-Degradationskomplex hemmt. Letzterer besteht aus der Glycogen-synthase Kinase 3β, Axin und dem Adenomatous polyposis coli (APC) Protein. Wird β-Catenin in diesem Komplex gebunden, erfährt es eine Phosphorylierung durch die Glycogensynthase-Kinase 3ß und wird proteasomal degradiert. Wenn der Degradationskomplex hingegen durch die aktive Wnt-Signalkaskade gehemmt wird, akkumuliert β-Catenin im Zytoplasma und transloziert in den Zellkern. Dort bindet es und aktiviert Mitglieder der T-cell-factor (TCF) / Lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF1) Transkriptionsfaktorfamilie. Dies wiederum führt zur Transkription der Zielgene, welche Einfluss auf Proliferation und Differenzierung der entsprechenden Zelle nehmen.

Die aberrante Aktivierung der Wnt-Signalkaskade ist für viele maligne Neoplasien wie z. B. das Bronchial-, das Kolon-, das Ovarial- oder das Mammakarzinom beschrieben worden ^(150,157,72). Bei der CLL ist die Expression von Wnt-Inhibitoren durch epigenetische Modifikationen reduziert ⁽³⁰⁾, wohingegen die Wnt-Proteine überexprimiert werden. Dies führt zu einer hochaktiven Wnt-Signalkaskade in der CLL ⁽¹¹⁶⁾. Eine besonders große Rolle spielt hierbei der Transkriptionsfaktor LEF1 (siehe 1.2.2).

1.1.4.4 Dysbalance von pro- und antiapoptotischen Proteinen

In der CLL sind mehrere antiapoptotische Proteine überexprimiert, während proapoptotische Proteine herunterreguliert bzw. inhibiert werden. Von besonderer Bedeutung ist das antiapoptotische Protein BCL2, welches in der CLL überexprimiert wird ⁽⁸⁷⁾. BCL2 inhibiert proapoptotische Proteine durch die Bilduna inaktiver Heterodimere. Außerdem stabilisiert es die Mitochondrienmembrane und verhindert somit die Freisetzung apoptoseinduzierender Faktoren wie Cytochrome C⁽⁸⁷⁾. In einem transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von BCL2 im B-Zell-Kompartiment alleine schon ausreichend ist, um B-Zell-Lymphome hervorzurufen ⁽¹⁾. Ein weiteres Protein der BCL2-Familie ist das Myeloid leukemia-celldifferentiation-protein 1, dessen Expression mit Therapieresistenz bei CLL-Patienten assoziiert ist ⁽¹⁰⁸⁾. Auch der X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) ist ein antiapoptotisches Protein, das in der CLL überexprimiert wird ^(19,167). XIAP gehört zur Familie der Inhibitors-of-apoptosis-Proteins (IAPs), welche durch direkte Inhibition der Apoptose-Caspasen den programmierten Zelltod verhindern ⁽⁴⁴⁾.

Außerdem ist das Protoonkogen TCL1 in einem Großteil der CLL-Fälle überexprimiert ^(92,93). TCL1 ist ein Koaktivator der Akt-Kinase, welche wiederum proapoptotische Proteine inaktiviert ^(111,40,43). Hohe TCL1-Expression ist bei CLL-Patienten mit einer ungünstige Prognose assoziiert ^(93,16). Darüber hinaus führt die Überexpression von TCL1 im B-Zell-Kompartiment von Mäusen zu der Entwicklung einer B-Zell-Neoplasie, welche der aggressiven CLL sehr ähnelt ^(192,11). Des Weiteren zeigen fast alle CLL-Fälle eine deutlich verminderte Expression des proapototischen Proteins Death-Associated-Protein-Kinase 1 ⁽¹⁵⁵⁾.

1.1.5 Prognose der CLL

1.1.5.1 Allgemeine Prognose

Der Median der Überlebenszeiten von CLL-Patienten liegt bei etwa 8-9 Jahren ^(128,10). Die Prognose der CLL ist dabei ausgesprochen heterogen. Der Median der Überlebenszeiten schwankt bei verschiedenen Patientenkollektiven zwischen 2 und 20 Jahren ⁽⁹⁾.

1.1.5.2 Klassifikationen

Die Klassifikationen nach Binet ⁽¹³⁾ und Rai ^(153,152) haben sich in der klinischen Anwendung durchgesetzt. Dabei wird im europäischen Raum vorwiegend die Klassifikation nach Binet verwendet, während in den USA hauptsächlich nach Rai klassifiziert wird. Beide Klassifikationen teilen die Patienten in drei Risikogruppen.

Tabelle 1: Klassifikation nach Binet ⁽¹³⁾

Stadium	Definition	Medianes Überleben
Binet A	Hämoglobinkonzentration > 10,0 g/dl, Thrombozytenzahl > 100 G/l, < 3 ver- größerte Lymphknotenregionen	> 10 Jahre
Binet B	Hämoglobinkonzentration > 10,0 g/dl, Thrombozytenzahl > 100 G/l, ≥ 3 ver- größerte Lymphknotenregionen	5 Jahre
Binet C	Hämoglobinkonzentration ≤ 10,0 g/dl, Thrombozytenzahl < 100 G/l	2 Jahre

Tabelle 2: Klassifikation r	nach Ra	ai ^(153,152)
-----------------------------	---------	-------------------------

Risiko	Stadium	Definition	Mediane Über- lebenszeit
niedrig	0	Lymphozytose > 15.000 /mm ³	> 10 Jahre
		$\frac{1}{1000} = \frac{1}{1000} = 1$	
intermediär	I	Lymphadenopathie	
		Lymphozytose > 15.000/mm ³	7Jahre
	Ш	Hepatomegalie und/oder Spleno- megalie	
		Lymphadenopathie irrelevant	
hoch		Lymphozytose > 15.000/mm ³	
	ш	Hämoglobinkonzentration <11,0 g/dl	
		Lymphadenopathie irrelevant Hepa- tosplenomegalie irrelevant	
		Lymphozytose > 15.000/mm ³	1,5 Jahre
	117	Thrombozytenzahl < 100.000 / µl	
	IV	Lymphadenopathie irrelevant Hepa- tosplenomegalie irrelevant Hämog- lobinkonzentration irrelevant	

1.1.5.3 Prognostische Marker

1.1.5.3.1 Klinische Symptomatik und hämatologische Parameter

Die in der körperlichen Untersuchung erfassbare Symptomatik wie z. B. Lymphadenopathie sowie Spleno- und Hepatomegalien haben für sich genommen kaum unabhängige prognostische Aussagekraft ⁽⁹⁾. Auch das Alter der Patienten scheint bei CLL-Patienten kein unabhängiger prognostischer Marker zu sein ⁽¹²⁷⁾. Blutbildveränderungen im Sinne einer Anämie, Thrombozytopenie oder das Ausmaß der Lymphozytose zeigen nicht in allen multivariaten Analysen einen unabhängigen prognostischen Wert. Sie sind jedoch aufgrund der einfachen und kostengünstigen Bestimmbarkeit nach wie vor von klinischem Nutzen ⁽⁹⁾. Die klinische Symptomatik und die Blutbildveränderungen zeigen ihren größten prognostischen Wert in ihrer Kombination im Rahmen der Klassifikationen nach Binet und Rai. Insbesondere die Klassifikation nach Binet hatte in vielen multivariaten Analysen einen unabhängigen prognostischen Wert ^(152,13,9,184,169). Jedoch wird in frühen Stadien eine Subgruppe der Patienten mit besonders schlechter Prognose von beiden Klassifikationen nicht als solche erfasst ^(169,9,126). Daher sind weitere prognostische Marker notwendig, die insbesondere bereits in frühen Stadien eine bessere Auflösung der Prognose erzielen.

1.1.5.3.2 Genetische Anomalien und laborchemische Parameter

Im Laufe der letzten Jahre konnten sich zwei molekulargenetische Anomalien als diagnostische Kriterien mit prognostischer Relevanz durchsetzen. So konnte gezeigt werden, dass die Deletion 17p13 (Genlocus von p53) sowie p53-Mutationen mit schlechter Prognose und Therapieresistenz gegenüber Fludarabin assoziiert sind ^(9,48,48,66,193,118). Des Weiteren ist ein unmutierter IGVH-Status mit einem aggressiven Krankheitsverlauf und einer schlechten Prognose verbunden ^(39,85).

Darüber hinaus scheint auch die 11q-Deletion mit verstärkter Lymphadenopathie und schlechter Prognose einherzugehen ^(50,49,78). Jedoch konnte dies in manchen multivariaten Analysen nicht bestätigt werden ^(103,140). Die Deletion 13q14 scheint hingegen bei isoliertem Vorkommen mit einer guten Prognose assoziiert zu sein ⁽⁹⁾.

Bei den laborchemischen Parametern ist die Thymidinkinase hervorzuheben, deren prognostischer Wert in mehreren multivariaten Analysen gezeigt werden konnte ^(83,84,32). Andere Marker wie β 2-Microglobulin oder CD23 werden kontrovers diskutiert ⁽⁹⁾.

1.1.5.3.3 Immunphänotypische Marker

Der Prozentsatz der CD38-exprimierenden Zellen zeigt eine Assoziation mit schlechter Prognose ⁽¹³⁹⁾. CD38 scheint dabei ein unabhängiger prognostischer Marker zu sein. Er hat jedoch den Nachteil, dass seine Expression im Laufe der Erkrankung variieren kann ⁽⁸⁶⁾. Ein weiterer prognostischer immunphänotypischer Marker ist die Zeta-chain-associated-protein-Kinase 70 (ZAP70). Dieser Marker zeigt eine hohe Assoziation mit unmutiertem IGVH-Status und wird daher häufig als Surrogatmarker für den IGVH-Status verwendet ⁽¹⁵⁴⁾. Eine neue Studie konnte jedoch auch für ZAP70 eine deutliche Veränderung der Ausprägung im Verlauf der Erkrankung bei einem Drittel der Patienten zeigen ⁽¹⁸⁸⁾.

1.1.6 Diagnose der CLL

Die Verdachtsdiagnose der CLL ergibt sich aus Anamnese, körperlicher Untersuchung und Differentialblutbild. Hinweisend auf eine CLL ist, wie bereits im Abschnitt 1.1.2.2 erwähnt, das Leitsymptom der Lymphozytose sowie der Gumprecht'schen Kernschatten im Blutausstrich. Anamnestisch sollte nach Leistungsschwäche, häufigen Infekten und B-Symptomen gefragt werden. In der körperlichen Untersuchung finden sich häufig das Vorliegen von Lymphknotenschwellungen, Spleno- und Hepatomegalie sowie eventuell klinische Zeichen einer Anämie oder Thrombozytopenie. Die Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie empfiehlt außerdem die serologische Untersuchung von LDH, CRP, eine Protein-Elektrophorese sowie eine Thoraxröntgenaufnahme mit der Fragestellung nach mediastinalen Lymphknotenvergrösserungen, Pleuraergüssen und Hinweisen auf eine inaktive Tuberkulose ⁽⁸²⁾.

Zur Diagnosesicherung bedarf es einer zytologischen Untersuchung sowie einer immunphänotypischen Analyse. Der "International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia" verlangt mindestens 5×10⁹/L CLL-Zellen im peripheren Blut. Dabei müssen im Blutausstrich kleine, morphologisch reif wirkende Lymphozyten mit einem schmalen Zytoplasmasaum und dichten Zellkernen ohne erkennbare Nucleoli vorhanden sein. Diese können durchmischt sein mit bis zu 55% atypischen Zellen oder Prolymphozyten. Immunphänotypisch muss eine Koexpression von CD5, CD19, CD20 und CD23 vorliegen. Charakteristisch ist außerdem die schwache Expression von CD20 und CD79b. Des Weiteren muss mit Hilfe der Leichtkettenrestriktion (κ oder λ) die Monoklonalität der Zellen bewiesen werden ⁽⁸¹⁾.

Wenn weniger als 5×10⁹/L monoklonale B-Zellen im peripheren Blut vorliegen und außerdem keinerlei Symptomatik wie beispielsweise Lymphknotenschwellung, Spleno- und Hepatomegalie, Anämie oder Thrombozytopenie erkennbar ist, spricht man von einer monoklonalen Lymphozytose unbekannter Signifikanz beziehungsweise einer "Monoclonal B-lymphocytosis" ⁽¹⁵⁶⁾.

1.1.7 Therapie der CLL

1.1.7.1 Therapieindikation

Im Allgemeinen sollten Patienten in frühen Stadien (Rai 0-II, Binet A und B) außerhalb von klinischen Studien nicht therapiert, sondern vorerst nur überwacht werden. In mehreren Studien sowie deren Metaanalyse konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit Alkylanzien in frühen Stadien zu keinem Überlebensvorteil führt ⁽³⁵⁾. Somit besteht außerhalb klinischer Studien nur eine Therapieindikation für Patienten in fortgeschrittenen Stadien (Rai III-IV, Binet C) oder bei Patienten mit hoch aktiver symptomatischer Erkrankung unabhängig vom Krankheitsstadium ⁽⁸⁰⁾.

1.1.7.2 Therapie in Abhängigkeit von Patienten- und Erkrankungs-Charakteristiken

Besteht eine Indikation zur Therapie, so ist die Wahl der Therapie abhängig vom Allgemeinzustand und der Komorbidität des Patienten sowie des genetischen Risikoprofils des CLL-Klons. Patienten mit einem normalen Kreatinin-Clearance sowie einem niedrigen Wert in der "cumulative illness rating scale" ⁽⁵⁹⁾ sollten einer Kombinationstherapie aus den Zytostatika Fludarabin und Cyclophosphamid sowie dem monoklonalen Anti-CD20-Antikörper Rituximab zugeführt werden ⁽⁸⁰⁾. Komorbide Patienten hingegen sollten eine Chlorambucil- oder eine Fludarabin-Therapie mit reduzierter Dosis als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Therapeutika erhalten. Hochrisikopatienten mit einer 17p-Deletion / p53-Mutation weisen eine hohe Resistenz gegenüber Standardtherapien auf und sollten daher mit experimentellen Therapie-Regimen und wenn möglich mit einer allogenen Stammzelltransplantation therapiert werden ⁽⁸⁰⁾.

Bei einem Rezidiv kann die Initialtherapie wiederholt werden, falls die rezidivfreie Zeit länger als 12 (bzw. 24 Monaten bei modernen Chemoimmunotherapien) angedauert hat. Liegt jedoch ein Frührezidiv innerhalb von 6 Monaten oder eine 17p-Deletion / p53-Mutation vor, sollte das Therapieregime geändert werden ⁽⁸⁰⁾. Die Therapieoptionen erstrecken sich dann auf Flavopiridol ⁽²⁰⁾ oder Lenalidomid ⁽²⁷⁾ innerhalb klinischer Studien oder auf Alemtuzumab Mono- ⁽¹⁵¹⁾ bzw. Kombinationstherapie ⁽⁵⁷⁾ sowie die allogenen Stammzelltransplantation ⁽⁵⁴⁾.

1.1.7.3 Supportive Therapie

Bei IgG-Werten unter 0,5 g/L und häufigen oder sehr schweren bakteriellen Infektionen kann nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie die Gabe von Immunglobulinen erfolgen ⁽⁸²⁾. Außerdem können manche Patienten mit Anämie von der Behandlung mit Erythropoietin profitieren ^(117,115). Des Weiteren können während einer myelosuppressiven Therapie Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel der Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) hilfreich sein ^(143,172).

1.1.7.4 Stammzelltransplantation

Da selbst eine myeloablative Therapie mit anschließender autologer Rücktransplantation der eigenen hämatologischen Stammzellen nicht in der Lage ist, die CLL zu heilen, gilt die allogene Stammzelltransplantation als einziger kurativer Therapieansatz bei Patienten mit CLL ⁽⁵²⁾. Wegen der hohen therapiebedingten Mortalität und Morbidität wird sie nur bei Patienten mit ausgesprochen schlechter Prognose aber guter körperlicher Fitness eingesetzt (siehe 1.1.7.2).

Der Vorteil der allogenen Transplantation gegenüber der autologen beruht dabei auf dem immunologischen Angriff des fremden Immunsystems gegen die Leukämiezellen. Man spricht vom sogenannten Graft-versus-leukemia-Effekt (GVL). Dabei gilt, dass ein Rezidiv der Leukämie umso weniger wahrscheinlich ist, je aggressiver sich das transplantierte Immunsystem gegenüber dem Wirtsorganismus verhält (Graft-versus-host disease (GVHD))^(53,178,60).

Mit Hilfe der allogenen Stammzelltransplantation kann ein progressionsfreies Langzeitüberleben in 30-60% der Hoch-Risiko-CLL-Patienten erreicht werden. Dabei liegt die therapiebedingte Mortalität bei modernen Konditionierungsregimen mit reduzierter Intensität im Bereich 15-25% ⁽⁵²⁾.

1.1.7.5 Neue therapeutische Verfahren

Da die klassischen, auf Zytostatika basierenden, Therapieregime vergleichsweise unspezifisch wirken und somit viele Nebenwirkungen verursachen, wird bei neueren therapeutischen Verfahren versucht, eine spezifische Wirkung der Therapie auf die Leukämiezellen zu erreichen. Ein therapeutischer Ansatz ist hierbei die Gabe von Antikörpern gegen CLL-typische Oberflächenantigene wie zum Beispiel Rituximab (anti-CD20 Antikörper), der bereits breite Anwendung findet, und Alemtuzumab (anti-CD52 Antikörper), der bei Fludarabinrefraktärer CLL eingesetzt wird ⁽⁸⁰⁾. Weitere noch in der klinischen Testung befindliche Antikörper sind Lumiliximab (anti-CD23 Antikörper) und Ofatumumab (anti-CD20 Antikörper). Ein weiterer neuer therapeutischer Ansatz ist die Verwendung von Immunmodulatoren wie Thalidomid und Lenalidomid, welche die Mikro-Umgebung der CLL verändern ⁽¹⁷³⁾. Eine andere Klasse neuer Therapeutika sind Tyrosin-Kinase-Inhibitoren wie beispielsweise das semisynthetische Flavonoid Flavopiridol, welches unabhängig vom p53-Signalweg cyclin-abhängige Kinasen hemmt und zur Herabregulation antiapoptotischer Proteine führt ⁽¹⁷³⁾. Außerdem werden derzeit Inhibitoren von antiapoptotischen Proteinen wie Oblimersen, welches die mRNA des BCL2 Proteins inhibiert ^(145,80), oder der pan-BCL2-Inhibitor Obatoclax ⁽¹³⁷⁾ getestet.

1.2 Lymphoid enhancer-binding factor 1

1.2.1 Physiologisches Vorkommen und Funktion von LEF1

Der Lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF1) ist Teil der LEF1/TCF Transkriptionsfaktor-Familie. Diese Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Zielgenen der Wnt-Signalkaskade ^(7,99). Die Wnt-Signalkaskade erfüllt vielfältige Funktionen während der Embryogenese und wird danach weitgehend deaktiviert. LEF1 ist jedoch auch im adulten Organismus notwendig für das Überleben und die Proliferation in frühen Stadien der B-Zellentwicklung ⁽¹⁵⁹⁾.

1.2.2 LEF1 in der CLL und anderen neoplastischen Erkrankungen

In Microarray-Studien konnte eine Überexpression von LEF1 in der CLL gezeigt werden ^(102,110). Dabei zeigte die LEF1-Expression eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen Patienten. Frühere Forschungsergebnisse liefern Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Ausprägung der LEF1-Überexpression und schlechter Prognose in leukämisch verlaufenden Malignomen. Wang et al. konnten beispielsweise zeigen, dass die LEF1-Expression in hochgradig malignen akuten Leukämien relativ zu niedrigmalignen chronischen Leukämien signifikant erhöht ist ⁽¹⁸⁹⁾. Des Weiteren haben Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie und hoher LEF1-Expression durch epigenetische Transkriptionshemmung von Wnt-Suppressoren eine schlechtere Prognose als solche mit relativ niedriger LEF1-Expression ⁽¹⁶⁴⁾. Gutierrez et al. fanden außerdem Hinweise, dass die Zellen der Monoclonal Blymphocytosis LEF1 in geringerem Maße überexprimieren als die Zellen der manifesten CLL ⁽⁷⁹⁾. Weitere Studien fanden Hinweise auf Effekte der LEF1-Expression auf die Malignität neoplastischer Erkrankungen. Beispielsweise scheint LEF1 Tumorwachstum und Invasivität in androgenabhängigen Prostatakarzinomen zu fördern ⁽¹¹⁴⁾. Auch in Mamakarzinomen konnten Hinweise auf einen verstärkenden Effekt von LEF1 auf die Invasivität des Tumors gefunden werden ⁽¹³⁵⁾. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass die unkontrollierte Expression von LEF1 ein wichtiger Schritt in der Entwicklung von verschiedenen malignen Erkrankungen sein könnte. Beispielsweise kann LEF1 die Repression des C-Myc-Onkogens durch den TGF- β unterbinden ⁽¹⁶⁶⁾. Außerdem konnten Rivat et al. zeigen, dass LEF1 an der Induktion der Matrix-Metalloproteinasen Matrilysin beteiligt ist, welche eine Schlüsselrolle in der lokalen Invasivität von Tumoren des Verdauungstraktes einnimmt ⁽¹⁶⁰⁾. Des Weiteren konnte die neoplastische Transformation durch LEF1 sowohl in vitro als auch in vivo gezeigt werden. Aoki et al. konnten beispielweise den onkogenen Effekt von LEF1 auf Hühner-Fibroblasten nachweisen ⁽³⁾. Außerdem führt unkontrollierte LEF1-Expression in hämatopoetischen Stammzellen zu akuten lymphatischen und myeloiden Leukämien in Mäusen ⁽¹⁴⁶⁾.

1.3 Fibromodulin

1.3.1 Physiologisches Vorkommen und Funktion von Fibromodulin

Fibromodulin hat ein Molekulargewicht von 59 kDa und ist das am häufigsten vorkommende leucinreiche Protein. Die Erstbeschreibung erfolgte durch Hedbom und Heinegård im Jahre 1989.



Abbildung 1: Schematische Darstellung von Fibromodulin (modifiziert nach ⁽⁹¹⁾)

Fibromodulin ist durch seine Wechselwirkungen mit Kollagen vom Typ I und II am Aufbau der Extrazellularmatrix beteiligt. Es kommt am häufigsten im Gelenkknorpel sowie in Ligamenten und der Sclera vor ^(89,89).

