

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

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

**Pharmakologische Inhibierung von PI3K-AKT-mTOR in der CLL –  
*eine Strategie zur Hemmung zentraler und TCL1A-Onkogen  
vermittelter Signalwege im Überleben der Leukämiezelle***

vorgelegt von

**Wagma Popal**

aus Kabul, Afghanistan

Promoviert am 10. April 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

2013

Dekan: Universitätsprofessor Dr. Dr. h.c. T. Krieg

1. Berichterstatter:

Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek

2. Berichterstatterin/Berichterstatter:

Universitätsprofessor Dr. med. U. Fuhr

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift 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.

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

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, den 25.09.2012

Die vorliegende Arbeit sowie alle dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im Labor für lymphozytäres Signaling und Onkoproteom, Klinik I für Innere Medizin des Klinikums der Universität zu Köln von August 2007 bis Oktober 2011 in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. med. Marco Herling von mir unter seiner Anleitung durchgeführt.

## **Danksagungen**

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei all denen bedanken, die mich bei meiner Promotion in jeglicher Form unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Marco Herling für die Überlassung des interessanten Themas und die ausgezeichnete Betreuung bei den Versuchsdurchführungen und der Erstellung der Publikation.

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Michael Hallek danke ich dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, die vorliegende Forschungsarbeit in der Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln durchführen zu können.

Dr. Jorge Boucas möchte ich besonders für die Zusammenarbeit und Hilfe bei der Erstellung der Publikation danken.

Für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und das daraus resultierende produktive und angenehme Arbeitsklima danke ich allen meinen Kolleginnen und Kollegen, insbesondere: Dr. Jorge Boucas, Hannes Beckert, Dr. Nils Lilienthal, Petra Mayer und vielen anderen.

Bei Robert Doll, Dr. Iris Gehrke, Dr. Marius Stiefelhagen, Nicole Weit und anderen bedanke ich mich für das gewissenhafte Korrekturlesen der Arbeit.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die chronische lymphatische Leukämie</b>	<b>1</b>
1.1.1 Die Definition der Erkrankung und Abgrenzung gegenüber anderen verwandten Entitäten	1
1.1.2 Die Epidemiologie der CLL	1
1.1.3 Die klinischen Aspekte und relevante Aufgabenstellungen für die Grundlagenforschung	2
1.1.4 Die aktuellen Konzepte zur molekularen Pathogenese der CLL	10
<b>1.2 Der B-Zell-Rezeptor(BZR) und seine physiologische Funktion</b>	<b>11</b>
1.2.1 Die BZR-Signalübertragung	11
1.2.2 Die Rolle des BZR in der CLL	13
1.2.3 TCL1A (T-Cell Leukemia 1A) als Regulator des BZR-Signalweges in der Pathogenese der CLL	14
1.2.4 TCL1 A als Koaktivator von AKT	15
1.2.5 EPAC – ein weiterer Interaktionspartner von TCL1A	16
<b>1.3 Die PI3K-AKT-mTOR-Signalübertragung</b>	<b>18</b>
1.3.1 Der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg und seine Rolle in der CLL bzw. allgemein in Krebserkrankungen	19
1.3.2 Die PI3K-Inhibitoren in der klinischen Anwendung der CLL	20
<b>1.4 Die Hypothese und Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>26</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>27</b>

2.1.1	Geräte .....	27
2.1.2	Verbrauchsmaterial .....	28
2.1.3	Chemikalien.....	28
2.1.4	Puffer und Lösungen .....	29
2.1.5	Reagenzien und Nährmedien für die Zellkultur .....	32
2.1.6	Antikörper.....	33
2.1.7	Zelllinien .....	34
2.1.8	Patientenmaterial.....	34
2.1.9	Datenbanken und Computerprogramme.....	35
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>35</b>
2.2.1	Methoden der Zellkultur .....	35
2.2.2	Zytotoxizitätstests .....	38
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	41
2.2.4	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	43
2.2.5	Statistische Auswertung .....	44
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>Die Untersuchungen der Wirksamkeit der Inhibitoren <i>in vitro</i> .....</b>	<b>49</b>
3.1.1	Der Einfluss der untersuchten Substanzen auf das Überleben von CLL-Zellen (Hauptpatientenkollektiv) .....	49
3.1.2	Der Einfluss der Substanzen auf die Viabilität von CLL-Zellen.....	58
3.1.3	Die Charakterisierung der induzierten Apoptose.....	65
<b>3.2</b>	<b>Die Charakterisierung von <i>Responder</i> und <i>Non-Responder</i> CLL Proben</b>	<b>71</b>

3.2.1 Die Korrelation der Ansprechrate der Inhibitoren mit klinisch-pathologischen Parametern .....	71
3.2.2 Die Assoziation der Ansprechrate der Inhibitoren mit TCL1A-Proteinlevel der Tumorzellen.....	83
3.2.3 Die Assoziationen der pAKT-Proteinlevel der Tumorzellen mit der Ansprechrate der Inhibitoren.....	85
<b>3.3 Der Effekt auf AKT und die <i>downstream</i> Moleküle ist PI3K-AKT-mTOR Inhibitor-spezifisch. ....</b>	<b>87</b>
<b>3.4 Beeinflusst TCL1A die Wirksamkeit der Inhibitoren? .....</b>	<b>93</b>
3.4.1 TCL1A beeinflusst die Wirkung der Standardchemotherapeutika <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	93
3.4.2 TCL1A beeinflusst die Wirksamkeit der PI3K-AKT-mTOR Inhibitoren <i>in vitro</i> .....	95
3.4.3 Das Maß der mTOR-Inhibition durch Rapamycin ist abhängig vom TCL1A-Status und zellulärer Aktivierung .....	99
3.4.4 Die selektive Inhibition von AKT beeinflusst die Bildung der TCL1A-AKT Komplexe..	99
<b>4. Diskussion</b>	<b>102</b>
<b>4.1 Die PI3K-AKT-mTOR-Inhibition in der CLL und der Einfluss von TCL1A auf die Wirksamkeit der Inhibitoren .....</b>	<b>104</b>
4.1.1 Die Apoptoseinduktion durch PI3K-AKT-mTOR Inhibitoren variiert in der CLL .....	104
4.1.2 Der Nachweis der induzierten Apoptose .....	105
4.1.3 Die untersuchten Inhibitoren wirken zielgerichtet und spezifisch.....	107
4.1.4 Ist das zytotoxische Potential gegen gesunde Zellen gerichtet? .....	110
4.1.5 TCL1A-/pAKT-Level beeinflussen die Wirksamkeit der Inhibitoren .....	112
<b>4.2 Die Bedeutung der Ergebnisse für die experimentellen Therapieansätze in der CLL .....</b>	<b>114</b>

4.2.1 Die Assoziation der Wirksamkeit der Inhibitoren mit etablierten prognostischen Faktoren wie klinisch-pathologische Tumor-Parametern.....	114
4.2.2 Die Umgehung von Resistenzen durch PI3K-AKT-mTOR Inhibitoren gegenüber der Standardchemotherapie .....	115
<b>4.3 Ausblick .....</b>	<b>118</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>119</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>120</b>
<b>7. Vorabveröffentlichung von Ergebnissen</b>	<b>142</b>
<b>8. Lebenslauf</b>	<b>143</b>



# Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-Actinomycin
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Caspase	Cysteine-dependent aspartate-directed protease
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
°C	Grad Celsius
CIRS	Cumulative illness rating scale
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
4EBP1	Eukaryotic translation factor 4E-binding protein 1
ECL	Enhanced chemiluminescence
EPAC	Exchange protein directly activated by cAMP
FACS	Fluorescent activated cell sorter
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FKBP12	FK506 binding protein 1A, transient variant 12A
g	Gramm
HRP	Horse radish peroxidase
IC50	Half maximal inhibitory concentration
IGHV	Immunglobulin heavy chain variable region
IRS-1	Insulin receptor substrate-1
kDa	Kilodalton
l	Liter
LD50	Lethal dose, 50%

LDT	Lymphocyte doubling time
M	Molarität
MCL1	Myeloische Zelleukämie-1
MCL	Mantelzelllymphom
min	Minute
mTOR	Mammalian target of rapamycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PB	Peripheral blood
PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	Phosphate buffered saline-Tween 20
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PDPK1/2	Phosphoinositide-dependent protein kinase 1/2
pH	Negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PIP2	Phosphatidylinositol-3,4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Protein kinase A
RPMI medium	Roswell Park Memorial Institute medium
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulphate (Natriumdodecylsulfat)
s	Sekunde
S6K	S6 Kinase
TCL1A	T-cell leukemia 1 A
T-NHL	T-Zell non-HodgkinLymphom

T-PLL

T-Zell Prolymphozytenleukämie

SEM

Standard error of the mean

WBC

White blood cell

ZAP70

Zeta associated protein kinase 70

## 1. Einleitung

### 1.1 Die chronische lymphatische Leukämie

#### 1.1.1 Definition der Erkrankung und Abgrenzung gegenüber anderen verwandten Entitäten

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist eine maligne Erkrankung der reifen Lymphozyten und damit eine Unterform der Non-Hodgkin-Lymphome. Sie ist charakterisiert durch die Anreicherung an reifen, immuninkompetenten B-Zellen, die sich in der Milz, im peripheren Blut und in anderen Organen befinden. Die CLL ist charakterisiert durch: die Lymphozytenzahl  $> 5000/\mu\text{l}$  im peripheren Blut, die Anwesenheit von CD19/CD5/CD23 positiven B-Zellen und weniger als 55 % zirkulierende Prolymphozyten (47, 55, 93). Gemäß der Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist die CLL immer zu 95 % eine Erkrankung der B-Zellen, daher wird statt von einer B-CLL nur noch von einer CLL gesprochen. Die aktuelle Bezeichnung der früheren T-CLL, welche die übrigen 5 % ausmacht, ist T-PLL (T-Zell-Prolymphozytenleukämie) (55).

#### 1.1.2 Die Epidemiologie der CLL

Die CLL ist eine vornehmliche Erkrankung von älteren Menschen und die am häufigsten auftretende Leukämie bei Erwachsenen der westlichen Länder (130). Die Inzidenz in den westlichen Ländern beträgt 5 pro 100000 Einwohner. Das mediane Erkrankungsalter der CLL liegt bei 70 Jahren, wobei Männer häufiger erkranken als Frauen (130). Es wird jedoch berichtet, dass 10 % der CLL-Patienten jünger sind als 55 (48).

### **1.1.3 Die klinischen Aspekte und relevante Aufgabenstellungen für die Grundlagenforschung**

#### **1.1.3.1 Symptomatik**

Die CLL verläuft in den Frühstadien meist asymptomatisch und wird daher häufig erst spät durch einen Zufallsbefund diagnostiziert. Zu den Symptomen gehören Lymphknotenschwellungen und Befall vieler Lymphknotenregionen, meist axillär und lingual. Zudem werden von den Patienten häufig unspezifische Allgemeinsymptome wie körperliche Abgeschlagenheit, Müdigkeit, Fieber, Gewichtsverlust, Nachtschweiß und Leistungsminderung angegeben. Fieber, Gewichtsverlust und Nachtschweiß gehören zu den B-Symptomen. Zusätzlich können eine Anämie, Leukozytose, Leber- und Milzvergrößerung vorliegen (47, 93).

#### **1.1.3.2 Diagnostik**

Die CLL wird meist durch eine Routineuntersuchung diagnostiziert, charakteristisch ist eine erhöhte Lymphozytenzahl im peripheren Blut. Die Diagnose einer CLL ist durch zwei Kriterien erwiesen: zum einen, wenn mindestens 3 Monate lang eine anhaltende Lymphozytose von mindestens  $5 \times 10^3$  Lymphozyten/ $\mu\text{l}$  im peripheren Blut vorliegt (55). Der Zellklon wird durchflusszytometrisch immunophänotypisiert. Zum anderen lassen sich CLL-Zellen unter dem Mikroskop als kleine Lymphozyten mit schmalen Zytoplasmasaum, dichtem Kern und teilweise verklumptem Chromatin ohne Nukleolen nachweisen. In der Durchflusszytometrie ist die Koexpression der B-Zell-Antigene CD19, CD20 und CD23 sowie CD5 typisch für die CLL (40, 46, 49, 87). Die Oberflächen-Antigene CD20 und CD79b werden schwach exprimiert im Vergleich zu gesunden B-Zellen. Daneben dienen die folgenden Serumparameter dem Staging und der Therapieinitiierung: Laktatdehydrogenase, Bilirubin, Serum-Immunglobulin und der direkte Antiglobulintest (DAT) (48, 55). Zusätzlich wird empfohlen, vor Therapiebeginn eine FISH-Analyse zur Identifizierung zytogenetischer Abnormalitäten, wie etwa der 17p- oder 11q-Deletion, durchzuführen.

## 1.1.3.3 Stadieneinteilung nach Binet und Rai

Um das mediane Überleben der CLL-Patienten abzuschätzen, wurden zwei Stagingssysteme entwickelt: Binet und Rai (13, 163). In Europa klassifiziert man diese vorwiegend nach den Kriterien von Binet, in Nordamerika hingegen eher in Anlehnung an die Kriterien von Rai. Diese ermöglichen die Einteilung in jeweils drei verschiedene Risikogruppen, um so die optimale Therapie auszuwählen und den Therapieerfolg einzuschätzen. Infolgedessen erlaubt die Einteilung nach Rai und Binet eine erste Prognoseabschätzung (12). Aus heutiger Sicht dagegen liefern neue Parameter (siehe Seite 4) eine viel genauere Prognoseabschätzung und Risikostratifizierung (51).

**Tabelle 1: Stadieneinteilung der CLL nach Binet**

Binet-System	Definition	Medianes Überleben
Binet A	Hb $\geq$ 10,1 g/dl, Thrombozyten $\geq$ $100 \times 10^9/l$ , weniger als drei Lymphknoten sind befallen	> 10 Jahre
Binet B	Hb $\geq$ 10,1 g/dl, Thrombozyten $\geq$ $100 \times 10^9/l$ , wenn mehr als drei Lymphknoten befallen sind	> 8 Jahre
Binet C	Hb < 10,0 g/dl, Thrombozyten < $100 \times 10^9/l$	6,5 Jahre

**Tabelle 2: Stadieneinteilung der CLL nach Rai**

Rai-System	Definition	Medianes Überleben
Niedriges Risiko Rai 0	Lymphozytose > 15x10 <sup>9</sup> /l	> 10 Jahre
Intermediäres Risiko Rai 1 Rai 2	Lymphozytose und Lymphadenopathie, Lymphozytose und Hepatomegalie und/oder Splenomegalie mit/ohne Lymphadenopathie	> 8 Jahre
Hohes Risiko Rai 3 Rai 4	Lymphozytose und Hb < 11.0 g/dl mit/ohne Lymphadenopathie/Organomegalie  Lymphozytose und Thrombozytopenie < 100x10 <sup>9</sup> /l mit/ohne Lymphadenopathie/Organomegalie	6,5 Jahre

### 1.1.3.4 Prognostische Faktoren

Die Erkrankung kann sehr variabel verlaufen. In extremen Fällen kann sie sehr schnell zum Tode des Erkrankten führen oder Patienten überleben 10 Jahre ohne Komplikationen. Dazwischen gibt es eine Vielzahl von anders gelagerten Patienten-Fällen. Prognosefaktoren spielen daher eine bedeutende Rolle in der Vorhersage von Therapiebeginn, Therapieantwort und Überleben (35, 46, 47, 69).

### **IGHV-Mutationsstatus**

CLL-Patienten, die ein unmutiertes IGHV-Gen aufweisen, zeigen eine ungünstige Prognose mit einer aggressiven Form der CLL und einem rascheren Krankheitsverlauf. Dagegen zeigen CLL-Patienten mit einem mutierten IGHV-Gen eine eher langsamere Progression (46, 63). Die Untersuchung des IGHV-Mutationsstatus ist Bestandteil der Routinediagnostik. Man identifizierte Surrogatparameter, wie die Expression von CD38 oder ZAP70, die mit dem Mutationsstatus korrelieren (102, 164).

### **CD38- und ZAP70-Expression**

ZAP70, das zeta-assoziierte Protein 70, ist eine Protein-Tyrosin-Kinase, die eigentlich von T-Zellen exprimiert wird. Die Expressionen von ZAP70 und CD38 korrelieren mit dem IGHV-Mutationsstatus (15, 88, 165). CLL-Zellen mit unmutiertem IGHV-Gen exprimieren nahezu immer ZAP70 (202) und oft CD38 (87). Den (hiervon) betroffenen Patienten werden ein rascher Krankheitsverlauf und eine verringerte Lebensdauer prognostiziert (102, 164).

### **Serum-Thymidinkinase und Serum- $\beta$ 2-Mikroglobulin**

Erhöhte Werte für Serum-Thymidinkinase ( $> 7,0$  U/l) und Serum- $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $> 3,5$  mg/l) sind ein Hinweis auf eine ungünstige Prognose (68, 70). Wierda et al. zeigten anhand eines „Nomogramms“, dass das Überleben abhängig von dem Serum- $\beta$ 2-Mikroglobulin und Alter ist (201). Die Thymidinkinase ist ein Enzym, welches an der DNA-Synthese beteiligt ist. Die Konzentration der Thymidinkinase lässt eine Aussage über die Teilungsaktivität von Zellen zu.

### **Lymphozytenverdopplungszeit**

Die Dynamik der Erkrankung wird durch die Lymphozytenverdopplungszeit (LDT) festgestellt. Die LDT wurde in vielen klinischen Studien als prognostischer Wert belegt, daher zeigt eine LDT unter 12 Monaten einen rascheren Krankheitsverlauf an (131) und wird oft als Parameter zur Entscheidung zum Therapiebeginn hinzugezogen.

## Zytogenetik

Die klassische zytogenetische Untersuchung wurde durch Chromosomenbänderanalyse festgestellt. Demgegenüber wird heutzutage die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) an Interphasekernen verwendet, um zytogenetische Abnormalitäten, wie zum Beispiel eine 17p- oder 11q-Deletion in der CLL, festzustellen (52, 191). Das Auftreten von Chromosomenanomalien scheint eine schlechtere Prognose als ein normaler Karyotyp zu begünstigen; noch ungünstiger für die Prognose wäre das Auftreten komplexer Karyotypanomalien (144, 145). Die Trisomie 12 gehört zu den häufigsten zytogenetischen Anomalien, sie ist verbunden mit einer kürzeren Überlebenszeit sowie kürzeren therapiefreien Intervallen (106). Döhner et al. konnten das Vorliegen von chromosomalen Aberrationen in 268 (von 325) Fällen nachweisen (51). Sie klassifizierten diese Aberrationen statistisch in fünf Kategorien: 17p-Deletion, 11q-Deletion, Trisomie 12, normaler Karyotyp und isolierte 13q-Deletion. Patienten mit einer 17p- oder 11q-Deletion haben eine schlechte Prognose mit fortschreitender Erkrankung, dieser Zustand geht mit einem unmutierten IGHV-Mutationsstatus einher (53). Patienten mit einer 13q-Deletion haben eine günstige Prognose, dieser Zustand korreliert mit einem mutierten IGHV-Mutationsstatus.

### 1.1.3.5 Die Therapie der CLL

Es gibt drei grundsätzliche Möglichkeiten der Primärtherapie: Die reine Beobachtung ohne Therapie (*watch and wait*) empfiehlt sich besonders bei Patienten im frühen Krankheitsverlauf mit positivem Risikoprofil; es sollten hier alle 3 bis 12 Monate Kontrollen der Blutwerte sowie eine ärztliche Untersuchung stattfinden. Bei jüngeren Patienten hat man als Therapieziel, das krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben zu verlängern, dabei kann eine Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender allogener Stammzelltransplantation in Betracht gezogen werden. Die Therapieauswahl erfolgt hierbei nach den folgenden Kriterien: Fitness-Score und Komorbidität der Patienten, individuelle prognostische Risikofaktoren, Rai- oder Binet-Stadium der Erkrankung (69). Patienten in frühen Stadien (Binet A/B, Rai 0-II), die keine Symptome zeigen, brauchen keine Therapie („*watch and wait*“). Patienten mit fortschreitender, symptomatischer Erkrankung, die nach Binet C, Rai III-4 (1.1.3.3, Seite 3) eingeteilt wurden, sollten umgehend therapiert werden. Dabei sollte auch die körperliche Verfassung in Betracht gezogen werden. Patienten, die sich in guter körperlicher Verfassung befinden („*go go*“), normale Kreatininclearance und einen niedrigen Wert in der CIRS („*cumulative illness rating scale*“) (57) aufweisen, sollten

eine FCR-Kombinationstherapie (1.1.3.5.1, Seite 7) erhalten. Patienten, die eine relevante Komorbidität zeigen („slow go“), sollten Chlorambucil, Bendamustin oder ein dosisreduziertes FCR-Regime erhalten. Patienten mit symptomatischer Erkrankung, die darüber hinaus noch eine Deletion 17p oder p53-Mutation aufweisen, sprechen schlecht auf Fludarabin oder FC an (50). Diese Patienten werden mit einer Alemtuzumab-Monotherapie oder FCR behandelt; so erreicht man eine 50%ige *Response*.

### 1.1.3.5.1 Die Standardtherapie der CLL

Die Kombination aus Fludarabin, Cyclophosphamid und Rituximab (FCR) gilt als Standardtherapie bei körperlich fitten CLL-Patienten, mit der die Gesamtüberlebensrate gesteigert werden kann (55, 69). Chlorambucil oder Bendamustin gelten als Standardtherapie bei Patienten mit einer relevanten Komorbidität (101).

Im Folgenden werden die drei Monosubstanzen kurz beschrieben.

**Fludarabin** hemmt in seiner Eigenschaft als Purinantimetabolit die DNA-Polymerase; Stoffwechsel und Zellteilung werden mit proapoptotischen Eigenschaften gestört (65, 203).

Mit Fludarabin erzielt man relativ hohe Rate an Komplettremissionen, besonders bei vorher unbehandelten Patienten (162). Fludarabin weist als eine der Hauptnebenwirkungen eine Myelosuppression und Immunsuppression auf.

**Cyclophosphamid** gehört zu den Alkylantien, es handelt sich um eine nicht aktive Form (Prodrug). Es wird in der Leber mittels des Cytochrom-P450-Systems in die aktive Form überführt, und zwar in 4-Hydroxycyclophosphamid. Dieser Wirkstoff ist chemisch stabil und überträgt Alkylreste auf körpereigene Strukturen. Es kommt zur Alkylierung der DNS, wodurch Zellteilungsvorgänge gehemmt werden. Cyclophosphamid verursacht weniger häufig Thrombozytopenien als andere Zytostatika und kann daher auch bei thrombozytopenen Patienten eingesetzt werden (130, 183).

**Rituximab** ist ein chimärer anti-CD20-Antikörper. CD20 spielt als Zielgen für die Regulation des Zellzyklus und der Zelldifferenzierung eine Rolle (178, 183). Es ist auf normalen und malignen B-Lymphozyten zu mehr als 90 % in unterschiedlicher Expression vorhanden, fehlt aber auf nicht hämatologischen Zellen, B-Progenitor-Zellen, Plasmazellen, T-Lymphozyten, Monozyten, dendritischen Zellen und pluripotenten Stammzellen. Als einige der wichtigsten Nebenwirkungen von Rituximab sind Fieber, Schüttelfrost, Atembeschwerden und Hautausschläge zu nennen.

**Chlorambucil** ist ebenfalls eine alkylierende Substanz, die oral verabreicht wird. Bei Patienten mit einer relevanten Komorbidität gilt **Chlorambucil** als Standardtherapie, alternativ sind auch die Gabe dosisreduzierter Purinanaloga im FC- oder FCR-Regime oder die Therapie mit Bendamustin möglich. Die Gabe von Chlorambucil zeichnet sich durch eine geringe Toxizität aus; es können jedoch als Nebenwirkungen Knochenmarksdepression oder Anämie auftreten oder eine Lungenfibrose kann sich abzeichnen.

**Bendamustin** gehört gleichfalls zu den alkylierenden Substanzen, es ist dem Chlorambucil chemisch sehr ähnlich, ist jedoch wasserlöslich (5). Bendamustin wird vermehrt bei soliden Tumoren und Lymphomen eingesetzt (91). Bendamustin besitzt ein gutes Nebenwirkungsprofil innerhalb der Alkylanzien.

### **1.1.3.5.2 Die Therapie bei rezidierten und therapieresistenten CLL-Patienten**

**Alemtuzumab** ist ein humaner anti-CD52-Antikörper. Das CD52-Antigen befindet sich auf der Oberfläche von mehr als 95% aller Blutlymphozyten/-Monozyten sowie auf den meisten B- und T-Zell-Lymphomen und in geringen Mengen auf Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten. Stammzellen exprimieren dieses Antigen nicht, daher wird durch den Einsatz von Alemtuzumab die normale Hämatopoese nicht negativ beeinflusst. Dieser Antikörper kommt bei rezidivierter CLL oder primär Fludarabin-refraktärer CLL zum Einsatz (56, 94). Daher ist dieser Antikörper besonders für Hochrisikopatienten geeignet, die eine Deletion 11q, 17p oder eine p53-Mutation aufweisen. Um bei Patienten mit einem starken Fortschreiten der Erkrankung bessere Wirkungen zu erzielen, kann Alemtuzumab mit einem Glucocorticoid kombiniert werden. Als Nebenwirkung weist es eine Infusionsreaktion auf (145).

Trotz dieser Behandlungsansätze bleibt die allogene Stammzelltransplantation die einzige Therapiemöglichkeit mit kurativer Zielsetzung bei Hochrisikopatienten. Aufgrund ihres Charakters kommt diese jedoch nur für einen kleinen Teil der refraktären Hochrisikopatienten infrage, weshalb die Entwicklung neuer Behandlungsansätze hohe Priorität hat (53).

### 1.1.3.5.3 Die neuen Arzneistoffe in der CLL-Therapie

#### **Lenalidomid**

Lenalidomid ist eine immunmodulierende Substanz, die strukturell mit Thalidomid verwandt ist, beide werden zur Behandlung des Multiplen Myeloms eingesetzt (4). Eine Phase-II-Studie von Lenalidomid (NCT00478959) zeigt erste Wirkungen der Substanz bei rezidivierten oder nicht auf eine Standardtherapie ansprechenden Patienten. Weitere Studien werden gegenwärtig durchgeführt, unter anderem wird die Kombination aus Lenalidomid und Rituximab (NCT00783367) untersucht.

#### **Flavopiridol**

Flavopiridol ist ein synthetisches Flavon; dabei handelt es sich um einen Kinase-Inhibitor, der die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) inhibiert. Flavopiridol zeigte Wirkung bei Hochrisikopatienten mit rezidivierter CLL (23, 157) in einer Phase-II-Studie (111). Die Nebenwirkungen sind erstaunlich gering.

#### **Oblimersen**

Oblimersen ist ein BCL2-Antagonist, ein Antisense-Oligonukleotid, der oral verfügbar ist und mehrere Mitglieder der BCL2-Familie inhibiert (141). Dieser wird zum gegenwärtigen Zeitpunkt in Kombination mit Rituximab in einer Phase-II-Studie an Patienten mit B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen untersucht (160). Eine auftretende Thrombozytopenie scheint bisher die einzige Nebenwirkung zu sein.

#### **Ofatumumab**

Ofatumumab ist ein humaner, monoklonaler CD20-Antikörper (Wirkmechanismus von CD20-Antikörpern (1.1.3.5.1, Seite 7). Dieser zeigte Wirkung bei CLL-Patienten (140), die refraktär auf Fludarabin und Rituximab reagierten (200, 136). Derzeit wird eine Kombination von Ofatumumab mit FC an unbehandelten Patienten untersucht (200).

#### **GA101**

Bei GA101 handelt es sich ebenso um einen monoklonalen CD20-Antikörper. Dieser Wirkstoff ist der erste monoklonale CD20-Antikörper, der durch *Glykoengineering* (Glykosylierung) optimiert wurde. Der Wirkstoff wird zur Therapie wiederkehrender und therapieresistenter Non-Hodgkin-Lymphome eingesetzt (38). Im Vergleich zu Rituximab

zeigte er *in vitro* eine erhöhte antikörperabhängige Zytotoxizität, aber gleichzeitig eine erhöhte Induktion von Zelltod (14). GA101 weist ein ähnliches Sicherheitsprofil auf wie Rituximab. Derzeit wird sowohl GA101 als Monotherapie als auch die Kombination von GA101 mit Chlorambucil in einer Phase-II-Studie der GCLLSG (CLL11) durchgeführt.

### 1.1.4 Die aktuellen Konzepte zur molekularen Pathogenese der CLL

Die genaue Krankheitsursache ist weitgehend unbekannt, Vererbungsfaktoren scheinen eine Rolle zu spielen. Daher erkranken Kinder von CLL-Patienten häufiger an einer CLL oder an einem anderen Non-Hodgkin-Lymphom als die Normalbevölkerung. Die CLL verläuft sehr heterogen, das mediane Überleben liegt zwischen 2 bis 20 Jahren (47, 93).

Die Erkenntnis über die Ursprungs- oder Vorläuferzelle der CLL ist bedeutsam für das Verständnis der Pathogenese der Erkrankung (31). Sie liefert Hintergründe über die Umwandlung einer gesunden B-Zelle in eine maligne CLL-Zelle. Die hämatologische pluripotente Stammzelle entwickelt sich in der normalen B-Zell-Entwicklung zur reifen B-Zelle und schließlich zur Antikörper-sezernierenden Plasmazelle oder zur Memory-B-Zelle (99). Eine Theorie, die noch nicht endgültig bewiesen wurde, besagt, dass die CLL aus naiven B-Zellen entstehe, die sich zu Antigen-erfahrenen B-Zellen entwickelten. Diese Differenzierung kann entweder abhängig vom Keimzentrum und von T-Zellen stattfinden, aber auch unabhängig von diesen verlaufen. Wenn sich die naiven B-Zellen abhängig vom Keimzentrum und von T-Zellen entwickeln, entstehen Antigen-erfahrene B-Zellen und nach genetischer Aberration Marginalzonen- und Memory-B-Zellen mit einer Mutation in der variablen Genregion der Immunglobulin-Ketten (IgV) (147). Diese zeigen gleichzeitig eine fehlende Expression der Tyrosinkinase ZAP70 und des Glykoproteins CD38 (36). Verläuft die Differenzierung zu Antigen-erfahrenen-B-Zellen unabhängig vom Keimzentrum und von T-Zellen, fehlt die entsprechende Mutation in der variablen Genregion der Immunglobulin-Schwerketten (IGHV). Diese CLL-Zellen zeigen gleichzeitig eine erhöhte Expression von ZAP70 und CD38 an (41, 45, 202).

Die Prognose für Patienten mit einem unmutierten IGHV-Gen ist schlechter.

Der B-Zell-Rezeptor (BZR, *B-cell receptor*), der während der normalen B-Zellreifung entwickelt wird, besitzt eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der CLL (99). Denn während der B-Zelldifferenzierung spielen Signale, die über ihn vermittelt werden, eine entscheidende Rolle. Der BZR setzt sich während der B-Zellreifung aus leichten und schweren Ketten der Oberflächenimmunglobuline zusammen, die nicht kovalent mit einem

Dimer aus CD79A(Ig $\alpha$ )/CD79(Ig $\beta$ ) assoziiert sind. Während der BZR zusammengesetzt wird, unterziehen sich die Zellen genetischen Veränderungen. Als Konsequenz entstehen CLL-Zellen, die entweder ein mutiertes oder ein unmutiertes IGHV der Schwer- und IGLV der Leichtkette tragen.

Die zu erzielenden Therapieerfolge der CLL werden mit der Heterogenität der CLL in Verbindung gebracht, aber auch mit der Aktivierung verschiedener Signalwege. Einer dieser bedeutenden Signalwege in der CLL ist der BZR-Signalweg, der eine Rolle in der Prognose der CLL spielt und von dem zu erzielenden Therapieerfolg stark abhängig zu sein scheint (189, 130). Es wird postuliert, dass die Signalweiterleitung durch den BZR das Fortschreiten der CLL begünstigt (147). So kann das Fortschreiten der CLL sowohl abhängig von der BZR-Signalweiterleitung als auch unabhängig von ihr verlaufen (108). Der BZR hat eine enorme Bedeutung im Hinblick auf die Beibehaltung/Erhaltung und Ausdehnung des CLL-Klones (21).

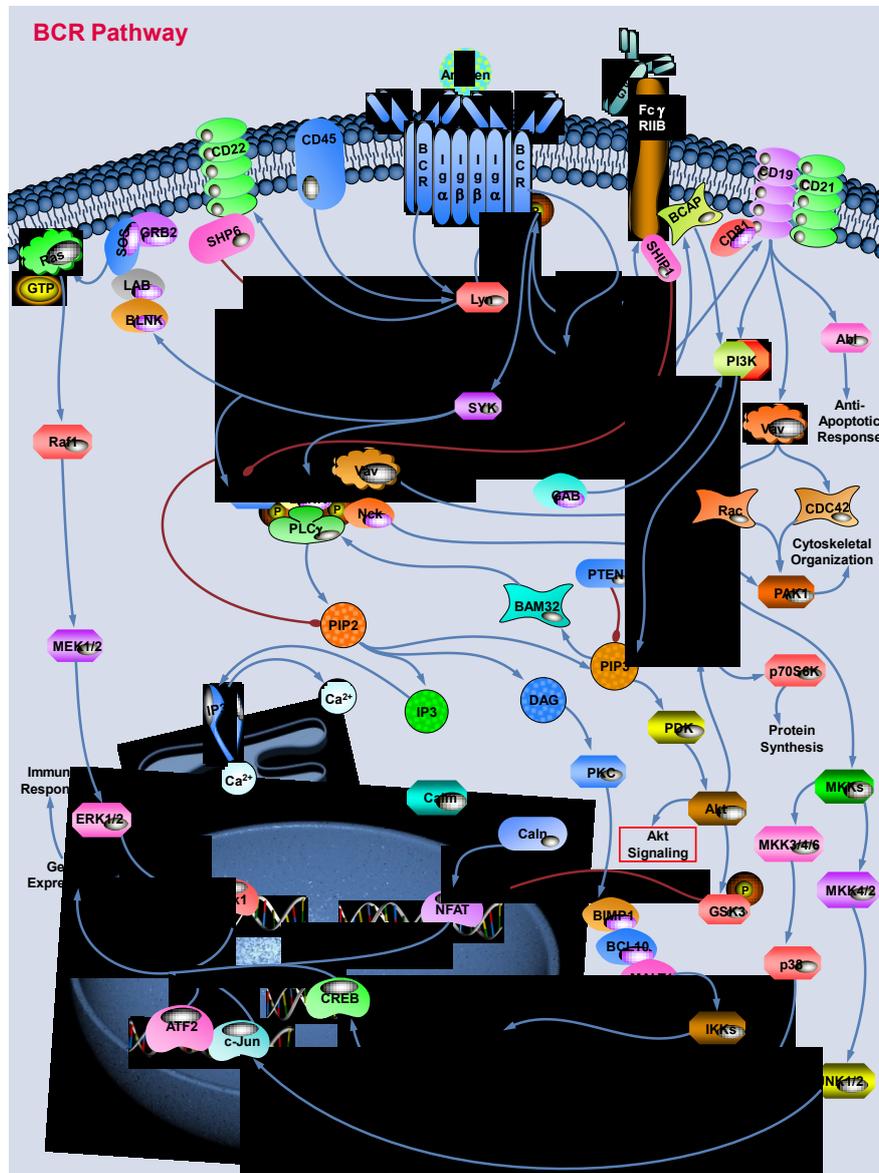
### **1.2 Der B-Zell-Rezeptor (BZR) und seine physiologische Funktion**

B-Zellen erkennen Antigene an deren BZR. Diese Antigene besitzen spezifische Epitope, somit sind es keine Liganden, sondern deren Struktur ist unveränderlich. Das Erkennen bzw. Andocken von Antigenen an dem BZR involviert die „BZR-Aggregation“ und die Aktivierung von intrazellulären Effektorproteinen (99). Phenotypische und genotypische Alterationen definieren die Ansprechrate zu jenem besonderen Stimulus. Der BZR setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen – dem membrangebundenen Oberflächenimmunglobulin (Ig), das als Antigenbindungsdomäne fungiert, und einem Heterodimer aus CD79A(Ig $\alpha$ )/CD79(Ig $\beta$ ) – welches als signalübertragende Einheit fungiert. Der initiierende Schritt, der die komplexe Signalkaskade in Gang setzt (Abbildung 1, Seite 11), ist die auf Tyrosin basierende Phosphorylierung der Ig $\alpha$ - und Ig $\beta$ -Strangleinheiten.

#### **1.2.1 Die BZR-Signalübertragung**

BZR-Stimulation durch Antigenbindung führt zur Rekrutierung und Aktivierung/Phosphorylierung der SYK-Kinasen (103). Es folgt eine Calciummobilisation, eine Aktivierung von PLC $\gamma$ 2, ERK, NF- $\kappa$ B und AKT (92, 39); diese *downstream*-Kinasen sind ebenfalls sehr bedeutend für die BZR-Signalweiterleitung. Die Aktivierung von AKT ist wichtig für das Überleben und die Proliferation von Zellen. Dies wird durch Inaktivierung des

proapoptotischen Moleküls BCL2 oder Aktivierung des antiapoptotischen Proteins MCL2 vermittelt. Man erhält bei einer Überexpression von ZAP70 und CD38 in CLL-Zellen nach vorheriger BZR-Stimulation eine vermehrte Calciummobilisation (27, 28) und vermehrte Phosphorylierung/Aktivierung von SYK, BLNK und PLC $\gamma$ 2 (92).



**Abbildung 1: Die BZR-Signalkaskade.**

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods. Sie wird durch verschiedene Signale beeinflusst, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone oder Toxine. Es ist gewissermaßen ein Selbstmordprogramm, welches für eukaryotische Zellen essentiell ist. Denn auf diese Weise werden defekte oder entartete Zellen kontrolliert aus dem Zellpool entfernt. Während der Apoptose werden Mitglieder der Enzymfamilie der Caspase (Aspartat-spezifische Cysteiny-Proteasen) aktiviert. Die Caspasen 3/7/6 gehören zu den

Effektorcaspasen, die wiederum von den Initiatorcaspasen (Caspase 2/8/9/10) aktiviert werden. Diese kaskadenartige Aktivierung führt zu verschiedenen Spaltprodukten, die das apoptotische Programm ausführen, zum Beispiel PARP (Poly(ADP-ribose)-Polymerase). Die Apoptose ist in vielen Krebszellen defekt und kann nicht ausgeführt werden. Tumorzellen wie CLL-Zellen entwickeln eine Resistenz gegenüber der Einleitung der Apoptose, so dass diese Zellen nicht eliminiert werden können.

Man fand eine Überexpression von BCL2 in der CLL (72). MCL1 gehört zur BCL2-Familie und ist ebenfalls antiapoptotisch wirksam. Erhöhte Level des antiapoptotischen Proteins MCL1 führen zu Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika und sagen eine schlechte Prognose voraus (98). Die Herunterregulierung von MCL1 mittels siRNA führt zur Apoptose in der CLL (117). Auf diese Weise wird der antiapoptotische Effekt, der durch BZR-Stimulation ausgelöst wird, verhindert (117). Eine konstitutive Aktivierung von AKT in der CLL führt zur Induktion der MCL1-Expression und zu anschließendem Zellüberleben. Aufgrund dessen kann die pharmakologische Inhibierung der PI3K-AKT-Aktivität die MCL1-Level vermindern und die Apoptose fördern (147).

### 1.2.2 Die Rolle des BZR in der CLL

CLL-Zellen exprimieren niedrige Level an Oberflächenimmunglobulinen ((s)-Ig), besonders IgM. Das *Crosslinking* des BZR mit unterschiedlichen Formen von anti-IgM führt zu einer unterschiedlichen Wirkung in CLL-Zellen (133). Die Stimulierung mit löslichem anti-IgM induziert Apoptose, wohingegen immobilisiertes anti-IgM Apoptose verhindert (147). Eine mögliche Erklärung könnte die Dauer der Stimulierung sein. Lösliche anti-IgM-Antikörper werden rasch (Dauer der Stimulierung 2 h) durch den Rezeptor internalisiert, wohingegen bei der Stimulierung mit immobilisiertem anti-IgM-Antikörper 24 h nötig sind (147). Die Stimulation mit immobilisiertem anti-IgM erhöht das Zellüberleben und unterdrückt die durch Fludarabin induzierte Apoptose (156). Erhöhtes Überleben durch Stimulation mit immobilisiertem anti-IgM ist assoziiert mit einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B, ERK und AKT (156). Die durch Stimulation mit löslichem anti-IgM ausgelöste Apoptose wird hauptsächlich durch BCL2- oder MCL1-Proteine reguliert (98, 156).

Aus einer Stimulation des BZR von CLL-Zellen *in vitro* mit anti-IgM resultiert ein heterogenes Ansprechen. Die BZR-Signalkapazität (*in vivo*) ist *in vitro* reversibel durch Stimulation mit sIgM, hängt jedoch von der Menge des sIgM ab (129). CLL-Zellen, die sich aus

Präkeimzentrumszellen entwickeln, zeigen eine intakte – aber funktional abnorme – BZR-Signalweiterleitung.

Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte Expression von CD79B, ZAP70, TCL1A und PKC $\beta$ II die *Response* zu einer BZR-Stimulation mit anti-IgM modulieren kann (147). Daher dient die Bestimmung der CD79B-/ZAP70- oder TCL1A-Expression mittels Durchflusszytometrie als *Read-outs* für ein Ansprechen auf eine BZR-Stimulation.

Somit ist die BZR-Signalkapazität abhängig von prognostischen Faktoren, wie zum Beispiel einem unmutierten IGHV-Gen oder einer ZAP70- und CD38-Expression (27, 215). CLL-Fälle, bei denen das IGHV-Gen unmutiert ist, lassen sich durch anti-IgM stimulieren und zeigen dabei eine erhöhte BZR-Signalkapazität (169, 215). Jedoch lassen sich CLL-Fälle, bei denen das IGHV-Gen mutiert ist, nicht durch anti-IgM stimulieren und zeigen dabei keine BZR-Signalkapazität (169). Aufgrund dessen lassen sich Fälle, deren BZR nicht aktiv ist, in unterschiedliche Gruppen einteilen (134); zum Beispiel weisen sie niedrige TCL1A- und pAKT-Werte (78) auf.

Damit wird die BZR-Signalkapazität auch durch TCL1A, SYK, LYN, AKT und PI3K beeinflusst. So wurde veranschaulicht, dass die p110 $\delta$ -Untereinheit der PI3K mit dem Ansprechen einer BZR-Stimulation assoziiert ist (22, 110). Die Inhibition der p110 $\delta$ -Untereinheit mittels spezifischer Inhibitoren nach vorheriger BZR-Stimulation bewirkt eine effektive Blockade des PI3K-Signalweges. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die p110 $\delta$ -Untereinheit die B-Zellreifung beeinflusst, denn durch Inaktivierung der p110 $\delta$ -Untereinheit wird die Anzahl an Marginalzonen und B1b-Zellen reduziert (110).

### **1.2.3 TCL1A (T-Cell Leukemia 1A) als Regulator des BZR-Signalweges in der Pathogenese der CLL**

Die TCL1-Onkogenfamilie übt eine physiologische Funktion während der frühen Embryogenese und der B-Zelldifferenzierung aus (75). Die TCL1A-Expression wird während der B-Zell- und T-Zell-Rezeptorreifung reguliert (77, 78). Zur TCL1-Onkogenfamilie gehören TCL1A (14 kDa), TCL1B (15 kDa) und MTCP1. In dieser Arbeit geht es in erster Linie um TCL1A. Hierbei handelt es sich um ein 14 kDa-Protein, das weder über die DNA-Bindedomänen noch über enzymatisch aktive Motive verfügt.

Im Entwicklungsstadium der gesunden B-Zelle ist im Präkeimzentrum eine TCL1A-Expression vorhanden, dagegen ist kaum eine TCL1A-Expression im Postkeimzentrum zu finden (172). Das deutet darauf hin, dass TCL1A bei der BZR-Reifung involviert ist (78, 154). TCL1A wurde erstmals in der T-PLL entdeckt, in dessen Pathogenese es auch stark

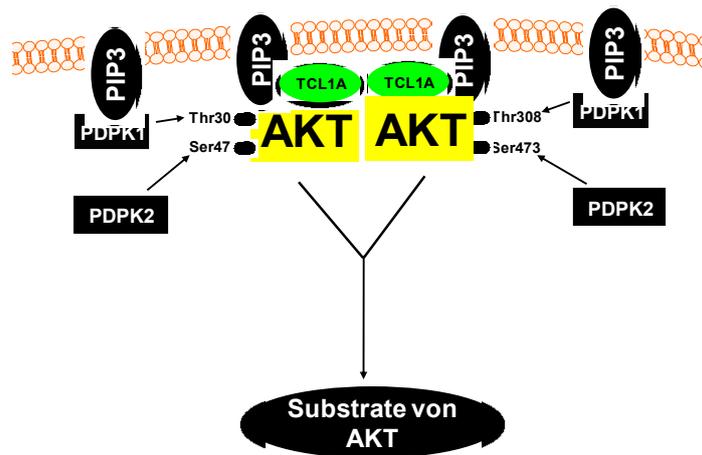
einbezogen ist (151, 196). TCL1A ist in vielen Formen der CLL exprimiert (79, 78), besonders in der aggressiven Form der CLL (155). Patienten, bei denen hohe TCL1A-Level nachgewiesen wurden, starben zeitlich früher oder hatten ein kürzeres progressionsfreies Überleben als Patienten mit kaum nachweisbarem TCL1A nach einer FCR-Therapie (78). TCL1A hat eine klinische Relevanz als Marker einer schlechten Prognose in der CLL, denn TCL1A korreliert mit hohen Leukozytenwerten, einem fortgeschrittenen Binet-Stadium, kurzer LDT, positiver ZAP70-, CD38-Expression, einem unmutierten IGHV-Gen und einer Deletion 11q23 (76, 78). Wir konnten zeigen, dass bei CLL-Zellen, bei denen eine hohe Expression von TCL1A nachgewiesen wurde, eine anhaltende BZR-Signalkapazität festgestellt wurde und eine vermehrte Aktivierung von AKT (77).

Die E $\mu$ -TCL1-Maus gilt allgemein als „CLL-Modell“. In diesem Spektrum wurde das TCL1A-Gen unter der Kontrolle eines B-Zell-spezifischen Promoters integriert (11). Infolgedessen entwickelt diese Maus eine der humanen CLL ähnliche Leukämie, die für die *In-vivo*-Untersuchung der CLL sehr bedeutsam ist. Außerdem stellt das Mausmodell einen Beweis für das onkogene Potential von TCL1A dar.

Ferner fungiert TCL1A als Regulator des BZR-Signalweges und zwar durch seine Eigenschaft, als AKT-Koaktivator tätig zu sein (siehe 1.2.4). Zudem verstärkt TCL1A die NF $\kappa$ B-Aktivität und inhibiert den Transkriptionsfaktorkomplex AP-1 (154).

### **1.2.4 TCL1 A als Koaktivator von AKT**

Es konnte gezeigt werden, dass TCL1A als Koaktivator von AKT fungiert (107, 153), indem es sich an die PH(Pleckstrin Homologie)-Domäne von AKT bindet und dadurch das *downstream*-Signal verstärkt (80). Indem TCL1A die Phosphorylierung von AKT erhöht, herrscht eine vermehrte Kinaseaktivität vor. Dies führt zu einer nuklearen Translokation von AKT. Ferner aktiviert AKT sich selbst, indem sich zwei AKT-Moleküle zu einem Dimer zusammenlagern und sich dabei gegenseitig phosphorylieren (103, 139).



**Abbildung 2: Ausschnitt aus dem PI3K-AKT-mTOR-Signalweg.** TCL1A bindet an der PH-Domäne von AKT und fungiert dabei als AKT-Koaktivator. TCL1A kann indirekt als PDPK2 fungieren, indem sich jeweils zwei Komplexe aus TCL1A gebunden an die PH-Domäne von AKT *vercrosslinken* und sich gegenseitig phosphorylieren. TCL1A fungiert als aktivitätssteigernde Komponente.

Frühere Arbeiten veranschaulichten, dass TCL1A sowohl in der T-PLL als auch in der CLL als AKT-Koaktivator fungiert (76, 77, 104, 153).

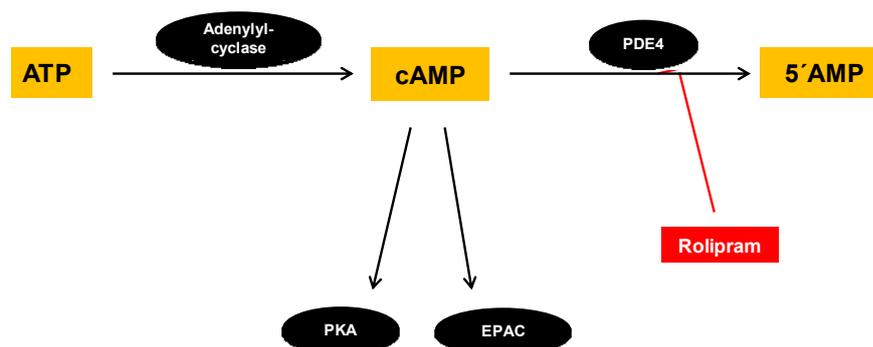
In der CLL korreliert die BZR-Stimulation mit dem Ausmaß der AKT-Phosphorylierung bzw. AKT-Aktivierung, welche durch TCL1A beeinflusst wird. Daher kann postuliert werden, dass TCL1A die B-Zell-induzierte zelluläre Aktivierung durch Interaktion mit AKT reguliert; mit einbezogen sind dabei die folgenden Kinasen: LYN, SYK, ZAP70 und PKC (78).

## 1.2.5 EPAC – ein weiterer Interaktionspartner von TCL1A

EPAC (*Exchange protein activated by cAMP*) gehört zu den Effektorproteinen von cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat); cAMP reguliert eine Vielzahl an Prozessen durch seine zwei Effektorproteine EPAC und Proteinkinase A (PKA) (192) (Abbildung 3). Je nachdem, welches durch cAMP beeinflusst wird (EPAC oder PKA), wird Apoptose oder Proliferation ausgelöst (194, 209). Lerner et al. konnten zeigen, dass der Einfluss eines zellulären cAMP-Level durch einen PDE4 (Phosphodiesterase4)-Inhibitor oder ein cAMP-Derivat Apoptose in der CLL, nicht aber in der T-PLL auslösen konnte (109). Diese Forschergruppe hat ebenfalls zeigen können, dass EPAC synergistisch mit TCL1A interagiert, um die AKT-Aktivierung zu verstärken. Es wird ein AKT-TCL1A-EPAC-Komplex in Makrophagen gebildet (128).

## 1.2.5.1 Rolipram/cAMP induzieren cAMP-Signalweiterleitung

Rolipram/cAMP erhöht die zellulären cAMP-Level. Rolipram reduziert den Abbau des sekundären Botenstoffs cAMP, indem es die PDE4 (Phosphodiesterase4) inhibiert. Der Einsatz von cAMP-Derivaten (109) führt ebenfalls zu einem Anstieg von zellulären cAMP-Spiegeln (siehe Abbildung 3). Induziertes cAMP-Signaling inhibiert die TCL1A-Expression (105). Die Aktivierung von PKA oder PKC (durch cAMP-Aktivierung) führt zur Phosphorylierung von CREB an Ser133; die Promoterbindung von CREB wird verstärkt und rekrutiert den CBP/p300-Koaktivator. TORC2 fungiert als Regulator von CREB; es bindet an CREB und aktiviert die Genexpression (unabhängig von CREB-133). CREB und TORC2 unterdrücken die basale Promoteraktivität von TCL1A (105). Sie konnten zeigen, dass in Abwesenheit von TORC2 eine erhöhte TCL1A-Promotoraktivität vorhanden war. Kuraishy et al. konnten bei einer Koexpression von CREB und TORC2 eine vermehrte Promotoraktivität von TCL1A feststellen (105) und ebenfalls illustrieren, dass TORC2 die TCL1A-Expression reguliert und zwar unabhängig von einer Phosphorylierung an CREB (Ser133) (105).