Darüber hinaus kann Fibromodulin TGF- β binden und dessen biologische Aktivität inhibieren ⁽⁹⁶⁾. Des Weiteren wird die Fibromodulin-Expression in Myofibroblasten bei Verletzungen stark erhöht ⁽⁷⁾. Außerdem scheint Fibromodulin an der Regulation der Narbenbildung beteilig zu sein ⁽¹⁷⁵⁾. Dies lässt vermuten, dass Fibromodulin eine wichtige Rolle bei der Wundheilung spielt.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Fibromodulin die Komplementkaskade aktivieren kann und somit wahrscheinlich auch an Entzündungsprozessen beteiligt ist ⁽¹⁷¹⁾. Des Weiteren ist Fibromodulin sowohl in Chondrozyten als auch in Osteoblasten während der fetalen Knochenentwicklung im Mausmodell hochreguliert und somit vermutlich an der intramembranösen und enchondralen Knochenbildung beteiligt ⁽⁷⁴⁾.

1.3.2 Fibromodulin bei der CLL

Fibromodulin ist ein hochgradig überexprimiertes Gen in der CLL. Klein und Mitarbeiter konnten als erste mittels Microarray-Analysen eine sehr hohe Fibromodulin-Expression in CLL-Zellen nachweisen ⁽¹¹⁰⁾. Jelinek et al. ermittelten eine im Durchschnitt 2188-fache Überexpression von Fibromodulin in primären CLL-Proben im Vergleich zu gesunden B-Zellen ⁽¹⁰²⁾. Giannopoulos und Mitarbeiter fanden mit Hilfe der konventionellen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 63% Fibromodulin-mRNA-positive CLL-Fälle bei keinem einzigen positiven Fall in der gesunden Kontrolle ⁽⁷¹⁾.

1.3.3 Therapeutische und prognostische Bedeutung von Fibromodulin in der CLL

Mayr et al. gelang es, mittels CD40L-stimulierten CLL-Zellen autologe T-Zellen zu aktivieren und die Zahl der fibromodulin-spezifischen T-Zellen um den Faktor 10 zu vergrößern. Diese T-Zellen sezernierten Interferon-γ bei Kontakt zu Fibromodulin ⁽¹²²⁾. Außerdem konnten Choudhury et al. zeigen, dass der siR-NA knockdown von Fibromodulin selektiv Apoptose in CLL-Zellen induziert ⁽³¹⁾. Des Weiteren zeigt Fibromodulin eine höhere Expression in CLL-Zellen mit p53-Mutationen und erfährt in diesen Zellen nach DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlung eine weitere Induktion ⁽¹⁸²⁾. Somit scheint eine erhöhte Fibromodulin-Expression bei CLL-Zellen mit einer Resistenz gegen Apoptosein-duktion durch DNA-Schäden assoziiert zu sein.

1.4 Zielsetzung und Hypothese dieser Arbeit

Sowohl für das extrazelluläre Matrixprotein Fibromodulin als auch für den Wnt-Transkriptionsfaktor LEF1 konnte in Microarray-Analysen gezeigt werden, dass sie in der CLL erheblich höher exprimiert sind als in gesunden B-Zellen ^(102,110). Für LEF1 konnte eine wichtige Rolle für Pathogenese und Aggressivität vieler neoplastischer Erkrankungen nachgewiesen werden (siehe 1.1.2). Der Fibromodulin-Promotor enthält eine mögliche Bindungsstelle für Wnt-Transkriptionsfaktoren. Außerdem zeigt Fibromodulin eine erhebliche Assoziation mit der p53-Mutation in der CLL, welche wiederum mit schlechter Prognose und Therapieresistenz assoziiert ist ⁽¹⁸²⁾.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass LEF1 die Transkription von Fibromodulin reguliert und beide eine Assoziation mit schlechter Prognose und fortgeschrittener Erkrankung in der CLL aufweisen. Zur Untersuchung dieser Hypothese soll

- 1. mittels effizienz-korrigierter quantitativer real-time-PCR die Überexpression von LEF1 und Fibromodulin in der CLL bestätigt werden;
- 2. der Effekt einer LEF1-Überexpression auf die Fibromodulin-Expression einer Wnt-negativen Ziellinie untersucht werden;
- der Effekt einer LEF1-Hemmung auf die Fibromodulin-Expression primärer CLL-Zellen und einer CLL-ähnlichen Zelllinien untersucht werden;
- die Assoziation von LEF1 und Fibromodulin in primären CLL-Zellen untersucht werden und außerdem kontrolliert werden, ob auch der Wnt-Transkriptionsfaktor TCF4 eine Assoziation mit Fibromodulin in der CLL zeigt;
- 5. die Assoziation von LEF1 und Fibromodulin mit prognostischen Markern, der Tumorlast und dem Krankheitsstadium untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

In den laborexperimentellen Untersuchungen dieser Dissertation kamen die in den folgenden Unterabschnitten aufgeführten Materialien, Geräte und Computerprogramme zum Einsatz.

2.1.1 Verbrauchsmaterial

Kryoröhrchen	1,5 ml, Sarstedt
Leucosep [®] -Zentrifugenröhrchen	Leucosep [®] , Greiner
Mikroskopier-Deckgläser	24 x 24 mm, Brand
Nitrozellulose-Membran incl. Filterpapier	LC2000, Invitrogen
Objektträger	76 x 26 mm, Engelbrecht
Pipettenzubehör	Standardtips 10 µl, Eppendorf;
	10-100 µl, 100 - 1000 µl,
	Sarstedt; Dualfilter PCRclean,
	sterile,10 µl, 200 µl,1000 µl,
	Eppendorf
Plastikpipetten (steril)	5 ml, 10 ml, 25 ml, Costar
Polyacrylamidgele	NuPage [®] 4-12% Bis-Tris, Invit-
	rogen
Reaktionsgefäße	LoBind 0,5 ml, Eppendorf; 1,5
	ml, Sarstedt
RT-PCR Kapillaren	LightCycler Capillaries 20 µl,
	Roche Diagnostics
Spritzen	10 ml, 20 ml, Braun
Spritzen-Kanülen	Microlance 3, 0,9x40 mm, BD
Sterilfilter	Sterifix , 0,2 µm, Braun
Zellkultur Multiwell-Platten	6er-Well, 12er-Well, 96er Well,
	Nunc
Zellkulturflaschen	175 cm ² , 75 cm ² , 25 cm ² , Nunc
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml, Greiner
2.1.2 Chemikalien

Agarose	Carl Roth
Albumin Fraktion V	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Eisessig	Roth
Ethanol absolut	Carl Roth
Ethidiumbromid (EtBr)	Serva
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-	Roth
tetraessigsäure (EGTA)	
Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz	Carl Roth
(EDTA)	
Ficoll-Hypaque (Lymphoprep)	Axis-Shield
Formaldehyd	Carl Roth
Methanol	Carl Roth
Milchpulver	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
PBS Tabletten	Gibco
Ponceau S	Carl Roth
Protease-Inhibitorkocktail (Complete ®)	Roche
Roti-Blok ®	Carl Roth
Roti-Nanoquant ®	Carl Roth
Salzsäure (HCL)	Carl Roth
TRIS-Base	Carl Roth
Tween20	Serva

2.1.3 Geräte

Agarosegel Kammer	DNA Sub Cell, Bio Rad
Autoklave	Varioklav Typ 400, Labortech-
	nik GmbH
Filmentwickler	Curix 60, Agfa
Gefrierschrank -80 °C	Labotect -80 ℃ ilShin®
	DF8524

Geldokumentationseinheit	
UV/VIS Transluminator	LTF Labortechnik
Kamera	Hama
Thermoprinter	P91, Mitsubishi
Bildschirm	Sony
Haemozytometer	Neubauer, Labortechnik
Heizblock	TB1 Thermoblock, Biometra
Inkubator	B 5060 EK/C02, Hereaus;
	Labotect Incubator C200,
	BeLoTecLab
Kapillar-Kühler	Light Cycler Cooling block,
	Roche
Laborwaage	TE 153S, Sortius
Luminometer	MicroLumatPlus LB 96V,
	Berthold
MACS [®] Separator	Miltenyi Biotec
Mikroskope	Diavert, Leitz; Axiolab, Carl
	Zeiss
Mikrozentrifugen	Biofuge fresco, Hereaus (Rotor:
	3325B; Hereaus); Biofuge pico,
	Hereaus (Rotor: 3328,
	Hereaus)
Netzteile	Power Pac 200, BioRad; Power
	Pac 1000, BioRad
Nucleofector	Amaxa
PAGE System	X-cell SureLock, Invitrogen
pH-Meter	pH Level1, inoLab
Photometer	μ Quant, BioTek Instruments;
	Ultrospec 3000, Pharmacia Bio-
	tech
Pipetten	Research, Eppendorf;
	Multipette stream, Eppendorf;
	PreCision, Biozym; PreCision
	Multi, Biozym; Proline, Biohit;

RT-PCR Systeme	LightCycler 2.0 Instruments,
	Roche Diagnostics; LightCycler
	480, Roche Diagnostics;
	LightCycler Carousel Centrifuge
	2.0, Roche Diagnostics; Centri-
	fuge 5430, Eppendorf
Rüttelschüttler	Vortex K-550-GE, Bender &
	Holbein
Schüttelplatte	Rocky RT-1S, Uniequip
Sterilbanken	HLB 2448, Hereaus; SterilGard
	III Advance, Baker Company
Ultraschallsystem	Sonoplus HD 2070, Bandelin
Wasserbad	GFL-1004, Gesellschaft für La-
	bortechnik
Western-Blot System	Xcell II blot module, Invitrogen
Zentrifuge	Laborfuge 400R. Hereaus (Ro-
	tor: 8172, Hereaus)

2.1.4 Zellkultur-Materialien

2.1.4.1 Reagenzien für die Zellkultur

Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure (HEPES) (1 M)	Gibco
Penicillin/ Streptomycin-Lösung (10000 µg/ml Streptomycinsulfat	
und 10000 U/ml Penicillin G)	Biochrom
RPMI 1640-Medium mit L-Glutamin	Biochrom
G418	Invivogen

2.1.4.2 Nährmedien für die Zellkultur

Nährmedium für primäre Zellen

20% (V/V)	FKS
100 U/ml	Penicillin
10 µg/ml	Streptomycin
10 mM	HEPES-Puffer
gelöst in RPMI-1640 Zellkulturmedium	

Nährmedium für Zelllinien

10% (V/V)	FKS
100 U/ml	Penicillin
10 µg/ml	Streptomycin
10 mM	HEPES-Puffer
gelöst in RPMI-1640 Zellkulturmedium	

Nährmedium für LEF1 tranfizierte Hela-Zellen

10% (V/V)	FKS	
100 U/ml	Penicillin	
10 µg/ml	Streptomycin	
10 mM	HEPES-Puffer	
500 µ/ml	G418	
gelöst in RPMI-1640 Zellkulturmedium		

2.1.4.3 Zelllinien

JVM3-Zellen

Die CLL-ähnliche Zelllinie JVM3 wurde etabliert aus dem Blut eines 73jährigen Mannes mit einer B-Prolymphozyten-Leukämie. Um eine stabile Zelllinie zu etablieren, wurden die Zellen EBV-transformiert.

Hela-Zellen

Die epitheloide Hela-Zelllinie wurde 1951 aus dem Zervixkarzinom einer 31jährigen Frau etabliert.

2.1.4. Primäre Zellen

Die primären CLL-Proben wurden aus den anonymisierten Resten von routinediagnostisch untersuchten Blutproben von CLL-Patienten gewonnen. Die gesunden B-Zellen wurden aus den anonymisierten Abfallprodukten der Aufarbeitung des Blutes gesunder Blutspender gewonnen. Es wurde nur Material von Patienten und Blutspendern verwendet, die ihr Einverständnis zur anonymisierten wissenschaftlichen Verwendung ihres Materials gegeben hatten.

2.1.5 Puffer und Lösungen

2.1.5.1 Puffer und Lösungen für Nukleinsäureanalysen

Ethidiumbromid-Lösung

Verwendet wurde 1% (m/V) Ethidiumbromid, gelöst in bidestilliertem Wasser und bei 4C gelagert.

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

Verwendet wurde 1 M Eisessig und 50 mM EDTA, gelöst in bidestilliertem Wasser und titriert auf einen pH-Wert von 7,6.

Der Ansatz wurde bei Zimmertemperatur gelagert und vor Gebrauch 1:50 mit bidestilliertem Wasser verdünnt.

DNA-GrößenmarkerTrackIt® 100 und 1000 bp DNA LadderInvitrogengelagert bei 4℃.

2.1.5.2 Puffer und Lösungen für die Proteinanalyse

Phosphatpuffer (PBS) 1 Tablette wurde zu 500 ml gelöst in bidestilliertem Wasser Block I -Lösung 10% Rotiblok[®] und 5% Milchpulver gelöst in PBS und filtriert. Bei 4℃ ist die Lösung ein bis zwei Wochen verwendbar.

Block II -Lösung

5% Milchpulver gelöst in PBS und filtriert. Bei 4℃ ist die Lösung ein bis zwei Wochen verwendbar.

Ponceau-S-Lösung

2% (m/V) Ponceau S, 30% (m/V) Trichloressigsäure und 30% (m/V) Sulfosalicylsäure gelöst in bidestilliertem Wasser. Vor Gebrauch wurde die Lösung 3:1 mit bidestilliertem Wasser verdünnt.

Protein-Lysepuffer

10 ml M-PER® mammalian protein extraction reagent (Roche), eine Tablette Proteinaseinhibitor Complete (Roche) und kurz vor Verwendung 1µl/ml DTT. Die Lösung ist bei 4℃ bis zu 2 Wochen verwendbar.

Protein-Molekulargewichtsstandard

SeeBlue Plus 2 Prestained Standard (Invitrogen) gelagert bei $4 \ensuremath{\mathfrak{C}}$

<u>Antikörper</u>

Anti LEF1 (C12A5) monoklonaler Kaninchenantikörper	Cell Signaling
Anti Kaninchen IgG HRP-gekoppelter Ziegeantikörper	Dako Cytomation
Anti β-Actin monoklonaler Mausantikörper	BD Biosciences
Anti Maus IgG HRP-gekoppelter Ziegeantikörper	Dako Cytomation

2.1.5.3 Vorgefertigte Puffer und Lösungen

Agarosegelelektrophorese-Probenpuffer (6x)	Fermentas
ECL Western blotting detection reagents (I+II)	Amersham
Erythrozyten-Lyse-Puffer	Qiagen
Kollagen-Essigsäure-Lösung	
(2 mg/ml in 0,1% Essigsäure)	Serva
Lymphoprep®	Axis Shield

M-PER® mammalian protein extraction reagent	Roche
NaCl 0,9% Lösung (steril)	Braun
NuPage® Antioxidant	Invitrogen
NuPage® LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen
NuPage® MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen
NuPage® Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen
NuPage® Transfer Buffer (20x)	Invitrogen
PolyFect Transfection Reagent	Qiagen
Rosette Sep ®	
B-cell enrichment antibody cocktail	Stemcell technologies
Trypanblaulösung (0,5%)	Biochrom

Alle vorgefertigte Puffer und Lösungen wurden bei 4°C gelagert.

2.1.6 Komplette Labor-Kits

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Cell line nucleofection kit V	Amaxa
LightCycler® FastStart DNA MasterPlus	
Hybridization Probes	Roche Applied Science
MACS® cell separation Kit	Miltenyi Biotec
Maxi Kit	Qiagen
QIAamp® RNA Blood Mini Kit	Qiagen
SuperScript® III First-Strand Synthesis	
System for RT-PCR	Invitrogen

2.1.7 Primer

Die Primer und Sonden wurden von TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen. Die Primer wurden in diethyldicarbonat-behandeltem Wasser zu 100 µM und die Sonden zu 10 µM gelöst und bei -20°C gelagert.

RT-PCR Primer

LEF1 Vorwärtsprimer:5'-GCCACGGACGAGATGATCC-3'LEF1 Rückwärtsprimer:5'-TGTCTGGCCACCTCGTGTC-3'LEF1 Sonde:5'-6FAM-TCAAGGACGAGGGCGATCCTCAGAAGGAA-Dabcyl-3'

Fibromodulin Vorwärtsprimer: 5'-ATGACCCTCATTGGTGGTTCC-3' Fibromodulin Rückwärtsprimer: 5'-GGAGGTGATCTGGTTGTTCTGGA-3' Fibromodulin Sonde: 5'-6FAM-TACGGCTCTCCATCCCCTCCAGATCCCCGCGACT–TMR-3'

ABL Vorwärtsprimer ⁽⁸⁾: 5'-TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT-3' ABL Rückwärtsprimer ⁽⁸⁾: 5'-GATGATGTTGCTTGGGACCCA-3' ABL Sonde ⁽⁸⁾: 5'- 6FAM-CCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT-Dabcyl -3'

TCF4 Vorwärtsprimer: 5'-TATGCTCCATCAGCAAGCAC-3' TCF4 Rückwärtsprimer: 5'-AGAGTTGCCCAACATTCCTG-3' TCF4 Sonde: 5'-6FAM-CTTCTTCATGCAAGATGGCCATCACAGCAGT–TMR-3'

C-MYC Vorwärtsprimer: 5´-GCAGCCGTATTTCTACTGCGAC-3´ C-MYC Rückwärtsprimer: 5´-CTTCCAGATATCCTCGCTGGG-3´ C-MYC Sonde: 5'-6FAM-ACTTCTACCAGCAGCAGCAGCAGAGCGAGCT-Dabcyl-3'

CCND1 Vorwärtsprimer:5'-AGTGCAAGGCCTGAACCTG-3'CCND1 Rückwärtsprimer:5'-GGCAGTCTGGGTCACACTTGA-3'CCND1 Sonde:5'-6FAM-TTCCTGTCCTACTACCGCCTCACACGCTTC-Dabcyl-3'

Sequenzierungsprimer

CMV-Profor Primer ⁽¹⁶⁸⁾: 5´-ATGGGCGGTAGGCGTG-3´ M13for Primer ⁽¹⁶⁸⁾: 5´-TGTAAAACGACGGCCAG-3´

2.1.8 Plasmide und small interfering ribonuclein acids (siRNAs)

ON-TARGET plus SMARTpool LEF1 siRNA ON-TARGETplus siCONTROL Green fluorescent protein (GFP) Plasmid IOH27038-pDEST26 LEF1 Plasmid Dharmacon Dharmacon Amaxa Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH

2.1.9 Software

Chromas Lite 2.0 GraphPad Prism 4 G*Power 3.1.2 ⁽⁶¹⁾ Office 2007 (Word, Excel) Reference Manager 11.0.1 SPSS 17.0 Technelysium Pty. Ltd. GraphPad Software

Microsoft Thomson SPSS

2.2 Methoden

2.2.1 Aufbereitung primärer Zellen

Um die RNA-Expression bestimmter Gene von CLL-Zellen und gesunden B-Zellen exakt messen zu können, müssen diese erst von den anderen Blutbestandteilen getrennt und aufgereinigt werden.

Primäre CLL-Zellen

Das Blut der CLL-Patienten wurde dazu mit einer Antikörper-Mischung (Rosette Sep ®) in einem Mischungsverhältnis von 40 µl pro ml Blut 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das weitere Vorgehen richtete sich nach dem Protokoll des Herstellers. Die Antikörper-Mischung enthält Antikörper gegen Oberflächenmarker aller mononukleärer Zellen im peripheren Blut, die nicht B-Zellen beziehungsweise CLL-Zellen sind (CD2, CD3, CD16, CD36, CD56, CD66b, und GlykophorinA). Die Antikörper verbinden diese Zellen mit mehreren Erythrozyten und werden dann unter Einsatz eines Ficoll-Hypaque-Dichtegradient-Mediums (LymphoPrep®) zusammen mit allen anderen zellulären Blutbestanteilen abzentrifugiert. Die übrigen mononukleären Zellen (B-Zellen und CLL-Zellen) verbleiben dabei an dem Dichtegradienten und können selektiv abpipettiert werden.

Gesunde B-Zellen

Die gesunden B-Zellen wurden entweder mit der gleichen Methode wie die CLL-Zellen aufgereinigt oder mit Hilfe von gegen CD19 gerichteten Antikörpern selektiert. Für diese Methode wurde das MACS®-cell-separation-Kit von Miltenyi Biotec verwendet. Aus den in der Transfusionsmedizin nicht verwendbaren Blutspende-Abfällen gesunder Blutspender wurden zuerst mit Hilfe des Ficoll-Hypaque-Dichtegradient-Mediums (LymphoPrep®) die mononukleären Zellen von den restlichen Blutbestanteilen getrennt. Die mononukleären Zellen wurden dann mit magnetisch markierten Anti-CD19-Antikörpern inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz in eine MACS®-Säule pipettiert. Die Säule befand sich dabei in einem Permanentmagneten, so dass die magnetisch markierten CD19-positiven B-Zellen in der Säule verblieben, während die restlichen Zellen in mehreren Waschschritten eluiert wurden. Nach Entfernung der Säule aus dem Permanentmagneten konnten die isolierten B-Zellen ebenfalls eluiert und in Zellkulturmedium aufgenommen werden.

2.2.2 Zellkultur

Alle Zellen wurden im Inkubator bei 37°C in wasserd ampfgesättigter Luft mit 5% CO² kultiviert. Alle offenen Arbeiten an den Zellkulturen wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

Kultivierung von Hela-Zellen:

Die Hela-Zellen wurden als adhärente Zelllinie in liegenden Zellkulturflaschen bis zur vollständigen Konfluenz der Zellen kultiviert. Bei vollständiger Konfluenz wurden die Zellen 3-mal mit Medium ohne FKS gewaschen und anschließend mit Hilfe einer Trypsin-Lösung vom Boden der Kulturflasche gelöst. Die gelösten Zellen wurden dann mit einer Dichte von etwa 10⁶ Zellen/40 cm² wieder in Kultur genommen.

Kultivierung von JVM3-Zellen:

Die JVM3-Zellen wurden als Suspensionskultur in stehenden Zellkulturflaschen kultiviert. Alle 36 bis 48 Stunden wurden die Zellen gezählt, abzentrifugiert und mit einer Dichte von 5 x 10^5 Zellen/ml in frischem Medium wieder in Kultur genommen.

2.2.3 Bestimmung der Zellkonzentration in einer Zellsuspension

Um die Zellkonzentration zu ermitteln, wurden die Zellen erst 1:1 mit einer Trypanblau-Lösung verdünnt. Trypanblau färbt selektiv tote Zellen blau an, wohingegen lebende Zellen nicht angefärbt werden. Somit kann der Prozentsatz toter Zellen und die genaue Konzentration lebender Zellen in der Kultur ermittel werden. Die Zählung der Zellen wurde in angemessener Verdünnung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt und anschließend auf das Volumen der ursprünglichen Zellsuspension hochgerechnet.