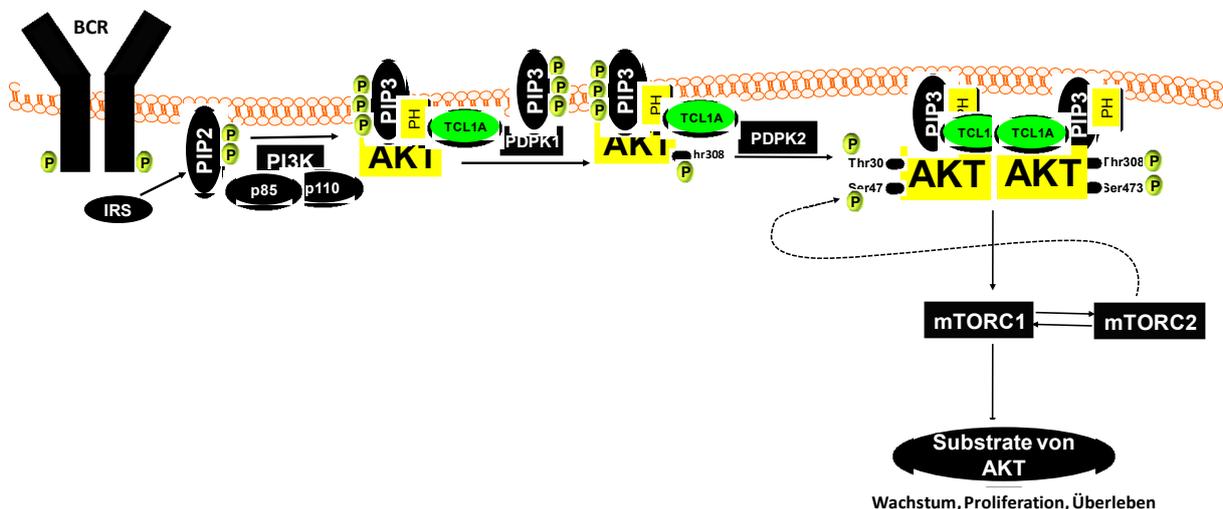


**Abbildung 3: Umwandlung von ATP zu 5' AMP durch verschiedene Kinasen.** Rot eingerahmt ist der PDE4-Inhibitor Rolipram.

Rolipram wurde erstmals zur Behandlung von Depressionen und Multipler Sklerose entwickelt (126, 198), es kam jedoch nicht zur Zulassung. Rolipram gehört zu den ersten Phosphodiesterase-Inhibitoren, die entwickelt wurden. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Rolipram/cAMP Apoptose in der CLL induzieren, jedoch hat Rolipram keinerlei Wirkung an T-Zellen gezeigt (127). Des Weiteren erhöht Rolipram die durch Glucocorticoide induzierte Apoptose in der CLL (195).

### 1.3 Die PI3K-AKT-mTOR-Signalübertragung

Eine Aktivierung des PI3K-AKT-mTOR-Signalweges wird initiiert durch zum Beispiel Stimulierung des BZR oder Aktivierung des CD40-Rezeptors durch den CD40-Liganden. Daraufhin wird eine Kaskade an Phosphorylierungen durch Kinasen in Gang gesetzt wie zum Beispiel die Umwandlung von PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) in PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat) durch die PI3-Kinase (Abbildung 4). Im Anschluss lagert sich die aktivierte PIP3 an die PH-Domäne von AKT, und zwar an der Plasmamembran, an, wodurch der erste Schritt der Aktivierung von AKT initiiert wird, nämlich die Phosphorylierung durch die PDPK1 (*phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) an Threonin308. Der zweite Schritt folgt durch Phosphorylierung an Serin473 durch die PDPK2 (*phosphoinositide-dependent protein kinase 2*) zur vollen AKT-Aktivierung (123).



**Abbildung 4: Der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg in der CLL.** B-Zell-Rezeptor-Stimulation durch verschiedene Stimuli führt zu Wachstum, Proliferation und Überleben. TCL1A fungiert dabei als AKT-Koaktivator. mTORC2 kann als PDPK2 fungieren, indem es pAKT an Serin473 phosphoryliert. Parallel kann TCL1A indirekt als PDPK2 fungieren, indem sich jeweils zwei Komplexe aus TCL1A gebunden an die PH-Domäne von AKT *vercrosslinken* und sich gegenseitig phosphorylieren. TCL1A fungiert als aktivitätssteigernde Komponente.

Die Aktivierung von AKT bewirkt eine Aktivierung bzw. Phosphorylierung der Substrate von AKT. Der in diesem Signalweg beteiligte mTOR-Komplex (*mammalian target of rapamycin*) ist maßgeblich für den intrazellulären PI3K-AKT-mTOR-Signalweg verantwortlich, der die Translation von verschiedenen Proteinen steuert, die den Zellzyklus regulieren (114). Dieser Komplex setzt sich zusammen aus mTORC1 und mTORC2, dabei kann mTORC2 als PDPK2) fungieren, indem es AKT an Serin473 phosphoryliert (123). Der mTOR-Komplex

gehört zu einer etablierten Angriffsstelle (*Target*) für Arzneistoffe in der Krebstherapie (34, 114), da das Rapamycin und seine Analoga bereits in Phase-I-Studien in der Krebstherapie eingesetzt werden (44). Zu den Substraten, die durch AKT-Aktivierung beeinflusst werden, gehören auch die Schlüsselkomponenten der apoptotischen Kaskade. Dabei werden die proapoptischen Proteine inaktiviert und die antiapoptischen Proteine (BCL2, MCL1) hochreguliert (117).

### **1.3.1 Der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg und seine Rolle in der CLL bzw. allgemein in Krebserkrankungen**

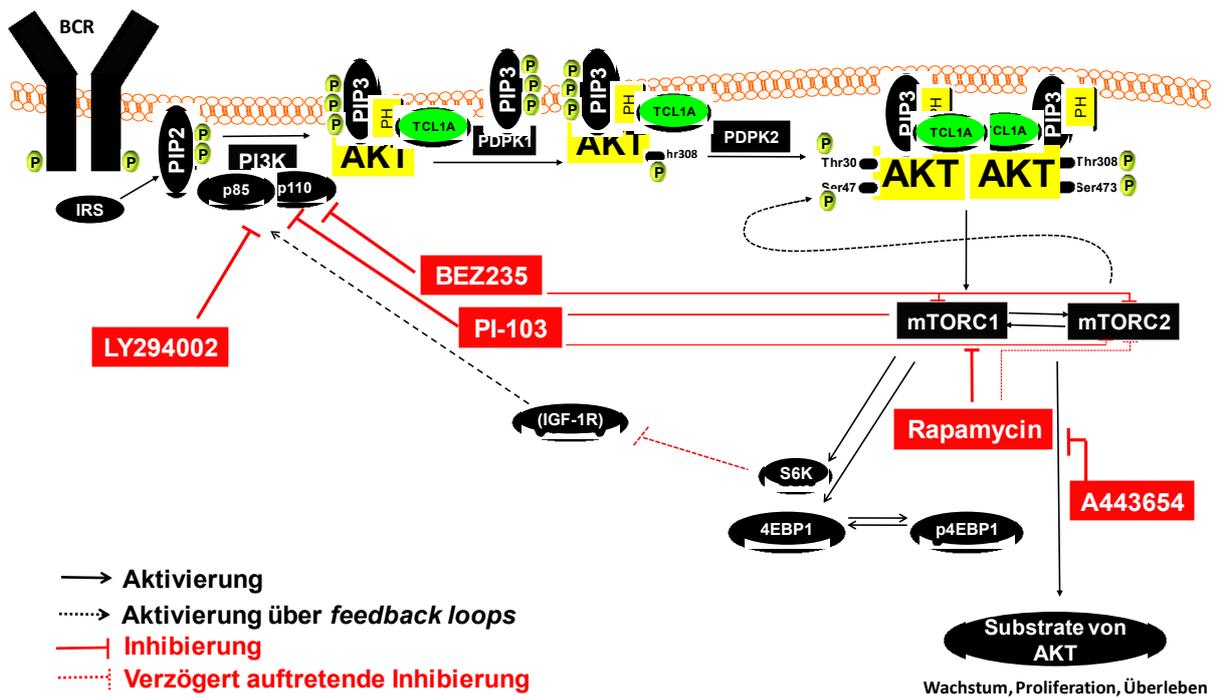
Der PI3K(Phosphoinositid-3-Kinase)-AKT-mTOR-Signaltransduktionsweg hat eine zentrale Bedeutung bei der Regulierung von Wachstum, Überleben und Proliferation der CLL (123). Er spielt aber auch in anderen Krebserkrankungen eine bedeutende Rolle (135, 209, 125). Der AKT-Signalweg ist oft in Tumorzellen konstitutiv aktiv (167). Dagegen wird die Rolle von AKT in der CLL kontrovers diskutiert. Einige behaupten, es würde eine vermehrte Phosphorylierung von AKT (an Ser473 und Thr308) in CLL-Zellen vorherrschen, die nicht stimuliert worden waren (133). Bernal et al. berichteten über eine Aktivierung der PI3K in der CLL (10). In einer kürzlich durchgeführten Studie hat man an 21 untersuchten CLL-Proben keine Phosphorylierung von AKT feststellen können (133). Eine Forschergruppe berichtete über eine konstitutive Aktivierung von PKC und PI3K in der CLL, jedoch ging das mit einer ausbleibenden Aktivitätssteigerung von AKT einher (167). Dagegen beschrieben andere Wissenschaftler eine konstitutive Aktivierung von AKT in der CLL (158). Es sind Mutationen innerhalb des PI3K-AKT-mTOR-Signalweges (209) – zum Beispiel in der AML (akute myeloische Leukämie) – bekannt (25), die ebenfalls zu einer konstitutiven Aktivierung des PI3K-AKT-Signalweges führen können. Es sind PTEN(Phosphatase and Tensin homolog)-Mutationen bekannt; PTEN fungiert als negativer Regulator des PI3K-Signalweges, indem es die Umwandlung von PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) in PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat) inhibiert. So ist PTEN in vielen Tumoren nicht funktionsfähig; dies führt zu einer nahezu dauerhaften Aktivierung des PI3K-Signalweges und somit zu hohen AKT-Level (173, 24, 67, 86). Außerdem sind Mutationen in der PI3K (16, 18), von AKT (120, 211) und Abnormalitäten in dem mTOR-Komplex bekannt (72).

### **1.3.2 Die PI3K-Inhibitoren in der klinischen Anwendung der CLL**

Der spezifische PI3K-Inhibitor Cal-101, der die p110 $\delta$ -Untereinheit der PI3K inhibiert, hat bereits beeindruckende klinische Wirksamkeit erwiesen (62, 64). Andere Wissenschaftler haben gezeigt, dass die BZR-Signalkapazität stark von der p110 $\delta$ -Untereinheit abhängt (22). Daher ist Cal-101 in der Lage, die PI3K-AKT-Signalweiterleitung in der CLL erfolgreich zu hemmen (81). Des Weiteren führt die BZR-Stimulation zur Induktion von Cytokinen, welche die Interaktion von CLL-Zellen mit dem Mikromilieu anregen. Daraufhin werden die Proliferation und das Überleben der CLL-Zellen angeregt. B-Zell-Kinase-Inhibitoren können diese Interaktion inhibieren und so Proliferation und Überleben der CLL-Zellen stoppen (21). Aufgrund dessen hat Cal-101 Effizienz in der klinischen Anwendung gezeigt. In Phase-I/II-Studien wird Cal-101 in Kombination mit Rituximab und/oder Bendamustin gegeben. In einer solchen Phase-I/II-Studie sind Patienten eingeschlossen, die ungünstige prognostische Charakteristika aufweisen (62, 64). Die Gabe von Cal-101 wurde gut toleriert (62, 64). Außerdem wurde eine drastische Reduktion der Lymphknoten beobachtet; dies geht mit einer transienten Lymphozytose in den ersten Behandlungswochen einher.

#### **1.3.2.1 Die PI3K-AKT-mTOR-Inhibitoren LY294002, PI-103, BEZ235, Rapamycin und A443654**

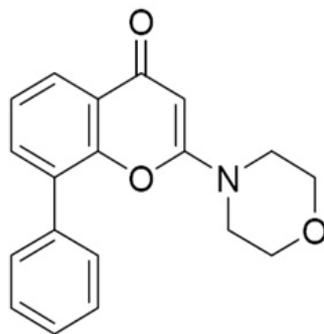
Auf Basis der oben aufgeführten Argumentation werden spezifische PI3K-AKT-mTOR-Inhibitoren als neue therapeutische Strategie gesehen (118, 43). Da derzeit viele PI3K-AKT-Inhibitoren in der Forschung im Umlauf sind (205, 117), werden als Fokus dieser Doktorarbeit die folgenden Inhibitoren ausgewählt, diese sind mit ihren Zieltargets in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5: PI3K-AKT-mTOR-Signalweg in der CLL.** BZR-Stimulation führt zu Wachstum, Proliferation und Überleben von CLL-Zellen. TCL1A fungiert dabei als AKT-Koaktivator. Dargestellt sind die verschiedenen Inhibitoren (rote Boxen), die aufwärts (*upstream*) und abwärts (*downstream*) von AKT angreifen bzw. inhibieren.

### LY294002

LY294002 ist ein Morpholinderivat des Quercertins und gilt als Inhibitor der p110-Untereinheit der PI3K (197, 66). Dieser Inhibitor stellt ein Derivat von Wortmannin dar und wurde von dieser Substanz hergeleitet (19).

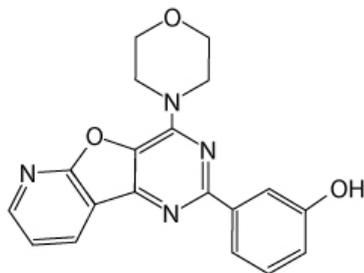


LY294002 [2-morpholin-4-yl-8-phenylchromen-4-one]

LY294002 gehörte zu den ersten PI3K-Inhibitoren, die entwickelt wurden. Die Substanz eignete sich gut für eine erste Untersuchung des PI3K-Signalweges, da sie nur die PI3K inhibiert. Die Wirkung der PI3K-Inhibition durch LY294002 wurde bereits an CLL-Zellen gezeigt (158). Aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften und der hohen Toxizität erzielte sie keinerlei Erfolge in der klinischen Entwicklung (188). Dies führte dazu, dass weitere PI3K-Inhibitoren entwickelt wurden, die selektiver inhibieren, eine vorteilhaftere Pharmakokinetik besitzen, geringere Toxizität aufweisen und somit für die klinische Anwendung besser geeignet sind.

### PI-103

Der trizyklische Pyridofuopyrimidin-Inhibitor wurde entwickelt, um die p110 $\alpha$ -Einheit aller 4 Isoformen der Klasse I PI3K, mTORC1 und mTORC2 zu inhibieren (60), etwa mit gleicher Potenz.



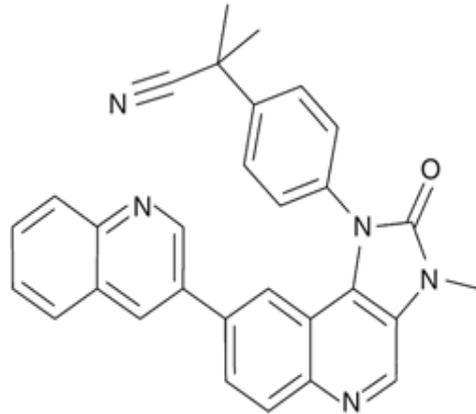
**PI-103** [3-[4-(4-morpholinyl)pyrido[3',2':4,5]furo[3,2-d]pyrimidin-2-yl]-pheno]

PI-103 scheint eine stärkere Affinität zu mTORC1 aufzuweisen ( $IC_{50}$ = 3nM) als zur PI3K der p110 $\alpha$ -Untereinheit ( $IC_{50}$ = 0,5nM). Erstmals zeigte sich PI-103 gegen Glioblastom-Zellen wirkungsvoll (60), wofür die Wirkung der Inhibierung von mTOR und die p110 $\alpha$ -Untereinheit verantwortlich gemacht wurden. Jedoch zeigte PI-103 ebenso eine antileukämische Wirksamkeit in der AML (akute myeloische Leukämie) (148).

Leider weist PI-103 pharmakokinetische Nachteile auf, zum Beispiel einen schnellen Metabolismus und eine beschränkte Löslichkeit, was eine *In-vivo*-Anwendung an Patienten sehr einschränkt.

## BEZ235

Das Imidazoquinazolin BEZ235 (Novartis) ist ein dualer PI3K-Inhibitor und inhibiert kompetitiv die  $\alpha$ p110-Untereinheit der PI3K, mTORC1 und mTORC2 durch Bindung an die ATP-Tasche (122).



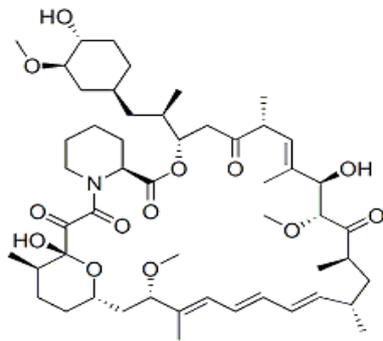
**BEZ235** [2-Methyl-2-{4-[3-methyl-2-oxo-8-(quinolin-3-yl)-2,3-dihydro-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-yl]phenyl}propanenitrile]

BEZ235 scheint zunächst eine stärkere Affinität zur  $p110\alpha$ -Untereinheit der PI3K aufzuweisen ( $IC_{50}$  von 4 nM) als zu mTOR ( $IC_{50}$  27,7nM) (43). BEZ235 demonstrierte Wirksamkeit bei vielen Tumorzellen, unter anderem zum Beispiel im Nierenzellkarzinom, in der AML (akute myeloische Leukämie), T-ALL (T-Zell-akute lymphatische Leukämie) oder in Bronchialkarzinomen (9, 30). Aufgrund der oralen Bioverfügbarkeit eignet sich BEZ235 gut für die klinische Anwendung. Daher wird BEZ235 bereits in Phase-I-Studien untersucht und zwar an Patienten mit soliden Tumoren (NCT00620594). Dabei zeigt BEZ235 ein gutes Toxizitätsprofil.

## Rapamycin

Das Rapamycin ist ein Immunsuppressivum mit Makrolidstruktur (180). Rapamycin, Tacrolimus und Everolimus sind Rapamycin-Analoga, die aus unterschiedlichen Streptomyceten isoliert wurden und sich geringfügig in Bezug auf Struktur und Wirkmechanismus unterscheiden. Rapamycin weist eine Antitumoraktivität *in vitro* (1, 74, 167) und *in vivo* (211) in der CLL auf. Die Substanzgruppe zeigt eine synergistische Aktivität in Kombination mit der konventionellen Chemotherapie wie Paclitaxel oder mit dem selektiven Estrogenrezeptormodulator Tamoxifen (171, 115).

Sabatini et al. haben gezeigt, dass, wenngleich das Rapamycin in erster Linie mTORC1 inhibiert (171), bei längerer Inkubationszeit auch mTORC2 inhibiert werden kann (174).



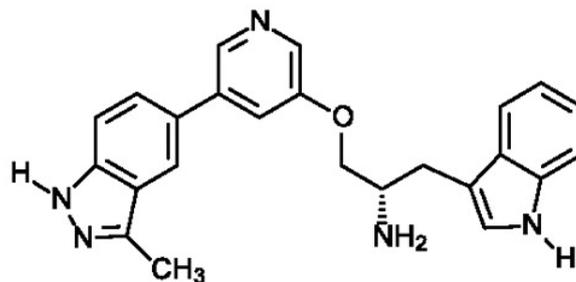
**Rapamycin** [-hexadecahydro-9,27-dihydroxy-3-[(1R)-2[(1S,3R,4R)-4-hydroxy-3-methoxycyclohexyl]-1-methylethyl]-10,21-dimethoxy-6,8,12,14,20,26-hexamethyl-23,27-epoxy-3H-pyrido[2,1-c][1,4]oxaazacyclohentriacontine-1,5,11,28,29(4H,6H,31H)-pentone]

Außerdem wirkt Rapamycin bei niedrigen, also nanomolaren Konzentrationen antiproliferativ; in höheren, also mikromolaren Konzentrationen induziert es Apoptose (61).

Es wurden bereits erste Phase-I-Studien mit Rapamycin und Everolimus durchgeführt. Jedoch erwiesen sich die Resultate aufgrund der relativ hohen zu verabreichenden Dosen und der damit verbundenen Toxizität als nicht vielversprechend (44).

## A443654

Der AKT-Inhibitor A443654 ist aus einem Indazol-Grundgerüst aufgebaut. A443654 bindet kompetitiv an die ATP-Bindestelle von AKT und verhindert so reversibel die Interaktion zwischen AKT und seinen Substraten (42).



**A443654** 5-indazolylpyridine 3::5-{5-[(2S)-2-amino-3-(1H-indol-3-yl)propoxy]pyridin-3-yl}-3-methyl-1H-indazole::indazole-pyridine, 4

Der Pan-AKT-Inhibitor ist gegen alle drei Isoformen von AKT (AKT1, AKT2 und AKT3) gerichtet. Es wurde bereits gezeigt, dass A443654 Apoptose in der CLL *in vivo* und *in vitro* induziert (42). Des Weiteren wird eine zunehmende konstitutive Aktivierung von AKT in T-ALL beobachtet, in welcher A443654 einen Zelltod induziert (42, 59).

Es sind bisher keine klinischen Studien mit dem A443654 bekannt.

### 1.4 Die Hypothese und Zielsetzung der Arbeit

Durch spezifische Inhibierung des PI3K-AKT-mTOR-Signalweges sollte es möglich sein, das Überleben von CLL-Zellen zu verhindern und Apoptose zu induzieren. Außerdem wurde untersucht, ob TCL1A oder klinisch-pathologische Tumor-Parameter einen Einfluss auf die Wirksamkeit der Inhibitoren ausüben.

Fragestellungen dieser Arbeit:

1. Eignen sich PI3K-AKT-mTOR-Inhibitoren zur Apoptose-Induktion bzw. zur Reduktion der Viabilität in CLL-Zellen?
2. Ist die Wirksamkeit der Inhibitoren spezifisch oder werden auch gesunde Zellen beeinflusst?
3. Wodurch wird die Apoptoseinduktion durch die Inhibitoren ausgelöst?
4. Sind klinisch-pathologische Parameter mit der Wirksamkeit der Inhibitoren assoziiert?
5. Ist die Wirksamkeit der Inhibitoren mit dem TCL1A-Status assoziiert – falls ja, wie sieht diese Assoziation aus?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Autoklav	Varioklav Typ 400, Labortechnik GmbH
Analysenwaage	Sartorius
Cryo-Einfriergerät	Qualilab
Durchflusszytometer	Calibur, BD Bioscience
Einschweißgerät	Impulse Sealer
Fotoentwickler	Curix 60
Heizblock	Yellowline MSC Basic C
Heizrührer	Yellowline MSC Basic C
Inkubator	Labotec Inkubator C200, BeLoTec
Kühlzentrifuge	Zentrifuge 5415 R Eppendorf
Laborwaage	Acculab Sartorius group Vicon
Magnetrührstäbchen	Roth
Mikroskop	Tension
pH-Meter	Lab850 SCHOTT Instruments
Photometer	µ Quant, BioTek Instruments, Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech
Pipetten	Costar corning
Pipetboy	Hirschmann Laborgeräte
Schüttler	Rocking Platform VWR
Sonicator	Brauson Sonifier 150
Sterilarbeitsbank	HLB 2448, Heraeus SterilGard III Advance, Baker Company
Vortexgerät	Velp Scientifice #F20220176
Ultraschallstab	Bandelin, Sonopuls
Wasserbad	Destamat Bi 80E

Western-Blot-System	Invitrogen
Tischzentrifuge	Allegra TM X-22R Centrifuge, Beckman Coulter

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Einfrierröhrchen	Sarstedt
FACS-Röhrchen	BD Falcon
Filterpapiere	BIO-RAD # 1703968
Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Membran	Hybond-P Ammersham Bioscience
Reaktionsgefäße	Schott Duran
Sterilfilter	BD Falcon
Zellkulturflaschen	Sarsted
Zellkultur-Multiwellplatten	Sarsted

### 2.1.3 Chemikalien

Albumin Standard	# 23909 Thermo Scientific
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth
Bromphenolblau Na-Salz	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Ethanol absolut	Roth
Fetales Kälber-Serum (FCS)	PAA, The Cell Culture Company
LSM 1020	PAA, The Cell Culture Company
Isopropanol	Roth
Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Roth
Milchpulver (fettfrei)	Roth
Natriumazid	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumfluorid (NaF)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Natriumorthovanadat	Roth

Phosphatgepufferte Saline (PBS)	Invitrogen
Protease-Inhibitor-Cocktailtabletten	Roche
RosetteSep (B-Zell-Isolierungskit)	Stemcell Technologies
Rotiquant	Roth
Salzsäure (17 %)	Roth
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Tris-HCl	Roth
Triton X-100	Roth
Tween20	Roth

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

Sämtliche Lösungen wurden mit destilliertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Millipore) angesetzt.

#### 2.1.4.1 Testsubstanz-Stammlösungen

##### LY294002-Stammlösung

10 mM LY294002

Die Testsubstanz wurde in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

##### PI-103-Stammlösung

10 mM PI-103

Die Testsubstanz wurde in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

##### BEZ235-Stammlösung

10 mM BEZ235

Die Testsubstanz wurde in DMSO gelöst, aliquotiert und bei 4 °C gelagert.

### **Rapamycin-Stammlösung**

10 mM Rapamycin

Die Testsubstanz wurde in DMSO gelöst, aliquotiert und vor Licht geschützt bei -20 °C gelagert.

### **A443654-Stammlösung**

10 mM A443654

Die Testsubstanz wurde in DMSO gelöst, aliquotiert und vor Licht geschützt bei -20 °C gelagert.

### **Rolipram-Stammlösung**

10 mM Rolipram

Die Testsubstanz wurde in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

**cAMP**(Dibutyryl cAMP Na-Salz oder N<sup>6</sup>,2'-O-Dibutyryladenosin 3',5'-cyclisches monophosphat Na-Salz)-**Stammlösung**

100 mM cAMP

Die Testsubstanz wurde in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

### **2.1.4.2 Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie**

#### **Blockinglösung**

5 % Milchpulver

Das Milchpulver wurde in PBS-T gelöst.

### **PBS**

137 mM	NaCl
8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,4
2,7 mM	KCl
1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

### **PBS-T**

0,05 %	Tween-20
(w/v)	

Wurde in PBS gelöst.

### **Laufpuffer (Gelelektrophorese)**

25 mM	Tris/HCl
0,19 M	Glycin
1 %	SDS

### **Transferpuffer (Western Blot, "semi-dry"-Methode)**

25 mM	Tris/HCl
0,19 M	Glycin
20 % (v/v)	Methanol
0,037 % (w/v)	SDS

### **Lysepuffer, "Joes"**

120 mM	NaCl
50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
1 % (w/v)	NP-40
5 mM	DTT
25 mM	NaF
200 µM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
T/500 ml	Complete Protease Inhibitor

### **Probenpuffer, reduzierend (5x) (nach Laemmli)**

50 % (v/v)	Glycerin
10 % (w/v)	Sodiumdodecylsulfat (SDS)
50 mM	Tris/HCl, pH 6,8
25 % (v/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol
0,25 mg/ml	Bromphenolblau

### **2.1.4.3 Vorgefertigte Puffer und Lösungen**

ECL Western Blotting detection reagents (I+II)	Quiagen
Erythrozytenlysepuffer	Quiagen
NuPage Antioxidant	Invitrogen
NuPage MES SDS Running Buffer (20 x)	Invitrogen
NuPage MOPS SDS Running Buffer (20 x)	Invitrogen
Trypanblaulösung (0,5 %)	
Western Blotting Stripping Buffer	

### **2.1.5 Reagenzien und Nährmedien für die Zellkultur**

#### **2.1.5.1 Reagenzien**

Fätales Kälberserum (FCS)
L-Glutamin (200 mM)
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure (HEPES) (1M)
Penicillin/Streptomycin-Lösung
RPMI 1640-Medium + L-Glutamin
RPMI 1640-Medium + L-Glutamax

### 2.1.5.2 Nährmedien

#### Nährmedium für CLL-Zellen

10 %	FCS
1 %	Penicillin
1 %	Streptomycin
1%	Hepes-Puffer

Gelöst in L-Glutamin-haltigem RPMI-1640-Zellkulturmedium.

#### Nährmedium für Zelllinien

15 %	FCS
1 %	Penicillin
1 %	Streptomycin
1%	Hepes-Puffer

Gelöst in L-Glutamin-haltigem RPMI-1640-Zellkulturmedium.

### 2.1.6 Antikörper

#### 2.1.6.1 Primärantikörper

β-Actin (Maus)	<i>polyclonal mouse</i>	Santa Cruz Biotechnology
Anti-pAKT (Ser473)	<i>monoclonal rabbit</i>	Cell Signaling Technology
Anti-AKT1/2	<i>polyclonal goat</i>	Santa Cruz Biotechnology
Anti-AKT1/2/3	<i>polyclonal rabbit</i>	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Caspase3	<i>monoclonal rabbit</i>	Cell Signaling Technology
Anti-4EBP1	<i>monoclonal rabbit</i>	Cell Signaling Technology
Anti-p4EBP1 (Thr37/46)	<i>monoclonal rabbit</i>	Cell Signaling Technology
Anti-GAPDH	<i>polyclonal mouse</i>	Santa Cruz Biotechnology
Anti-MCL1	<i>polyclonal rabbit</i>	Santa Cruz Biotechnology
Anti-PARP	<i>polyclonal rabbit</i>	Cell Signaling Technology

Anti-pmTOR (Ser2448)	<i>monoclonal rabbit</i>	Cell Signaling Technology
Anti-mTOR	<i>monoclonal rabbit</i>	Cell Signaling Technology

### 2.1.6.2 Sekundärantikörper

Anti-Maus IgG-HRP	GE Healthcare/Santa Cruz Biotechnology
Anti-Kaninchen IgG-HRP	GE Healthcare/Santa Cruz Biotechnology
Anti-Ziege IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology

### 2.1.7 Zelllinien

#### 2.1.7.1 DoHH2 und DoHH2-TCL1

Die DoHH2-Zellen sind eine humane Non-Hodgkin-B-Lymphom-Zelllinie. Die Zellen wurden einem 60 Jahre alten Patienten, der ein follikuläres B-Zell-Lymphom aufwies, entnommen. Aus ihnen wuchs spontan in Kultur eine Zelllinie (100). Die DoHH2-Zellen weisen eine (14;18) (q32;q21) chromosomale Translokation auf (100). Diese wurden wiederum stabil mit TCL1 transfiziert (77). Dabei wurde ein retrovirales TCL1-Konstrukt verwendet, bestehend aus einer cDNA, kodiert für humanes TCL1, und einem *murine stem cell virus* (MSCV)-Vektorkonstrukt. Mit Hilfe der *Phoenix packaging* 293T-Zellen stellte man nach Transfektion mit MSCV-GFP-Puromycin oder MSCV-TCL1-Puromycin retrovirale Überstände her (83). Die DoHH2-Zellen wurden mit diesen infektiösen Überständen transduziert (77). Die transduzierten Zellen wurden gegenüber untransfizierten durch Puromycin selektioniert.

### 2.1.8 Patientenmaterial

Im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Diagnostik wurde Patienten mit CLL mit ihrem schriftlichen Einverständnis peripheres Blut entnommen. Darunter befanden sich Patienten aus Studien, diese wurden gemäß der Deklaration von Helsinki (Declaration of Helsinki – current (2008) version) durchgeführt und von der Ethikkommission der Universität zu Köln genehmigt. Das Blut wurde in einer mit EDTA oder Heparin beschichteten Monovette aufgefangen, das Material bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 24 h aufgearbeitet.

## 2.1.9 Datenbanken und Computerprogramme

Pubmed

Graph Pad Prism 5

Adobe Photoshop

Office 2007 (Word, Excel, PowerPoint)

Winglow

Adobe ImageJ

Gene Pattern

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Methoden der Zellkultur

#### 2.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Die verwendeten Säugerzelllinien wurden als Suspensionskulturen in Zellkultur-Plastikware bei 37 °C unter 5 %CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Der hohe CO<sub>2</sub>-Partialdruck gewährleistet die Konstanthaltung des pH-Wertes der Medien mit CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Puffersystemen. Die Zellen wurden in der Regel zweimal wöchentlich passagiert, abhängig von den Wachstumseigenschaften der Zelllinien. Informationen zu Wachstumseigenschaften und Kulturbedingungen kann man sich durch das Anfertigen von Wachstumskurven verschaffen, welche die Zellvermehrung widerspiegeln. Dazu werden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten gezählt. Die Verdopplungszeit wird mittels Zellzählung unter dem Mikroskop bestimmt.

##### 2.2.1.1.1 Auftauen von gefrorenen Zellen

Das Auftauen von Zellen in flüssigem Stickstoff (N<sub>2</sub>) erfolgte in einem Wasserbad bei 37 °C. Die Zellen wurden in 10 ml Zellkulturmedium (37 °C) aufgenommen und 5 min. bei 1000 g zentrifugiert, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wurde dann in 10 ml frischem Zellkulturmedium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt. Nach 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde das Volumen der Zellsuspension mit frischem Medium auf 20 ml aufgefüllt.

### 2.2.1.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die am häufigsten verwendete Methode ist die Auszählung unter dem Mikroskop mittels einer Neubauer-Zählkammer. Dabei kann parallel die Lebendzellzahl bestimmt werden. Dies geschieht durch Zugabe von Trypanblau. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der an Proteine bindet. Die Bindung ist abhängig vom pH-Wert (Optimum pH 7,5) und von der Einwirkzeit. Die Aufnahme des Farbstoffes erfolgt selektiv in Zellen mit geschädigter Zellmembran. Dazu wurden etwa 10 µl der zu bestimmenden Zellsuspension in eine gereinigte Zählkammer gefüllt. Unter dem Mikroskop wurden anschließend bei 100-facher Vergrößerung die Zellen in den äußeren 4 Eckquadraten ausgezählt. Die Zellzahl (N) pro Milliliter Suspension ergab sich nach folgender Formel:

$$N = \frac{n * 10^4 * F}{4}$$

N = Zellzahl pro Milliliter Suspension

n = Zellzahl der äußeren 4 Quadrate der Neubauer-Zählkammer

F = Verdünnungsfaktor

### 2.2.1.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Die Langzeitlagerung der Zelllinien erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zum Einfrieren der Zellen wurde die Zellsuspension aus einer Kulturflasche entnommen, abzentrifugiert (5 min., 1000 g) und mit Einfriermedium auf eine Konzentration von  $1 \times 10^7$ /ml eingestellt. Dieses Einfriermedium enthielt 10 % DMSO, so dass die Bildung von Eiskristallen beim Einfrierprozess verhindert wird. Die Aliquote von 1 ml wurden in Einfrier Röhrchen in einem Einfrierbehälter („Mr. Freeze“) mit einer Kühlungsrate von 1 °C/min. auf -80 °C gebracht. Nach 24 h wurden die Röhrchen in den Flüssigstickstoffbehälter überführt.

### 2.2.1.2 Primäre CLL-Zellen

#### 2.2.1.2.1 Isolation der CLL-Zellen aus dem peripheren Blut

Mononukleäre Zellen (Monozyten und Lymphozyten) können aus dem peripheren Blut mittels Ficoll-Hypaque über eine isopyknische Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden. Die Ficoll-Hypaque-Dichtezentrifugation erlaubt eine schnelle und effiziente Isolierung der

mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut. Bei diesem Verfahren wird der Unterschied der Dichte zwischen mononukleären Zellen und anderen im Blut vorhandenen Bestandteilen ausgenutzt. Zur Isolation der B-Zellen bzw. CLL-Zellen wurde das Blut mit 40ul/ml RosetteSep für 20 min. inkubiert. Dabei handelt es sich um einen Antikörpercocktail gegen Oberflächenmarker der Nicht-B-Zellen (CD2, CD3, CD16, CD36, CD56, CD66b und Glycerophosphorin A). Die Antikörper vernetzen die Nicht-B-Zellen zu einem Komplex mit Erythrozyten und werden dadurch während der Dichtegradientenzentrifugation pelletiert. Nach der Inkubation des Blutes mit RosetteSep wurde das Blut mit einem gleichen Anteil an Volumen PBS mit 0,5 % FBS verdünnt und auf das Dichtegradientenmedium Ficoll-Hypaque geschichtet. Nach 20 min. Zentrifugation bei 1600 rpm konzentrieren sich Plasma und Thrombozyten an der Oberfläche der Ficoll-Hypaque-Schicht, da sie eine niedrigere Dichte als Ficoll-Hypaque haben. Im Gegensatz dazu haben die Erythrozyten und Granulozyten eine höhere Dichte als Ficoll-Hypaque und sammeln sich daher am Boden der Ficoll-Hypaque-Schicht. Die B-Zellen sind in der Phasengrenze konzentriert.

Um die Anzahl der Erythrozyten zu reduzieren, wurden die isolierten Zellen mit Erythrozytenlysepuffer 5 bis 10 min. bei 37 °C inkubiert. Abschließend folgten zwei Waschschrte mit PBS-T. Die Zellen wurden resuspendiert in RPMI, Pen/Strep, Hapes, 20 % FCS. Nach diesem Prozess erhielt man eine zu 95 % reine CLL-Population.

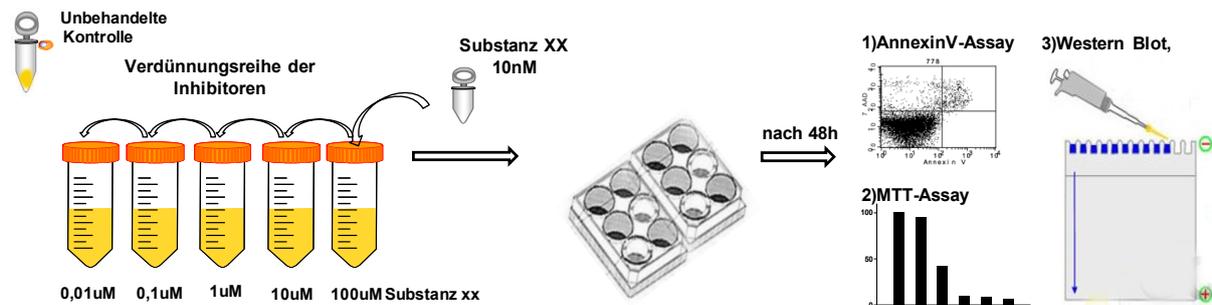
### **2.2.1.2.2 Isolierung gesunder PBMC aus dem peripheren Blut**

Aus sogenannte *Buffy coats* gesunder Spender (aus der Blutbank), die hauptsächlich aus Leukozyten und Thrombozyten sowie kontaminierenden Erythrozyten bestehen, wurden – wie oben beschrieben, jedoch ohne die Zugabe von RosetteSep – mononukleäre Zellen isoliert.

### **2.2.1.3 Behandlung von CLL-Zellen, gesunden PBMC- und DoHH2/DoHH2-TCL1-Zellen mit Inhibitoren des PI3K-Signaltransduktionsweges**

Nach der Isolierung der CLL-Zellen aus dem peripheren Blut wurden die CLL-Zellen mit den jeweiligen Inhibitoren für 48 h inkubiert. Da die optimale Wirkkonzentration noch ermittelt werden musste, wurde eine Konzentrationsspanne der jeweiligen Inhibitoren konzipiert. Anschließend wurde zur Ermittlung der Apoptose der Annexin-V/7-AAD-Assay (2.2.2.1) und zur Ermittlung der Viabilität der MTT-Assay (2.2.2.3) durchgeführt. Des Weiteren wurden zur

Durchführung von Immunoblots Proteinlysate gesammelt. Abbildung 6 illustriert den Versuchsablauf. Ebenso wurden die gesunden PBMC (peripheral blood mononuclear cells) mit den Inhibitoren mit der entsprechenden Zeit inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die gesunden B-Zellen mittels CD19/CD5-Färbung im Durchflusszytometer erfasst und dementsprechend zur Analyse und Darstellung herangezogen.



**Abbildung 6: Ablauf der Experimente.** Nach Inkubation der jeweiligen Inhibitoren mit den CLL-Zellen wurde die Apoptose mittels Annexin-V bestimmt und die Viabilität mittels MTT-Assay. Außerdem wurden Proteinlysate zur Durchführung von Immunoblots gesammelt.

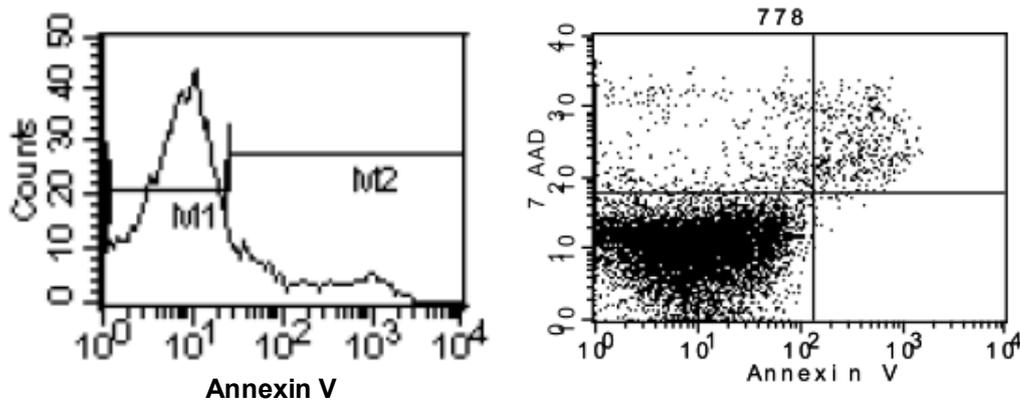
## 2.2.2 Zytotoxizitätstests

### 2.2.2.1 Durchflusszytometrischer Annexin-V/7-AAD-Assay

Die Viabilität der Zellen wurde unter anderem durchflusszytometrisch bestimmt.

Bei Annexin-V handelt es sich um ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein, welches PS an der Außenseite binden kann. Auf die Weise eignet sich Annexin-V zur Detektion apoptotischer Zellen. 7-AAD ist ein Zellstofffarbstoff, der zur Interkalation der DNA eingesetzt wird. Nekrotische Zellen zeichnen sich durch einen Verlust der Membranintegrität aus, dadurch kann 7-AAD in die Zelle eindringen und diese markieren. Beide werden als Farbstoffe zur Bestimmung von Apoptose im Durchflusszytometer verwendet. Intakte Zellen reagieren negativ auf die Färbungen, frühapoptotische Zellen reagieren positiv auf Annexin-V, jedoch negativ auf 7-AAD. Dagegen reagieren spätapoptotische (tote) Zellen positiv auf beide Färbungen, da tote Zellen keine intakte Zellmembran besitzen und das 7-AAD aus diesem Grund in die Zelle eindringen kann. Phosphatidylserin (PS) befindet sich normalerweise nur auf der zytoplasmatischen Innenseite der Membran. In frühen Apoptose-Stadien findet eine Translokation von PS auf die Außenseite der Membran statt. Die Proben wurden nach dem Protokoll des Herstellers mit einem PE-markierten Farbstoff gegen

Phosphatidylserin (Annexin) und 7-AAD (7 Aminoactinomycin) behandelt. Die ermittelten Daten können als Histogramm oder Dot-Plot dargestellt werden.

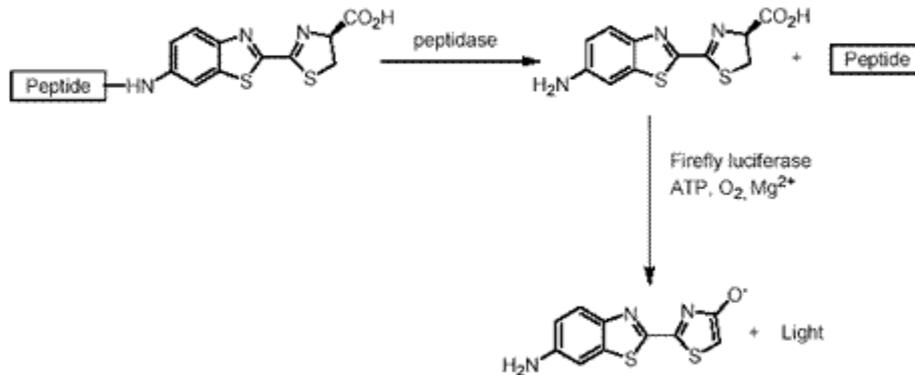


**Abbildung 7: Viabilitätsbestimmung von CLL-Zellen bzw. Zelllinien mittels durchflusszytometrischer Bestimmung von Annexin-V und 7-AAD.** Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und CLL-Zellen lassen sich im Dot-Plot (rechts) durch zwei Zellpopulationen klar voneinander abgrenzen. Die eine Population ist eine als viabel definierte, die Annexin-V- und 7-AAD-negativ ist; die andere Population hingegen besteht hauptsächlich aus toten Zellen, diese sind Annexin-V- und 7-AAD-positiv.

### 2.2.2.2 Caspase3/7 – Assay

Während der Apoptose werden Mitglieder der Enzymfamilie der Caspase (Aspartat-spezifische Cysteiny-Proteasen) aktiviert. Die Caspasen 3/7/6 gehören zu den Effektorcaspasen, die wiederum von den Initiatorcaspasen (Caspase 2/8/9/10) aktiviert werden. Diese kaskadenartige Aktivierung führt zu verschiedenen Spaltprodukten, die das apoptotische Programm ausführen, zum Beispiel PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase). Zur Aktivitätsbestimmung der Caspasen 3 und 7 wurde der Caspase-Glo 3/7-Assay (Promega) verwendet. Bei den Caspasen 3 und 7 handelt es sich um Effektorcaspasen, die eine Schlüsselrolle beim apoptotischen Zelltod spielen. Bei diesem Test wurde die Proteaseaktivität der Caspasen 3 und 7 anhand des Umsatzes eines lumineszierenden Substrates ermittelt. Durch proteolytische Spaltung der Tetrapeptidsequenz Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) des Aminoluciferins wird dieses als Substrat für eine folgende Reaktion mit Luciferase freigesetzt. Nun erfolgt eine Luciferase/Luciferin-Reaktion, bei der in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  und ATP Oxyaminoluciferin entsteht und Energie in Form von Lumineszenz freigesetzt wird. Das emittierte Lumineszenzlicht ist direkt proportional zur Aktivität der

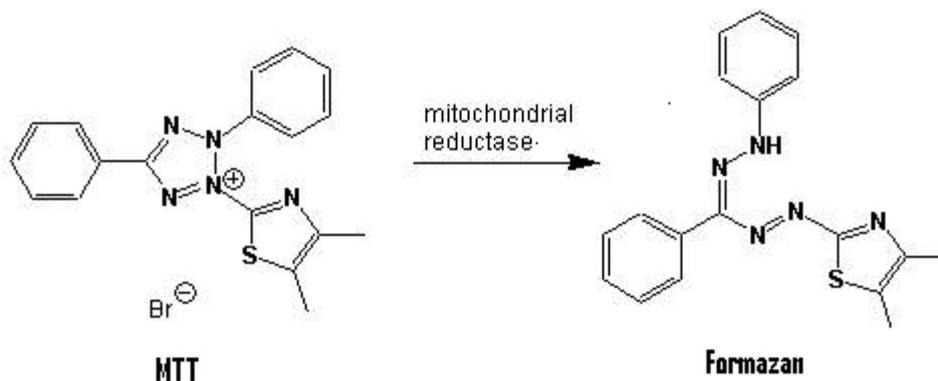
Caspasen 3 und 7 und wurde mit einem MicoLumatPlus LB96V (Berthold)-Luminometer gemessen.



**Abbildung 8: Farbreaktion, die bei der Aktivitätsbestimmung der Caspase 3/7 abläuft.**

### 2.2.2.3 MTT-Assay

Der Nachweis der Zellviabilität mittels MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Diese Reduktion wird von der mitochondrialen Dehydrogenase katalysiert.



**Abbildung 9: Umwandlung des gelben MTT in das blau-violette Formazan.**

Die gemessene Konzentration an Formazan korreliert mit dem Proliferationsverhalten der Zellen. Die Proben wurden nach dem Protokoll des Herstellers mit dem Reagenz inkubiert und anschließend im Photometer ausgewertet. Die Absorption des sich bildenden

Formazans wurde bei einer Wellenlänge von 565-570 nm bestimmt. Diese korreliert mit der Menge bzw. der Anzahl von stoffwechselaktiven Zellen.

Zunächst wurde anhand unterschiedlicher Messzeitpunkte (0 h, 2 h, 4 h, 8 h) überprüft, wann bei den CLL-Zellen der ideale Zeitpunkt ist, zu dem das MTT in das Formazan reduziert wird. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen fanden an CLL-Zellen statt, aber auch an Zelllinien (DoHH2-/DoHH2-TCL1). Da CLL-Zellen langsamer proliferieren als Zelllinien, reichte bei den DoHH2-/DoHH2-TCL1-Zellen zum Farbumschlag eine Inkubationszeit mit dem MTT-Reagenz von 4 h aus. Bei den CLL-Zellen war jedoch eine Inkubationszeit von ca. 8 h zur Bildung des Formazans notwendig.

Zur Messung der metabolischen Aktivität wurden die Zellen pro Bedingung in Triplets mit dem MTT-Reagenz vermischt. Zur Auswertung wurde der daraus gebildete Mittelwert gewählt, Standardfehler wurden berücksichtigt und alles wurde zur Kontrolle normalisiert.

### **2.2.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **2.2.3.1 Proteinquantifizierung nach Bradford**

Die Zelllysate wurden mit Hilfe eines Lysepuffers ("Joes" LB) hergestellt. Je nach Größe des Zellpellets gab man zwischen 30 bis 120 µl des Lysepuffers hinzu und somnifizierte für ca. 1 min. Anschließend wurden die Proben 30 min. auf Eis aufbewahrt und abschließend für 30 min. bei 4°C zentrifugiert. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt. Hierbei wird der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brillant-Blue G-250 eingesetzt. Dieser Farbstoff bildet in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe. Die ungebundene Form hat ein Absorptionsmaximum von 470 nm, dagegen verschiebt sich das nach Komplexbildung gebildete Absorptionsmaximum auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Zur Proteinkonzentrationsbestimmung von Zelllysaten wurde 1 Teil Rotiquant®-Reagenz mit 4 Teilen Wasser vermischt. In 1ml-Tubes wurden jeweils zu 1 ml dieser Lösung 2 µl des Lysats gegeben, von diesem jeweils 200 µl in eine *96-well-plate* überführt und die Absorption wurde bei 595 nm vermessen.

### 2.2.3.2 Immunoblot

Um zunächst die Proteine zu denaturieren, kochte man sie in Natriumdodecylsulfat (SDS)-haltigem Ladepuffer bei 90 °C für 5 min. auf dem Heizblock. Dadurch erfolgte eine Anlagerung von SDS an die Proteine.

Für diese Arbeit wurden NuPage® 4–12 % Bis-Tris-Fertiggele verwendet, die Gelelektrophorese wurde in einer Elektrophoresekammer (Invitrogen) durchgeführt. Die Proteinproben wurden aufgetragen und danach erfolgte die Auftrennung bei 100 Volt für 3–4 h. Im Anschluss erfolgte das Blotting nach einer Semi-dry-Methode; Proteine wurden durch Anlegen einer Spannung aus 4–12 % Gelen auf eine PVDF-Membran übertragen. Um eine optimale Primärantikörperbindung sicherzustellen, wurde die Membran 30 min. in 5%iger Milchlösung geblockt.