2.2.4 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die abzentrifugierten Zellen bei einer Konzentration von 10⁷ Zellen/ml in Medium mit 20% FKS und 10% DMSO gelöst. Diese Zellsuspension wurde dann in Kryoröhrchen zu 1 ml aliquotiert und mit Hilfe eines methanol-gefüllten Einfrierbehälters langsam auf -80°C abgekühlt. Nach mindestens 24 Stunden bei -80°C erfolgte dann die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff.

Um kryokonservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde das entsprechende Aliquot in einem Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut und in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Um das im Einfriermedium enthaltene DMSO restlos zu entfernen, wurden die Zellen anschließend abzentrifugiert und in 10 ml frischem Zellkulturmedium wieder in Kultur genommen.

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1 Proteinisolierung

Um ein Proteinlysat aus einer Zellsuspension anzufertigen, wurden die 2 x 10⁷ Zellen abzentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 250µl kaltem Protein-Lysepuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Lysat dreimal für jeweils 10 s bei 50%iger Leistung mit dem Ultraschallstab behandelt und dann bei 4°C und 13.000 Umdrehungen pro Minute für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann entweder direkt der weiteren Analyse zugeführt oder bei -80°C gelagert. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Insbesondere zwischen den einzelnen Behandlungen mit dem Ultraschallstab wurde auf ausreichende Kühlung geachtet.

2.2.5.2 Photometrische Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Protein-Konzentrationsbestimmung wurde unter Verwendung von Roti® Nanoquant durchgeführt. Roti® Nanoquant arbeitet auf Basis der Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford ⁽¹⁵⁾. Dabei bildet der Farbstoff Commassie Brilliant Blau G 250 in saurem Milieu einen blauen Komplex mit den kationischen und hydrophoben Seitenketten der Proteine. Die Konzentration dieser blauen Komplexe kann anhand einer Standardkurve photometrisch bestimmt werden. Als Proteinstandardkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin verwendet. Vor der photometrischen Messung wurden die Proteinlysate angemessen verdünnt (meist 1:50 und 1:100) und zwei Verdünnungsreihen mit bovinem Serumalbumin von 5 bis 125 µg/ml hergestellt. Anschließend wurden je 50 µl der Proteinverdünnung und der Standardverdünnungsreihe in eine 96-Well Platte pipettiert und mit jeweils je 200 µl Roti® Nanoquant versetzt. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit wurden die photometrische Messung bei 590 nm und 450 nm durchgeführt. Eine lineare Konzentrationskurve ergibt sich aus dem Quotient der optischen Dichte bei 590 nm mit der optischen Dichte bei 450 nm. Alle Messungen wurden mit mindestens zwei Ansätzen durchgeführt und die Messergebnisse anschließend gemittelt.

2.2.5.3 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteinlysate nach dem Molekulargewicht der einzelnen Proteine wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wandern die denaturierten und durch die Behandlung mit SDS negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht durch das Trenngel zur Kathode. Mithilfe eines farbig markierten Molekulargewichtsstandard kann dann das Molekulargewicht der einzelnen Proteine bestimmt werden. Es wurde bei der Gelelektrophorese nach dem NuPage®-Protokoll der Firma Invitrogen vorgegangen. Unter Verwendung von NuPage® 4-12% Bis-Tris Fertiggelen, NuPage® MES SDS Laufpuffer, NuPage® LDS Probenpuffer, NuPage® Sample Reducing Agent und NuPage® Antioxidans wurde die Gelelektrophorese in einer Invitrogen Elektrophorese mer durchgeführt.

2.2.5.4 Western-Blot

Zur weiteren Analyse wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine nach dem Western-Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dabei wurde unter Verwendung einer Western-Blot-Kammer von Invitrogen und dem NuPage® Transfer Puffer nach dem NuPage®-Protokoll der Firma Invitrogen vorgegangen. Um den Erfolg und die Qualität des Blots beurteilen zu können, wurde anschließend eine reversible Färbung mit Ponceau S durchgeführt. Nach Beurteilung des Blots und dem Ausschluss von Luftblasen auf der Membran während des Transfers wurde die Membran durch mehrmaliges Waschen mit PBS-Puffer wieder entfärbt.

2.2.5.5 Immunoblot

Um selektiv und spezifisch Proteine auf der Nitrozellulose-Membran detektieren zu können, wurde ein Immunoblot durchgeführt. Zuerst wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur mit Block-I-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran 10 Minuten unter ständigem Schwenken mit PBS-Puffer gewaschen und 12 Stunden bei 4°C mit dem jeweiligen proteinspezifisc hen Antikörper in entsprechender Verdünnung mit Block-I-Lösung inkubiert. Dann wurde die Membran viermal 10 Minuten lang mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit dem Sekundär-Antikörper in Block-II-Lösung bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Membran erneut viermal 10 Minuten lang mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit den 1:1 gemischten ECL-Reagenzien 60 Sekunden lang benetzt und zwischen zwei Folien luftblasenfrei in eine Filmkassette eingeklebt. Je nach Signalstärke wurde der Film bis zu 30 Minuten lang belichtet und dann mithilfe des Foto-Entwicklers entwickelt. Anhand des Fotos konnten nun die LEF1-Banden verglichen werden. β-Aktin wurde als "Housekeeping" -Protein beziehungsweise Ladekontrolle verwendet.

2.2.6. Molekulargenetische Methoden

2.2.6.1 Transfektionen

2.2.6.1.1 LEF1-Plasmid Transfektion

Das LEF1-Plasmid wurde mithilfe von Hitzeschock-Transformation kompetenter Bakterienzellen vervielfältig und unter Verwendung des Qiagen Maxi Kit aufgereinigt. Die photometrische Testung des aufgereinigten Plasmides ergab eine hohe Reinheit von doppelsträngiger DNA. Anschließend wurde das LEF1-Insert des Plasmides mit Hilfe des BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems sequenziert und dessen korrekte Sequenz bestätigt.

Für die Transfektion der Hela-Zellen mit dem LEF1-Plasmid wurde das PolyFect® Transfection Reagenz von Quiagen verwendet. Das PolyFect® Reagenz verpackt die DNA in eine kompakte Hülle, welche dann an die Zelloberfläche bindet und über unspezifische Endozytose in die Zelle aufgenommen wird. Im Endosom wirkt das Reagenz als Puffer und führt so zur pHabhängigen Hemmung von endosomalen Nukleasen.

Um das Transfektionsverfahren zu etablieren, wurde zuerst Transfektionen mit einem green fluorescent protein (GFP) Plasmid von Amaxa durchgeführt und anschließend der Prozentsatz grün fluoreszierender Zellen mikroskopisch bestimmt. Das von Quiagen empfohlene Protokoll zur Transfektion von Hela-Zellen führte nur zu einer Transfektionseffizienz von rund 1% nach 24 und 4% nach 48 Stunden. Daher wurde das Protokoll schrittweise optimiert, bis unter Verwendung von 4 x 10⁵ Hela- Zellen in einer 60 mm Kulturschale mit 5 µg Plasmid in 150 µl RPMI-Medium und 25 µl PolyFect® Transfection Reagenz eine Transfektionseffizienz von rund 25% nach 48 Stunden erreicht werden konnte. Um Kulturen mit 100% transfizierten Hela-Zellen zu erhalten, wurden 500 µg/ml G418 zum Zellkulturmedium hinzugegeben. Durch die vom LEF1-Plasmid ebenfalls kodierte Resistenz sind die erfolgreich transfizierten Zellen vor der G418-Wirkung geschützt, wohingegen die untransfizierten Zellen einer Kontrollkultur innerhalb von sechs Tagen vollständig abgetötet wurden.

2.2.6.1.2 siRNA Transfektion

Small interfering RNAs (siRNA) sind kleine doppelsträngige RNA-Moleküle, die aus 20-25 Nukleotiden bestehen und die posttranskriptionale Hemmung von Genen auf RNA-Ebene bewirken können ^(55,56). Für die siRNA-Transfektionsexperimente wurden eine Mischung aus siRNAs, die gegen unterschiedliche Teile der LEF1 mRNA gerichtet sind (ON-TARGET plus SMARTpool LEF1 siRNA), und eine Mischung aus nicht zielgerichteten siR-NAs (ON-TARGETplus siCONTROL) verwendet.

Die Transfektion der siRNAs in die primären CLL-Zellen und JVM3-Zellen wurde mit Hilfe des Amaxa nucleofection systems I durchgeführt. Dazu wurden jeweils 10^7 Zellen in 100 µl des Cell line solution kit V und siRNA in einer Konzentration von 0,5 µM mit dem Programm U-013 des Amaxa nucleofection systems I behandelt.

2.2.6.2 RNA-Isolierung und Aufbereitung

Die Isolierung der RNA wurde mit Hilfe des QIAamp® RNA Blood Mini Kit von Qiagen durchgeführt. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Die so erhaltene aufgereinigte RNA wurde unter Verwendung des SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR von Invitrogen nach den Angaben des Herstellers in copy-DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.6.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können spezifische Nukleotid-Sequenzen selektiv amplifiziert werden. Bei einer 100%-Effizienz der Reaktion wird die Zahl der Moleküle mit jedem Schritt verdoppelt. Somit steigt die Zahl der Kopien exponentiell und es können auch sehr kleine Mengen an Nukleotidsequenzen schnell amplifiziert werden. Der Reaktionsansatz durchläuft dabei schrittweise eine bestimmte Sequenz verschiedener Temperaturbereiche. Bei dem zuerst erfolgenden Denaturierungsschritt wird die doppelsträngige DNA bei 94-96°C in Einzelstränge aufgeschmolzen. An schließenden erfolgt der "anealing"-Schritt, bei dem zwei kurze Oligonukleotide, die als Primer bezeichnet werden, jeweils an das 3´-Ende des codogenen und des komplementären Stranges der zu amplifizierenden Sequenz binden. Die Temperatur bei diesem Schritt wird so gewählt, dass sie knapp unter dem Schmelzpunkt der Primer liegt. Danach erfolgt in der Elongationsphase die Amplifikation durch die DNA-Polymerase. Diese beginnt an dem 3´-Ende der Primer und synthetisiert zu den DNA-Einzelsträngen den jeweiligen komplementären Strang. Dies geschieht bei der für die DNA-Polymerase optimalen Temperatur, welche üblicherweise bei etwa 72°C liegt. Da jedes neu erzeugt e Nukleotid im nächsten Schritt selbst auch wieder amplifiziert werden kann, entwickelt sich eine exponentielle Reaktionskinetik ⁽¹³³⁾.

2.2.6.3 Real-time-PCR

Um mittels PCR die Menge einer spezifischen Nukleotidsequenz in einer Probe zu quantifizieren, kann eine sogenannte Real-time-PCR durchgeführt werden. Dabei wird die entstandene DNA-Menge in Echtzeit (real-time) nach jedem PCR-Zyklus gemessen. Die Messung der DNA-Menge kann mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs wie beispielsweise SYBR-green erfolgen ⁽¹³⁰⁾. Der Nachteil dieser Methode ist, dass der Fluoreszenzfarbstoff alle Nukleotid-Moleküle anfärbt und somit auch unspezifische Amplifikationen und Primerdimere in die Messung mit eingehen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit sogenannte TaqMan®-Sonden verwendet. Die TaqMan®-Sonde ist ein sequenzspezifisches Oligonukleotid, das an dem einen Ende mit einem Fluorophor und an dem anderen Ende mit einem Fluoreszenzlöscher, einem sogenannten Quencher, versehen ist. Die bei dieser Methode verwendete Taqpolymerase verfügt über eine 5'-3'Exonukleaseaktivität und hydrolysiert so die Sonde von ihrem 5'-Ende aus, während sie den komplementären DNA-Strang synthetisiert. Die dadurch entstehende räumliche Trennung von Fluorophor und Quencher verhindert die Fluoreszenzlöschung und führt somit zu einem Fluoreszenzsignal nach der Elongationsphase. In den ersten PCR-Zyklen wird

die Fluoreszenz der freigesetzten Fluorophore noch von der Hintergrundfluoreszenz überlagert. Der Zyklus, nach dem die Fluoreszenz zum ersten Mal deutlich über der Hintergrundfluoreszenz liegt, wird als Ct (threshold cycle) bezeichnet ⁽⁹⁵⁾. Da eine Probe mit einer hohen Anfangskonzentration der Zielsequenz den Ct früher erreicht als eine Probe mit niedriger Anfangskonzentration, kann von dem Ct einer Probe auf deren Konzentration der Zielsequenz geschlossen werden.

2.2.6.3.1 Reaktionsbedingungen der verschiedenen Real-time-PCRs

Alle Real-time-PCRs wurden mit Hilfe des LightCycler® FastStart DNA MasterPlus Hybridization Probes Kit durchgeführt. Dazu wurden 5 µl der zu messenden cDNA-Probe mit jeweils 0,5 µl der auf 100 µM verdünnten Primer und der auf 10 µM verdünnten Sonde sowie 4 µl des LightCycler® Mastermix, 0,25 µl Uracil-Glycosylase und 9,25 µl Diethyldicarbonat behandeltem Wasser in eine LightCycler® Kapillare pipettiert. Bei jedem Lauf wurde eine Negativkontrolle mit Wasser anstelle von cDNA mitgemessen, um eine Kontamination der Reagenzien ausschließen zu können.

Jedes PCR-Programm begann mit Denaturierungszyklus mit 40°C für 5 min, gefolgt von weiteren 5 min bei 95°C. Danach folgte das Amplifikations- und Quantifizierungs-Programm, welches für jede der verschiedenen PCRs spezifisch optimiert wurde. Das Amplifikations- und Quantifizierungs-Programm wurde jeweils 45 mal wiederholt. Zuletzt folgte ein Abkühlungszyklus mit 40°C für 5 min.

Amplifikations-	und Qu	antifizieru	ngs-Progi	ramme fü	r die	verschieden	PCRs:

LEF1-PCR:	95° für 10 s, 62° für 15 s und 72° für 15 s.
Fibromodulin-PCR:	95℃ für 10 s und 65℃ für 20 s .
ABL-PCR:	95℃ für 10 s, 60℃ für 15 s und 72℃ f ür 15 s

Die CCND1- und C-Myc-PCR wurden mit dem gleichen Programm wie ABL durchgeführt.

2.2.6.3.1 Auswertung der PCR-Daten

Um eine Aussage über die Zahl der jeweiligen RNA-Moleküle pro Zelle treffen zu können, müssen die PCR-Daten gegen ein sogenanntes "Housekeeping"-Gen normalisiert werden. Ein "Housekeeping"-Gen ist ein Gen, das in jeder Zelle gleich stark exprimiert und in seiner Expression nicht durch äußere Einflüsse moduliert wird. In dieser Arbeit wurde das Abelson protoonkogene (ABL) als "Housekeeping"-Gen verwendet. Die Normalisierung gegen ein "Housekeeping"-Gen funktioniert aber nur dann zuverlässig, wenn die Effizienz der "Housekeeping"-Gen PCR identisch mit der des Zielgenes ist. Da dies nur selten erreicht werden kann, müssen die Werte für eine genaue Messung zusätzlich auch effizienzkorrigiert werden.

Um die Effizienz der einzelnen PCRs bestimmen zu können, wurde aus einer Mischung verschiedener cDNAs eine Verdünnungsreihe angefertigt. Die daraus ermittelten Ct-Werte wurden dann gegen den dekadischen Logarithmus der entsprechenden Konzentrationen aufgetragen und die Steigung der besten Geraden durch diese Punkte bestimmt. Bei allen Standardkurven war der Korrelationskoeffizient nach Pearson größer als 0,99 und die PCR somit nahezu perfekt linear. Aus der Steigung der Graden lässt sich nach der Formel

Effizienz = $10^{-1 / Steigung}$

die Effizienz der jeweiligen PCR errechnen⁽¹⁴⁷⁾.

Mit den Cts von Zielgen und "Housekeeping"-Gen, den jeweiligen Effizienzen der beiden PCRs und der Verwendung eines Kalibrators lassen sich relative Expressionsraten (RERs) nach der Formel

$$RER = E_Z \xrightarrow{Ct_Z K - Ct_Z P} \times E_H \xrightarrow{Ct_H P - Ct_H K}$$

- E_z: Zielgen-PCR
- E_H: Effizienz "Housekeeping"-Gen-PCR
- Ct_Z: Ct Zielgen
- Ct_H: Ct "Housekeeping"-Gen
- K: Kalibrator
- P: zu messende Probe

berechnen ⁽¹⁶²⁾. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Proben gegen gesunde B-Zellen oder die jeweilige Kontrolle kalibriert.

2.2.7 Statistik

Vor allen statistischen Analysen wurden mit Hilfe des F-Tests nach Fischer sowie des Kolmogorov-Smirnov-Tests die Stichproben auf ihre Vereinbarkeit mit den Vorrausetzungen des Allgemeinen Linearen Modells überprüft. Bei nicht Vereinbarkeit kamen nonparametrische Testverfahren wie der *U*-Test nach Mann und Whitney sowie die Korrelationsanalysen nach Kendall (τ) und Spearman (ρ) zum Einsatz.

Der Mittelwertsvergleich zweier Stichproben wurde mithilfe des *U*-Tests nach Mann und Whitney durchgeführt. Dabei wurde ab einer Stichprobengröße von 30 der *p*-Wert mittels gaußscher Approximation berechnet. Alle *p*-Werte in dieser Arbeit korrespondieren zweiseitigen Tests.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von LEF1 und Fibromodulin in der CLL

3.1.1 Untersuchung der Fibromodulin-Expression in CLL-Zellen im Vergleich zu gesunden B-Zellen

Um die Expression von Fibromodulin in CLL-Zellen mit der Expression in gesunden B-Zellen zu vergleichen, wurden mithilfe effizienzkorrigierter quantitativer Real-Time-PCR relative Expressionsraten (RERs) von Fibromodulin in 98 unabhängigen primären CLL-Proben erhoben. Diese wurden mit den RERs von sechs mittels CD19-Microbeats isolierten unabhängigen gesunden B-Zell-Proben verglichen. Die Expressionsraten wurden dabei relativ zum Mittelwert der gesunden B-Zellen berechnet. Der Mittelwert der gesunden B-Zellen beträgt somit per definitionem Eins. Die Expressionsraten der CLL-Zellen werden hingegen als Vielfaches der Expression gesunder B-Zellen angegeben.

3.1.1.1 Deskriptive Statistik der Fibromodulin-Expression in CLL-Zellen und gesunden B-Zellen sowie inferenzstatistischer Vergleich der Stichproben

In der erhobenen Stichprobe war das arithmetische Mittel der Fibromodulin-Expression in den primären CLL-Zellen 15,81-mal höher als das der gesunden B-Zellen (siehe Abbildung 2). Die Messwerte der gesunden B-Zellen verhielten sich dabei mit einer Standardabweichung von 1,09 sehr homogen. Die CLL-Zellen hingegen wiesen eine erhebliche Heterogenität bei einer Standardabweichung von 29,71 auf.

Ein Vergleich der (quadrierten) Standardabweichungen mittels Fishers *F*-Test ergab signifikant unterschiedliche Varianzen der beiden Stichproben (*F*(97, 5) = 740.48, p < 0,001). Außerdem erwiesen sich die Residuen der CLL-Stichprobe im Kolmogorov-Smirnov-Test als nicht normalverteilt (p < 0,05) Daher wurde zum inferenzstatistischen Vergleich der Mittelwerte beider Stichproben ein nonparametrischer *U*-Test nach Mann und Whitney durchgeführt. Der zweiseitige *U*-Test fiel hochsignifikant aus (U = 46, p < 0,001), so dass die höhere Fribomodulin-Expression in den CLL-Zellen als statistisch gesichert gelten kann.



Abbildung 2: Mittlere Fibromodulin-Expression und Standardschätzfehler in gesunden B-Zellen und primären CLL-Zellen (Mann-Whitney U = 46, p < 0,001).

3.1.2 Untersuchung der LEF1-Expression in CLL-Zellen im Vergleich zu gesunden B-Zellen

LEF1 RERs wurden in 120 unabhängigen primären CLL-Proben erhoben. Diese wurden mit den relativen Expressionsraten von vier unter Verwendung von CD19-Microbeats und weiteren drei mittels Rosettesep®-isolierten unabhängigen gesunden B-Zell-Proben verglichen. Die Expressionsraten wurden wieder relativ zum Mittelwert der gesunden B-Zellen berechnet.

3.1.2.1 Deskriptive Statistik der LEF1-Expression in CLL-Zellen und gesunden B-Zellen sowie inferenzstatistischer Vergleich der Stichproben

In der erhobenen Stichprobe war der Mittelwert der LEF1-Expression in den CLL-Zellen 39,56-mal höher als jener der gesunden B-Zellen (siehe Abbildung 3). Die mithilfe der beiden verschieden Methoden aufgereinigten B-Zellen unterschieden sich nicht signifikant in ihrer LEF1-Expression. Die Messwerte der

gesunden B-Zellen verhielten sich wie bei der Fibromodulin-Expression sehr homogen mit einer Standardabweichung von 1,03. Die CLL-Zellen wiesen mit einer Standardabweichung von 51,96 eine noch größere Variabilität der LEF1-Expression auf als das bei der Fibromodulin-Expression der Fall war.

Im *F*-Test zeigten sich wieder hoch signifikant unterschiedliche Varianzen der beiden Stichproben (*F*(119, 6) = 2549, p < 0,05). Außerdem war die Verteilung der Residuen in der CLL-Stichprobe im Kolmogorov-Smirnov-Test wiederum nicht vereinbar mit der Normalverteilung. Daher wurde zum Vergleich der beiden LEF1-Stichprobenmittelwerte ein zweiseitiger *U*-Test nach Mann und Whitney durchgeführt, der erneut hochsignifikant ausfiel (U = 33, p < 0,001).



Abbildung 3: LEF1 Punktdiagramm mit Mittelwerten für gesunde B-Zellen und primäre CLL-Zellen (Mann-Whitney U = 33, p < 0,001).

3.2 Korrelation der Wnt-Transkriptionsfaktoren LEF1 und TCF4 mit Fibromodulin in primären CLL-Zellen

3.2.1 Korrelation von LEF1 und Fibromodulin in primären CLL-Zellen

Um einen Zusammenhang zwischen LEF1- und Fibromodulin-Expression in der CLL zu untersuchen, wurden Korrelationsanalysen der beiden Expressionsraten durchgeführt. Hierzu wurden die RERs von 96 primären CLL-Proben jeweils gegen den Mittelwert der gesunde B-Zellen kalibriert und Korrelationsanalysen unterzogen. Da die Residuen der beiden Stichproben im Kolmogorov-Smirnov-Test nicht mit der Normalverteilung vereinbar waren, wurden nichtparametrischen Korrelationsanalysen nach Kendall (τ) und Spearman (ρ) verwendet. Dabei ergab die τ -Korrelationsanalyse nach Kendall einen Korrelationskoeffizienten von $\tau = 0,302$, welcher bei einem *p*-Wert von unter 0,001 als hochsignifikant positiv einzustufen ist. Die ρ -Korrelationsanalyse nach Spearman ergab einen Korrelationskoeffizienten von $\rho = 0,450$ und war mit einem *p*-Wert von unter 0,001 ebenfalls hochsignifikant positiv.



Abbildung 4: Beziehung zwischen LEF1-RERs und Fibromodulin-RERs für 96 primäre CLL-Proben (jeweils gegen gesunde B-Zellen kalibriert).

3.2.2 Assoziation von LEF1 und Fibromodulin im LEF1 Median-Split

Um die Assoziation zwischen der Expression von LEF1 und Fibromodulin etwas deutlicher zu machen, wurde ein LEF1-Median-Split durchgeführt. Die Patienten wurden dazu in zwei Gruppen aufgeteilt, von denen die eine alle Patienten enthielt, deren LEF1-RER über dem Median lag, und die andere Gruppe alle Patienten mit LEF1-RERs unterhalb des Medians. Dabei wies die Gruppe mit der hohen LEF1-Expression eine mittlere Fibromodulin-RER von 34,14 auf. Die Gruppe mit der niedrigen LEF1-Expression zeigte hingegen einen Mittelwert von nur 4,19. Wegen Verletzung der Verteilungsvoraussetzungen parametrischer Verfahren wurde ein zweiseitiger *U*-Test nach Mann und Whitney durchgeführt. Es ergab sich ein hochsignifikantes *U* von 554,00 (p < 0,001).



Abbildung 5: Mittlere Fibromodulin-Expression und Standardschätzfehler für "Niedrig LEF1"-Patienten (LEF1-RER < Median) und "Hoch LEF1"-Patienten (LEF1-RER > Median) (Mann-Whitney U = 554,00, p < 0,001).

3.2.3 Korrelation von LEF1 und TCF4 in primären CLL-Zellen

Da häufig beschrieben wurde, dass LEF1/TCF Transkriptionsfaktoren Zielgene von anderen Mitgliedern der LEF1/TCF Transkriptionsfaktorfamilie sind ^(165,98,62), wurde auch die Assoziation von LEF1 und TCF4 in primären CLL-Zellen untersucht (vgl. Abbildung 6). In der Analyse von 84 primären CLL-Proben ergab sich ein τ-Korrelationskoeffizienten nach Kendall von 0,499 und einen p-Korrelationskoeffizient nach Spearman von 0,687 für die RERs von LEF1 und TCF4. Beide Korrelationskoeffizienten waren mit *p*-Werten von unter 0,001 hochsignifikant.



Abbildung 6: Beziehung zwischen LEF1-RERs und TCF4-RERs für 84 primäre CLL-Proben (jeweils gegen gesunde B-Zellen kalibriert).

3.2.4 Korrelation von TCF4 und Fibromodulin in primären CLL-Zellen

Um zu überprüfen, ob neben LEF1 auch andere LEF/TCF Transkriptionsfaktoren in der CLL mit der Fibromodulin-Expression assoziierten sind, wurde auch auf eine mögliche Korrelation mit TCF4 getestet. Für die Korrelationsanalyse von Fibromodulin und TCF4 wurden die RERs von 94 primären CLL-Proben jeweils gegen gesunde B-Zellen kalibriert und Korrelationsanalysen nach Kendall und Spearman unterzogen. Die T-Korrelationsanalyse nach Kendall ermittelte einen Korrelationskoeffizienten von $\tau = 0,102$, welcher bei einem *p*-Wert von 0,171 nicht signifikant war. Die *p*-Korrelationsanalyse nach Spearman ergab einen Korrelationskoeffizient von $\rho = 0,163$ und war mit einem *p*-Wert von 0,137 ebenfalls nicht signifikant. Es konnte somit kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von Fibromodulin und dem Transkriptionsfaktor TCF4 in primären CLL-Zellen nachgewiesen werden.

3.3 Effekt einer LEF1-Überexpression auf die Fibromodulin-Expression einer Wnt-Signalkaskade-negativen Ziellinie

3.3.1 Transfektion von Hela-Zellen mit einem LEF1-Überexpressionsplasmid

In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob die gezielte Überexpression von LEF1 in einer Wnt-Signalweg-negativen Zelllinie einen Einfluss auf die Fibromodulin-Expression dieser Zelllinie hat. Als Wnt-negative Zelllinie wurden Hela-Zellen verwendet und mit einem CMV-Promotor-gesteuerten LEF1-Überexpressionsplasmid transfiziert.

3.3.2 LEF1-mRNA-Expression transfizierter Hela-Zellen

Nach Transfektion und Aufreinigung konnten mehre Subkulturen mit sehr hoher LEF1-mRNA-Expression etabliert werden. Um die Expressionsrate vergleichbar zu machen, wurden die RERs für untransfizierte Hela-Zellen, primäre CLL-Zellen und der transfizierten Hela-Subkulturen gegen den Mittelwert der untransfizierten Hela-Zellen kalibriert. Somit beträgt der Mittelwert der untransfizierten Hela-Zellen per definitionem Eins, wohingegen die Expressionsrate der primären CLL-Zellen und der transfizierten Hela-Subkulturen als Vielfaches der Expression der untransfizierten Hela-Zellen angegeben werden. Die 120 primären CLL-Proben wiesen eine im Mittel 5779-mal höhere LEF1-Expression auf als die untransfizierten Hela-Zellen. Die relative LEF1Expression der verschiedenen transfizierten Hela-Subkulturen lag bei 170434, 36927, 72, 47 und 1806 (siehe Abbildung 7).



Abbildung 7: LEF1-RERs relativ zu untransfizierten Hela-Zellen für primäre CLL-Zellen und fünf LEF1-transfizierte Hela-Subkulturen.

3.3.3 LEF1-Protein-Expression transfizierter Hela-Zellen

Um sicherzugehen, dass die erfolgreich überexprimierte LEF1-mRNA in den Hela-Zellen auch zu einem Protein translatiert wird, wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Es wurden dazu Proteinlysate von vier Hela-Subkulturen, zwei untransfizierten Hela-Kulturen und JVM3-Zellen als Positivkontrolle untersucht. Dabei konnte das LEF1-Protein in den transfizierten Hela-Subkulturen nachgewiesen werden, wohingegen die untransfizierten Subkulturen keine nachweisbare Expression zeigten (siehe Abbildung 8).



Abbildung 8: LEF1 Western-Blot für vier LEF1-transfizierte Hela-Subkulturen, zwei untransfizierten Hela-Kulturen und JVM3-Zellen als Positivkontrolle

3.3.4 Expression von Fibromodulin und bekannter LEF1-Zielgene in transfizierten Hela-Zellen

Bei nachgewiesener Überexpression von LEF1 in den transfizierten Hela-Zellen wurde nun die Expression der Fibromodulin-mRNA untersucht. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Fibromodulin-Expression zwischen den transfizierten und den untransfizierten Hela-Zellen festgestellt werden (Mann-Whitney U = 2, p = 0,143).



Abbildung 9: Fibromodulin-RERs relativ zu untransfizierten Hela-Zellen (und Standardfehler) für untransfizierte Hela Zellen und fünf LEF1-transfizierte Hela-Subkulturen (Mann-Whitney U = 2, p = 0,143).

Darüber hinaus zeigte sich auch kein klarer dosisabhängiger Effekt der LEF1-Expression auf die Fibromodulin-Expression in den transfizierten Hela-Zellen (siehe Abbildung 10).



Abbildung 10: LEF1-RERs abgetragen gegen Fibromodulin-RERs für fünf LEF1-transfizierten Hela-Subkulturen.

Um zu prüfen, ob das transfizierte LEF1 wirklich als Transkriptionsfaktor in den Hela-Zellen fungiert, wurde auch die Expression von cyclin-D1 (CCND1) und C-Myc ermittelt. CCND1 und C-Myc sind bekannte Zielgene der TCF/LEF1-Transkriptionsfaktoren ^(166,170). Es konnte jedoch auch für die Expression von CCND1 und C-Myc kein wesentlicher Unterschied zwischen den transfizierten und den untransfizierten Hela-Zellen festgestellt werden (siehe Abbildung 11).





3.4 Effekt einer LEF1-Hemmung auf die Fibromodulin-Expression primärer CLL-Zellen und einer CLL-ähnlichen Zelllinie

Der zweite Ansatz, mit dem die transkriptionelle Regulation von Fibromodulin durch LEF1 untersucht werden sollte, war die gezielte Hemmung von LEF1 in Wnt-Signalweg-positiven Proben. Dazu wurden in primäre CLL-Zellen und Proben der CLL-ähnlichen Zelllinie JVM3 mithilfe des Amaxa Nucleofectors gegen LEF1 gerichtet siRNA eingebracht. Anschließend wurden für die LEF1siRNA-Probe, eine Kontroll-siRNA-Probe, eine Probe, die ohne siRNA dem Nucleofector ausgesetzt wurde, und eine unbehandelte Probe LEF1-Expressionsraten bestimmt. Diese Expressionsraten wurden gegen die Kontroll-siRNA-Probe kalibriert. Es zeigte sich, dass die LEF1-mRNA-Werte in JVM3-Zellen durch die siRNA auf 54% der Kontrolle reduziert werden konnten (siehe Abbildung 12). In den CLL-Zellen war die LEF1-mRNA im Vergleich zur Kontrolle auf 62% reduziert (siehe Abbildung 13).



Abbildung 12: JVM3-Zell-Nucleofector-Experiment: Mittlere LEF1-RERs (und Standardschätzfehler) relativ zum Mittelwert der Kontroll-siRNA-Proben, für LEF1-siRNA-Proben, Kontroll-siRNA-Proben, unbehandelte Proben, und Proben, die ohne siRNA dem Nucleofector ausgesetzt wurde (jeweils n=3).



Abbildung 13: CLL-Zell-Nucleofector-Experiment: Mittlere LEF1-RERs (und Standardschätzfehler) relativ zum Mittelwert der Kontroll-siRNA-

Probe für die LEF1-siRNA-Probe, die Kontroll-siRNA-Probe, eine unbehandelte Probe und eine Probe, die ohne siRNA dem Nucleofector ausgesetzt wurde.

Nachdem eine erfolgreiche Reduktion der LEF1-mRNA durch das Einbringen der LEF1-siRNA gezeigt werden konnte, wurden nun RERs für Fibromodulin und die bekannten Zielgene CCND1 und C-Myc erhoben. Es zeigte sich jedoch auch hier wieder kein wesentlicher Unterschied der Expression sowohl von Fibromodulin als auch der bekannten Zielgene (vgl. Abbildungen 14 und 15).



Abbildung 14: JVM3-Zell Nucleofector Experiment: Fibromodulin RERs (und Standardschätzfehler) relativ zum Mittelwert der Kontroll-siRNA-Proben, jeweils für drei LEF1-siRNA-Proben, Kontroll-siRNA-Proben, Proben, die ohne siRNA dem Nucleofector ausgesetzt wurden, und unbehandelte Proben.



Abbildung 15: CLL-Zell-Nucleofector-Experiment: Fibromodulin-RERs relativ zum Mittelwert der Kontroll-siRNA-Probe für die LEF1-siRNA-Probe, Kontroll-siRNA-Probe, eine unbehandelte Probe und eine Probe, die ohne siRNA dem Nucleofector ausgesetzt wurde.

3.5 Assoziation von Fibromodulin mit prognostischen Markern, der Tumorlast und dem Krankheitsstadium

Um die Assoziation von Fibromodulin mit der CLL-Prognose zu untersuchen, wurden die Fibromodulin-RERs von 88 primären CLL-Proben auf Korrelationen mit dem Anteil von ZAP70- und CD38-positiven Zellen sowie dem Prozentsatz von Lymphozyten im Differentialblutbild untersucht. Da sich die Residuen der Fibromodulin-RERs im linearen Regressionsmodell mittels Kolmogorov-Smirnov-Test als nicht normalverteilt erwiesen, wurden erneut die nonparametrischen Korrelationsanalysen nach Kendall und Spearman verwendet. Außerdem wurde die Fibromodulin-Expression von neu diagnostizierten Patienten im Stadium Binet A mit der Expression von behandlungsbedürftigen Patienten verglichen.

3.5.1 Assoziation von Fibromodulin mit dem Anteil ZAP70-positiver Zellen

Für den Anteil ZAP70-positiver Zellen und die Fibromodulin RERs ermittelte die τ -Korrelationsanalyse nach Kendall einen Korrelationskoeffizienten von $\tau = 0,073$, welcher mit einem *p*-Wert von 0,332 nicht signifikant war. Die *p*-Korrelationsanalyse nach Spearman war mit einem *p*-Wert von 0,332 bei einem Korrelationskoeffizienten von $\rho = 0,105$ ebenfalls nicht signifikant.

Außerdem wurden die CLL-Proben in ZAP70-positive und ZAP70-negative Proben aufgeteilt und in ihrer Fibromodulin-Expression miteinander verglichen. Rassenti et al. folgend wurde alle Proben mit mehr als 20% ZAP70-positiven Zellen als ZAP70-positiv deklariert, alle anderen als ZAP70-negativ⁽¹⁵⁴⁾. Für die ZAP70-positiven CLL-Proben wurde eine mittlere Fibromodulin-RER von 27,64 errechnet. Die ZAP70-negativen Proben zeigten hingegen einen Mittelwert von nur 15,46. Zur Signifikanzprüfung wurde ein zweiseitiger U-Test nach Mann und Whitney durchgeführt. Bei einem U von 703.00 (p = 0.347) war der Unterschied der beiden Stichproben nicht signifikant (siehe Abbildung 16). Eine statistische Poweranalyse zeigte jedoch, dass die Power zur Entdeckung mittelstarker Effekte (d = 0,5) $^{(36)}$ bei einem Signifikanzniveau von 5% und den hier gegebenen Stichprobenumfängen lediglich 0,50 beträgt ⁽⁶¹⁾. Die Wahrscheinlichkeit, mindestens mittelstarke Effekte zu entdecken, beträgt in diesem Falle also lediglich 50%. Üblicherweise fordert man eine statistische Power von mindestens 80% (36). Mit anderen Worten: Unter den gegebenen Bedingungen können mittlere und kleine Unterschiede der beiden Stichproben nicht zuverlässig erfasst werden.



Abbildung 16: Mittlere Fibromodulin-Expression und Standardschätzfehler für ZAP70-positive- und ZAP70-negative-CLL-Proben (Mann-Whitney U = 703, p = 0,347).

3.5.2 Assoziation von Fibromodulin mit dem Anteil CD38-positiver Zellen

Für den Anteil CD38-positiver Zellen und die Fibromodulin RERs ergab sich ein τ -Korrelationskoeffizienten nach Kendall von $\tau = -0,030$ welcher mit einem p-Wert von 0,678 nicht signifikant war. Auch der p-Korrelationskoeffizient nach Spearman, der mit einem Wert von $\rho = -0,050$ errechnet wurde, war mit einem p-Wert von 0,646 nicht signifikant.

Des Weiteren wurden die CLL-Proben in CD38-positive und -negative Proben aufgeteilt und in ihrer Fibromodulin-Expression verglichen. Alle Proben mit mehr als 30% CD38-positiven Zellen wurden Hamblin et al. folgend als CD38positiv eingestuft ⁽⁸⁶⁾. Die mittlere Fibromodulin-RER für die CD38-positiven CLL-Proben betrug 20,46. Die CD38-negativen Proben zeigten einen Mittelwert von 17,51. Ein Mann-Whitney *U*-Test erbrachte hierfür ein insignifikantes *U* von 951,50 (*p* = 0,907). Die Fibromodulin-Expression war somit in CD38positiven CLL-Proben nicht signifikant höher als in CD38-negativen (siehe Abbildung 17).



Abbildung 17: Mittlere Fibromodulin-Expression und Standardschätzfehler für CD38-positive und CD38-negative CLL-Proben (Mann-Whitney U = 951,50, p = 0,907).

3.5.3 Assoziation von Fibromodulin mit der Tumorlast

Um den Zusammenhang zwischen der Tumorlast und der Fibromodulin-Expression in der CLL zu untersuchen, wurde ermittelt, ob der Prozentsatz von Lymphozyten im Differentialblutbild mit der Fibromodulin-Expression korreliert ist. Die T-Korrelationsanalyse nach Kendall ermittelte einen Korrelationskoeffizienten von $\tau = 0,107$, welcher bei einem *p*-Wert von 0,141 als nicht signifikant einzustufen war. Die p-Korrelationsanalyse nach Spearman war mit einem *p*-Wert von 0,135 bei einem Korrelationskoeffizienten von $\rho = 0,161$ ebenfalls nicht signifikant. Es konnte somit keine signifikante Korrelation zwischen der Fibromodulin-Expression und dem Prozentsatz von Lymphozyten im Differentialblutbild festgestellt werden.

3.5.4 Assoziation der Fibromodulin-Expression mit der Schwere der Erkrankung und dem Krankheitsstadium

Die Assoziation von Fibromodulin mit der Schwere der Erkrankung und dem Krankheitsstadium wurde überprüft, indem die Fibromodulin-Expression von neu diagnostizierten Patienten im Stadium Binet A mit der Expression von behandlungsbedürftigen Patienten verglichen wurde. Als behandlungsbedürftig
gelten dabei nur Patienten im Stadium C nach Binet oder Patienten mit hoch aktiver symptomatischer Erkrankung unabhängig vom Krankheitsstadium ⁽⁸⁰⁾.

Vallat et al. konnten zeigen, dass in p53-mutierten CLL-Zellen Fibromodulin eine Induktion durch DNA-Schädigung erfährt ⁽¹⁸²⁾. Eine Therapie könnte somit die Fibromodulin-Expression bei behandlungsbedürftigen Patienten erhöhen und somit das Ergebnis verfälschen. Daher wurden nur Patienten untersucht, die noch keine Therapie erhalten hatten. Es wurden die Fibromodulin-RERs von 38 Patienten im Stadium Binet A mit denen von 48 behandlungsbedürftigen Patienten verglichen. Die behandlungsbedürftigen Patienten zeigten eine mittlere Fibromodulin-RER von 14,94 wohingegen die Patienten im Stadium Binet A eine RER von 12,21 aufwiesen. Zur Signifikanzprüfung wurde wiederum ein zweiseitiger U-Test nach Mann und Whitney durchgeführt. Der Unterschied der beiden Stichproben war bei U = 610,00 (p = 0,995) nicht signifikant. Die Poweranalyse ergab jedoch, dass die Power zur Entdeckung mittelstarker Effekte (d = 0.5) ⁽³⁶⁾ bei einem Signifikanzniveau von 5% unter den hier untersuchten Stichprobenumfängen nur 0,52 beträgt ⁽⁶¹⁾. Wiederum können also mittlere und kleine Unterschiede der beiden Stichproben im vorliegenden Test nicht zuverlässig erfasst werden.



Abbildung 18: Mittlere Fibromodulin-Expression und Standardschätzfehler für gesunden B-Zellen, Patienten im Stadium Binet A und behandlungsbedürftigen Patienten (Mann-Whitney U = 610, p = 0,995).

3.6 Assoziation von LEF1 mit prognostischen Markern, der Tumorlast und dem Krankheitsstadium

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen LEF1-Expression und der CLL-Prognose wurden die LEF1-RERs von 112 primären CLL-Proben auf Korrelationen mit dem Anteil von ZAP70- und CD38-positiven Zellen sowie dem Prozentsatz von Lymphozyten im Differentialblutbild untersucht. Wegen Verletzung der Verteilungsvoraussetzungen des Allgemeinen Linearen Modells fanden erneut nonparametrische Korrelationsanalysen nach Kendall und Spearman Anwendung. Zusätzlich wurde die LEF1-Expression von neu diagnostizierten Patienten im Stadium Binet A mit der Expression von behandlungsbedürftigen Patienten mittels *U*-Test verglichen.

3.6.1 Assoziation von LEF1 mit dem Anteil ZAP70-positiver Zellen

Bei der Korrelationsanalyse zwischen LEF1-Expression und dem Anteil ZAP70-positiver Zellen ermittelte die τ -Korrelationsanalyse nach Kendall einen Korrelationskoeffizienten von $\tau = 0,203$. Diese positive Korrelation erwies sich bei einem *p*-Wert von 0,002 als signifikant. Auch die *p*-Korrelationsanalyse nach Spearman ermittelte einen positiven Korrelationskoeffizienten von $\rho = 0,300$. Diese Korrelation war mit einem *p*-Wert von 0,001 ebenfalls als signifikant einzustufen.

Des Weiteren wurden die CLL-Proben in ZAP70-positive und -negative Proben aufgeteilt und hinsichtlich ihrer LEF1-Expression verglichen. Wieder wurden alle Proben mit mehr als 20% ZAP70-positiven B-Zellen als ZAP70-positiv deklariert ⁽¹⁵⁴⁾. Die ZAP70-positiven CLL-Proben zeigten eine mittlere LEF1-RER von 53,72. Für die ZAP70-negativen Proben wurde hingegen einen Mittelwert von nur 37,10 ermittelt. Bei einem Mann-Whitney U = 866,50 und p = 0,004erwies sich die LEF1-Expression in den ZAP70-positiven Proben als signifikant höher (siehe Abbildung 19).



Abbildung 19: Mittlere LEF1-Expression und Standardschätzfehler für ZAP70positive und ZAP70-negative CLL-Proben (Mann-Whitney U = 881,50, p = 0,004).

3.6.2 Assoziation von LEF1 mit dem Anteil CD38-positiver Zellen

Der T-Korrelationskoeffizienten nach Kendall zwischen dem Anteil CD38positiver Zellen und den LEF1-RERs betrug T = -0.100. Bei einem *p*-Wert von 0,119 war diese Korrelation jedoch als nicht signifikant einzustufen. Der *p*-Korrelationskoeffizienten nach Spearman betrug ρ = -0,152 und war mit einem *p*-Wert von 0,111 ebenfalls nicht signifikant.