Nach dem Blockvorgang wird die überschüssige Milchlösung entfernt und die Membran in einer Primärantikörperlösung (pAKT, AKT1/2, TCL1A, pmTOR, mTOR, p4EBP1, 4EBP1, Caspase3, PARP und  $\beta$ -Actin) über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran mit PBS-T gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit der Sekundärantikörperlösung inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper und erneutem Waschvorgang wurde die Bindung des Sekundärantikörpers mit Hilfe eines *Chemilumineszenz-Reagenzes (ECL Western Blotting detection reagents (I+II))* detektiert.

#### 2.2.3.2.1 Densitometrie der Proteinbanden

Um die basalen Level an TCL1A und pAKT der unbehandelten Lysate zu bestimmen, wurden die Intensitäten der Proteinbanden von TCL1A, pAKT, AKT1/2 und  $\beta$ -Actin mittels des Programms ImageJ bestimmt. Nachdem die Werte der einzelnen Proteinbanden gemessen waren, wurden sie zu  $\beta$ -Actin normalisiert, dem *Housekeeping Gene*. Abschließend wurde dieses Ergebnis noch zu der jeweiligen Positivkontrolle (DoHH2, DoHH2-TCL1) normalisiert. Die ermittelten Werte dienen dazu, die unterschiedliche *Response* der einzelnen CLL-Proben weiter zu charakterisieren.

Bei den experimentellen Untersuchungen der DoHH2-/DoHH2-TCL1-Zellen hinsichtlich PI3K-AKT-mTOR-Inhibition mittels der spezifischen Inhibitoren wurden auf den Western Blots ebenso die Proteinintensitäten bestimmt. Dies diente dazu, die Unterschiede auf Proteinbasis zwischen den mit Inhibitoren behandelten DoHH2- und DoHH2-TCL1-Zellen

besser unterstreichen zu können. Dazu wurde die Proteinbandenintensität der von uns ausgewählten Zieltargets der Inhibitoren pAKT, AKT1/2, TCL1A und  $\beta$ -Actin bestimmt, zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollen normalisiert und anschließend wurden alle Werte zu  $\beta$ -Actin normalisiert.

### 2.2.4 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Zur genauen Lokalisation von fluoreszierenden Proteinen bzw. im Rahmen dieser Arbeit zur Lokalisation der Protein-Interaktion wurde eine konfokale Mikroskopie durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine Weiterentwicklung der konventionellen Lichtmikroskopie. Im Gegensatz zum Lichtmikroskop wird nicht das gesamte Präparat beleuchtet, sondern nur ein Bruchteil. Durch ein Laserlicht werden verschiedene Fluoreszenz-Farbstoffe angeregt, die Methode macht so die Detektion von verschiedenen Proteinen in einer Probe möglich. Die Aufbereitung und Fixierung der *cytospins* aus der Zellsuspension sowie das Anfärben wurden durchgeführt wie in (75, 76) beschrieben. Die primären Antikörper detektieren TCL1 (Klon 1-21, 1:50 verdünnt und mit einem 1:600 verdünnten, polyklonalen TCL1-Antiserum (172)) und AKT1/2 (1:200 verdünnt, *Santa Cruz Biotechnology*). Die Sekundäantikörper waren Cy3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (1:300 verdünnt) und mit Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (1:30 verdünnt); beide stammten aus den Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA).

## 2.2.5 Statistische Auswertung

### Berechnung des Mittelwertes bzw. des Median und dessen Standardfehler

Bei der Auswertung der Messwerte wurden Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (n) und der dazugehörige Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Mittelwerte und Standardfehler wurden mit dem Programm GraphPad Prism® errechnet.

#### Arithmetischer Mittelwert $\bar{x}$ :

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

n = Stichprobenumfang

$x_i$  = Einzelmesswert

#### Median $\bar{x}$ :

$$\bar{x} = \begin{cases} x\left(\frac{1}{2}(n+1)\right), & \text{falls } n \text{ ungerade} \\ \frac{1}{2}\left(x\left(\frac{n}{2}\right) + x\left(\frac{n}{2} + 1\right)\right), & \text{falls } n \text{ gerade} \end{cases}$$

#### Standardabweichung:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$\bar{x}$  = arithmetischer Mittelwert

$x_i$  = Einzelmesswert

n = Stichprobenumfang

### Standardfehler des Mittelwertes

$$\sigma_n = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

SD = Standardabweichung

n = Stichprobenumfang

### Berechnung der LD50 und IC50

Die Parameter LD50 und IC50 wurden aus sigmoidalen Dosiswirkungskurven ermittelt, die durch eine nicht lineare Regressionsanalyse mit dem Programm GraphPad Prism® erstellt wurden. Die Berechnung beruht auf folgender Funktion:

$$y(X) = Y_{\min} + \frac{Y_{\max} - Y_{\min}}{1 + 10^{(\log IC_{50} - x) * Hillkoeffizient}}$$

y = prozentual zur Kontrolle verminderter Anteil

y<sub>min</sub> = y-Wert am niedrigsten Plateau, hier: 0

y<sub>max</sub> = y-Wert am höchsten Plateau, hier: 100

x = Logarithmus der Substratkonzentration

Die LD50 ist definiert als die „*Lethal Dosage*“ und stellt die Konzentration dar, bei der 50 % der Zellen sterben. Die LD50 ist ein Maß für das Auftreten einer Apoptose, diese wird aus dem Annexin-V/7-AAD-Assay hergeleitet. Die IC50 ist die „*Inhibitory Concentration*“ und wird als die Konzentration bezeichnet, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird. Dementsprechend ist die IC50 ein Maß für die Viabilität; den Wert der IC50 kann man aus dem MTT-Assay entnehmen.

*Responder* werden definiert als CLL-Patienten, bei denen nach Inkubation mit den Inhibitoren eine LD50/IC50 erreicht wird. Dagegen werden *Non-Responder* definiert als Fälle, bei denen keine LD50/IC50 erreicht wird. Diese Fälle wurden zwecks statistischer Auswertung mit einer LD50/IC50= 101 µM gesetzt, denn 100 µM war die höchste zu verwendende Konzentration aller Inhibitoren. Die CLL-Proben, die wir als *Non-Responder* einteilten, konnten wir klar anhand der Dosiswirkungskurve zeigen, dass ab 100 µM aufwärts die Zellen nicht weiter abstarben, sondern ein Plateau erreicht wurde.

Daher wird die Ansprechrate auch anhand der LD50 und IC50 definiert.

### **Signifikanzprüfungen**

Die statistische Signifikanz der Unterschiede zweier unabhängiger Gruppen wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Der Wilcoxon "*matched pairs*"-Test wurde angewandt, um die statistische Signifikanz zweier abhängiger Gruppen zu belegen. Die statistischen Analysen wurden unter Verwendung von GraphPad Prism® durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Fragestellungen bearbeitet: Zum einen wurde untersucht, ob CLL-Zellen sich sensitiv gegenüber den Inhibitoren verhalten. Dabei sollten sie so selektiv sein, dass gesunde Kontrollen nicht beeinflusst werden. Zum anderen wurde der Frage nachgegangen, ob klinisch-pathologische Parameter oder TCL1A die Wirkung der Inhibitoren gegenüber CLL-Zellen beeinflussen.

In einer Vorphase wurden CLL-Zellen von 16 CLL-Patienten (erstes Patientenkollektiv aus einer sogenannten Vorphase) an Rapamycin, Rolipram, cAMP untersucht (3.1.1, Seite 54 und 57). Hierbei wurden jeweils 2 bis 3 Konzentrationen, die aus der Literatur bereits bekannt waren, ausgewählt. Ziel in Bezug auf diese 16 untersuchten CLL-Patienten aus der Vorphase war es, erste Wirkungen festzustellen.

Anschließend wurde an einem zweiten Patientenkollektiv (Hauptpatientenkollektiv) von 32 CLL-Patienten (Tabelle 3, Seite 48) die Untersuchung aller Inhibitoren durchgeführt. Das heißt die CLL-Zellen aus jeder einzelnen CLL-Probe wurden jeweils mit allen Inhibitoren behandelt. Um optimal die IC50 und LD50 berechnen lassen zu können, wählte ich jeweils fünf Konzentrationen pro Inhibitor aus, mit denen die CLL-Zellen behandelt wurden. Die Resultate beinhalten sowohl Daten, die aus den Experimenten der Vorphase gewonnen wurden, als auch Daten aus den Experimenten, die aus der Hauptphase (Hauptpatientenkollektiv) stammten.

In Tabelle 3 sind die Patientencharakteristika der aus dem zweiten Patientenkollektiv (Hauptpatientenkollektiv) stammenden 32 CLL-Patienten aufgelistet.

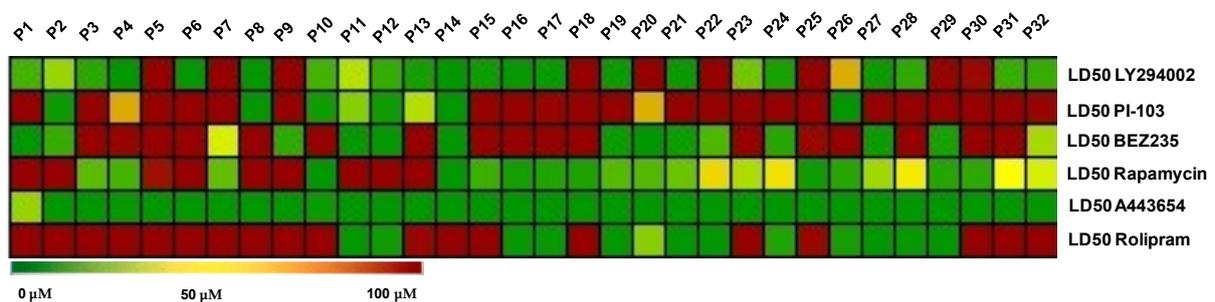
**Tabelle 3: Charakteristika der aus dem zweiten Patientenkollektiv stammenden 32 CLL-Patienten (Hauptpatientenkollektiv) (die Abkürzung „n/a“ steht für *not available*).**

Patient	Alter	WBC [x1E9/L]	ZAP70 CD38 (durchflusszytometrisch ermittelt)		Binet- Stadium	Zytogenetik	IGHV- Status	Serum- Thymidin- Kinase (UL)	Serum-β2- Mikroglobulin (mg/L)	Vortherapie ja (1) nein (0)
			pos (1) neg (0)	pos (1) neg (0)						
P1	78	79,40	n/a	n/a	n/a	-13q, - 11q	U	n/a	n/a	0
P2	68	179,00	0	0	C	normal	n/a	11,90	2,40	1
P3	46	20,20	0	n/a	A	normal	M	n/a	n/a	0
P4	76	87,00	1	0	B	trisomie 12	n/a	66,90	2,30	0
P5	73	190,95	1	1	C	-17p	M	750	4,50	1
P6	58	279,00	0	0	C	(keine - 17p)	n/a	9,10	2,09	0
P7	69	554,40	0	0	C	n/a	n/a	12,00	2,60	0
P8	64	280	0	0	A	-6q, - 13q	U	10,10	n/a	0
P9	80	78,54	1	0	B	-17p	n/a	90,50	4,60	1
P10	55	96,36	1	0	C	normal	U	51,70	3,50	1
P11	64	163,55	n/a	n/a	A	n/a	n/a	54,80	3,50	1
P12	77	92,33	0	0	A	normal	U	3,00	9,80	0
P13	70	151,60	0	0	B	normal	U	20	n/a	0
P14	59	n/a	1	1	n/a	n/a	M	n/a	n/a	0
P15	72	149,80	0	0	A	normal	U	n/a	n/a	0
P16	53	113,82	1	1	A	-13q	U	15,00	2,80	0
P17	62	32,75	1	1	A	-5q	n/a	n/a	n/a	1
P18	69	28,00	0	n/a	A	-13q	U	4,60	n/a	0
P19	89	70,47	0	0	B	normal	n/a	n/a	n/a	0
P20	69	98,68	0	0	B	-13q	M	9,60	n/a	0
P21	56	49,30	0	0	B	(keine - 17p)	n/a	5,20	2,80	0
P22	76	223,00	1	0	B	trisomie 12	U	32,20	4,20	1
P23	55	131	1	1	n/a	-13q	U	n/a	3,40	1
P24	79	25,00	0	0	n/a	-13q, trisomie 12	n/a	10	5,24	0
P25	66	44,00	1	1	A	-11q, -13q	n/a	9,20	3,02	0
P26	62	218,00	0	0	C	-17p	M	n/a	4,20	0
P27	76	60,50	0	0	A	-13q	n/a	2,50	1,81	0
P28	58	251	1	1	B	-13q	n/a	24,00	5,00	0
P29	52	48,00	0	0	C	keine 17p	n/a	n/a	n/a	0
P30	49	91,49	1	0	B	-13q	n/a	7,60	3,10	0
P31	47	55,10	0	0	A	n/a	n/a	39,00	3,70	1
P32	57	152,50	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	1

### 3.1 Untersuchungen der Wirksamkeit der Inhibitoren *in vitro*

#### 3.1.1 Einfluss der untersuchten Substanzen auf das Überleben von CLL-Zellen (Hauptpatientenkollektiv)

Um die Wirkung der Inhibitoren auf das Überleben der CLL-Zellen zu untersuchen, wurden die Inhibitoren über 48 h mit den CLL-Zellen inkubiert. Der Anteil an toten/spätapoptotischen Zellen wurde im Durchflusszytometer erfasst. Zunächst werden die Wirkungen der Inhibitoren an 32 untersuchten CLL-Patienten zur Übersicht in einer Heatmap dargestellt (siehe Abbildung 10).

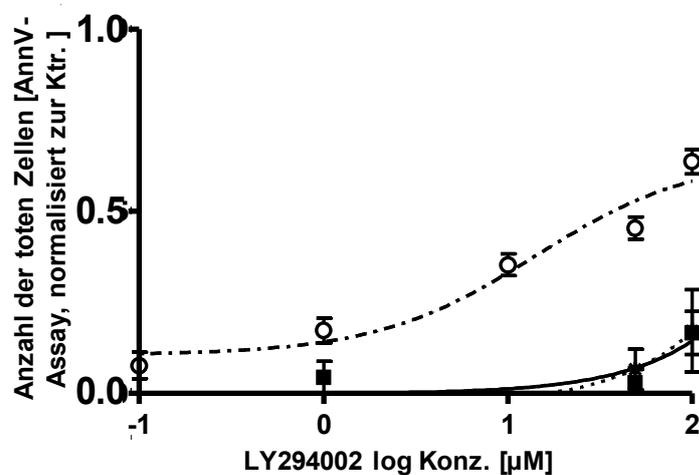


**Abbildung 10: Heatmap auf Basis der ermittelten LD50-Werte aus dem Annexin-V/7-AAD-Assay.** Die Induktion der Apoptose durch die Inhibitoren variiert innerhalb der untersuchten CLL-Proben. Die unterschiedlichen Farben verdeutlichen die unterschiedliche Ansprechrate der Inhibitoren. In Gene Pattern wurden jeweils alle LD50-Werte (jene lagen zwischen 0,01 und 101 µM) als Tabelle eingegeben und auf Basis dieser Werte wurde die Heatmap erstellt. Grün steht für gute Ansprecher (*Responder*), orange-gelb steht für mittelmäßig gute Ansprecher und rot für schlechte Ansprecher bzw. *Non-Responder*. *Non-Respondern* wurde zwecks statistischer Auswertung eine LD50 von 101 µM erteilt. Charakterisierung zwischen *Responder/Non-Responder* bitte aus dem Methodenteil entnehmen (siehe 2.2.5, Seite 44).

Die LD50 wurde mittels GraphPad Prism® ermittelt und die Werte wurden als Heatmap dargestellt. Die LD50-Werte variieren unter den 32 CLL-Proben; unter den Proben befinden sich gute Ansprecher (*Responder*), mittelmäßig gute Ansprecher oder schlechte Ansprecher (*Non-Responder*). Die Gruppen werden durch die verschiedenen Farben gekennzeichnet. Im Allgemeinen zeigte sich eine variable Zunahme der spätapoptotischen Zellen in den CLL-Proben; dies zeigen die Anhäufungen der Farben grün-gelb-orange, die wiederum die LD50-Werte repräsentieren.

## LY294002 (PI3K-Inhibitor) induziert Apoptose spezifisch in CLL-Zellen.

Um die Wirkung von LY294002 auf das Überleben von CLL-Zellen zu untersuchen, wurden diese über 48 h mit LY294002 in Konzentrationen von 0,1, 1, 10, 50 und 100  $\mu\text{M}$  inkubiert. Der Anteil an toten/spätapoptotischen Zellen wurde im Durchflusszytometer erfasst. Die Abbildung 11 gibt die Resultate von 32 untersuchten CLL-Patienten wieder. Zur Bestimmung der Selektivität von LY294002 und um zu zeigen, dass es eine geringe Toxizität gegenüber B-Zellen und PBMC aus gesunden Spendern aufweist, wurden diese ebenfalls zu der Untersuchung hinzugezogen. Dazu wurde LY294002 analog mit PBMC inkubiert und die gesunden B-Zellen wurden im Durchflusszytometer gegatet.



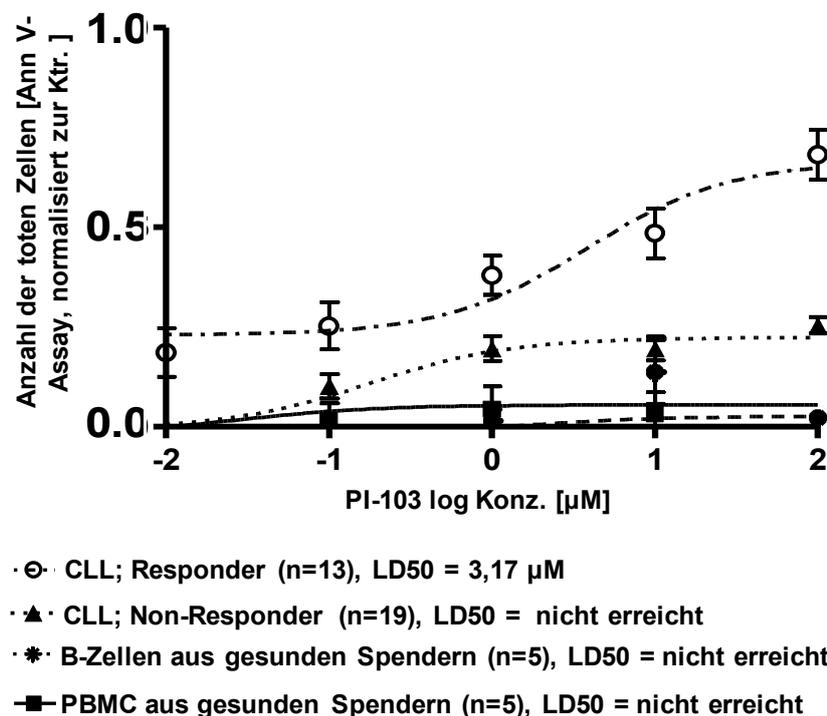
- \*· B-Zellen aus gesunden Spendern (n=5), LD50 = nicht erreicht
- PBMC aus gesunden Spendern (n=5), LD50 = nicht erreicht
- ⊖· CLL (n=32), LD50 = 36,30  $\mu\text{M}$

**Abbildung 11: Wirksamkeit von LY294002, Apoptose in der CLL zu induzieren.** Die toten Zellen sind gegen die logarithmische Konzentration von LY294002 aufgetragen und die entsprechenden LD50-Werte ermittelt.

Es zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der spätapoptotischen CLL-Zellen in einem sigmoidalen Kurvenverlauf in den untersuchten Proben. Es stellte sich heraus, dass unter den Proben keine *Non-Responder* waren. Dagegen blieb die Apoptoseinduktion durch LY294002 auf die gesunden B-Zellen und PBMC aus. Die Erfassung der gesunden B-Zellen wurde im Durchflusszytometer mittels CD19-Antikörper-Färbung vollzogen (also gegatete B-Zellen). Dennoch verlaufen die Kurven annähernd parallel zu der CLL-Kurve. Die LD50 lag bei 36,30  $\mu\text{M}$  bei den CLL-Proben, wurde hingegen bei den gesunden B-Zellen und PBMC nicht erreicht.

## Der duale PI3K-mTOR-Inhibitor PI-103 induziert spezifisch Apoptose in einer Fraktion von CLL-Proben.

Analog wurde die Wirkung von PI-103 auf das Überleben von CLL-Zellen untersucht. CLL-Zellen wurden über 48 h mit PI-103 in Konzentrationen von 0,01 bis 100  $\mu\text{M}$  inkubiert. Der Anteil an toten/spätapoptotischen Zellen wurde im Durchflusszytometer erfasst. Abbildung 12 stellt die Ergebnisse der 32 untersuchten Proben dar. Um die Selektivität von PI-103 auf CLL-Zellen zu veranschaulichen, wurden ebenfalls B-Zellen (gगतet) und PBMC aus gesunden Spendern analog über 48 h mit PI-103 inkubiert.

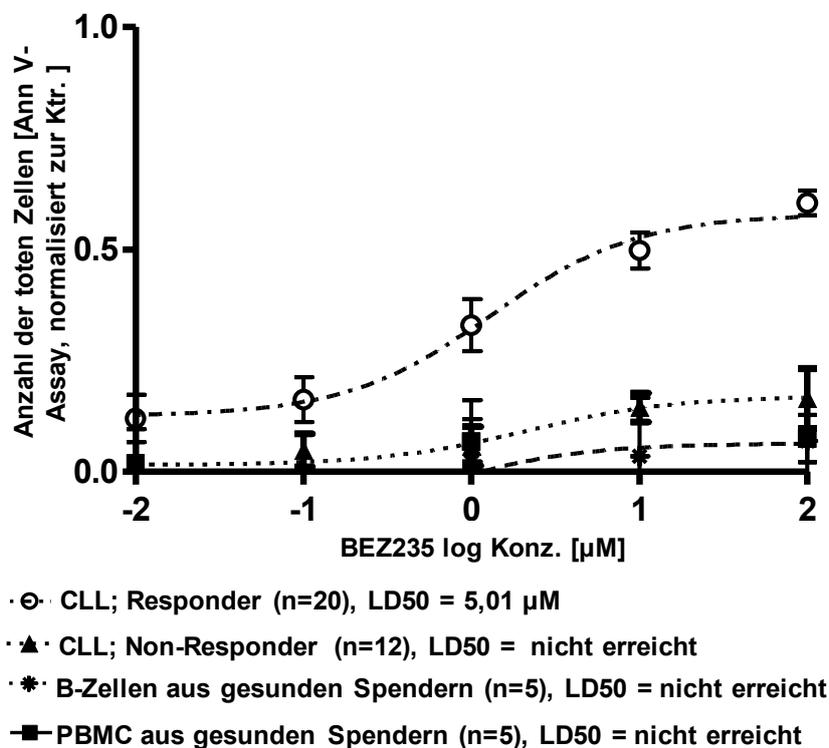


**Abbildung 12: Wirksamkeit von PI-103, Apoptose in der CLL zu induzieren.** Die toten Zellen sind gegen die logarithmische Konzentration von PI-103 aufgetragen und die entsprechenden LD50-Werte ermittelt.

Es zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der spätapoptotischen CLL-Zellen in einem sigmoidalen Kurvenverlauf in den untersuchten Proben. Dagegen blieb die Apoptoseinduktion durch PI-103 auf die gesunden B-Zellen und PBMC aus. Die LD50 lag bei 3,17  $\mu\text{M}$  bei den CLL-Proben (*Responder*), wurde hingegen bei den gesunden B-Zellen (gगतet) und PBMC nicht erreicht. Bei 19 CLL-Proben blieb die Wirkung von PI-103 aus. Diese Gruppe wurde im Laufe der Arbeit weiter charakterisiert (siehe 3.2, Seite 71), um eine Ursache für das Ausbleiben der Wirkung zu finden.

## Der duale PI3K-Inhibitor BEZ235 induziert spezifisch Apoptose in einer Fraktion von CLL-Proben.

Äquivalent wurde die Wirkung von BEZ235 auf das Überleben von CLL-Zellen untersucht. CLL-Zellen wurden über 48 h mit BEZ235 in Konzentrationen von 0,01 bis 100  $\mu\text{M}$  inkubiert. Der Anteil an toten/spätapoptotischen Zellen wurde im Durchflusszytometer erfasst. Abbildung 13 präsentiert die Ergebnisse der 32 untersuchten Proben. Um die Selektivität von BEZ235 auf CLL-Zellen zu veranschaulichen, wurden ebenfalls B-Zellen und PBMC aus gesunden Spendern gleichartig über 48 h mit BEZ235 inkubiert.



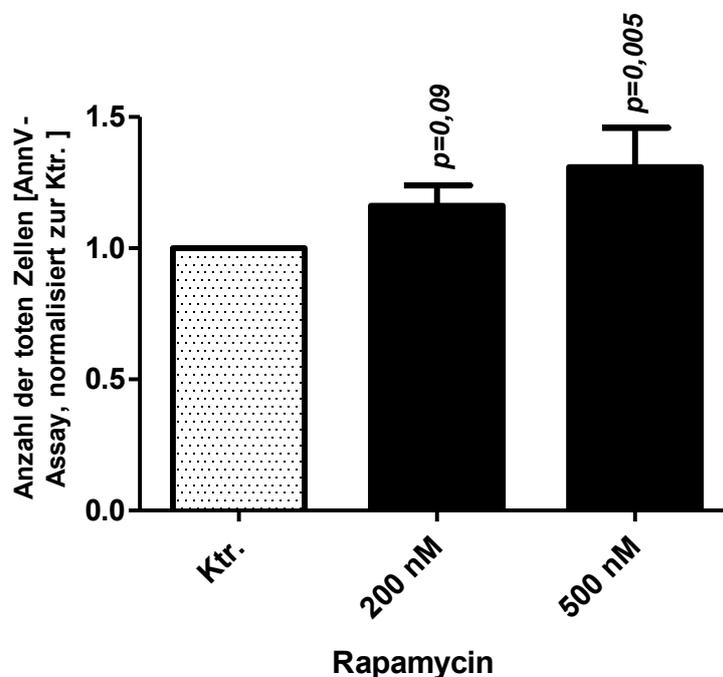
**Abbildung 13: Wirksamkeit von BEZ235, Apoptose in der CLL zu induzieren.** Die toten Zellen sind gegen die logarithmische Konzentration von BEZ235 aufgetragen und die entsprechenden LD50-Werte ermittelt.