Außerdem wurden CD38-positive und CD38-negative CLL-Proben in Bezug auf ihre LEF1-Expression verglichen. Alle Proben mit mehr als 30% CD38positiven Zellen wurden als CD38-positiv eingestuft ⁽⁸⁶⁾. Die mittlere LEF1-RER für die CD38-positiven CLL-Proben betrug 35,41. Die CD38-negativen Proben zeigten hingegen einen Mittelwert von 51,39. Der *U*-Test nach Mann und Whitney ergab U = 1424,50 bei einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von p= 0,446. Die LEF1-Expression war somit in CD38-positiven CLL-Proben nicht signifikant unterschiedlich von der Expression in den CD38-negativen Proben (siehe Abbildung 20).



Abbildung 20: Mittlere LEF1-Expression und Standardschätzfehler für CD38-positive und CD38-negative CLL-Proben (Mann-Whitney U = 1424,50, p = 0,446).

3.6.3 Assoziation der LEF1-Expression mit der Tumorlast

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Höhe der LEF1-Expression und der Tumorlast in der CLL wurde untersucht, in dem der Prozentsatz von Lymphozyten im Differentialblutbild mit der LEF1-Expression korreliert wurde. Die T-Korrelationsanalyse nach Kendall ermittelte einen Korrelationskoeffizienten von $\tau = 0,296$, welcher bei einem *p*-Wert unter 0,001 als hoch signifikant einzustufen war. Die p-Korrelationsanalyse nach Spearman war ebenfalls mit einem *p*-Wert unter 0,001 bei einem Korrelationskoeffizienten von $\rho = 0,440$ hoch signifikant. Es konnte somit eine starke positive Korrelation zwischen der LEF1-Expression und dem Prozentsatz von Lymphozyten im Differentialblutbild blutbild festgestellt werden (siehe Abbildung 21).



Abbildung 21: Punktdiagramm zur Illustration des Zusammenhangs zwischen dem Prozentsatz von Lymphozyten im Differentialblutbild und den LEF1-RERs von 112 primären CLL-Proben (grün: Lymphozyten bis maximal 50%; gelb: mehr als 50% Lymphozyten und LEF1-RER < 70; rot: alle Patienten mit einer LEF1-RER > 70).

Außerdem lassen sich anhand des Punktdiagramms in Abbildung 21 drei Untergruppen unterscheiden, welche im Punktdiagramm jeweils grün, gelb und rot eingefärbt wurden. Um die Relevanz der Gruppenzugehörigkeit für Prognose und Krankheitsstadium zu untersuchen, wurden die Patientencharakteristiken der einzelnen Gruppen ermittelt und miteinander verglichen.

Die erste Gruppe mit grünen Punkten im Punktdiagramm rekrutiert sich aus Patienten mit normalen oder nur leicht erhöhten Lymphozyten bis maximal 50%. Alle Patienten dieser Gruppe haben eine LEF1-RER von unter 50 (siehe Abbildung 21), 14% sind behandlungsbedürftig und keiner ist ZAP70-positiv.

Die zweite Gruppe mit gelb eingefärbten Punkten besteht aus Patienten mit mehr als 50% Lymphozyten im Blut und einem LEF1-RER von weniger als 70. Die Hälfte dieser Patient ist behandlungsbedürftig und 25% sind ZAP70positiv.

Die dritte Gruppe mit roten Punkten enthält alle Patienten mit einer LEF1-RER von über 70 (siehe Abbildung 21). Jeder Patient dieser Gruppe hat mindestens 80% Lymphozyten im Differentialblutbild. Insgesamt 90% der Patienten dieser Gruppe sind behandlungsbedürftig und 55% sind ZAP70-positiv.

3.6.4 Assoziation von LEF1 mit der Schwere der Erkrankung und dem Krankheitsstadium

Zur weiteren Überprüfung der Assoziation von LEF1 mit der Schwere der Erkrankung und dem Krankheitsstadium wurde die LEF1-Expression von neu diagnostizierten Patienten im Stadium Binet A mit der Expression bei behandlungsbedürftigen Patienten verglichen. Als behandlungsbedürftig gelten dabei wieder nur Patienten im Stadium C nach Binet oder Patienten mit hoch aktiver symptomatischer Erkrankung unabhängig vom Krankheitsstadium ⁽⁸⁰⁾. Um einen möglichen Einfluss von Zytostatika auf die LEF1-Expression auszuschließen, wurden nur Patienten untersucht, die noch keine Therapie erhalten hatten. Es wurden die LEF1-RERs von 48 Patienten im Stadium Binet A mit denen von 33 behandlungsbedürftigen Patienten verglichen.

Die Patienten im Stadium Binet A hatten eine mittlere LEF1-RER von nur 22,01. Die behandlungsbedürftigen Patienten hingegen zeigten eine mittlere LEF1-RER von 85,61. Bei einem Mann-Whitney U = 341,50 und einer Überschreitungswahrscheinlichkeit p < 0,001 erwies sich der Unterschied der beiden Stichproben als hoch signifikant (siehe Abbildung 22).



Abbildung 22: Mittlere LEF1-Expression und Standardschätzfehler für gesunden B-Zellen, Patienten im Stadium Binet A und behandlungsbedürftigen Patienten (Mann-Whitney U = 341,50, p < .001).

3.7 ROC-Kurven zur Diskriminierung zwischen behandlungsbedürftigen und nicht behandlungsbedürftigen CLL-Patienten

Zur Veranschaulichung der Trennschärfe zwischen behandlungsbedürftigen Patienten und Patienten im Stadium Binet A wurden Receiver Operating Characteristic-Kurven (ROC-Kurven) für die LEF1- und Fibromodulin-Expression im Vergleich zu den prognostischen Markern ZAP70 und CD38 erstellt. ROC-Kurven stammen ursprünglich aus den Ingenieurwissenschaften und dienen der Veranschaulichung des Zusammenhangs zwischen "Treffern" (richtig positive Urteile) und "falschen Alarmen" (falsch positive Urteile) bei zunehmend liberaleren Urteilskriterien. ROC-Kurven lassen sich nutzbringend auch in der medizinischen Diagnostik anwenden, indem man für einen hinsichtlich der diagnostischen oder prognostischen Brauchbarkeit zu bewertenden Parameter die Sensitivität gegen das Komplement der Spezifität (100% -Spezifität) für verschiedene Cut-off-Punkte des Parameters abträgt. Je steiler die Sensitivität in diesem ROC-Diagramm ansteigt (d. h. je mehr Fläche unterhalb der ROC-Kurve liegt), desto brauchbarer ist der betreffende Parameter. Wenn ein Parameter in keinerlei Zusammenhang mit der Behandlungsbedürftigkeit steht, würde mit steigender Sensitivität die Spezifität in gleichem Maße abnehmen. Die entsprechende Kurve würde somit auf der Indifferenzlinie (siehe Abbildung 23) verlaufen. Um die ROC-Kurven für verschiedene Parameter vergleichen zu können, wird üblicherweise die Fläche unter jeder ROC-Kurve berechnet und der Unterschied zur Indifferenzlinie jeweils einem Signifikanztest unterzogen.

In der aktuellen Anwendung wurden für die LEF1- und Fibromodulin-RERs sowie den Prozentsatz von ZAP70- und CD38-positiven Zellen ROC-Kurven zur Diskriminierung behandlungsbedürftiger und nicht-behandlungsbe-dürftiger CLL-Patienten erstellt (siehe Abbildung 23). Um Verfälschungen der Werte durch bereits erhaltene Therapien auszuschließen, wurden in diese Untersuchung nur unbehandelte Patienten einbezogen.



Abbildung 23: ROC-Kurven zur Diskriminierung zwischen behandlungsbedürftigen Patienten und Patienten im Stadium Binet A für LEF1- und Fibromodulin RERs sowie die Prozentsätze von ZAP70-und CD38positiven Zellen.

Außerdem wurden die Flächen unter den Kurven berechnet und deren Abweichung von der Indifferenzlinie auf Signifikanz geprüft (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Stichprobengrößen, Flächen unter den Kurven und *p*-Werte der ROC-Kurven zur Trennung zwischen behandlungsbedürftigen Patienten und Patienten im Stadium Binet A für LEF1- und Fibromodulin RERs sowie die Prozentsätze von ZAP70- und CD38-positiven Zellen.

Parameter	Binet A	Behandlungs-	Fläche unter	<i>p</i> -Wert
		bedürftig	der Kurve	
LEF1	n = 48	n = 33	0,7844	<i>p</i> < 0,001
Fibromodulin	n = 38	n = 33	0,5072	<i>p</i> = 0,917
% ZAP70	n = 48	n = 33	0,6313	<i>p</i> = 0,046
% CD38	n = 48	n = 33	0,5713	<i>p</i> = 0,278

Die o.g. Tabelle zeigt, dass lediglich die LEF1-RER und der Prozentsatz ZAP70-positiver Zellen signifikant zwischen behandlungsbedürften und nichtbehandlungsbedürften CLL-Patienten trennen, letzterer allerdings weit weniger eindeutig als die LEF1-RER. Zu beachten ist, dass weder die Fibromodulin-RER noch der Prozentsatz CD38-positiver Zellen signifikant zwischen beiden Gruppen trennt.

4 Diskussion

Die CLL ist die häufigste Leukämie in der westlichen Welt und gilt nach wie vor als nicht heilbar. Ein weiteres hervorstechendes Merkmal der CLL ist der außerordentlich heterogene Verlauf der Erkrankung mit einerseits fulminanten Verläufen, die innerhalb von Monaten zum Tode des Patienten führen, und andererseits Patienten, die jahrzehntelang fast symptomfrei mit der Erkrankung leben ⁽⁹⁾. Das frühzeitige Erkennen von Hochrisiko-Patienten ist eine der wesentlichen Herausforderungen in der Therapie der CLL und mit hohen Kosten verbunden. Auch die Ätiologie und die molekulare Pathogenese der CLL sind größtenteils noch weitgehend ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die prognostische Bedeutung und die Regulation des Transkriptionsfaktors LEF1 sowie des extrazellulären Matrixproteins Fibromodulin in der CLL untersucht.

4.1 Überexpression von Fibromodulin in der CLL

Die Überexpression von Fibromodulin in der CLL konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden. In den Arbeiten von Klein et al. und Jelinek et al. wurde die Überexpression mit Hilfe von Microarray-Analysen nachgewiesen. Klein et al. ermittelten dabei eine 287-fache Überexpression ⁽¹¹⁰⁾ und Jelinek et al. eine 2188-fache Überexpression ⁽¹⁰²⁾ relativ zu gesunden B-Zellen. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse erklärt sich vermutlich dadurch, dass sich Microarray-Analysen zwar hervorragend als Suchtest eignen, jedoch leider eine gewisse Messungenauigkeit aufweisen. Giannopoulos et al. konnten mit Hilfe der konventionellen PCR nur eine qualitative Aussage über die Fibromodulin-Expression machen. Mit dem von ihnen gewählten PCR-Protokoll konnten sie in 63% der CLL-Fälle Fibromodulin-mRNA nachweisen, jedoch in keiner der gesunden Kontrollen ⁽⁷¹⁾. In der vorliegenden Arbeit wurde die Fibromodulin-Expression erstmalig mit Hilfe hochspezifischer effizienzkorrigierter TaqMan®-Sonden-Real-time-PCR in der CLL untersucht und die Überexpression im Vergleich zu gesunden B-Zellen (15,81-fach) konnte bestätigt werden.

4.2 Überexpression von LEF1 in der CLL

Klein et al. und Jelinek et al. konnten ebenfalls die Überexpression von LEF1 mit Hilfe von Microarray-Analysen nachweisen. Klein et al. ermittelten für LEF1 eine 80-fache ⁽¹¹⁰⁾ und Jelinek et al. eine 832-fache Überexpression ⁽¹⁰²⁾ im Vergleich zu gesunden B-Zellen. Auch für LEF1 konnte in dieser Arbeit unter Verwendung hochspezifischer TaqMan®-Sonden-Real-time-PCR die Überexpression von LEF1 in der CLL im Vergleich zu gesunden B-Zellen (39,56-fach) bestätigt werden.

4.3 Korrelation der Wnt-Transkriptionsfaktoren LEF1 und TCF4 mit Fibromodulin in primären CLL-Zellen

4.3.1 Korrelation von LEF1 und Fibromodulin in primären CLL-Zellen

Im LEF1-Median-Split zeigte sich eine über 8-mal höhere Fibromodulin-Expression in den Patienten mit hoher LEF1-Expression im Vergleich zu denen mit relativ niedriger LEF1-Expression. Bei einem *p*-Wert von unter 0,001 kann von einer hochsignifikanten Assoziation zwischen Fibromodulin und LEF1-Expression in der CLL ausgegangen werden.

Des Weiteren zeigten die Korrelationsanalysen nach Kendall und Spearman hochsignifikant positive Korrelationskoeffizienten für LEF1 und Fibromodulin. Somit kann die Aussage getroffen werden, dass in den untersuchten CLL-Proben die Fibromodulin-Expression umso höher ist, je höher LEF1 exprimiert wird. Dieser Aspekt weist auf einen möglichen funktionellen Zusammenhang zwischen LEF1 und Fibromodulin in der CLL hin. Es kann jedoch hieraus nicht zwingend geschlossen werden, dass es sich um einen direkten funktionellen Zusammenhang handelt. So kann beispielsweise nicht ausgeschlossen werden, dass sowohl LEF1 als auch Fibromodulin in gleichem Maße von einem dritten Faktor in ihrer Expression moduliert werden.

4.3.2 Korrelation von LEF1, TCF4 und Fibromodulin in primären CLL-Zellen

Es wurde beschrieben, dass LEF1/TCF Transkriptionsfaktoren häufig Zielgene von sich selbst beziehungsweise anderen Mitglieder der LEF1/TCF Transkriptionsfaktorfamilie sind ^(165,98,62). Es wäre also denkbar, dass sowohl LEF1 also auch Fibromodulin von einem weiteren LEF1/TCF Transkriptionsfaktor in ihrer Expression moduliert werden. Da für den Transkriptionsfaktor TCF4 mehrfach gezeigt werden konnte, dass er für die Transkription von Wnt-Zielgenen verantwortlich ist ^(165,166,34), wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen TCF4, LEF1 und Fibromodulin-Expression in der CLL besteht. Es zeigte sich eine stark positive Korrelation zwischen LEF1 und TCF4, jedoch keine signifikante Korrelation zwischen TCF4 und Fibromodulin. Falls einer der beiden Transkriptionsfaktoren die Transkription von Fibromodulin in den CLL-Zellen reguliert, kann also davon ausgegangen werden, dass es mit hoher Wahrscheinlichkeit LEF1 und nicht TCF4 ist.

4.4 Gezielte Überexpression von LEF1 in Hela-Zellen

Hela-Zellen exprimieren sowohl LEF1 als auch Fibromodulin nur in sehr geringem Ausmaß im Vergleich zu CLL-Zellen. Um eine mögliche transkriptionelle Regulation von Fibromodulin durch LEF1 zu untersuchen, wurde mit Hilfe eines CMV-Promotor-gesteuerten Plasmides LEF1 in den Hela-Zellen gezielt überexprimiert. Anschließend wurde untersucht, ob diese Überexpression auch zu einer Steigerung der Fibromodulin-Expression führt. Zur Kontrolle wurden auch die Expressionen der bekannten LEF1-Zielgene CCND1 und C-Myc untersucht.

Wie in Kapitel 3.3 beschrieben, konnte jedoch trotz erfolgreicher Überexpression von LEF1 auf mRNA und Proteinebene keine Änderung der Expression von Fibromodulin nachgewiesen werden. Da sich auch keine Änderung in der Expression der bekannten Zielgene zeigte, muss davon ausgegangen werden, dass das transfizierte LEF1 keine Wirkung als Transkriptionsfaktor in den Hela-Zellen hatte.

Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass der His-Tag des transfizierten LEF1 dessen Funktion als Transkriptionsfaktor stört. Möglicherweise wird auch das LEF1-Protein in den Hela-Zellen wiederum durch die Ladung des His-Tags oder auch durch eine abnorme Chaperon-Umgebung in den Hela-Zellen nicht korrekt gefaltet. Die Funktion von LEF1 in Hela-Zellen könnte auch durch Mutationen oder epigenetische Modifikationen verhindert werden. Da β-Catenin notwendig für die Funktion von LEF1 als Transkriptionsfaktor ist, wäre es auch denkbar, dass keine ausreichenden Mengen β-Catenin oder nur nicht funktionales β-Catenin in den Hela-Zellen vorliegt. Eine weitere mögliche Ursache für die fehlende Funktion als Transkriptionsfaktor könnte die Expression von dominant negativem LEF1 in den Hela-Zellen sein. Außerdem wäre es denkbar, dass das LEF1-Protein in den Hela-Zellen posttranslationalen Modifikationen unterliegt oder die Hela-Zellen nach der Transfektion ein eigenes verändertes LEF1 produzieren. Diese Vermutung wird gestützt durch die Western Blot Analyse der transfizierten Hela-Zellen (siehe Abbildung 8). In den transfizierten Hela-Zellen sind zwei Banden mit unterschiedlichem Molekulargewicht zu sehen. Da die untransfizierten Hela-Zellen keinerlei Proteinbanden aufweisen, ist es unwahrscheinlich, dass es sich um eine unspezifische Bande handelt. Somit ist zu vermuten, dass zwei verschiedene LEF1-Varianten nach der Transfektion in den Hela-Zellen vorliegen, wovon eventuell eine die Funktion der anderen behindern könnte.

4.5 Gezielte Hemmung von LEF1 in JVM3- und primären CLL-Zellen

Da mit der Transfektion von Hela-Zellen die Regulation von Fibromodulin durch LEF1 weder gezeigt noch widerlegt werden konnte, wurde ein anderer experimenteller Ansatz gewählt. In diesem Experiment sollte in Zellen, die sowohl LEF1 als auch Fibromodulin exprimieren, die LEF1-Expression selektiv gehemmt werden. Falls Fibromodulin von LEF1 reguliert wird, sollte nach selektiver Hemmung von LEF1 auch Fibromodulin konsekutiv herabreguliert werden. Zur Kontrolle wurden wieder auch die Expressionen der bekannten LEF1 Zielgene CCND1 und C-Myc untersucht.

Es gelang eine siRNA-mediierte Reduktion der LEF1-mRNA auf 54% in JVM3-Zellen und auf 62% in primären CLL-Zellen. Es zeigte sich jedoch weder eine signifikante Änderung der Expression von Fibromodulin noch eine Expressionsänderung der bekannten Zielgene. Da die Reduktion der LEF1-mRNA keinen Effekt auf die Expression bekannter Zielgene hatte, kann wiederum keine fundierte Aussage darüber getroffen werden, ob auch Fibromodulin zu den Zielgenen gehört.

Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Effekt der LEF1-Reduktion auf die Zielgene könnte sein, dass die Transkription durch andere Mitglieder der LEF/TCF-Transkriptionsfaktorfamilie aufrecht erhalten wird. Des Weiteren wäre es denkbar, dass deutlich mehr LEF1 in den Zellen vorhanden ist als für eine maximale Transkription nötig ist und somit eine Reduktion auf 54% beziehungsweise 62% nicht ausreichend ist, um einen Effekt sichtbar zu machen.

4.6 Assoziation von Fibromodulin mit prognostischen Markern, der Tumorlast und dem Krankheitsstadium

In den 96 untersuchten primären CLL-Proben in der vorliegenden Arbeit fand sich eine sehr heterogene Fibromodulin-Expression in den CLL-Proben, wohingegen die Expression der gesunden B-Zellen relativ konstant war. Die Heterogenität der CLL in Bezug auf Aggressivität und Prognose könnte sich also möglicherweise unter anderem auch in der Fibromodulin-Expression manifestieren. Diese Hypothese wird gestützt durch die Assoziation von hoher Fibromodulin-Expression mit p53-Mutationen in CLL-Zellen, welche durch Vallat et al. gezeigt werden konnte ⁽¹⁸²⁾.

Um die prognostische Relevanz der Fibromodulin-Expression zu untersuchen wurde zuerst der Zusammenhang zwischen Fibromodulin und bekannten prognostischen Markern untersucht. Ein häufig verwendeter prognostischer Marker ist ZAP70. ZAP70 gilt als guter Surrogatmarker für unmutierten IGVH-Status ⁽¹⁵⁴⁾, welcher wiederum mit einem aggressiven Krankheitsverlauf und einer schlechten Prognose verbunden ist ^(39,85). In der Aufteilung der Patientenproben in ZAP70-positive und ZAP70-negative nach Rassenti et al. ⁽¹⁵⁴⁾ zeigte sich eine im Mittel fast doppelt so hohe Fibromodulin-Expression in den ZAP70-positiven Proben im Vergleich zu den ZAP70-negativen. Dieser Unter-

schied erwies sich im *U*-Test nach Mann und Whitney als nicht signifikant. Die statistische Poweranalyse zeigte jedoch, dass unter den gegebenen Umständen die Stichprobengröße nicht ausreichend war, um mittlere und kleine Unterschiede zwischen den beiden Stichproben sicher zu erfassen. Auch in den Korrelationsanalysen nach Kendall und Spearman konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem Prozentsatz ZAP70-positiver Zellen und der Fibromodulin-Expression festgestellt werden.

Ein weiterer prognostischer Marker ist CD38 ⁽¹³⁹⁾. Wie auch schon im Falle von ZAP70 konnte sowohl durch Aufteilung in CD38-positive und CD38-negative Patientenproben nach Hamblin et al. ⁽⁸⁶⁾ als auch durch nonparametrische Korrelationsanalysen kein signifikanter Zusammenhang zwischen CD38 und der Fibromodulin-Expression festgestellt werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich ein Zusammenhang zwischen der Fibromodulin-Expression und prognostischen Markern nicht statistisch untermauern ließ.

Neben den prognostischen Markern wurde auch die Assoziation der Fibromodulin-Expression mit der Höhe des Prozentsatzes von Lymphozyten im Differentialblutbild sowie der Schwere der Erkrankung und dem Krankheitsstadium untersucht. Wie schon bei den immunphänotypischen Markern zeigte der Prozentsatz von Lymphozyten im Differentialblutbild als Surrogatmarker für die Tumorlast keine signifikante Korrelation mit der Fibromodulin-Expression. Es konnte ebenfalls keine signifikant höhere Fibromodulin-Expression bei behandlungsbedürftigen Patienten im Vergleich zu Patienten im neu diagnostizierten Stadium A nach Binet nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18). Wegen nicht ausreichender statistischer Power des Tests können jedoch mittlere und kleine Unterschiede der beiden Gruppen wiederum nicht sicher ausgeschlossen werden.