Es zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der spätapoptotischen CLL-Zellen in einem sigmoidalen Kurvenverlauf in den untersuchten Proben. Dagegen blieb die Apoptoseinduktion durch BEZ235 auf die gesunden B-Zellen und PBMC aus. Die LD50 lag bei 5,01  $\mu\text{M}$  bei den CLL-Proben (*Responder*) und wurde nicht erreicht bei den gesunden B-Zellen (gegattet) und PBMC. Dennoch verlaufen die Kurven parallel zu der CLL-*Responder*-Kurve und zeigen einen annähernd sigmoidalen Kurvenverlauf. Bei 12 CLL-Proben blieb die

Wirkung von BEZ235 aus. Auf diese Gruppe wurde im weiteren Verlauf der Arbeit näher eingegangen (siehe 3.2, Seite 71).

### Rapamycin induziert Apoptose spezifisch in CLL-Zellen.

Um zunächst die Wirkung von Rapamycin auf das Überleben von CLL-Zellen zu untersuchen, wurden diese über 48 h mit Rapamycin in Konzentrationen von zunächst 200 und 500 nM inkubiert (erstes Patientenkollektiv aus der Vorphase; n=16). Diese Dosierungen basieren auf verschiedene Publikationen (61). Der Anteil an toten/spätapoptotischen Zellen wurde im Durchflusszytometer erfasst. Abbildung 14 präsentiert die Ergebnisse der 16 untersuchten Proben.

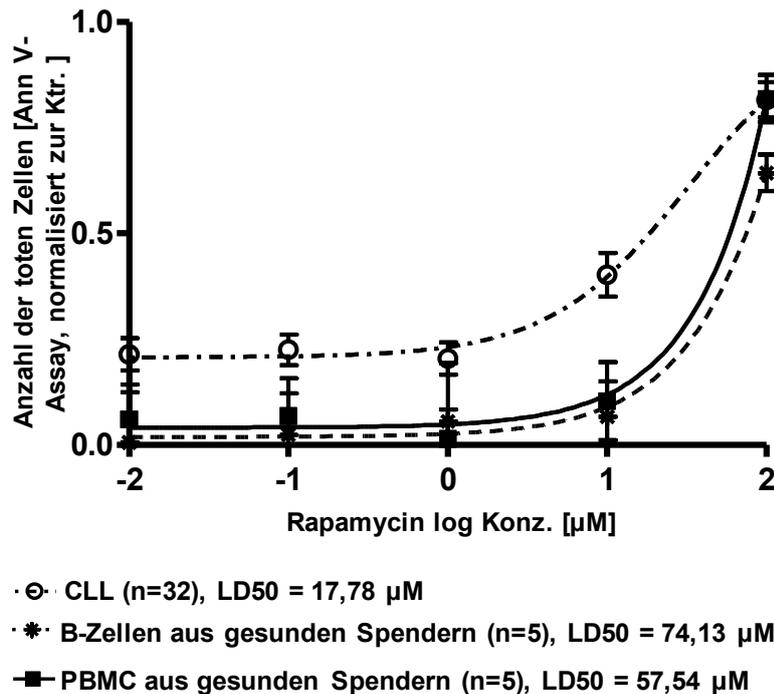


**Abbildung 14: Wirksamkeit von Rapamycin, Apoptose in der CLL zu induzieren.** Die toten Zellen sind gegen die Konzentration von Rapamycin aufgetragen. Unbehandelte CLL-Zellen wurden statistisch mit den mit Rapamycin behandelten CLL-Zellen verglichen; angegeben sind die SEM (*standard error of the mean*).

Es zeigte sich eine Zunahme der spätapoptotischen CLL-Zellen in den untersuchten Proben. Die P-Werte wurden mittels GraphPad Prism® ermittelt. Sie lagen bei 200 nM bei  $p=0,09$  und bei 500 nM bei  $p<0,05$ .

Um eine genauere Wirkung von Rapamycin auf das Sterben von CLL-Zellen zu untersuchen, führten wir weiter LD50-Dosisfindungen an einem Hauptpatientenkollektiv (Tabelle 3) durch. Zu diesem Zweck wurden CLL-Zellen über 48 h mit Rapamycin in Konzentrationen von 0,01

bis 100  $\mu\text{M}$  inkubiert. Der Anteil an toten/spätapoptotischen Zellen wurde im Durchflusszytometer erfasst. Abbildung 15 illustriert die Ergebnisse der 32 untersuchten Proben. Um die Selektivität von Rapamycin auf CLL-Zellen zu veranschaulichen, wurden ebenfalls B-Zellen (gगतet) und PBMC aus gesunden Spendern gleichartig über 48 h mit Rapamycin inkubiert.

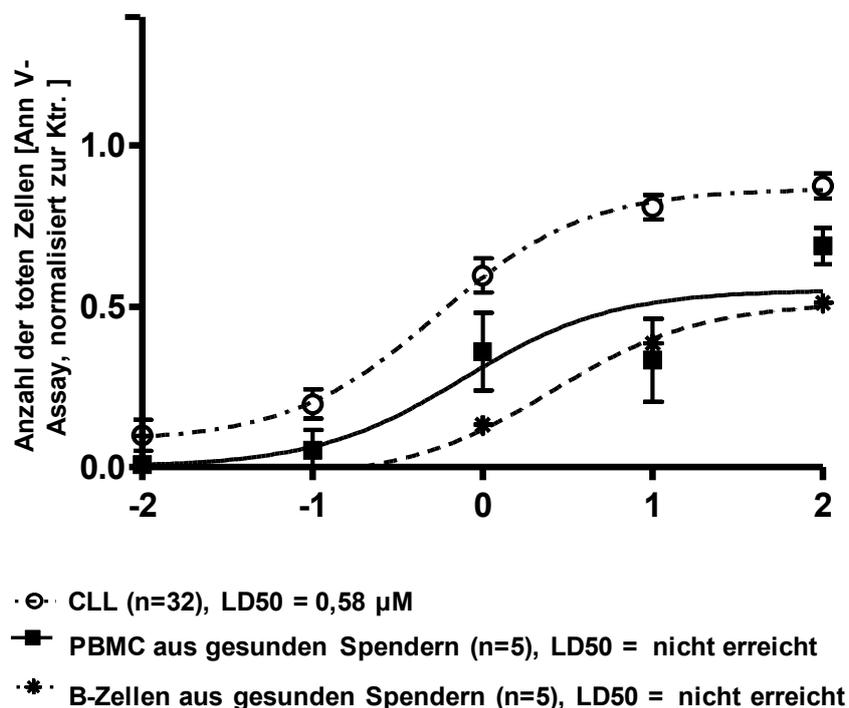


**Abbildung 15: Wirksamkeit von Rapamycin, Apoptose in der CLL zu induzieren.** Die toten Zellen sind gegen die logarithmische Konzentration von Rapamycin aufgetragen und die entsprechenden LD50-Werte ermittelt.

Es zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der spätapoptotischen Zellen sowohl in den untersuchten CLL-Proben als auch in den gesunden B-Zellen und PBMC in einem steilen Kurvenverlauf. Die LD50 lag bei 17,78  $\mu\text{M}$  bei den CLL-Proben, 74,13  $\mu\text{M}$  bei den gesunden B-Zellen (gगतete B-Zellen) und 57,54  $\mu\text{M}$  bei den gesunden PBMC. Diese Kurven verliefen ebenfalls zunehmend steil – parallel zueinander und zu der CLL-Kurve. Die Ergebnisse des Hauptpatientenkollektivs zeigten keinerlei CLL-Proben, die kein Ansprechen auf Rapamycin aufwiesen.

### A443654 induziert Apoptose spezifisch in CLL-Zellen.

Analog wurde die Wirkung von A443654 auf das Überleben von CLL-Zellen untersucht. CLL-Zellen wurden über 48 h mit A443654 in Konzentrationen von 0,01 bis 100  $\mu\text{M}$  inkubiert. Der Anteil an toten/spätapoptotischen Zellen wurde im Durchflusszytometer erfasst. Abbildung 16 veranschaulicht die Ergebnisse der 32 untersuchten Proben. Um die Selektivität von A443654 auf CLL-Zellen zu veranschaulichen, wurden ebenfalls B-Zellen und PBMC aus gesunden Spendern äquivalent über 48 h mit A443654 inkubiert.

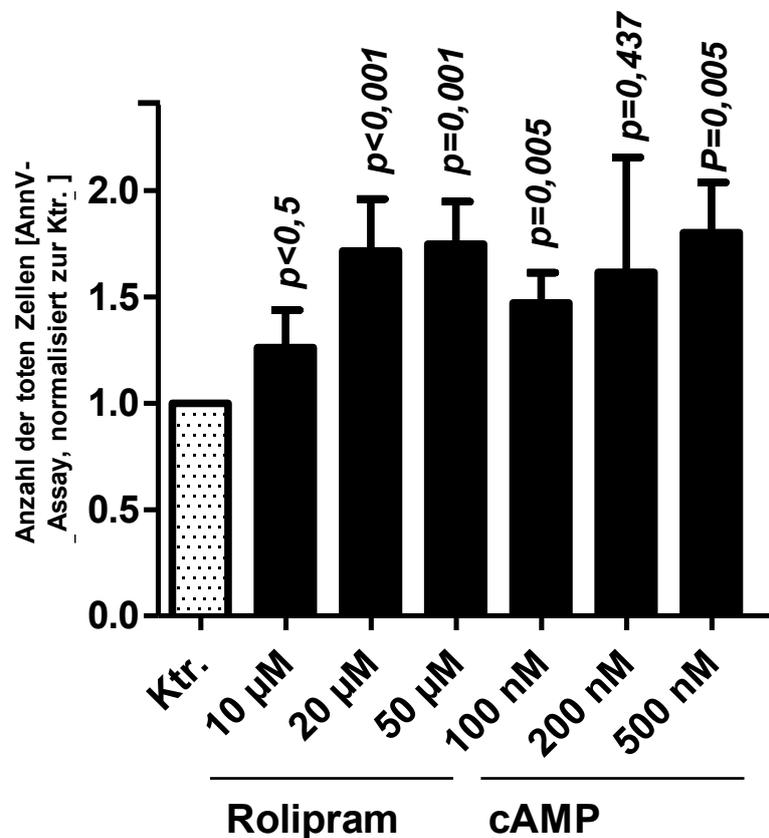


**Abbildung 16: Wirksamkeit von A443654, Apoptose in der CLL zu induzieren.** Die toten Zellen sind gegen die logarithmische Konzentration von A443654 aufgetragen und die entsprechenden LD50-Werte ermittelt.

Es zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der spätapoptotischen CLL-Zellen in einem sigmoidalen Kurvenverlauf in den untersuchten Proben. Die LD50 lag bei 0,58  $\mu\text{M}$  bei den CLL-Proben. Apoptose wurde ebenso durch A443654 in den gesunden B-Zellen und PBMC induziert, jedoch konnte keine LD50 erreicht werden. Die Kurven zeigten ebenso einen sigmoidalen Kurvenverlauf und verliefen parallel zueinander und zu der CLL-Responder-Kurve. Interessanterweise gab es keine CLL-Proben, die kein Ansprechen auf A443654 gezeigt haben (*Non-Responder-Gruppe*).

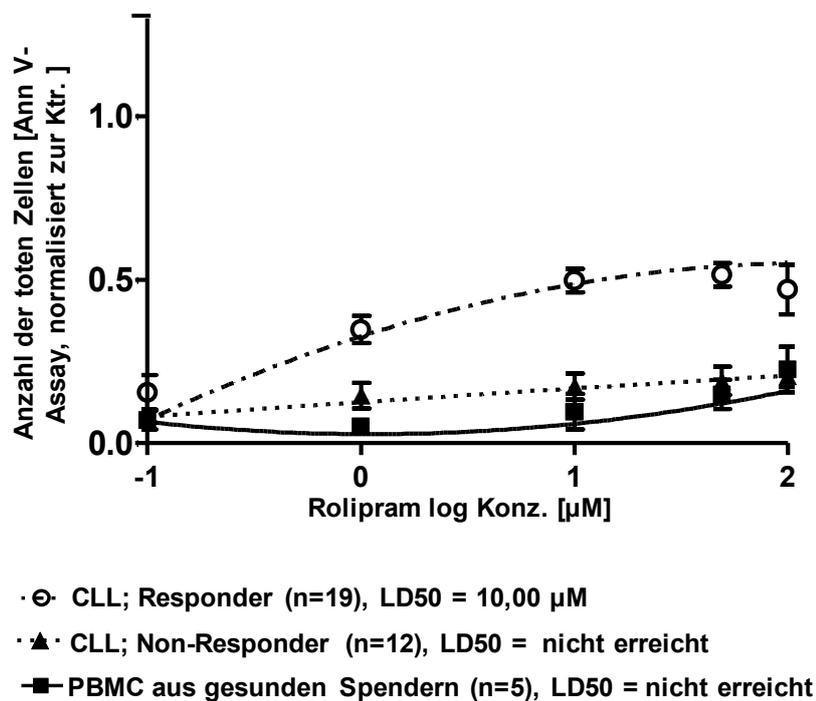
**Rolipram induziert Apoptose spezifisch in einem Teil von CLL-Proben.**

Um die Wirkung von Rolipram/cAMP [N<sup>6</sup>, 2'-O-Dibutyryladenosin-3', 5'-zyklisches monophosphat] auf das Überleben von CLL-Zellen zu untersuchen, wurden zunächst ebenfalls in einer Vorphase (n=16) CLL-Zellen über 48 h mit Rolipram/cAMP inkubiert. Zunächst wurden Konzentrationen verwendet, die aus der Literatur (125, 192) bzw. aus Vorarbeiten entnommen wurden. Diese Untersuchung diente dazu, einen groben Überblick über die Wirkung der Substanzen in der CLL zu erlangen. Der Anteil an toten/spätapoptotischen Zellen wurde im Durchflusszytometer erfasst. Abbildung 17 veranschaulicht die Ergebnisse der 16 untersuchten Proben.



**Abbildung 17: Wirksamkeit von Rolipram/cAMP, Apoptose in der CLL zu induzieren.** Die toten Zellen sind gegen die Konzentration von Rolipram/cAMP aufgetragen. Unbehandelte CLL-Zellen wurden statistisch mit den mit Rolipram/cAMP behandelten CLL-Zellen verglichen; angegeben sind die SEM (*standard error of the mean*).

Es zeigte sich eine Zunahme der spätapoptotischen CLL-Zellen in den untersuchten Proben. Um eine genauere Wirkung und die LD50-Dosisfindungen vornehmen zu können, wurden CLL-Zellen über 48 h mit Rolipram in Konzentrationen von 0,1, 1, 10, 50 und 100  $\mu\text{M}$  inkubiert. Der Anteil an toten/spätapoptotischen Zellen wurde im Durchflusszytometer erfasst. Abbildung 18 präsentiert die Ergebnisse der 32 untersuchten Proben (Hauptpatientenkollektiv, Tabelle 3, Seite 48). Um die Selektivität von Rolipram auf CLL-Zellen zu veranschaulichen, wurden ebenfalls B-Zellen (gegattet) und PBMC aus gesunden Spendern gleichzeitig über 48 h mit Rolipram inkubiert.

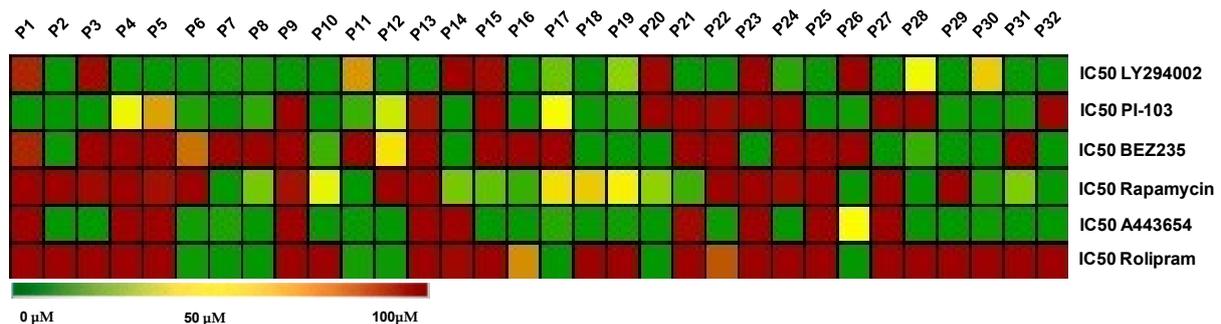


**Abbildung 18: Wirksamkeit von Rolipram, Apoptose in der CLL zu induzieren.** Die toten Zellen sind gegen die logarithmische Konzentration von Rolipram aufgetragen und die entsprechenden LD50-Werte ermittelt.

Es zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der spätapoptotischen CLL-Zellen in den untersuchten Proben. Die Dosiswirkungskurven lassen sich als asymptotische Form charakterisieren. Dagegen blieb die Apoptoseinduktion durch Rolipram auf die gesunden B-Zellen und PBMC aus. Die LD50 lag bei 10  $\mu\text{M}$  bei den CLL-Proben (*Responder*), wurde hingegen nicht bei den gesunden B-Zellen und PBMC erreicht. Bei 12 CLL-Proben zeigte Rolipram eine mangelnde Effizienz. Auf diese Gruppe wurde im weiteren Verlauf der Arbeit intensiver eingegangen (siehe 3.2, Seite 71).

### 3.1.2 Der Einfluss der Substanzen auf die Viabilität von CLL-Zellen

Um die Wirkung der Inhibitoren auf die Viabilität in der CLL zu untersuchen, wurden CLL-Zellen über 48 h mit den Inhibitoren inkubiert. Die relative Anzahl an metabolisch aktiven Zellen wurde mittels MTT-Assay erfasst. Zunächst werden die Wirkungen der Inhibitoren an 32 untersuchten CLL-Patienten zur Übersicht in einer Heatmap dargestellt (siehe Abbildung 19).

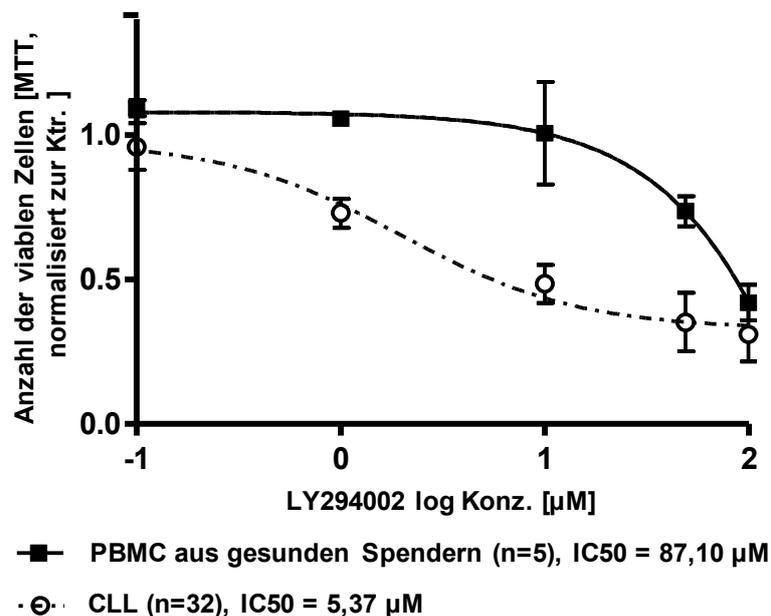


**Abbildung 19: Heatmap auf Basis der ermittelten IC50-Werte aus dem MTT-Assay.** Die Reduktion der Viabilität durch die Inhibitoren variiert innerhalb der untersuchten CLL-Proben. Die unterschiedlichen Farben verdeutlichen die unterschiedliche Ansprechrate der Inhibitoren. In Gene Pattern wurden jeweils alle IC50-Werte (jene lagen zwischen 0,01 und 101  $\mu\text{M}$ ) als Tabelle eingegeben und auf Basis dieser Werte wurde die Heatmap erstellt. Grün steht für gute Ansprecher (*Responder*), orange-gelb steht für mittelmäßig gute Ansprecher und rot für schlechte Ansprecher bzw. *Non-Responder*. *Non-Respondern* wurde zwecks statistischer Auswertung eine IC50 von 101  $\mu\text{M}$  erteilt. Charakterisierung der *Responder/Non-Responder* bitte aus dem Methodenteil entnehmen (siehe 2.2.5, Seite 44).

Die IC50-Werte wurden mittels GraphPad Prism® ermittelt und als Heatmap dargestellt. Die IC50-Werte variieren unter den 32 CLL-Proben (Hauptpatientenkollektiv, siehe Tabelle 3, Seite 48)<, unter diesen befinden sich gute Ansprecher (*Responder*), mittelmäßig gute Ansprecher und auch schlechte Ansprecher (*Non-Responder*) (Definitionen der Gruppen siehe 2.2.5, Seite 45). Die Gruppen werden durch die verschiedenen Farben gekennzeichnet. Es zeigte sich eine variable Abnahme der Viabilität in den CLL-Proben; dies zeigen die Anhäufungen der Farben grün-gelb-orange, die wiederum die IC50-Werte repräsentieren.

### LY294002 reduziert die Zellviabilität spezifisch in CLL-Zellen.

Um die Wirkung von LY294002 auf die Viabilität von CLL-Zellen zu untersuchen, wurden diese über 48 h mit LY294002 in Konzentrationen von 0,1, 1, 10, 50 und 100  $\mu\text{M}$  inkubiert. Die relative Anzahl an metabolisch aktiven Zellen wurde mittels MTT-Assay erfasst. Die Abbildung 20 veranschaulicht die Resultate der 32 untersuchten CLL-Patienten. Zur Bestimmung der Selektivität von LY294002 wurden analog auch PBMC aus gesunden Spendern mit LY294002 inkubiert.

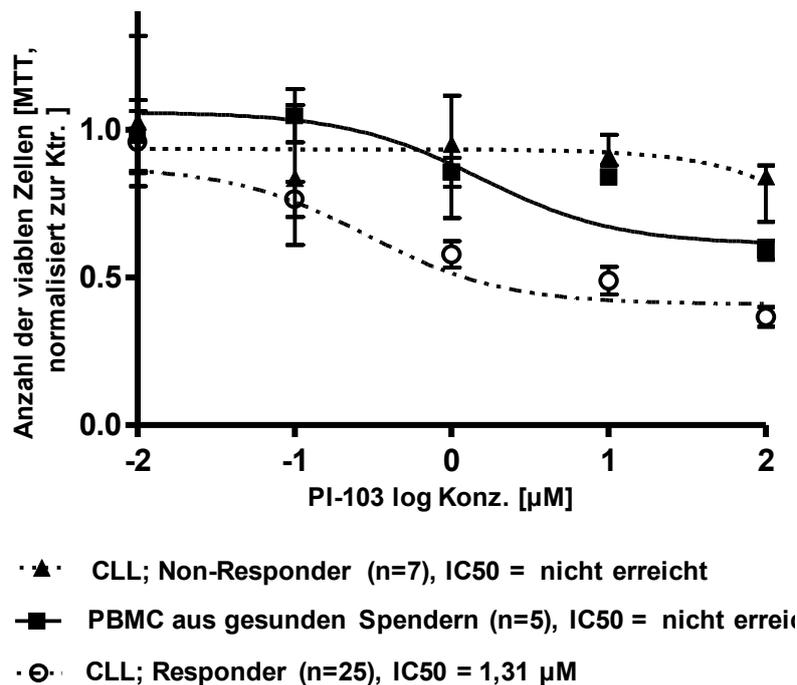


**Abbildung 20: Wirksamkeit von LY294002, die Viabilität in CLL-Zellen zu reduzieren.** Die relative Anzahl an metabolisch aktiven Zellen ist gegen die logarithmische Konzentration von LY294002 aufgetragen und die entsprechenden IC50-Werte sind ermittelt.

Es zeigte sich eine dosisabhängige Abnahme der Viabilität der CLL-Zellen in einem sigmoidal-abnehmenden Kurvenverlauf in den untersuchten Proben. Die IC50 lag bei 5,37  $\mu\text{M}$  bei den CLL-Proben; es gab keine *Non-Responder*-Gruppe. In einem steil abnehmenden Kurvenverlauf wird ebenso die Viabilität durch LY294002 in den gesunden PBMC von gesunden Spendern reduziert; die IC50 lag bei 87,10  $\mu\text{M}$ .

## PI-103 reduziert die Zellviabilität spezifisch in einer Fraktion von CLL-Proben.

Äquivalent wurde die Wirkung von PI-103 auf die Viabilität von CLL-Zellen untersucht. CLL-Zellen wurden über 48 h mit PI-103 in Konzentrationen von 0,01 bis 100  $\mu\text{M}$  inkubiert. Die relative Anzahl an metabolisch aktiven Zellen wurde mittels MTT-Assay erfasst. Abbildung 21 präsentiert die Ergebnisse der 32 untersuchten Proben. Um die Selektivität von PI-103 auf CLL-Zellen zu veranschaulichen, wurden ebenfalls PBMC aus gesunden Spendern analog über 48 h mit PI-103 inkubiert.