In Übereinstimmung mit dem Vergleich von behandlungsbedürftigen Patienten mit Patienten im Stadium A nach Binet konnte auch in der ROC-Kurve zur Behandlungsbedürftigkeit kein signifikanter Zusammenhang mit der Fibromodulin-Expression festgestellt werden (siehe Kapitel 3.7 ROC-Kurven zur Diskriminierung zwischen behandlungsbedürftigen und nicht behandlungsbedürftigen CLL-Patienten).

73

4.7 Assoziation von LEF1 mit prognostischen Markern, der Tumorlast und dem Krankheitsstadium

Die LEF1-Expression der untersuchten gesunden B-Zellen verhielt sich mit einer Standardabweichung von 1,03 sehr homogen. Die 120 primären CLL-Zellen wiesen hingegen mit einer Standardabweichung von 51,96 eine noch ausgeprägtere Variabilität der LEF1-Expression auf als das bei der Fibromodulin-Expression der Fall war. Dies wirft erneut die Frage auf, ob die Heterogenität in der LEF1-Expression mit der Variabilität der CLL hinsichtlich Aggressivität und Prognose in Verbindung steht. Diese Vermutung wird gestützt durch mehrere Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Ausprägung der LEF1-Expression und schlechter Prognose in anderen leukämisch verlaufenden Malignomen nachweisen konnten. Beispielsweise konnten Wang et al. zeigen, dass die LEF1-Expression in hochmalignen akuten Leukämien relativ zu niedrigmalignen chronischen Leukämien signifikant erhöht ist ⁽¹⁸⁹⁾. Des Weiteren haben Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie und hoher LEF1-Expression eine schlechtere Prognose als solche mit relativ niedrigerer LEF1-Expression ⁽¹⁶⁴⁾. Gutierrez et al. fanden außerdem Hinweise, dass die Zellen der Monoclonal B-lymphocytosis LEF1 in geringerem Maße überexprimieren als die Zellen der manifesten CLL ⁽⁷⁹⁾. Außerdem konnte in mehreren Studien ein Zusammenhang zwischen LEF1-Expression und der Aggressivität sowie der Invasivität neoplastischer Erkrankungen gezeigt werden. Beispielsweise scheint LEF1 Tumorwachstum und Invasivität in androgenabhängigen Prostatakarzinomen zu fördern⁽¹¹⁴⁾. Auch in Mamakarzinomen könnten Hinweise auf einen verstärkenden Effekt von LEF1 auf die Invasivität des Tumors gezeigt werden (135).

4.7.1 Assoziation von LEF1 mit ZAP70 und CD38

In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikant positive Korrelation zwischen der LEF1-Expression und dem Prozentsatz ZAP70-exprimierender Zellen im peripheren Blut gezeigt werden. Außerdem war in der Aufteilung in ZAP70-positive und ZAP70-negative Patientenproben nach Rassenti et al. ⁽¹⁵⁴⁾ die LEF1-Expression in den ZAP70-positiven Proben signifikant höher. Dies ist ein

starker Hinweis auf eine Assoziation zwischen hoher LEF1-Expression und schlechter Prognose sowie unmutiertem IGVH-Status in der CLL.

Es fand sich hingegen sowohl in der Aufteilung in CD38-positive und CD38negative Patientenproben nach Hamblin et al. ⁽⁸⁶⁾ als auch in den Korrelationsanalysen kein signifikanter Zusammenhang zwischen CD38 und der LEF1-Expression. Da gezeigt werden konnte, dass CD38 ein IGVH-Mutationsstatusunabhängiger prognostischer Faktor ist, wäre als Erklärung denkbar, dass die CD38-positive prognostische Subgruppe auch LEF1-unabhängig ist. Des Weiteren wäre es möglich, dass die bereits nachgewiesene Variabilität der CD38-Expression im Verlauf der Erkrankung die Korrelation zwischen CD38 und LEF1 reduziert ⁽⁸⁶⁾.

4.7.2 Assoziation von LEF1 mit der Tumorlast

Es fand sich eine hochsignifikant positive Korrelation zwischen dem Prozentsatz von Lymphozyten im Differentialblutbild und der Höhe der LEF1-Expression. Dies weist auf einen Zusammenhang zwischen LEF1-Expression und der Tumorlast hin und unterstützt die Annahme, dass hohe LEF1-Expression mit schlechter Prognose und fortgeschrittenem Krankheitsstadium assoziiert ist.

Des Weiteren lassen sich im Punktdiagramm, in dem LEF1-Expression gegen den Lymphozyten-Prozentsatz im Differentialblutbild abgetragen wird (siehe

Abbildung **21**) drei Subgruppen unterscheiden. Besonders interessant ist hierbei die dritte Gruppe (rote Punkte). Wenn man in Analogie zu ZAP70 und CD38 jeden Patienten mit einer LEF1-RER von über 70 als LEF1-positiv definieren würde, dann wären in dem in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv 90% der LEF1-positiven Patienten behandlungsbedürftig. Außerdem hätte jeder LEF1-positive Patient mindestens 80% Lymphozyten im Differentialblutbild und über die Hälfte wäre auch ZAP70-positiv. Dies unterstreicht die mögliche prognostische Bedeutung der LEF1-Expression bei CLL-Patienten. Allerdings wäre selbstverständlich noch zu prüfen, ob sich die prognostische Bedeutung der LEF1-Expression auch in einer prospektiven klinischen Studie mit entsprechend langer Beobachtungsdauer bestätigen lässt.

4.7.3 Assoziation von LEF1 mit dem Krankheitsstadium und der Therapiebedürftigkeit von CLL-Patienten

Die Bedeutung der LEF1-Expression in Bezug auf Prognose und Krankheitsstadium wird bei dem Vergleich von neu diagnostizierten Patienten im Stadium A nach Binet mit behandlungsbedürftigen Patienten deutlich. In der vorliegenden Arbeit konnte bei einem p-Wert von unter 0,001 eine etwa viermal höhere LEF1-Expression bei den behandlungsbedürftigen Patienten nachgewiesen werden. Auch die Aufteilung in "LEF1-positive" und "LEF1-negative" Patienten (siehe Abbildung 21) deutet daraufhin, dass eine hohe LEF1-Expression ein starker Prädiktor für die Behandlungsbedürftigkeit von Patienten mit CLL zu sein scheint. Dieser Aspekt wird weiterhin deutlich im Vergleich der ROC-Kurven zur Behandlungsbedürftigkeit (siehe Abbildung 23). Dort konnte gezeigt werden, dass die LEF1-Expression in erheblich stärkerem Maße mit der Behandlungsbedürftigkeit von CLL-Patienten assoziiert ist als ZAP70. CD38 wies demgegenüber keinen signifikanten Zusammenhang mit der Behandlungsbedürftigkeit auf. Die Messung der LEF1-Expression könnte somit möglicherweise als weiterer Parameter zur Feststellung der Behandlungsbedürftigkeit oder zur Verlaufsbeurteilung von CLL-Erkrankungen im klinischen Bereich Anwendung finden.

4.8 LEF1 als mögliches therapeutisches Ziel

Die erhebliche Überexpression von LEF1 sowie die Assoziation mit schlechter Prognose und fortgeschrittenem Krankheitsstadium in der CLL machen LEF1 zu einem möglichen therapeutischen Ziel. LEF1 erscheint auch deshalb als therapeutisches Ziel vielversprechend, weil mehrfach gezeigt werden konnte, dass die unkontrollierte Expression von LEF1 ein funktionell wichtiger Schritt in der Entwicklung von malignen Erkrankungen zu sein scheint. So konnte durch LEF1 verursachte neoplastische Transformation sowohl in vitro als auch in vivo gezeigt werden ^(3,146). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass LEF1 eine bedeutende funktionelle Rolle bei der Invasivität und Aggressivität verschiedener maligner Erkrankungen spielt ^(114,135,160). Darüber hinaus konnten Gandhirajan et al. zeigen, dass die gezielte Hemmung von LEF1 in vitro zu einer signifikant erhöhten Apoptoserate bei CLL-Zellen führt. Diese Aspekte zusammengenommen stützen die Hypothese, dass LEF1 ein vielversprechendes therapeutisches Ziel in der CLL sein könnte.

Da LEF1 in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor abhängig von β -Catenin ist, könnte durch die Hemmung von β -Catenin auch die Funktion von LEF1 beeinträchtigt werden. Die Hemmung von β -Catenin wurde bereits in mehreren neoplastischen Erkrankungen erfolgreich getestet. So konnte die spezifische Hemmung von β -Catenin in Kolonkarzinom-Zellen sowohl in vitro als auch im Mausmodell die Proliferation der neoplastischen Zellen signifikant reduzieren ^(76,163,186). Auch für Oesophaguskarzinom-Zellen konnte eine Hemmung von β -Catenin gezeigt werden ⁽¹⁸⁵⁾. Des Weiteren konnte sowohl in einer Zelllinie der myeloischen Leukämie als auch der akuten T-Zell-Leukämie mithilfe von dominant negativem β -Catenin eine Proliferationshemmung erreicht werden ⁽³³⁾. Der Nachweis der Wirksamkeiten einer β -Catenin-Hemmung in der CLL steht jedoch noch aus.

Zwei mögliche Therapeutika zur direkten und gezielten Hemmung von LEF1 sind die Substanzen PKF115-584 und CGP049090. Diese beiden Substanzen können die für die Transkriptionsinduktion notwendige Komplexbildung von LEF1 und β-Catenin gezielt verhindern. Außerdem konnte in In-vitro-Experimenten gezeigt werden, dass PKF115-584 und CGP049090 effektiv CLL-Zellen töten, wohingegen gesunde B-Zellen von den Substanzen nicht signifikant beeinträchtigt werden. Auch in einem Xenograft-Mausmodell mit der CLL-ähnlichen Zelllinie JVM3 führten die beiden Substanzen bei guter Verträglichkeit zu signifikant verringertem Tumorwachstum und verlängertem Überleben ⁽⁶⁵⁾.

4.9 Ausblick

4.9.1 Regulation der Fibromodulin-Expression in der CLL

In der vorliegenden Arbeit konnte eine hoch signifikante, von TCF4 unabhängige Korrelation der Fibromodulin-Expression mit LEF1 gezeigt werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Fibromodulin von LEF1 reguliert werden könnte. In den Transfektionsexperimenten konnte jedoch die transkriptionelle Regulation von Fibromodulin durch LEF1 weder gezeigt noch widerlegt werden.

Um die Regulation funktionell nachzuweisen, wäre es möglicherweise sinnvoll, das LEF1-Überexpressionsplasmid in einer anderen Zelllinie zu testen. Außerdem wurde in einer Studie von Sasaki et al. deutlich, dass die alleinige Überexpression von LEF1 nur einen geringen Effekt auf die Expression des Zielgens C-Myc hat und ein deutlicher Effekt erst nach der Ko-Transfektion mit einem β -Catenin-Überexpressionsplasmid nachweisbar ist ⁽¹⁶⁶⁾. Daher sollte auch für die Untersuchung der Fibromodulin-Regulation die Ko-Transfektion mit einem β -Catenin-Überexpressionsplasmid erwogen werden.

Ein weiterer vielversprechender Ansatz wäre die Klonierung der Fibromodulin-Promotor-Region in ein Reporter-Plasmid und die anschließende Ko-Transfektion mit einem LEF1-Überexpressionsplasmid. Sollte das Reporter-Plasmid nach der Ko-Transfektion mit einem LEF1-Überexpressionsplasmid erheblich stärker abgelesen werden als bei der alleinigen Transfektion des Reporter-Plasmides, wäre die Regulation von Fibromodulin durch LEF1 als sehr wahrscheinlich anzusehen.

Außerdem kann unter Verwendung eines electrophoretic mobility shift assays (EMSA) untersucht werden, ob LEF1 an bestimmte Bereiche des Fibromodulin-Promotors bindet. Dazu würde man die Bereiche des Promotors, die für eine Bindung in Frage kommen, mittels PCR amplifizieren. Anschließend würden die Amplifikate mit rekombinantem LEF1 und eventuell zusätzlich auch mit rekombinantem β-Catenin inkubiert. Sollte dann im EMSA das mit dem Amplifikaten inkubierte LEF1 deutlich langsamer laufen als das reine Protein, kann von einer Bindung zwischen Fibromodulin-Promotor und LEF1 ausgegangen werden. Um darüber hinaus die Bindung von LEF1 an die Fibromodulin-Promotorregion in vivo zu zeigen, wäre es möglich, bei primären CLL-Zellen eine Chromatin-Immunopräzipitation mit anschließender PCR durchzuführen. Sollte man unter Verwendung einer spezifischen RT-PCR nach der Immunopräzipitation mit gegen LEF1 gerichteten Antikörpern Teile des Fibromodulin Promotors nachweisen können, wäre die Funktion von LEF1 als Transkriptionsfaktor für Fibromodulin als wahrscheinlich anzusehen.

4.9.2 LEF1 als therapeutisches Ziel in der CLL

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass LEF1 in vorgeschrittenen Krankheitsstadien mit schlechter Prognose im Mittel etwa viermal höher exprimiert wird als in neu diagnostizierten Patienten mit guter Prognose. Daher ist zu vermuten, dass eine gegen LEF1 gerichtete Therapie in vorgeschrittenen Krankheitsstadien beziehungsweise bei Patienten mit schlechter Prognose möglicherweise eine besonders ausgeprägte Wirkung hat. Eine solche Therapie, zum Beispiel mit den Substanzen PKF115-584 und CGP049090, könnte also in Studien mit Patienten in fortgeschritten Krankheitsstadien in Kombination mit etablierten Therapieschemata getestet werden.

Da darüber hinaus mehrfach gezeigt werden konnte, dass deregulierte LEF1-Expression eine onkogene Wirkung hat ^(3,146) und den Malignitätsgrad neoplastischer Erkrankungen steigert ^(114,135,160), ist es außerdem denkbar, dass durch gezielte Hemmung von LEF1 bereits in frühen Stadien ein Fortschreiten der Erkrankung verhindert und ein milderer Verlauf erreicht werden kann. Daher erscheinen auch klinische Studien mit gegen LEF1 gerichteten Therapeutika bei neu diagnostizierten Patienten mit dem Ziel einer Verhinderung der Krankheitsprogression interessant.

4.9.3 LEF1 als prognostischer Marker

Um Patienten mit schlechter Prognose bereits bei Diagnosestellung identifizieren zu können und somit in der Lage zu sein, möglichst frühzeitig eine entsprechende Therapie einzuleiten, bedarf es prognostischer Marker. Diese Marker sollten also im Idealfall auch bereits bei Diagnosestellung positiv sein und nicht erst mit dem Fortschreiten der Erkrankung positiv werden. Für den prognostischen Marker CD38 ist bereits seit längerem bekannt, dass dessen Ausprägung im Verlauf der Erkrankung variieren kann ⁽⁸⁶⁾. Eine neue Studie konnte auch für den prognostischen Marker ZAP70 eine deutliche Veränderung der Ausprägung bei einem Drittel der Patienten zeigen ⁽¹⁸⁷⁾. Diese Variabilität der Marker schränkt deren prognostische Aussagekraft ein. Da das direkte Ermitteln des IGVH-Mutationsstatus oder der 17p-Deletion sehr aufwändig ist, besteht Bedarf an zuverlässigen und einfach zu bestimmenden prognostischen Markern.

Bislang ist noch unklar, ob die LEF1-Expression im Laufe der Erkrankung variiert und ob Patienten mit schlechter Prognose sich aufgrund ihrer LEF1-Expression bereits frühzeitig identifizieren lassen. Zur weiteren Validierung der in dieser Arbeit festgestellten Assoziation zwischen hoher LEF1-Expression und schlechter Prognose ist eine klinische Studie mit langer Dauer bei neu diagnostizierten Patienten notwendig. Mit Hilfe einer solchen Studie ließe sich feststellen, ob Patienten, die einen aggressiven Krankheitsverlauf entwickeln, bereits initial bei der Erstdiagnose eine hohe LEF1-Expression aufweisen. Wenn dies der Fall wäre, könnte die LEF1-Expression zur Vorhersage des Krankheitsverlaufs herangezogen werden.

Des Weiteren wäre es wünschenswert, die direkte Assoziation zwischen LEF1-Expression und dem IGVH-Status zu untersuchen. Der unmutierte IGVH-Status ist eine Eigenschaft früher B-Zell-Stadien vor der somatischen Hypermutation im Keimzentrum. Da LEF1 physiologischerweise in frühen Stadien der B-Zellentwicklung hochreguliert ist ^(159,79), liegt der Verdacht nahe, dass IGVH-unmutierte CLL-Klone sich möglicherweise durch eine höhere LEF1-Expression im Vergleich zu mutierten Klonen auszeichnen. Zusammengenommen mit den Ergebnissen der vorliegen Arbeit wäre somit durchaus denkbar, dass LEF1 ein vergleichbar guter oder möglicherweise sogar besserer Surrogatmarker für den IGVH-Mutationsstatus ist als ZAP70.

4.9.4 Fibromodulin als prognostischer Marker

Für Fibromodulin konnte in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Assoziation mit prognostischen Markern oder der Tumorlast nachwiesen werden.

Da p53-Mutationen nur bei einem sehr geringen Prozentsatz der Patienten vorliegen, kommen diese bei einer Stichprobe von 96 Patienten wahrscheinlich nicht signifikant zum Tragen. Somit stehen die hier ermittelten Ergebnisse nicht im Widerspruch zu der von Vallat et al. veröffentlichten Studie ⁽¹⁸²⁾. Es wäre daher sehr interessant, die von Vallat et al. festgestellte Assoziation zwischen der Fibromodulin-Expression und p53-Mutationen sowie Therapieresistenz weiter zu untersuchen. Darüber hinaus wäre es interessant, auch das Screening nach 17p-Deletionen in die Studie mit einzubeziehen. Vallat et al. ermittelten in ihrer Studie lediglich den p53-Mutationsstatus. Da aber das p53-Gen auf 17p lokalisiert ist und in über 80% der Patienten mit monoallelischem Verlust von p53 das verbleibende Allel mutiert ist ⁽¹⁹⁴⁾, liegt eine Verbindung zwischen Fibromodulin-Expression und 17p-Deletionen nahe. Es wäre also wünschenswert zu untersuchen, ob sich die Patienten mit p53-Mutation beziehungsweise 17p-Deletion durch die Höhe ihrer Fibromodulin-Expression zuverlässig von den anderen Patienten unterscheiden lassen.

Es wurde außerdem beschrieben, dass Fibromodulin in den p53-mutierten CLL-Klonen durch DNA-Schädigung induziert wird, während die Expression in unmutierten Klonen konstant bleibt ⁽¹⁸²⁾. Auch dieser Aspekt könnte zur Hilfe genommen werden, um Patienten mit p53-Mutation beziehungsweise 17p-Deletion zu identifizieren. Man könnte beispielsweise die Expression von Fibromodulin vor und nach DNA-Schädigung der CLL-Zellen in vitro messen und untersuchen, ob sich anhand des Quotienten (Expression nach DNA-Schädigung / Expression vor DNA-Schädigung) die p53-mutierten beziehungsweise 17p-deletierten Fälle zuverlässig von den anderen CLL-Klonen unterscheiden lassen.

So könnte durch ein Screening der Fibromodulin-Expression möglicherweise die kleine aber klinisch hochrelevante Gruppe von Patienten mit p53-Mutation und 17p-Deletion mit geringem finanziellen Aufwand frühzeitig identifiziert und entsprechend behandelt werden.

5 Zusammenfassung

In früheren Studien konnte mit Hilfe von Microarray-Analysen gezeigt werden, dass der Wnt-Transkriptionsfaktor LEF1 in der CLL erheblich höher exprimiert ist als in gesunden B-Zellen. Er spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle für Pathogenese und Aggressivität vieler neoplastischer Erkrankungen.

Auch das extrazelluläre Matrixprotein Fibromodulin ist in erheblichem Maße in der CLL überexprimiert. Außerdem zeigt Fibromodulin eine Assoziation mit der p53-Mutation in der CLL, welche wiederum mit schlechter Prognose und Therapieresistenz assoziiert ist. Des Weiteren enthält der Fibromodulin-Promotor eine mögliche Bindungsstelle für Wnt-Transkriptionsfaktoren. Dies weist auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Überexpression von Fibromodulin und dem Wnt-Transkriptionsfaktor LEF1 hin.

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels effizienzkorrigierter quantitativer Real-time-PCR die Überexpression von LEF1 und Fibromodulin in der CLL bestätigt werden. Außerdem konnte eine signifikant positive Korrelation zwischen der LEF1- und der Fibromodulin-Expression in primären CLL-Zellen nachgewiesen werden. Der funktionelle Nachweis der Regulation von Fibromodulin durch LEF1 konnte in Transfektionsexperimenten jedoch weder gezeigt noch eindeutig widerlegt werden.

Darüber hinaus konnte eine erhebliche Assoziation von hoher LEF1-Expression und schlechter Prognose sowie fortgeschrittenem Krankheitsstadium bei CLL-Patienten gezeigt werden. Die Höhe der LEF1-Expression war mit dem prognostischen Marker ZAP70 und dem Prozentsatz an Lymphozyten im Differentialblutbild hochsignifikant positiv korreliert. Dabei war die LEF1-Expression gemäß Aufteilung nach Rassenti et al. in ZAP70-positiven Patienten signifikant höher als in ZAP70-negativen Patienten. Darüber hinaus war die LEF1-Expression bei behandlungsbedürftigen Patienten bei einem *p*-Wert von unter 0,001 im Mittel etwa vier Mal höher ausgeprägt als bei neu diagnostizierten Patienten im Stadium A nach Binet. Anhand von ROC-Kurven konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die LEF1-Expression stärker mit der Behandlungsbedürftigkeit von Patienten assoziiert ist als die gängigen prognostischen Marker ZAP70 und CD38. Die Messung der LEF1-Expression könnte somit möglicherweise zukünftig zur Risikoabschätzung und/oder Überwachung der Krankheitsaktivität bei Patienten mit CLL eingesetzt werden.

6 Literaturverzeichnis

- 1. Adams JM, Harris AW, Strasser A, Ogilvy S, Cory S. Transgenic models of lymphoid neoplasia and development of a panhematopoietic vector (1999). Oncogene. 18: 5268-77
- Anaissie EJ, Kontoyiannis DP, O'Brien S, Kantarjian H, Robertson L, Lerner S, Keating MJ. Infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine (1998). Ann Intern Med. 129: 559-66
- Aoki M, Hecht A, Kruse U, Kemler R, Vogt PK. Nuclear endpoint of Wnt signaling: neoplastic transformation induced by transactivating lymphoid-enhancing factor 1 (1999). Proc Natl Acad Sci U S A. 96: 139-44
- Aroesty JM, Furth FW. Infection and chronic lymphocytic leukemia. A review of 61 cases 1 (1962). N Y State J Med. 62: 1946-52
- Austen B, Powell JE, Alvi A, Edwards I, Hooper L, Starczynski J, Taylor AM, Fegan C, Moss P, Stankovic T. Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL (2005). Blood. 106: 3175-82
- Bartal A, Bentwich Z, Manny N, Izak G. Ethnical and clinical aspects of chronic lymphocytic leukemia in Israel: a survey on 288 patients 5 (1978). Acta Haematol. 60: 161-71
- Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1 (1996). Nature. 382: 638-42
- Beillard E, Pallisgaard N, van dV, V, Bi W, Dee R, van der SE, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, van Dongen JJ, Hokland P, Gabert J. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reversetranscriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program (2003). Leukemia. 17: 2474-86
- 9. Bergmann M, Hallek M (2005). Prognoseabschätzung. In: Hallek, M. and Emmerich, B. (ed). Chronisch lymphatische Leukämie. 2. ed. Bremen: UNI-MED, p. 62-73
- Bhayat F, Das-Gupta E, Smith C, McKeever T, Hubbard R. The incidence of and mortality from leukaemias in the UK: a general population-based study (2009). BMC Cancer. 9: 252

- Bichi R, Shinton SA, Martin ES, Koval A, Calin GA, Cesari R, Russo G, Hardy RR, Croce CM. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression (2002). Proc Natl Acad Sci U S A. 99: 6955-60
- Bierman HR, Perkins EK, Ortega P. Pericarditis in patients with leukemia 15 (1952). Am Heart J. 43: 413-22
- Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis (1981). Cancer. 48: 198-206
- Boggs DR, Sofferman SA, Wintrobe MM, Cartwright GE. Factors influencing the duration of survival of patients with chronic lymphocytic leukemia 6 (1966). Am J Med. 40: 243-54
- 15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding (1976). Anal Biochem. 72: 248-54
- Browning RL, Geyer SM, Johnson AJ, Jelinek DF, Tschumper RC, Call TG, Shanafelt TD, Zent CS, Bone ND, Dewald GW, Lin TS, Heerema NA, Grever MR, Kay NE, Byrd JC, Lucas DM. Expression of TCL-1 as a potential prognostic factor for treatment outcome in B-cell chronic lymphocytic leukemia (2007). Leuk Res. 31: 1737-40
- 17. Burkhardt AL, Brunswick M, Bolen JB, Mond JJ. Anti-immunoglobulin stimulation of B lymphocytes activates src-related proteintyrosine kinases (1991). Proc Natl Acad Sci U S A. 88: 7410-4
- Byrd JC, Gribben JG, Peterson BL, Grever MR, Lozanski G, Lucas DM, Lampson B, Larson RA, Caligiuri MA, Heerema NA. Select highrisk genetic features predict earlier progression following chemoimmunotherapy with fludarabine and rituximab in chronic lymphocytic leukemia: justification for risk-adapted therapy (2006). J Clin Oncol. 24: 437-43
- Byrd JC, Kitada S, Flinn IW, Aron JL, Pearson M, Lucas D, Reed JC. The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction (2002). Blood. 99: 1038-43
- 20. Byrd JC, Lin TS, Dalton JT, Wu D, Phelps MA, Fischer B, Moran M, Blum KA, Rovin B, Brooker-McEldowney M, Broering S, Schaaf

LJ, Johnson AJ, Lucas DM, Heerema NA, Lozanski G, Young DC, Suarez JR, Colevas AD, Grever MR. Flavopiridol administered using a pharmacologically derived schedule is associated with marked clinical efficacy in refractory, genetically high-risk chronic lymphocytic leukemia (2007). Blood. 109: 399-404

- 21. Caligaris-Cappio F, Ghia P. Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? (2008). J Clin Oncol. 26: 4497-503
- 22. Calin GA, Croce CM. Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance (2006). Semin Oncol. 33: 167-73
- Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di LG, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia (2005). N Engl J Med. 353: 1793-801
- 24. Casadevall N, Lacombe C, Varet B. Erythroblastopenia: chronic idiopathic or associated with chronic lymphoid leukemia. Value of cultures of erythroblastic progenitors and therapeutic strategy (1993). Presse Med. 22: 1079-86
- 25. Catovsky D, Halsey J, Richards S. Sex as a prognostic factor in CLL. An analysis from MRC trials (2002). IX IWCLL, SanDiego. 32a
- Catovsky D, Fooks J, Richards S. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial. MRC Working Party on Leukaemia in Adults (1989). Br J Haematol. 72: 141-9
- 27. Chanan-Khan A, Miller KC, Musial L, Lawrence D, Padmanabhan S, Takeshita K, Porter CW, Goodrich DW, Bernstein ZP, Wallace P, Spaner D, Mohr A, Byrne C, Hernandez-Ilizaliturri F, Chrystal C, Starostik P, Czuczman MS. Clinical efficacy of lenalidomide in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II study (2006). J Clin Oncol. 24: 5343-9
- 28. Chapel HM, Bunch C. Mechanisms of infection in chronic lymphocytic leukemia (1987). Semin Hematol. 24: 291-6
- 29. Chilosi M, Pizzolo G, Caligaris-Cappio F, Ambrosetti A, Vinante F, Morittu L, Bonetti F, Fiore-Donati L, Janossy G. Immunohistochemical demonstration of follicular dendritic cells in bone marrow involvement of B-cell chronic lymphocytic leukemia (1985). Cancer. 56: 328-32

- Chim CS, Pang R, Liang R. Epigenetic dysregulation of the Wnt signalling pathway in chronic lymphocytic leukaemia (2008). J Clin Pathol. 61: 1214-9
- Choudhury A, Derkow K, Daneshmanesh AH, Mikaelsson E, Kiaii S, Kokhaei P, Osterborg A, Mellstedt H. Silencing of ROR1 and FMOD with siRNA results in apoptosis of CLL cells 1 (2010). Br J Haematol. 151: 327-35
- Christiansen I, Sundstrom C, Enblad G, Totterman TH. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) is an independent prognostic marker in Hodgkin's disease (1998). Br J Haematol. 102: 701-9
- Chung EJ, Hwang SG, Nguyen P, Lee S, Kim JS, Kim JW, Henkart PA, Bottaro DP, Soon L, Bonvini P, Lee SJ, Karp JE, Oh HJ, Rubin JS, Trepel JB. Regulation of leukemic cell adhesion, proliferation, and survival by beta-catenin (2002). Blood. 100: 982-90
- 34. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease (2006). Cell. 127: 469-80
- CLL Trialists' Collaborative Group. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials. CLL Trialists' Collaborative Group (1999). J Natl Cancer Inst. 91: 861-8
- 36. Cohen J. A power primer (1992). Psychol Bull. 112: 155-9
- Collins RJ, Verschuer LA, Harmon BV, Prentice RL, Pope JH, Kerr JF. Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro (1989). Br J Haematol. 71: 343-50
- Corcione A, Aloisi F, Serafini B, Capello E, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. B-cell differentiation in the CNS of patients with multiple sclerosis (2005). Autoimmun Rev. 4: 549-54
- Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia (1999). Blood. 94: 1840-7
- 40. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cellintrinsic death machinery (1997). Cell. 91: 231-41
- 41. de LM, O'Brien S, Lerner S, Keating MJ. Chronic lymphocytic leukemia in the young patient 1 (1998). Semin Oncol. 25: 107-16

- 42. De RG, Granati L, Girelli G, Gandolfo G, Arista MC, Martelli M, Conti L, Marini R, La TR, Leone R, . Incidence and prognostic significance of autoantibodies against erythrocytes and platelets in chronic lymphocytic leukemia (CLL) (1988). Nouv Rev Fr Hematol. 30: 403-6
- 43. del PL, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt (1997). Science. 278: 687-9
- 44. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases (1997). Nature. 388: 300-4
- 45. Di Bernardo MC, Crowther-Swanepoel D, Broderick P, Webb E, Sellick G, Wild R, Sullivan K, Vijayakrishnan J, Wang Y, Pittman AM, Sunter NJ, Hall AG, Dyer MJ, Matutes E, Dearden C, Mainou-Fowler T, Jackson GH, Summerfield G, Harris RJ, Pettitt AR, Hillmen P, Allsup DJ, Bailey JR, Pratt G, Pepper C, Fegan C, Allan JM, Catovsky D, Houlston RS. A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia (2008). Nat Genet. 40: 1204-10
- 46. Diehl LF, Ketchum LH. Autoimmune disease and chronic lymphocytic leukemia: autoimmune hemolytic anemia, pure red cell aplasia, and autoimmune thrombocytopenia (1998). Semin Oncol. 25: 80-97
- Dighiero G, Travade P, Chevret S, Fenaux P, Chastang C, Binet JL. Bcell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. French Cooperative Group on CLL (1991). Blood. 78: 1901-14
- Dohner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S, p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias (1995). Blood. 85: 1580-9
- 49. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia (2000). N Engl J Med. 343: 1910-6
- 50. Dohner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, Fischer K, Hunstein W, Lichter P. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis (1997). Blood. 89: 2516-22
- 51. Dores GM, Anderson WF, Curtis RE, Landgren O, Ostroumova E, Bluhm EC, Rabkin CS, Devesa SS, Linet MS. Chronic lympho-

cytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology (2007). Br J Haematol. 139: 809-19

- 52. Dreger P. Allotransplantation for chronic lymphocytic leukemia (2009). Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 602-9
- 53. Dreger P, Brand R, Milligan D, Corradini P, Finke J, Lambertenghi DG, Martino R, Russell N, van BA, Michallet M, Niederwieser D. Reduced-intensity conditioning lowers treatment-related mortality of allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: a population-matched analysis (2005). Leukemia. 19: 1029-33
- 54. Dreger P, Corradini P, Kimby E, Michallet M, Milligan D, Schetelig J, Wiktor-Jedrzejczak W, Niederwieser D, Hallek M, Montserrat E. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus (2007). Leukemia. 21: 12-7
- 55. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells (2001). Nature. 411: 494-8
- 56. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs (2001). Genes Dev. 15: 188-200
- 57. Elter T, Borchmann P, Schulz H, Reiser M, Trelle S, Schnell R, Jensen M, Staib P, Schinkothe T, Stutzer H, Rech J, Gramatzki M, Aulitzky W, Hasan I, Josting A, Hallek M, Engert A. Fludarabine in combination with alemtuzumab is effective and feasible in patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II trial (2005). J Clin Oncol. 23: 7024-31
- Engelhard M, Brittinger R, Heinz R, Theml H, Bartels H, Binder, H.H.Fuumllle, H.Gerhartz, Gunzer U, Ludwig F, Ludwig WD, owicki L, ertel J, ees HW, ralle H, uumlhl U, Schilling C.H., pann W., zeimies U., etzel H.J., Zwingers T, Feller AC, tein H., ennert K. Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL) and Immunocytoma (LP-IC): Clinical and Prognostic Relevance of this Distinction (1991). Leukemia and Lymphoma. 5: 161-73
- 59. Extermann M, Overcash J, Lyman GH, Parr J, Balducci L. Comorbidity and functional status are independent in older cancer patients (1998). J Clin Oncol. 16: 1582-7
- 60. Farina L, Carniti C, Dodero A, Vendramin A, Raganato A, Spina F, Patriarca F, Narni F, Benedetti F, Olivieri A, Corradini P. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction monitoring of minimal residual disease in relapsed chronic lymphocytic leukemia: early assessment can predict long-term outcome after re-

duced intensity allogeneic transplantation (2009). Haematologica. 94: 654-62

- 61. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences (2007). Behav Res Methods. 39: 175-91
- Filali M, Cheng N, Abbott D, Leontiev V, Engelhardt JF. Wnt-3A/betacatenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter (2002). J Biol Chem. 277: 33398-410
- 63. Finch SC, Linet MS. Chronic leukaemias (1992). Baillieres Clin Haematol. 5: 27-56
- 64. Foon KA, Rai KR, Gale RP. Chronic lymphocytic leukemia: new insights into biology and therapy (1990). Ann Intern Med. 113: 525-39
- Gandhirajan RK, Staib PA, Minke K, Gehrke I, Plickert G, Schlosser A, Schmitt EK, Hallek M, Kreuzer KA. Small molecule inhibitors of Wnt/beta-catenin/lef-1 signaling induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro and in vivo (2010). Neoplasia. 12: 326-35
- 66. Geisler CH, Philip P, Christensen BE, Hou-Jensen K, Pedersen NT, Jensen OM, Thorling K, Andersen E, Birgens HS, Drivsholm A, Ellegaard J, Larsen JK, Plesner T, Brown P, Andersen PK, Hansen MM. In B-cell chronic lymphocytic leukaemia chromosome 17 abnormalities and not trisomy 12 are the single most important cytogenetic abnormalities for the prognosis: a cytogenetic and immunophenotypic study of 480 unselected newly diagnosed patients (1997). Leuk Res. 21: 1011-23
- 67. Ghia P, Caligaris-Cappio F. The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms (2000). Adv Cancer Res. 79: 157-73
- Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation (2008). J Intern Med. 264: 549-62
- Ghia P, Circosta P, Scielzo C, Vallario A, Camporeale A, Granziero L, Caligaris-Cappio F. Differential effects on CLL cell survival exerted by different microenvironmental elements (2005). Curr Top Microbiol Immunol. 294: 135-45
- Ghia P, Strola G, Granziero L, Geuna M, Guida G, Sallusto F, Ruffing N, Montagna L, Piccoli P, Chilosi M, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22 (2002). Eur J Immunol. 32: 1403-13

- Giannopoulos K, Li L, Bojarska-Junak A, Rolinski J, Dmoszynska A, Hus I, Greiner J, Renner C, Dohner H, Schmitt M. Expression of RHAMM/CD168 and other tumor-associated antigens in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (2006). Int J Oncol. 29: 95-103
- 72. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer (2003). Biochim Biophys Acta. 1653: 1-24
- Goldin LR, Pfeiffer RM, LI X, Hemminki K. Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family-Cancer Database (2004). Blood. 104: 1850-4
- Gori F, Schipani E, Demay MB. Fibromodulin is expressed by both chondrocytes and osteoblasts during fetal bone development (2001). J Cell Biochem. 82: 46-57
- 75. Granziero L, Ghia P, Circosta P, Gottardi D, Strola G, Geuna M, Montagna L, Piccoli P, Chilosi M, Caligaris-Cappio F. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia (2001). Blood. 97: 2777-83
- 76. Green DW, Roh H, Pippin JA, Drebin JA. Beta-catenin antisense treatment decreases beta-catenin expression and tumor growth rate in colon carcinoma xenografts (2001). J Surg Res. 101: 16-20
- 77. Greene MH, Hoover RN, Fraumeni JF, Jr. Subsequent cancer in patients with chronic lymphocytic leukemia--a possible immunologic mechanism (1978). J Natl Cancer Inst. 61: 337-40
- 78. Grever MR, Lucas DM, Dewald GW, Neuberg DS, Reed JC, Kitada S, Flinn IW, Tallman MS, Appelbaum FR, Larson RA, Paietta E, Jelinek DF, Gribben JG, Byrd JC. Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997 (2007). J Clin Oncol. 25: 799-804
- 79. Gutierrez A, Jr., Tschumper RC, Wu X, Shanafelt TD, Eckel-Passow J, Huddleston PM, III, Slager SL, Kay NE, Jelinek DF. LEF-1 is a prosurvival factor in chronic lymphocytic leukemia and is expressed in the preleukemic state of monoclonal B-cell lymphocytosis (2010). Blood. 116: 2975-83
- 80. Hallek M. State-of-the-art treatment of chronic lymphocytic leukemia (2009). Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 440-9
- 81. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lym-

phocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines (2008). Blood. 111: 5446-56

- 82. Hallek M, Eichhorst B, Dreger P. Chronische lymphatische Leukämie (2006).
- Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dietzfelbinger H, Adorf D, Ostwald M, Busch R, Kuhn-Hallek I, Thiel E, Emmerich B. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia (1999). Blood. 93: 1732-7
- 84. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, Busch R, Senekowitsch R, Stern S, Schick HD, Kuhn-Hallek I, Emmerich B. Serum beta(2)microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma (1996). Leuk Lymphoma. 22: 439-47
- 85. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia (1999). Blood. 94: 1848-54
- 86. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG. 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 (2002). Blood. 99: 1023-9
- Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia (1993). Blood. 82: 1820-8
- Hansen MM. Chronic lymphocytic leukaemia. Clinical studies based on 189 cases followed for a long time (1973). Scand J Haematol Suppl. 18: 3-286
- Hedbom E, Heinegard D. Interaction of a 59-kDa connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II (1989). J Biol Chem. 264: 6898-905
- 90. Heilmeyer L, Mössner G, HESS K. Die lymphatische Leukämie (1959). Klin Wochenschr. 37: 790-4
- 91. Heinegard D. FMOD (Fibromodulin) http://www.cmb.lu.se/ctb/html/Fibromodulin.htm (2010).
- 92. Herling M, Patel KA, Khalili J, Schlette E, Kobayashi R, Medeiros LJ, Jones D. TCL1 shows a regulated expression pattern in chronic lymphocytic leukemia that correlates with molecular subtypes and proliferative state (2006). Leukemia. 20: 280-5

- Herling M, Patel KA, Weit N, Lilienthal N, Hallek M, Keating MJ, Jones D. High TCL1 levels are a marker of B-cell receptor pathway responsiveness and adverse outcome in chronic lymphocytic leukemia (2009). Blood. 114: 4675-86
- 94. Herve M, Xu K, Ng YS, Wardemann H, Albesiano E, Messmer BT, Chiorazzi N, Meffre E. Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity (2005). J Clin Invest. 115: 1636-43
- 95. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions (1993). Biotechnology (N Y). 11: 1026-30
- 96. Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta (1994). Biochem J. 302 (Pt 2): 527-34
- Hisada M, Biggar RJ, Greene MH, Fraumeni JF, Jr., Travis LB. Solid tumors after chronic lymphocytic leukemia (2001). Blood. 98: 1979-81
- Hovanes K, Li TW, Munguia JE, Truong T, Milovanovic T, Lawrence MJ, Holcombe RF, Waterman ML. Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer (2001). Nat Genet. 28: 53-7
- 99. Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R. Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1 (1996). Mech Dev. 59: 3-10
- 100. Hudson RP, Wilson SJ. Hypogammaglobulinemia and chronic lymphatic leukemia (1960). Cancer. 13: 200-4
- Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research (2009). Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 523-31
- 102. Jelinek DF, Tschumper RC, Stolovitzky GA, Iturria SJ, Tu Y, Lepre J, Shah N, Kay NE. Identification of a global gene expression signature of B-chronic lymphocytic leukemia (2003). Mol Cancer Res. 1: 346-61
- 103. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, Parker AC, Castoldi GL, Guneo A, Knuutila S, . Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities (1990). N Engl J Med. 323: 720-4
- 104. Kalla C, Scheuermann MO, Kube I, Schlotter M, Mertens D, Dohner H, Stilgenbauer S, Lichter P. Analysis of 11q22-q23 deletion target

genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: evidence for a pathogenic role of NPAT, CUL5, and PPP2R1B (2007). Eur J Cancer. 43: 1328-35

- 105. Kern C, Cornuel JF, Billard C, Tang R, Rouillard D, Stenou V, Defrance T, jchenbaum-Cymbalista F, Simonin PY, Feldblum S, Kolb JP. Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway (2004). Blood. 103: 679-88
- 106. Khan NI, Bendall LJ. Role of WNT signaling in normal and malignant hematopoiesis (2006). Histol Histopathol. 21: 761-74
- 107. Kipps TJ, Tomhave E, Pratt LF, Duffy S, Chen PP, Carson DA. Developmentally restricted immunoglobulin heavy chain variable region gene expressed at high frequency in chronic lymphocytic leukemia (1989). Proc Natl Acad Sci U S A. 86: 5913-7
- 108. Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, Wang HG, Zhang X, Bullrich F, Croce CM, Rai K, Hines J, Reed JC. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses (1998). Blood. 91: 3379-89
- 109. Klatte EC, Yardley J, Smith EB, Rohn R, Campbell JA. The pulmonary manifestations and complications of leukemia (1963). Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med. 89: 598-609
- 110. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, Freedman A, Inghirami G, Cro L, Baldini L, Neri A, Califano A, la-Favera R. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells (2001). J Exp Med. 194: 1625-38
- 111. Laine J, Kunstle G, Obata T, Sha M, Noguchi M. The protooncogene TCL1 is an Akt kinase coactivator (2000). Mol Cell. 6: 395-407
- Lavin MF. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer (2008). Nat Rev Mol Cell Biol. 9: 759-69
- 113. Lee JS, Dixon DO, Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients (1987). Blood. 69: 929-36
- 114. Li Y, Wang L, Zhang M, Melamed J, Liu X, Reiter R, Wei J, Peng Y, Zou X, Pellicer A, Garabedian MJ, Ferrari A, Lee P. LEF1 in androgen-independent prostate cancer: regulation of androgen receptor expression, prostate cancer growth, and invasion (2009). Cancer Res. 69: 3332-8
- 115. Lichtin A. The ASH/ASCO clinical guidelines on the use of erythropoietin (2005). Best Pract Res Clin Haematol. 18: 433-8
- 116. Lu D, Zhao Y, Tawatao R, Cottam HB, Sen M, Leoni LM, Kipps TJ, Corr M, Carson DA. Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia (2004). Proc Natl Acad Sci U S A. 101: 3118-23
- 117. Ludwig H, Rai K, Blade J, Dammacco F, Degos L, Itri L, Kyle R, Liso V, Littlewood TJ, Mandelli F, Meloni G, Molica S, Osterborg A, Pangalis GA, San MJ, Schmitt B, Voliotis D. Management of disease-related anemia in patients with multiple myeloma or chronic lymphocytic leukemia: epoetin treatment recommendations (2002). Hematol J. 3: 121-30
- 118. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L, Tichy B, Kuglik P, Vranova V, Cejkova S, Svitakova M, Skuhrova FH, Brychtova Y, Doubek M, Brejcha M, Klabusay M, Mayer J, Pospisilova S, Trbusek M. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage (2009). Blood. 114: 5307-14
- 119. Mandelli F, De RG, Mancini P, Alberti A, Cajozzo A, Grignani F, Leoni P, Liso V, Martelli M, Neri A, . Prognosis in chronic lymphocytic leukemia: a retrospective multicentric study from the GIMEMA group (1987). J Clin Oncol. 5: 398-406
- 120. Manusow D, Weinerman BH. Subsequent neoplasia in chronic lymphocytic leukemia (1975). JAMA. 232: 267-9
- 121. Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, Cordone I, Crescenzi S, Pescarmona E, Sala R, Cerretti R, Mandelli F. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases 4 (1999). Blood. 94: 448-54
- 122. Mayr C, Bund D, Schlee M, Moosmann A, Kofler DM, Hallek M, Wendtner CM. Fibromodulin as a novel tumor-associated antigen (TAA) in chronic lymphocytic leukemia (CLL), which allows expansion of specific CD8+ autologous T lymphocytes (2005). Blood. 105: 1566-73
- 123. Mellemgaard A, Geisler CH, Storm HH. Risk of kidney cancer and other second solid malignancies in patients with chronic lymphocytic leukemia (1994). Eur J Haematol. 53: 218-22
- 124. Mertens D, Wolf S, Tschuch C, Mund C, Kienle D, Ohl S, Schroeter P, Lyko F, Dohner H, Stilgenbauer S, Lichter P. Allelic silencing at the tumor-suppressor locus 13q14.3 suggests an epigenetic tumor-suppressor mechanism (2006). Proc Natl Acad Sci U S A. 103: 7741-6
- 125. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Kolitz J, Foa R, Damle RN, Fais F, Messmer D, Rai KR, Ferrarini M,