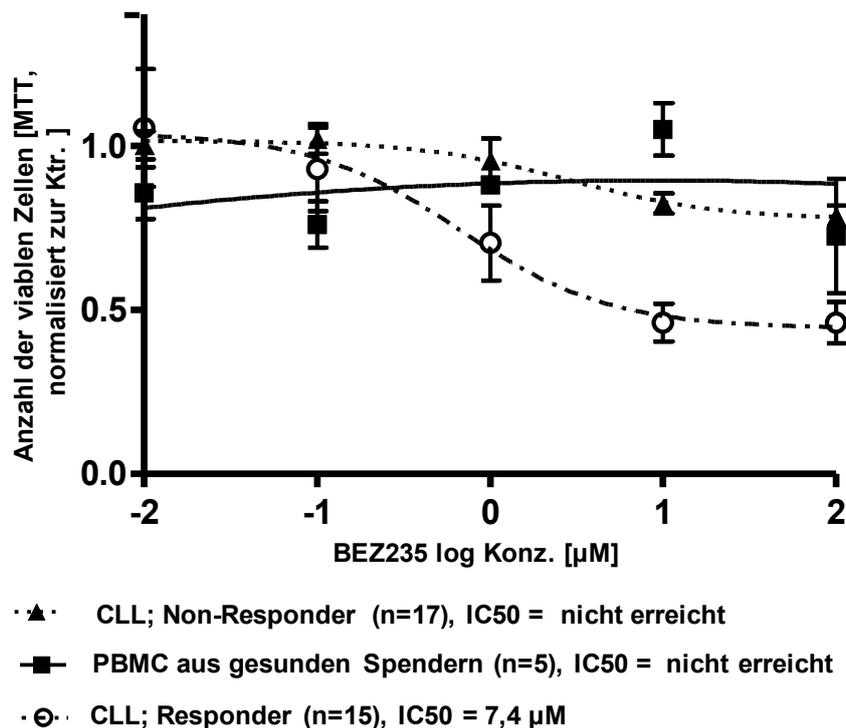


**Abbildung 21: Wirksamkeit von PI-103, die Viabilität in CLL-Zellen zu reduzieren.** Die relative Anzahl an metabolisch aktiven Zellen ist gegen die logarithmische Konzentration von PI-103 aufgetragen und die entsprechenden IC50-Werte sind ermittelt.

Es zeigte sich eine dosisabhängige Abnahme der Viabilität der CLL-Zellen in den untersuchten Proben. Die Dosiswirkungskurve lässt sich als sigmoidal-abnehmend beschreiben. Die IC50 lag bei 1,31  $\mu\text{M}$  bei den CLL-Proben (*Responder*). Dagegen blieb die Viabilitätsabnahme durch PI-103 in den gesunden PBMC von gesunden Spendern aus, so dass die IC50 auch nicht erreicht wurde. Bei 7 CLL-Proben blieb die erhoffte Wirkung aus. Es konnte keine IC50 erreicht werden, jedoch lässt sich die Kurve ebenso als sigmoidal-abnehmend beschreiben und verläuft parallel zu der CLL-*Responder*-Kurve. Diese Gruppe wurde im Laufe der Arbeit weiter charakterisiert (siehe 3.2, Seite 71), um eine eventuelle Ursache für das Ausbleiben der Wirkung zu erforschen.

## BEZ235 senkt die Zellviabilität spezifisch in einer Fraktion von CLL-Proben.

Gleichermaßen wurde die Wirkung von BEZ235 auf die Viabilität von CLL-Zellen untersucht. CLL-Zellen wurden über 48 h mit BEZ235 in Konzentrationen von 0,01 bis 100  $\mu\text{M}$  inkubiert. Die relative Anzahl an metabolisch aktiven Zellen wurde mittels MTT-Assay erfasst. Abbildung 22 präsentiert die Ergebnisse der 32 untersuchten Proben. Um die Selektivität von BEZ235 auf CLL-Zellen zu veranschaulichen, wurden ebenfalls PBMC aus gesunden Spendern analog über 48 h mit BEZ235 inkubiert.

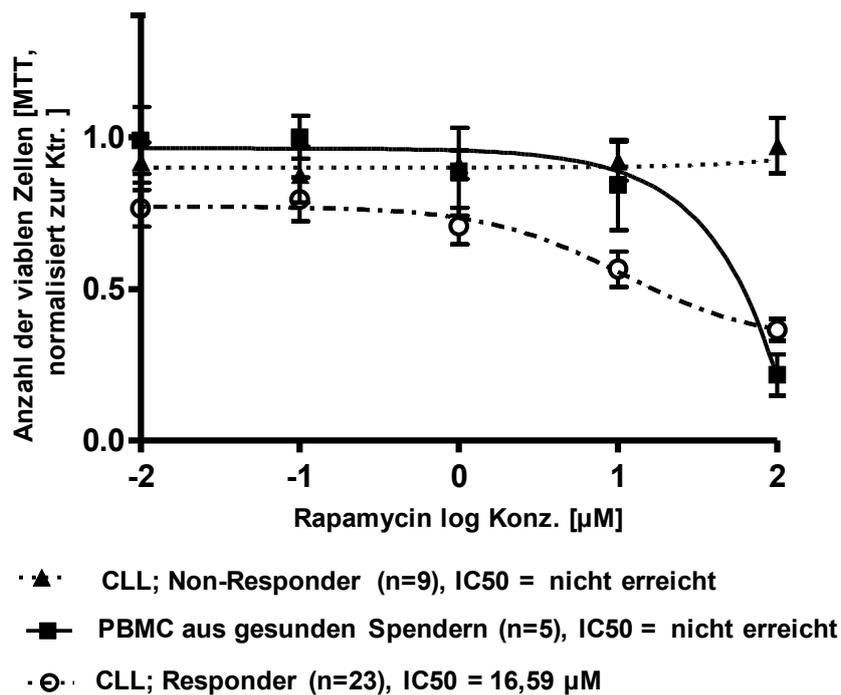


**Abbildung 22: Wirksamkeit von BEZ235, die Viabilität in CLL-Zellen zu reduzieren.** Die relative Anzahl an metabolisch aktiven Zellen ist gegen die logarithmische Konzentration von BEZ235 aufgetragen und die entsprechenden IC50-Werte sind ermittelt.

Es zeigte sich eine dosisabhängige Abnahme der Viabilität der CLL-Zellen in den untersuchten Proben. Der Kurvenverlauf ist nahezu sigmoidal-abnehmend. Die IC50 lag bei 7,4  $\mu\text{M}$  bei den CLL-Proben (*Responder*). Dagegen blieb die Viabilitätsabnahme durch BEZ235 in den gesunden PBMC von gesunden Spendern aus, so dass die IC50 nicht erreicht wurde. Bei 7 CLL-Proben zeigte BEZ235 eine mangelnde Effizienz, so dass keine IC50 erreicht werden konnte. Der Kurvenverlauf lässt sich ebenso als sigmoidal-abnehmend beschreiben und die Kurve verläuft ebenso parallel zu der CLL-*Responder*-Kurve. Auf diese Gruppe wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit weiter eingegangen (siehe 3.2, Seite 71).

### Rapamycin senkt die Zellviabilität spezifisch in CLL-Zellen.

Äquivalent wurde die Wirkung von Rapamycin auf die Viabilität von CLL-Zellen untersucht. CLL-Zellen wurden über 48 h mit Rapamycin in Konzentrationen von 0,01 bis 100  $\mu\text{M}$  inkubiert. Die relative Anzahl an metabolisch aktiven Zellen wurde mittels MTT-Assay erfasst. Abbildung 23 veranschaulicht die Ergebnisse der 32 untersuchten Proben. Um die Selektivität von Rapamycin auf CLL-Zellen zu veranschaulichen, wurden ebenfalls PBMC aus gesunden Spendern analog über 48 h mit Rapamycin inkubiert.

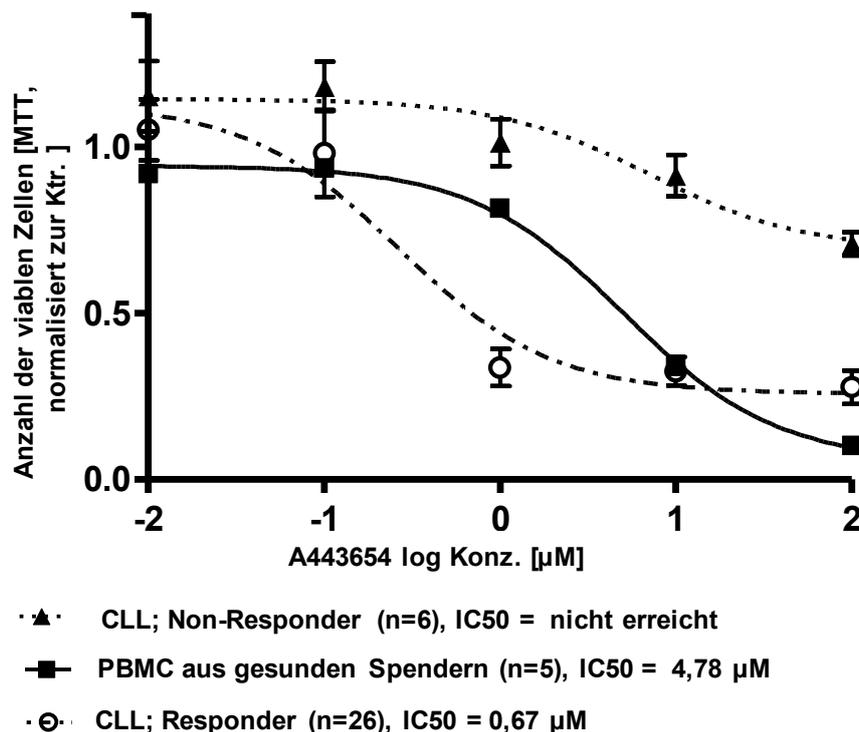


**Abbildung 23: Wirksamkeit von Rapamycin, die Viabilität in CLL-Zellen zu reduzieren.** Die relative Anzahl an metabolisch aktiven Zellen ist gegen die logarithmische Konzentration von Rapamycin aufgetragen und die entsprechenden IC50-Werte sind ermittelt.

Es zeigte sich eine dosisabhängige Abnahme der Viabilität der CLL-Zellen in den untersuchten Proben. Die IC50 lag bei 16,59  $\mu\text{M}$  bei den CLL-Proben (*Responder*); die Kurve verläuft flach-abnehmend. Die Viabilität durch Rapamycin in den gesunden PBMC von gesunden Spendern nahm in einer steil abnehmenden Kurve ebenso ab, so dass eine abgeschätzte IC50 von 91  $\mu\text{M}$  erreicht wurde. Bei 9 CLL-Proben blieb die Wirkung von Rapamycin aus. Dieser Kurvenverlauf zeigt keinerlei Ähnlichkeit mit der CLL-*Responder*-Kurve (wie bei den Dosiswirkungskurven von den mit PI-103 und BEZ235 behandelten Zellen). Diese Gruppe wurde im Laufe der Arbeit weiter charakterisiert (siehe 3.2, Seite 71).

## A443654 senkt die Zellviabilität spezifisch in einer Fraktion von CLL-Proben.

Um nun die Wirkung von A443654 auf die Viabilität von CLL-Zellen zu untersuchen, wurden CLL-Zellen über 48 h mit A443654 in Konzentrationen von 0,01 bis 100  $\mu\text{M}$  inkubiert. Die relative Anzahl an metabolisch aktiven Zellen wurde mittels MTT-Assay erfasst. Abbildung 24 stellt die Ergebnisse der 32 untersuchten Proben dar. Um die Selektivität von A443654 auf CLL-Zellen zu veranschaulichen, wurden ebenfalls PBMC aus gesunden Spendern analog über 48 h mit A443654 inkubiert.

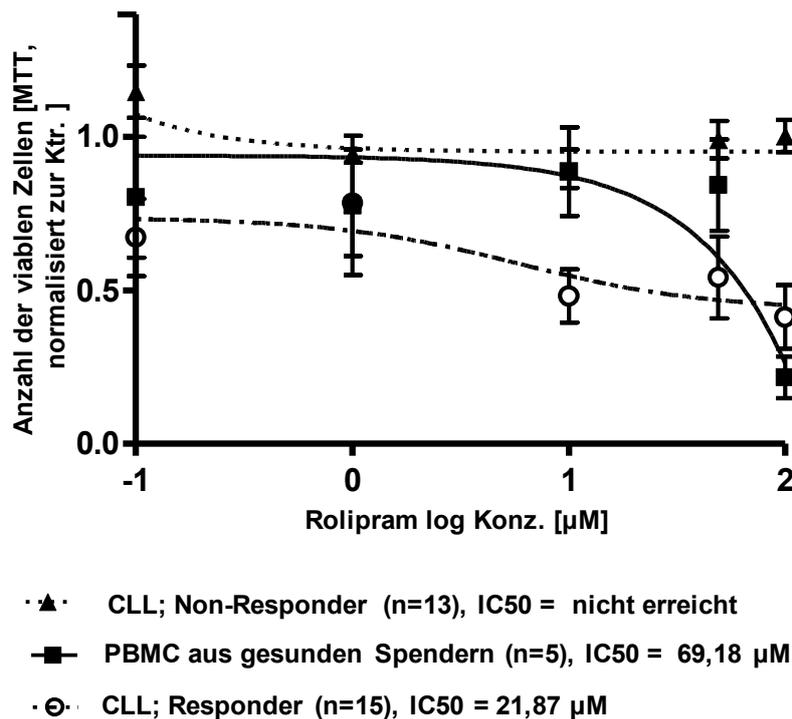


**Abbildung 24: Wirksamkeit von A443654, die Viabilität in CLL-Zellen zu reduzieren.** Die relative Anzahl an metabolisch aktiven Zellen ist gegen die logarithmische Konzentration von A443654 aufgetragen und die entsprechenden IC50-Werte sind ermittelt.

Es zeigte sich eine dosisabhängige Abnahme der Viabilität sowohl in den untersuchten CLL-Proben als auch in den gesunden PBMC. Die IC50 lag bei 0,67  $\mu\text{M}$  bei den CLL-Proben (*Responder*); die Kurve lässt sich als sigmoidal-abnehmend beschreiben. Die IC50 lag bei 4,78  $\mu\text{M}$  bei den gesunden PBMC von gesunden Spendern; diese Kurve verläuft ebenso sigmoidal-abnehmend. Bei 6 CLL-Proben zeigte A446554 eine mangelnde Effizienz, so dass keine IC50 erreicht werden konnte. Die Kurve lässt sich als annähernd parallel verlaufend zu der PBMC-Kurve charakterisieren. Diese Gruppe wurde im Laufe der Arbeit weiter charakterisiert (siehe 3.2, Seite 70).

## Rolipram senkt die Zellviabilität spezifisch in einer Fraktion von CLL-Proben.

In ähnlicher Weise wurde die Wirkung von Rolipram auf die Viabilität von CLL-Zellen untersucht. CLL-Zellen wurden über 48 h mit Rolipram in Konzentrationen von 0,1, 1, 10, 50 und 100  $\mu\text{M}$  inkubiert. Die relative Anzahl an metabolisch aktiven Zellen wurde mittels MTT-Assay erfasst. Abbildung 25 veranschaulicht die Ergebnisse der 32 untersuchten Proben. Um die Selektivität von Rolipram auf CLL-Zellen zu veranschaulichen, wurden ebenfalls PBMC aus gesunden Spendern analog über 48 h mit Rolipram inkubiert.



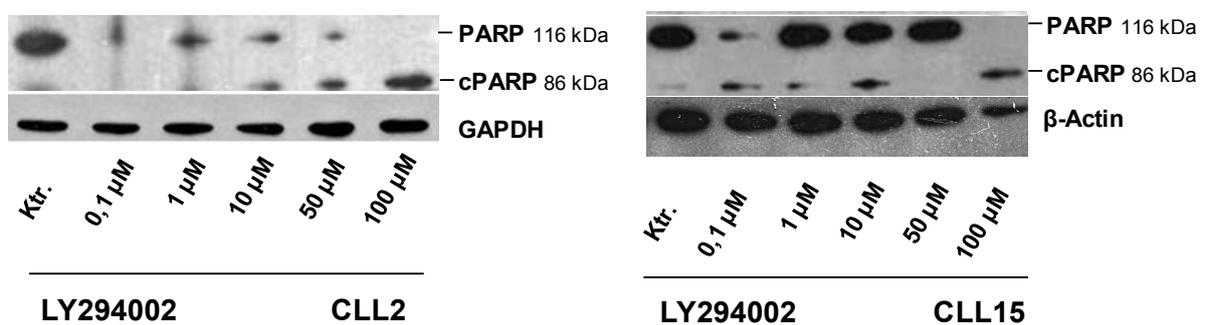
**Abbildung 25: Wirksamkeit von Rolipram, die Viabilität in CLL-Zellen zu reduzieren.** Die relative Anzahl an metabolisch aktiven Zellen ist gegen die logarithmische Konzentration von Rolipram aufgetragen und die entsprechenden IC50-Werte sind ermittelt.

Es zeigte sich eine dosisabhängige Abnahme der Viabilität sowohl in den untersuchten CLL-Proben als auch in den gesunden PBMC. Die Kurve der CLL-Responder-Gruppe nimmt flach ab, dagegen fällt die PBMC-Kurve steil ab. Die IC50 lag bei 21,87  $\mu\text{M}$  bei den CLL-Proben (Responder) und 69,18  $\mu\text{M}$  bei den gesunden PBMC von gesunden Spendern. Bei 13 CLL-Proben blieb die Wirkung aus, so dass keine IC50 erreicht werden konnte. Der Kurvenverlauf zeigte keine Ähnlichkeit mit der CLL-Responder-Kurve. Auf diese Gruppe wurde im weiteren Verlauf der Arbeit eingegangen (siehe 3.2, Seite 70).

### 3.1.3 Die Charakterisierung der induzierten Apoptose

#### Die Spaltung von PARP gibt einen Hinweis auf die induzierte Apoptose durch LY294002.

CLL-Zellen wurden mit LY294002 für 48 h inkubiert; nach der Inkubation wurde Apoptose/Zelltod durch Annexin-V/7-AAD-Färbung nachgewiesen und zusätzlich wurden Zelllysate gesammelt, um die induzierte Apoptose weiter durch einen Immunoblot zu spezifizieren. Diese Zelllysate wurden via Western Blot (n=1) analysiert.

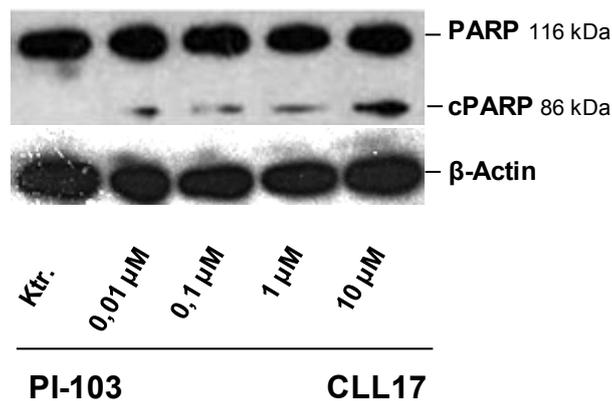


**Abbildung 26: Apoptose wird durch Spaltung von PARP nachgewiesen.** Die Immunoblots zeigen die Proteinlevel von PARP, cPARP („c“ steht für *cleaved*, Spaltprodukt) und die jeweiligen Standards.

Die Immunoblots zeigen in den behandelten Proben einen Anstieg der gespaltenen bzw. aktiven Form von PARP. Die Effektorcaspasen werden durch die Initiatorcaspasen aktiviert; diese kaskadenartige Aktivierung führt unter anderem auch zur Spaltung von PARP (116 kDa) (ein Substrat der Caspasen) zu der gespaltenen (*gecleavten*) Form von PARP (86 kDa). Daraufhin wird das apoptotische Programm durch dieses Spaltprodukt ausgeführt. Als Ladekontrolle dienen  $\beta$ -Actin und GAPDH.

#### Die induzierte Apoptose durch PI-103 wurde durch Spaltung von PARP nachgewiesen.

CLL-Zellen wurden mit PI-103 für 48 h inkubiert; nach der Inkubation hat man Apoptose/Zelltod durch Annexin-V/7-AAD-Färbung nachgewiesen. Die Zelllysate wurden via Western Blot (n=1) analysiert.

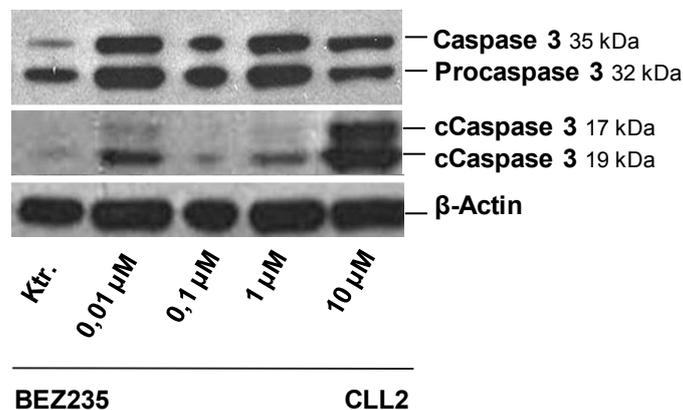


**Abbildung 27: Apoptose wurde durch Spaltung von PARP nachgewiesen.** Die Immunoblots zeigen die Proteinlevel von PARP, cPARP („c“ steht für *cleaved*, Spaltprodukt) und die jeweiligen Standards.

Die Immunoblots zeigen in den behandelten Proben einen Anstieg der gespaltenen bzw. aktiven Form von PARP. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Actin.

### Die Spaltung von Caspase 3 gibt einen Hinweis auf die induzierte Apoptose durch BEZ235

CLL-Zellen wurden mit BEZ235 für 48 h inkubiert; nach der Inkubation hat man Apoptose/Zelltod durch Annexin-V/7-AAD-Färbung nachgewiesen. Die Zelllysate wurden via Western Blot (n=1) analysiert.



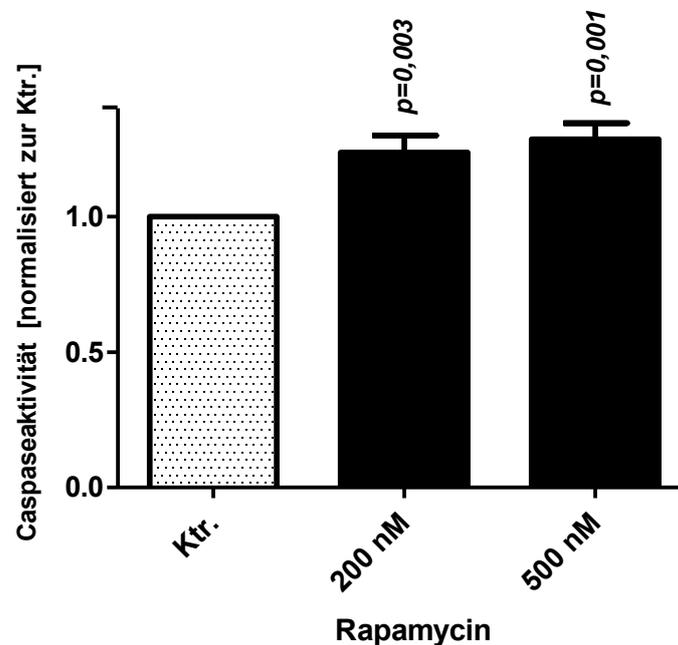
**Abbildung 28: Apoptose wurde durch Spaltung von Caspase 3 nachgewiesen.** Die Immunoblots zeigen die Proteinlevel von Caspase 3, cCaspase („c“ steht für *cleaved*, Spaltprodukt) und die jeweiligen Standards.

Die Immunoblots zeigen in den behandelten Proben einen Anstieg der gespaltenen bzw. aktiven Form von Caspase 3. Caspase 3 gehört zu den Effektorcaspasen; eine Aktivierung bedeutet, dass die kaskadenartige Aktivierung des apoptotischen Programms ausgelöst

wurde. Dabei bewirkten 10  $\mu$ M BEZ235 – im Gegensatz zu 0,01, 0,1 oder 1  $\mu$ M – eine verstärkte Spaltung der Caspase 3. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Actin.

### **Die Apoptose wurde bei Rapamycin durch erhöhte Aktivität von Caspase 3/7 nachgewiesen.**

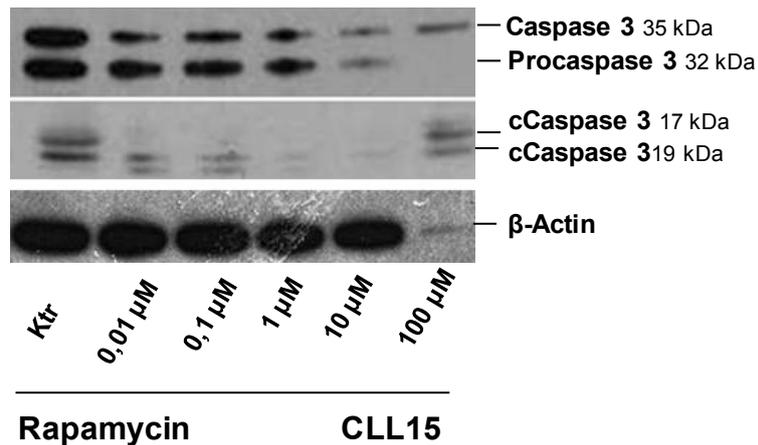
Im Folgenden wurden CLL-Zellen von CLL-Patienten (aus der Vorphase) mit jeweils 200 und 500 nM (aus der Literatur (61) und Vorarbeiten entnommen) Rapamycin für 48 h inkubiert und die Caspase-3/7-Aktivität wurde kolorimetrisch gemessen. Dies diente dazu, einen groben Überblick über den Mechanismus der induzierten Apoptose durch Rapamycin zu erlangen.



**Abbildung 29: Apoptose wurde durch erhöhte Aktivität von Caspase 3/7 nachgewiesen.** Die Caspase-Aktivität ist gegen die Konzentrationen der mit Rapamycin behandelten CLL-Zellen und der unbehandelten Zellen aufgetragen. Unbehandelte CLL-Zellen wurden statistisch mit den mit Rapamycin behandelten CLL-Zellen verglichen; angegeben sind die SEM (*standard error of the mean*).

Die Caspasen 3 und 7 gehören beide zu den Effektorcaspasen; eine Aktivierung bedeutet, dass das apoptotische Programm initiiert wurde. Das Säulendiagramm zeigt an, dass die Caspase-3/7-Aktivität in den mit Rapamycin behandelten CLL-Zellen (n=16) höher ist als in den unbehandelten Kontrollen. Die aufgetragenen Werte wurden zuvor auf Basis der jeweiligen Kontrollen normalisiert.