Chiorazzi N. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia (2004). J Exp Med. 200: 519-25

- 126. Montillo M, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies (2005). Haematologica. 90: 391-9
- 127. Montserrat E, Gomis F, Vallespi T, Rios A, Romero A, Soler J, Alcala A, Morey M, Ferran C, az-Mediavilla J, . Presenting features and prognosis of chronic lymphocytic leukemia in younger adults (1991). Blood. 78: 1545-51
- 128. Montserrat E, Rozman C. Chronic lymphocytic leukemia: present status (1995). Ann Oncol. 6: 219-35
- Montserrat E, Vinolas N, Reverter JC, Rozman C (1993). Chronic lymphocytic leukemia in early stage "smoldering" and "active" forms. In: Cheson, B. D. (ed). p. 281-96
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification (1998). Biotechniques. 24: 954-8, 960, 962
- 131. Morrison VA. The infectious complications of chronic lymphocytic leukemia (1998). Semin Oncol. 25: 98-106
- 132. Morrison VA, Rai KR, Peterson BL, Kolitz JE, Elias L, Appelbaum FR, Hines JD, Shepherd L, Martell RE, Larson RA, Schiffer CA. Impact of therapy With chlorambucil, fludarabine, or fludarabine plus chlorambucil on infections in patients with chronic lymphocytic leukemia: Intergroup Study Cancer and Leukemia Group B 9011 (2001). J Clin Oncol. 19: 3611-21
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction (1987). Methods Enzymol. 155: 335-50
- 134. Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Tobin G, Boudjogra M, Scielzo C, Laoutaris N, Karlsson K, Baran-Marzsak F, Tsaftaris A, Moreno C, Anagnostopoulos A, Caligaris-Cappio F, Vaur D, Ouzounis C, Belessi C, Ghia P, Davi F, Rosenquist R, Stamatopoulos K. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis (2008). Blood. 111: 1524-33
- 135. Nguyen A, Rosner A, Milovanovic T, Hope C, Planutis K, Saha B, Chaiwun B, Lin F, Imam SA, Marsh JL, Holcombe RF. Wnt pathway component LEF1 mediates tumor cell invasion and is ex-

pressed in human and murine breast cancers lacking ErbB2 (her-2/neu) overexpression (2005). Int J Oncol. 27: 949-56

- 136. Nishiyama H, Mokuno J, Inoue T. Relative frequency and mortality rate of various types of leukemia in Japan (1969). Gann. 60: 71-81
- 137. O'Brien SM, Claxton DF, Crump M, Faderl S, Kipps T, Keating MJ, Viallet J, Cheson BD. Phase I study of obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia (2009). Blood. 113: 299-305
- Oduncu FS, Emmerich B (2005). Klinische Symptome, Komplikationen und Begleiterkrankungen. In: Hallek, M. and Emmerich, B. (ed). Chronisch lymphatische Leukämie. 2. ed. Bremen: UNI-MED, p. 38-49
- 139. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE, Corcoran MM, Chapman RM, Thomas PW, Copplestone JA, Orchard JA, Hamblin TJ. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors (2002). Blood. 100: 1177-84
- Oscier DG, Stevens J, Hamblin TJ, Pickering RM, Fitchett M. Prognostic factors in stage AO B-cell chronic lymphocytic leukaemia (1990). Br J Haematol. 76: 348-51
- Osgood EE, Seaman AJ. Treatment of chronic leukemias; results of therapy by titrated, regularly spaced total body radioactive phosphorus, or roentgen irradiation 1 (1952). J Am Med Assoc. 150: 1372-9
- 142. Ott G, Balague-Ponz O, de LL, de JD, Hasserjian RP, Elenitoba-Johnson KS. Commentary on the WHO classification of tumors of lymphoid tissues (2008): indolent B cell lymphomas (2009). J Hematop.
- 143. Ozer H, Armitage JO, Bennett CL, Crawford J, Demetri GD, Pizzo PA, Schiffer CA, Smith TJ, Somlo G, Wade JC, Wade JL, III, Winn RJ, Wozniak AJ, Somerfield MR. 2000 update of recommendations for the use of hematopoietic colony-stimulating factors: evidence-based, clinical practice guidelines. American Society of Clinical Oncology Growth Factors Expert Panel (2000). J Clin Oncol. 18: 3558-85
- 144. Paolino W, Infelise V, Levis A, Marmont F, Vitolo U, Paolino F, Rossi M, Jayme A, Remondino M. Adenosplenomegaly and prognosis in uncomplicated and complicated chronic lymphocytic leukemia. A study of 362 cases (1984). Cancer. 54: 339-46

- 145. Pepper C, Hooper K, Thomas A, Hoy T, Bentley P. Bcl-2 antisense oligonucleotides enhance the cytotoxicity of chlorambucil in B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells (2001). Leuk Lymphoma. 42: 491-8
- 146. Petropoulos K, Arseni N, Schessl C, Stadler CR, Rawat VP, Deshpande AJ, Heilmeier B, Hiddemann W, Quintanilla-Martinez L, Bohlander SK, Feuring-Buske M, Buske C. A novel role for Lef-1, a central transcription mediator of Wnt signaling, in leukemogenesis (2008). J Exp Med. 205: 515-22
- 147. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR (2001). Nucleic Acids Res. 29: e45
- Pisciotta AV, Hirschboeck JS. Therapeutic considerations in chronic lymphocytic leukemia; special reference to the natural course of the disease 2 (1957). AMA Arch Intern Med. 99: 334-5
- Plate JM, Long BW, Kelkar SB. Role of beta2 integrins in the prevention of apoptosis induction in chronic lymphocytic leukemia B cells (2000). Leukemia. 14: 34-9
- 150. Polakis P. Wnt signaling and cancer (2000). Genes Dev. 14: 1837-51
- 151. Rai KR, Freter CE, Mercier RJ, Cooper MR, Mitchell BS, Stadtmauer EA, Santabarbara P, Wacker B, Brettman L. Alemtuzumab in previously treated chronic lymphocytic leukemia patients who also had received fludarabine (2002). J Clin Oncol. 20: 3891-7
- 152. Rai KR, Han T. Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia (1990). Hematol Oncol Clin North Am. 4: 447-56
- Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia (1975). Blood. 46: 219-34
- 154. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, Neuberg DS, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia (2004). N Engl J Med. 351: 893-901
- 155. Raval A, Tanner SM, Byrd JC, Angerman EB, Perko JD, Chen SS, Hackanson B, Grever MR, Lucas DM, Matkovic JJ, Lin TS, Kipps TJ, Murray F, Weisenburger D, Sanger W, Lynch J, Watson P, Jansen M, Yoshinaga Y, Rosenquist R, de Jong PJ, Coggill P, Beck S, Lynch H, de la CA, Plass C. Downregulation of death-

associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia (2007). Cell. 129: 879-90

- 156. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJ, Kwok M, Fenton JA, Plummer M, de TR, Owen RG, Richards SJ, Jack AS, Hillmen P. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia (2008). N Engl J Med. 359: 575-83
- 157. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer (2005). Nature. 434: 843-50
- 158. Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells (2003). Nature. 423: 409-14
- 159. Reya T, O'Riordan M, Okamura R, Devaney E, Willert K, Nusse R, Grosschedl R. Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism (2000). Immunity. 13: 15-24
- 160. Rivat C, Le FN, Sabbah M, Teyrol I, Redeuilh G, Bruyneel E, Mareel M, Matrisian LM, Crawford HC, Gespach C, Attoub S. Synergistic cooperation between the AP-1 and LEF-1 transcription factors in activation of the matrilysin promoter by the src oncogene: implications in cellular invasion (2003). FASEB J. 17: 1721-3
- Robertson LE, Pugh W, O'Brien S, Kantarjian H, Hirsch-Ginsberg C, Cork A, McLaughlin P, Cabanillas F, Keating MJ. Richter's syndrome: a report on 39 patients (1993). J Clin Oncol. 11: 1985-9
- 162. Roche Applied Science Technical Note No.LC 13/2001 (31) 4. Calibrator Normalized Relative Quantification, (2010).
- 163. Roh H, Green DW, Boswell CB, Pippin JA, Drebin JA. Suppression of beta-catenin inhibits the neoplastic growth of APC-mutant colon cancer cells (2001). Cancer Res. 61: 6563-8
- Roman-Gomez J, Cordeu L, Agirre X, Jimenez-Velasco A, San Jose-Eneriz E, Garate L, Calasanz MJ, Heiniger A, Torres A, Prosper F. Epigenetic regulation of Wnt-signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia (2007). Blood. 109: 3462-9
- 165. Roose J, Huls G, van BM, Moerer P, van der HK, Goldschmeding R, Logtenberg T, Clevers H. Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1 (1999). Science. 285: 1923-6
- 166. Sasaki T, Suzuki H, Yagi K, Furuhashi M, Yao R, Susa S, Noda T, Arai Y, Miyazono K, Kato M. Lymphoid enhancer factor 1 makes cells resistant to transforming growth factor beta-induced repression of c-myc (2003). Cancer Res. 63: 801-6

- 167. Schliep S, Decker T, Schneller F, Wagner H, Hacker G. Functional evaluation of the role of inhibitor of apoptosis proteins in chronic lymphocytic leukemia (2004). Exp Hematol. 32: 556-62
- 168. Sequiserve GmbH. Sequiserve Primer Datenbank (2010).
- 169. Shanafelt TD. Predicting clinical outcome in CLL: how and why (2009). Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 421-9
- 170. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. The cyclin D1 gene is a target of the betacatenin/LEF-1 pathway (1999). Proc Natl Acad Sci U S A. 96: 5522-7
- 171. Sjoberg A, Onnerfjord P, Morgelin M, Heinegard D, Blom AM. The extracellular matrix and inflammation: fibromodulin activates the classical pathway of complement by directly binding C1q (2005). J Biol Chem. 280: 32301-8
- 172. Smith TJ, Khatcheressian J, Lyman GH, Ozer H, Armitage JO, Balducci L, Bennett CL, Cantor SB, Crawford J, Cross SJ, Demetri G, Desch CE, Pizzo PA, Schiffer CA, Schwartzberg L, Somerfield MR, Somlo G, Wade JC, Wade JL, Winn RJ, Wozniak AJ, Wolff AC. 2006 update of recommendations for the use of white blood cell growth factors: an evidence-based clinical practice guideline 1 (2006). J Clin Oncol. 24: 3187-205
- 173. Smolej L. Modern concepts in the treatment of chronic lymphocytic leukemia (2009). Hematology. 14: 249-54
- 174. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjograh M, Guida G, Smilevska T, Belhoul L, Stella S, Stavroyianni N, Crespo M, Hadzidimitriou A, Sutton L, Bosch F, Laoutaris N, Anagnostopoulos A, Montserrat E, Fassas A, Dighiero G, Caligaris-Cappio F, Merle-Beral H, Ghia P, Davi F. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations (2007). Blood. 109: 259-70
- 175. Stoff A, Rivera AA, Mathis JM, Moore ST, Banerjee NS, Everts M, Espinosa-de-los-Monteros A, Novak Z, Vasconez LO, Broker TR, Richter DF, Feldman D, Siegal GP, Stoff-Khalili MA, Curiel DT. Effect of adenoviral mediated overexpression of fibromodulin on human dermal fibroblasts and scar formation in full-thickness incisional wounds (2007). J Mol Med. 85: 481-96
- 176. Takemura S, Braun A, Crowson C, Kurtin PJ, Cofield RH, O'Fallon WM, Goronzy JJ, Weyand CM. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis (2001). J Immunol. 167: 1072-80

- 177. Theml H (1993). Die chronische Lymphatische Leukämie im klassischen Sinne (B-CLL). In: Begemann, H. and Rastetter, J. (ed). 3. ed. Thieme, p. 718
- 178. Toze CL, Galal A, Barnett MJ, Shepherd JD, Conneally EA, Hogge DE, Nantel SH, Nevill TJ, Sutherland HJ, Connors JM, Voss NJ, Kiss TL, Messner HA, Lavoie JC, Forrest DL, Song KW, Smith CA, Lipton J. Myeloablative allografting for chronic lymphocytic leukemia: evidence for a potent graft-versus-leukemia effect associated with graft-versus-host disease (2005). Bone Marrow Transplant. 36: 825-30
- 179. Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia (2002). Blood. 99: 1030-7
- 180. Twomey JJ. Infections complicating multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia (1973). Arch Intern Med. 132: 562-5
- Uthgenannt H. Über Retikulopatien und das Phänomen der Pseudopolyposis lymphatica ilei (1959). Fortschr Geb Rontgenstr Nuklearmed. 90: 151-64
- 182. Vallat L, Magdelenat H, Merle-Beral H, Masdehors P, Potocki de MG, Davi F, Kruhoffer M, Sabatier L, Orntoft TF, Delic J. The resistance of B-CLL cells to DNA damage-induced apoptosis defined by DNA microarrays (2003). Blood. 101: 4598-606
- 183. Van Noesel CJ, Brouns GS, van Schijndel GM, Bende RJ, Mason DY, Borst J, van Lier RA. Comparison of human B cell antigen receptor complexes: membrane-expressed forms of immunoglobulin (Ig)M, IgD, and IgG are associated with structurally related heterodimers (1992). J Exp Med. 175: 1511-9
- 184. Vasconcelos Y, Davi F, Levy V, Oppezzo P, Magnac C, Michel A, Yamamoto M, Pritsch O, Merle-Beral H, Maloum K, jchenbaum-Cymbalista F, Dighiero G. Binet's staging system and VH genes are independent but complementary prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia (2003). J Clin Oncol. 21: 3928-32
- 185. Veeramachaneni NK, Kubokura H, Lin L, Pippin JA, Patterson GA, Drebin JA, Battafarano RJ. Down-regulation of beta catenin inhibits the growth of esophageal carcinoma cells (2004). J Thorac Cardiovasc Surg. 127: 92-8
- Verma UN, Surabhi RM, Schmaltieg A, Becerra C, Gaynor RB. Small interfering RNAs directed against beta-catenin inhibit the in vitro and in vivo growth of colon cancer cells (2003). Clin Cancer Res. 9: 1291-300

- 187. Vroblova V, Vrbacky F, Hrudkova M, Jankovicova K, Schmitzova D, Maly J, Krejsek J, Smolej L. Significant change in ZAP-70 expression during the course of chronic lymphocytic leukemia (2010). Eur J Haematol. 84: 513-7
- 188. Vroblova V, Vrbacky F, Hrudkova M, Jankovicova K, Schmitzova D, Maly J, Krejsek J, Smolej L. Significant change in ZAP-70 expression during the course of chronic lymphocytic leukemia (2010). Eur J Haematol. 84: 513-7
- 189. Wang W, Ji P, Steffen B, Metzger R, Schneider PM, Halfter H, Schrader M, Berdel WE, Serve H, Muller-Tidow C. Alterations of lymphoid enhancer factor-1 isoform expression in solid tumors and acute leukemias (2005). Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 37: 173-80
- 190. Widhopf GF, Rassenti LZ, Toy TL, Gribben JG, Wierda WG, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients express virtually identical immunoglobulins (2004). Blood. 104: 2499-504
- 191. Yamanashi Y, Kakiuchi T, Mizuguchi J, Yamamoto T, Toyoshima K. Association of B cell antigen receptor with protein tyrosine kinase Lyn (1991). Science. 251: 192-4
- 192. Yan XJ, Albesiano E, Zanesi N, Yancopoulos S, Sawyer A, Romano E, Petlickovski A, Efremov DG, Croce CM, Chiorazzi N. B cell receptors in TCL1 transgenic mice resemble those of aggressive, treatment-resistant human chronic lymphocytic leukemia (2006). Proc Natl Acad Sci U S A. 103: 11713-8
- 193. Zenz T, Benner A, Dohner H, Stilgenbauer S. Chronic lymphocytic leukemia and treatment resistance in cancer: the role of the p53 pathway (2008). Cell Cycle. 7: 3810-4
- 194. Zenz T, Krober A, Scherer K, Habe S, Buhler A, Benner A, Denzel T, Winkler D, Edelmann J, Schwanen C, Dohner H, Stilgenbauer S. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up (2008). Blood. 112: 3322-9
- 195. Zenz T, Mertens D, Kuppers R, Dohner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia (2010). Nat Rev Cancer. 10: 37-50

7 Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

- Erdfelder F, Hertweck M, Filipovich A, Uhrmacher S, Kreuzer KA (2010). High lymphoid enhancer-binding factor-1 expression is associated with disease progression and poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. Hematology Reports. 2:e3
- Erdfelder F, Poll-Wolbeck SJ, Gehrke I, Hallek M, Kreuzer KA (2010). High Lymphoid Enhancer-Binding Factor-1 (LEF1) Expression Is Associated with ZAP70 Positivity, Requirement of Treatment, and Fibromodulin (FMOD) Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). Posterpräsentation ASH Meeting 2010.
- Erdfelder F, Poll-Wolbeck SJ, Gehrke I, Hallek M, Kreuzer KA (2010). Lymphoid enhencer-bindingfactor-1 (LEF1) expression is associated with ZAP70 positivity and disease progression in chronic lymphocytic leukemia (CLL). Posterpräsentation ISH Meeting 2010.
- Poll-Wolbeck SJ, Grandhirajan RK, Erdfelder F, Gehrke I, Schlösser A, Schmitt EK, Plickert G, Hallek M, Kreuzer KA (2010). The transcritionfactor LEF1 links CLL cell survival and disease progression. Posterpräsentation DGHO Jahrestagung 2010.

8 Anhang: Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von Fibromodulin (modifiziert nach (91)) 19
Abbildung 2: Mittlere Fibromodulin-Expression und Standardschätzfehler in gesunden B-Zellen und primären CLL-Zellen (Mann-Whitney U = 46, p < 0,001)
Abbildung 3: LEF1 Punktdiagramm mit Mittelwerten für gesunde B-Zellen und primäre CLL- Zellen (Mann-Whitney U = 33, p < 0,001)
Abbildung 4: Beziehung zwischen LEF1-RERs und Fibromodulin-RERs für 96 primäre CLL- Proben (jeweils gegen gesunde B-Zellen kalibriert)
Abbildung 5: Mittlere Fibromodulin-Expression und Standardschätzfehler für "Niedrig LEF1"- Patienten (LEF1-RER < Median) und "Hoch LEF1"-Patienten (LEF1-RER > Median) (Mann- Whitney U = 554,00, p < 0,001)
Abbildung 6: Beziehung zwischen LEF1-RERs und TCF4-RERs für 84 primäre CLL-Proben (jeweils gegen gesunde B-Zellen kalibriert)
Abbildung 7: LEF1-RERs relativ zu untransfizierten Hela-Zellen für primäre CLL-Zellen und fünf LEF1-transfizierte Hela-Subkulturen
Abbildung 8: LEF1 Western-Blot für vier LEF1-transfizierte Hela-Subkulturen, zwei untransfizierten Hela-Kulturen und JVM3-Zellen als Positivkontrolle
Abbildung 9: Fibromodulin-RERs relativ zu untransfizierten Hela-Zellen (und Standardfehler) für untransfizierte Hela Zellen und fünf LEF1-transfizierte Hela-Subkulturen (Mann-Whitney U = 2, p = 0,143)
Abbildung 10: LEF1-RERs abgetragen gegen Fibromodulin-RERs für fünf LEF1-transfizierten Hela-Subkulturen
Abbildung 11: A C-Myc-RERs relativ zu untransfizierten Hela-Zellen für zwei LEF1-transfizierte Hela-Subkulturen. B CCND1-RERs relativ zu untransfizierten Hela-Zellen für LEF1- transfizierte Hela-Subkulturen
Abbildung 12: JVM3-Zell-Nucleofector-Experiment: Mittlere LEF1-RERs (und Standardschätzfehler) relativ zum Mittelwert der Kontroll-siRNA-Proben, für LEF1-siRNA-Proben, Kontroll-siRNA-Proben, unbehandelte Proben, und Proben, die ohne siRNA dem Nucleofector ausgesetzt wurde (jeweils n=3)
Abbildung 13: CLL-Zell-Nucleofector-Experiment: Mittlere LEF1-RERs (und Standardschätzfehler) relativ zum Mittelwert der Kontroll-siRNA-Probe für die LEF1-siRNA-Probe, die Kontroll-siRNA-Probe, eine unbehandelte Probe und eine Probe, die ohne siRNA dem Nucleofector ausgesetzt wurde

Abbildung 15: CLL-Zell-Nucleofector-Experiment: Fibromodulin-RERs relativ zum Mittelwert der Kontroll-siRNA-Probe für die LEF1-siRNA-Probe, Kontroll-siRNA-Probe, eine unbehandelte Probe und eine Probe, die ohne siRNA dem Nucleofector ausgesetzt wurde.55

•

9 Lebenslauf

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