Darauffolgend sind die Ergebnisse der Western Blots aus dem Hauptpatientenkollektiv abgebildet, die eine genauere Darstellung liefern. Denn zur besseren Dosisfindung wurden 5 Konzentrationen in einer logarithmischen Skalierung ausgewählt. CLL-Zellen wurden mit Rapamycin für 48 h inkubiert; nach der Inkubation hat man Apoptose/Zelltod durch Annexin-V/7-AAD-Färbung nachgewiesen. Die Zelllysate wurden via Western Blot (n=1) analysiert.

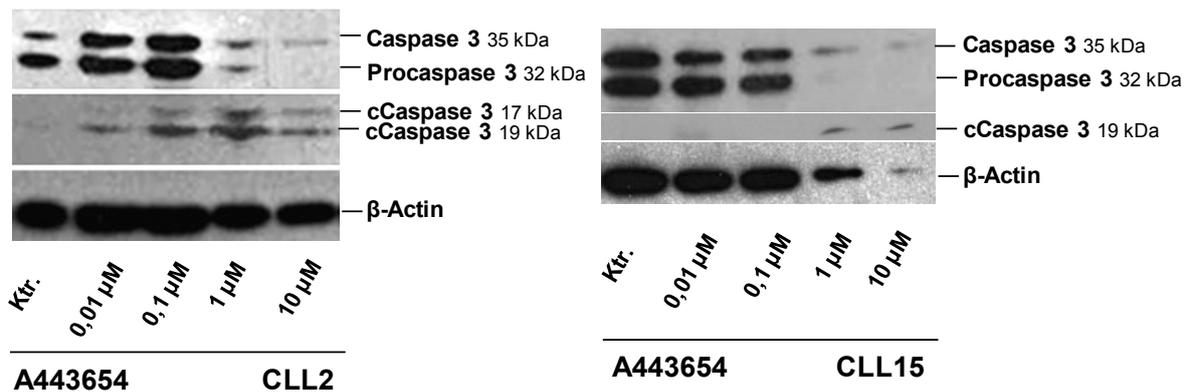


**Abbildung 30: Apoptose wurde durch Spaltung von Caspase 3 nachgewiesen.** Die Immunoblots zeigen die Proteinlevel von Caspase 3, cCaspase („c“ steht für *cleaved*, Spaltprodukt) und die jeweiligen Standards.

Die Immunoblots zeigen in den behandelten Proben einen Anstieg der gespaltenen bzw. aktiven Form von Caspase 3. Als Ladekontrolle diente β-Actin.

## Die Spaltung von Caspase 3 gibt einen Hinweis auf die induzierte Apoptose durch A443654.

CLL-Zellen werden mit A443654 für 48 h inkubiert; nach der Inkubation hat man Apoptose/Zelltod durch AnnexinV/7AAD-Färbung nachgewiesen. Die Zellysate wurden via Western Blot (n=1) analysiert.

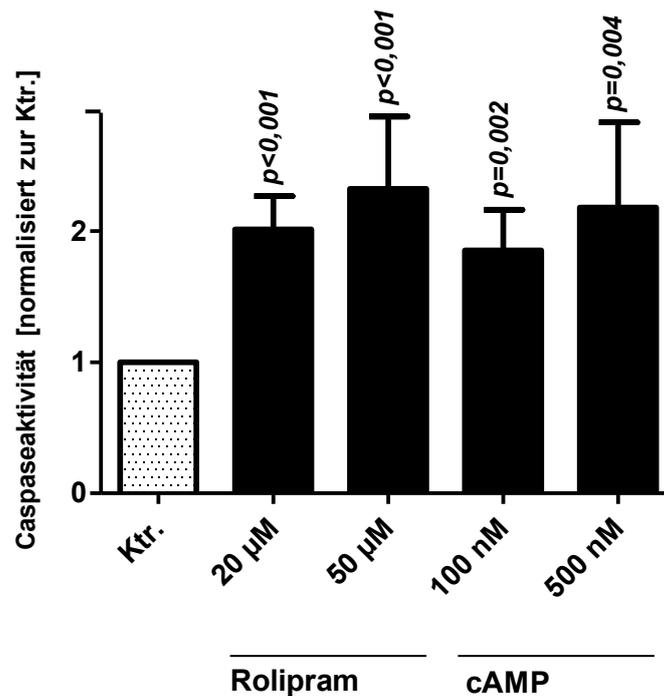


**Abbildung 31: Apoptose wurde durch Spaltung von Caspase 3 nachgewiesen.** Die Immunoblots zeigen die Proteinlevel von Caspase 3, cCaspase 3 („c“ steht für *cleaved*, Spaltprodukt) und die jeweiligen Standards.

Die Immunoblots zeigen in den behandelten Proben einen Anstieg der gespaltenen bzw. aktiven Form von Caspase 3. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Actin.

**Die induzierte Apoptose wurde bei Rolipram/cAMP durch eine erhöhte Aktivität von Caspase 3/7 nachgewiesen.**

Im Folgenden wurden CLL-Zellen (Hauptpatientenkollektiv) mit jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen an Rolipram und cAMP für 48 h inkubiert und die Caspase-3/7-Aktivität wurde kolorimetrisch gemessen.



**Abbildung 32: Apoptose wurde durch eine erhöhte Aktivität von Caspase 3/7 nachgewiesen.** Die Caspase-Aktivität ist gegen die mit Rolipram/cAMP behandelten als auch die unbehandelten CLL-Zellen aufgetragen. Unbehandelte CLL-Zellen wurden statistisch mit den mit Rolipram/cAMP behandelten CLL-Zellen verglichen; angegeben sind die SEM (*standard error of the mean*).

Das Säulendiagramm zeigt an, dass die Caspase-3/7-Aktivität in den jeweils mit Rolipram und cAMP behandelten CLL-Zellen (n=16) höher ist als in den nicht behandelten. Die aufgetragenen Werte wurden zuvor zu den jeweiligen Kontrollen normalisiert.

### 3.2 Die Charakterisierung von *Responder*- und *Non-Responder*-CLL-Proben

Nach den *In-vitro*-Experimenten an den CLL-Zellen (n=32) ergaben sich Gruppen, die gut, kaum oder gar nicht auf die jeweiligen Substanzen ansprachen. Die folgende Tabelle 4 zeigt eine Unterteilung aller Patienten in Bezug auf die Wirksamkeit des jeweiligen Inhibitors, um so ein besseres Ansprechen (*Response*) von einem schlechten zu unterscheiden. In der Tabelle ist cAMP nicht zu finden, da die Experimente aufgrund der fehlenden Wirksamkeit von cAMP an nur 10 CLL-Proben durchgeführt wurden.

**Tabelle 4: Zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen Wirksamkeiten der Substanzen anhand der LD50/IC50 ("n.r." steht für *not reached*).**

	LY294002	PI-103	BEZ235	Rapamycin	A4436542	Rolipram
<b>CLL; Responder</b>	n=32	n=13	n=20	n=32	n=32	n=19
<b>LD50</b>	36,30 µM	3,17 µM	5,01 µM	17,78 µM	0,58 µM	10,00 µM
<b>CLL; Non-Responder</b>	n=0	n=19	n=12	n=0	n=0	n=10
<b>LD50</b>		n.r.	n.r.			n.r.
<b>PBMC aus gesunden Spendern</b>	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
<b>LD50</b>	n.r.	n.r.	n.r.	57,54 µM	n.r.	n.r.
<b>B-Zellen aus gesunden Spendern</b>	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
<b>LD50</b>	n.r.	n.r.	n.r.	74,13 µM	n.r.	n.r.
<b>CLL; Responder</b>	n=32	n=25	n=15	n=23	n=26	n=15
<b>IC50</b>	5,37 µM	1,31 µM	7,40 µM	16,59 µM	0,67 µM	21,87 µM
<b>CLL; Non-Responder</b>	n=0	n=7	n=17	n=9	n=6	n=13
<b>IC50</b>		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
<b>PBMC aus gesunden Spendern</b>	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
<b>IC50</b>	87,10 µM	n.r.	n.r.	47,54 µM	4,78 µM	69,18 µM

Diese unterschiedlichen *Responses* wurden im Folgenden näher charakterisiert. Mögliche Ursachen für eine fehlende *Response* könnten klinisch-pathologische Parameter, das Onkogen TCL1A oder auch völlig andere Faktoren sein.

#### 3.2.1 Die Korrelation der Ansprechrate der Inhibitoren mit klinisch-pathologischen Parametern

Im Folgenden wurden die klinisch-pathologischen Parameter mit der unterschiedlichen Ansprechrate (*Response*) der Inhibitoren korreliert. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe von GraphPad Prism® durchgeführt.

	WBC gegen LD50	Binet-Stadium gegen LD50	Serum-TK gegen LD50	Serum-β2MG gegen LD50	LDT </>6 M gegen LD50	LDT </>12 M gegen LD50
LY294002	$p=0,1231$	$p=0,4848$	$p=0,2166$	$p=0,9291$	$p=0,2410$	$p=0,0579$
PI-103	$p=0,9351$	$p=0,2793$	$p=0,6029$	$p=0,1964$	$p=0,4719$	$p=0,3764$
BEZ235	$p=0,3051$	$p=0,1858$	$p=0,3913$	$p=0,2740$	$p=1,0000$	$p=0,5000$
Rapa	$p=0,0591$	$p=0,4847$	$p=0,1965$	$p=0,0470$	$p=0,0375$	$p=0,0514$
A443654	$p=0,0692$	$p=0,4226$	$p=0,8666$	$p=0,4303$	$p=0,3568$	$p=0,2483$
Rolipram	$p=0,4559$	$p=0,3634$	$p=0,3445$	$p=0,0608$	$p=0,4851$	$p=0,4397$

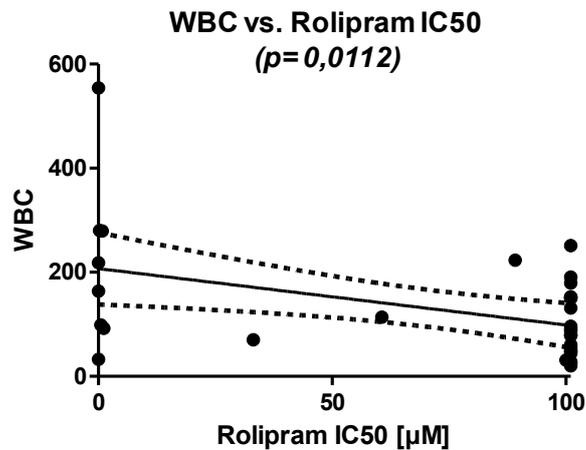
	WBC gegen IC50	Binet-Stadium gegen IC50	Serum-TK gegen IC50	Serum-β2MG gegen IC50	LDT </>6 M gegen IC50	LDT </>12 M gegen IC50
LY294002	$p=0,5487$	$p=0,0738$	$p=0,6642$	$p=0,8244$	$p=0,1837$	$p=0,1779$
PI-103	$p=0,8201$	$p=0,0382$	$p=0,3242$	$p=0,2470$	$p=0,3239$	$p=0,9805$
BEZ235	$p=0,4946$	$p=0,4838$	$p=0,2726$	$p=0,8879$	$p=0,0794$	$p=0,4696$
Rapa	$p=0,1217$	$p=0,4236$	$p=0,2822$	$p=0,4291$	$p=0,3819$	$p=0,8057$
A443654	$p=0,2309$	$p=0,0131$	$p=0,0768$	$p=0,3494$	$p=0,0653$	$p=0,8071$
Rolipram	$p=0,0112$	$p=0,1956$	$p=0,4367$	$p=0,3481$	$p=0,3332$	$p=0,2654$

**Tabelle 5a:** Darstellung des ersten Teils der Korrelationen der klinisch-pathologischen Parameter gegen die *Response* der Inhibitoren (zweiter Teil folgt). Die statistisch signifikanten Assoziationen wurden grau markiert.

## WBC

Der WBC wurde entweder zum Zeitpunkt der Probenverarbeitung (n=20) oder vor dem Zeitpunkt der Probenverarbeitung (n=12) bestimmt. Bezüglich der Höhe des WBC wurde weder eine Korrelation zur stattgehabten Vortherapie noch zum relativen Zeitpunkt seiner Messung zu dem der Probe detektiert.

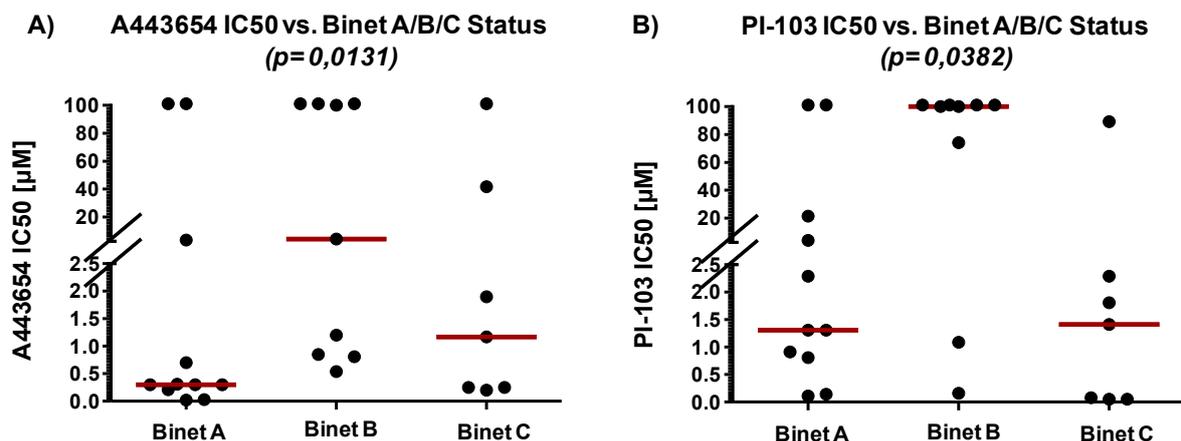
Es zeigte sich, dass der WBC signifikant mit der *Response* von Rolipram korreliert; Rolipram zeigte eine signifikant bessere Wirksamkeit in Proben mit hohen WBC (Abbildung 33). Die Wirksamkeit von Rapamycin und A443654 tendiert zu höherer Effektivität bei niedrigen WBC (Abbildung nicht gezeigt, da keine Signifikanz vorlag).



**Abbildung 33: Wirksamkeit von Rolipram ist abhängig von den WBC.** Statistische Darstellung der WBC gegen LD50-/IC50-Werte von Rolipram anhand einer linearen Regressionsanalyse. Abgebildet ist die Regressionsgerade. Die gestrichelten Linien stellen das 95%-ige Konfidenzintervall dar.

### Binet-Stadium

Die grobe Zuordnung der *Response* der Inhibitoren zu den jeweiligen Binet-Stadien hat ergeben, dass Patientengruppen aus Binet B schlechter auf PI-103 und A443654 ansprechen (siehe Abbildung 34). Die Einteilung nach Binet wurde entweder zum Zeitpunkt der Probenverarbeitung oder vor dem Zeitpunkt der Probenverarbeitung vorgenommen bzw. bei Erstdiagnose erhoben. Leider standen uns keine konkreten Informationen zur Verfügung.

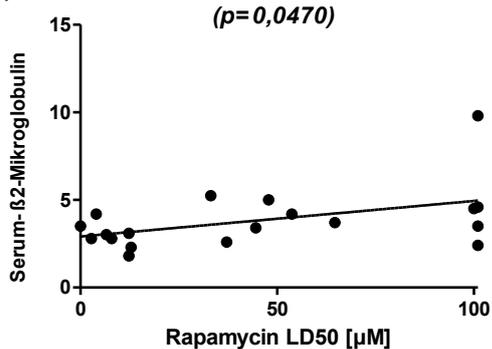


**Abbildung 34: Wirksamkeit von A443654 und PI-103 ist abhängig vom Binet-Status.** Dargestellt sind die IC50 von A443654 (A) und PI-103 (B) gegen den Binet-Status der jeweiligen Patienten. IC50-Fälle von Binet A, Binet B und Binet C wurden statistisch miteinander verglichen. Die roten Balken stellen die Mediane dar.

## Serum-β2-Mikroglobulinwerte

Nachdem auch die Serum-β2-Mikroglobulinwerte der CLL-Proben aus den Labordaten entnommen wurden, stellten wir fest, dass die CLL-Proben, die hohe Serum-β2-Mikroglobulinwerte aufwiesen, mit einer schlechten Wirksamkeit von Rapamycin assoziiert waren (siehe Abbildung 35).

**A) Serum-β2-Mikroglobulin vs. Rapamycin LD50**



**B)**

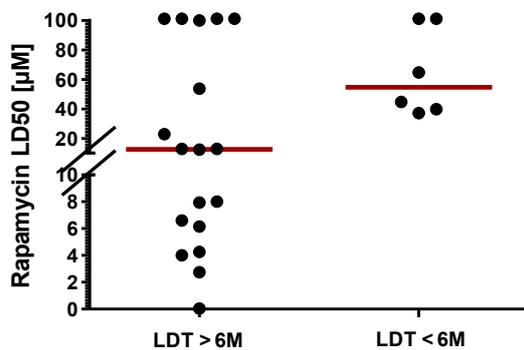
	Serum-β2MG-Status verfügbar	Serum-β2MG-Status nicht verfügbar
Rapamycin-Responder	n=15	n=9
Rapamycin-Non-Responder	n=5	n=3

**Abbildung 35: Wirksamkeit von Rapamycin ist abhängig von den Serum-β2-Mikroglobulinwerten.** Statistische Darstellung der Serum-β2-Mikroglobulinwerte gegen die LD50 von Rapamycin anhand einer linearen Regressionsanalyse. Abgebildet ist die Regressionsgerade (A). In (B) ist die Anzahl an Respondern und *Non-Respondern* abgebildet, inklusive der Angaben zu denjenigen CLL-Proben ohne Angaben über die Serum-β2-Mikroglobulinwerte.

## LDT

Die Wirksamkeit von Rapamycin korreliert signifikant mit der LDT der CLL-Proben (siehe Abbildung 36). Rapamycin wirkt bei einer LDT > 6 Monate der CLL-Proben effektiver. Für 8 CLL-Proben standen uns keine Angaben über die LDT zur Verfügung. Rapamycin zeigte auch eine sehr starke Tendenz, bei einer LDT > 12 Monate besser zu wirken als bei einer LDT < 12 Monate (Daten nicht gezeigt, da bei einem p-Wert = 0,0514 nicht signifikant).

**A) Rapamycin LD50 vs. LDT >6M/<6M Status**  
( $p=0,0375$ )



**B)**

	LDT > 6 M	LDT < 6 M	LDT nicht verfügbar
Rapamycin-Responder	n=14	n=4	n=6
Rapamycin-Non-Responder	n=4	n=2	n=2

**Abbildung 36: Wirksamkeit von Rapamycin ist abhängig von der LDT (relevanter Wert: größer/kleiner als 6 Monate).** Dargestellt sind die LD50-Werte von Rapamycin gegen die LDT größer (>) als 6 Monate (M) und kleiner (<) als 6 Monate (M) (A). Fälle, die eine LDT größer (>) als 6 Monate (M) aufweisen, wurden mit denen einer LDT kleiner (<) als 6 Monate (M) statistisch verglichen. In (B) sind die LDT der Anzahl der *Responder* und *Non-Responder* zugeordnet und die Anzahl an CLL-Proben, zu denen wir über keine Angaben zur LDT verfügten. Die roten Balken stellen die Mediane dar.

**Tabelle 5b: Korrelationen der klinisch-pathologische Tumor-Parameter mit der Response der Inhibitoren (zweiter Teil).** Die statistisch signifikanten Assoziationen wurden grau markiert.

	ZAP70 pos/neg gegen LD50	CD38 pos/neg gegen LD50	IGHV-Mutationsstatus gegen LD50	Vortherapiert j/n gegen LD50	Alter gegen LD50
LY294002	$p=0,4033$	$p=0,3695$	$p=0,3793$	$p=0,0471$	$p=0,8152$
PI-103	$p=0,2671$	$p=0,2144$	$p=0,1294$	$p=0,3596$	$p=0,8760$
BEZ235	$p=0,0371$	$p=0,0293$	$p=0,2033$	$p=0,2352$	$p=0,0137$
Rapa	$p=0,0422$	$p=0,0562$	$p=0,0972$	$p=0,0146$	$p=0,1867$
A443654	$p=0,3715$	$p=0,0352/0,0352$	$p=0,0521$	$p=0,4515$	$p=0,8061$
Rolipram	$p=0,5352$	$p=1,0000$	$p=0,8358$	$p=0,4535$	$p=0,3960$

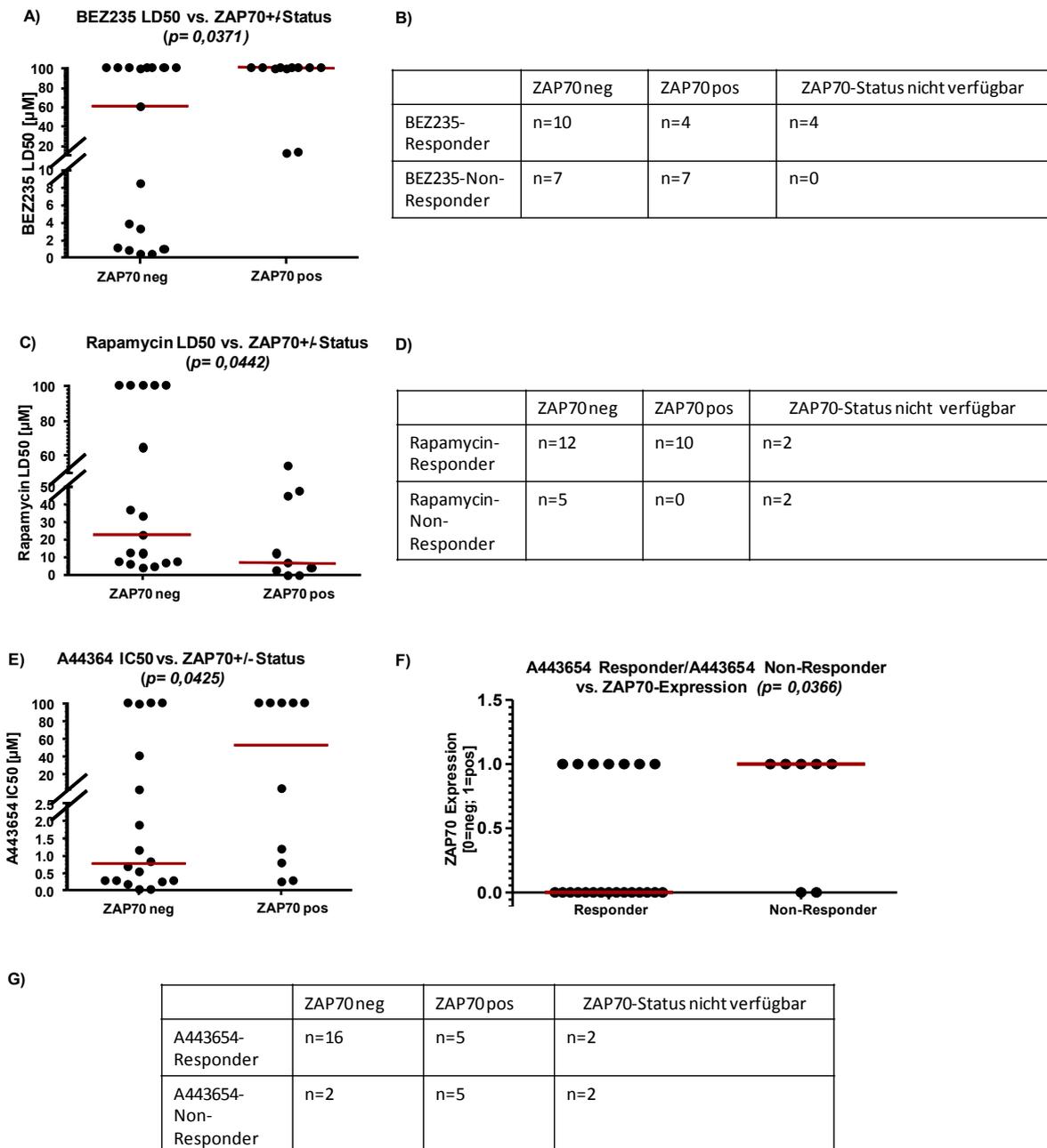
	ZAP70 pos/neg gegen IC50	CD38 pos/neg gegen IC50	IGHV-Mutationsstatus gegen IC50	Vortherapiert j/n gegen IC50	Alter gegen IC50
LY294002	$p=0,2897$	$p=0,1595$	$p=0,0204$	$p=0,1080$	$p=0,4659$
PI-103	$p=0,6383$	$p=0,6538$	$p=0,9510$	$p=0,8216$	$p=0,0490$
BEZ235	$p=0,4532$	$p=0,3959$	$p=0,4743$	$p=0,4493$	$p=0,3902$
Rapa	$p=0,9820$	$p=0,6723$	$p=0,2891$	$p=0,8687$	$p=0,0472$
A443654	$p=0,0425/0,0366$	$p=0,4889$	$p=0,0521$	$p=0,0326$	$p=0,1990$
Rolipram	$p=0,2156$	$p=0,4628$	$p=0,2325$	$p=0,3369$	$p=0,5443$

Die ZAP70- und CD38-Werte wurden im Labor für hämato-onkologische Routinediagnostik im Durchflusszytometer bestimmt.

### **ZAP70-Expression**

Die Wirksamkeit von BEZ235, Rapamycin und A443654 ist mit der ZAP70-Expression signifikant assoziiert (siehe Abbildung 37). BEZ235 und A443654 wirkten bei einer ZAP70-negativen-Patientenpopulation effektiver. Dagegen zeigte Rapamycin bei einer ZAP70-positiven-Patientenpopulation eine effektivere Wirksamkeit. Im Fall von 3 CLL-Proben lagen uns keine Angaben zu ihrem ZAP70-Status vor (Abbildung 37 (B, D, G)).

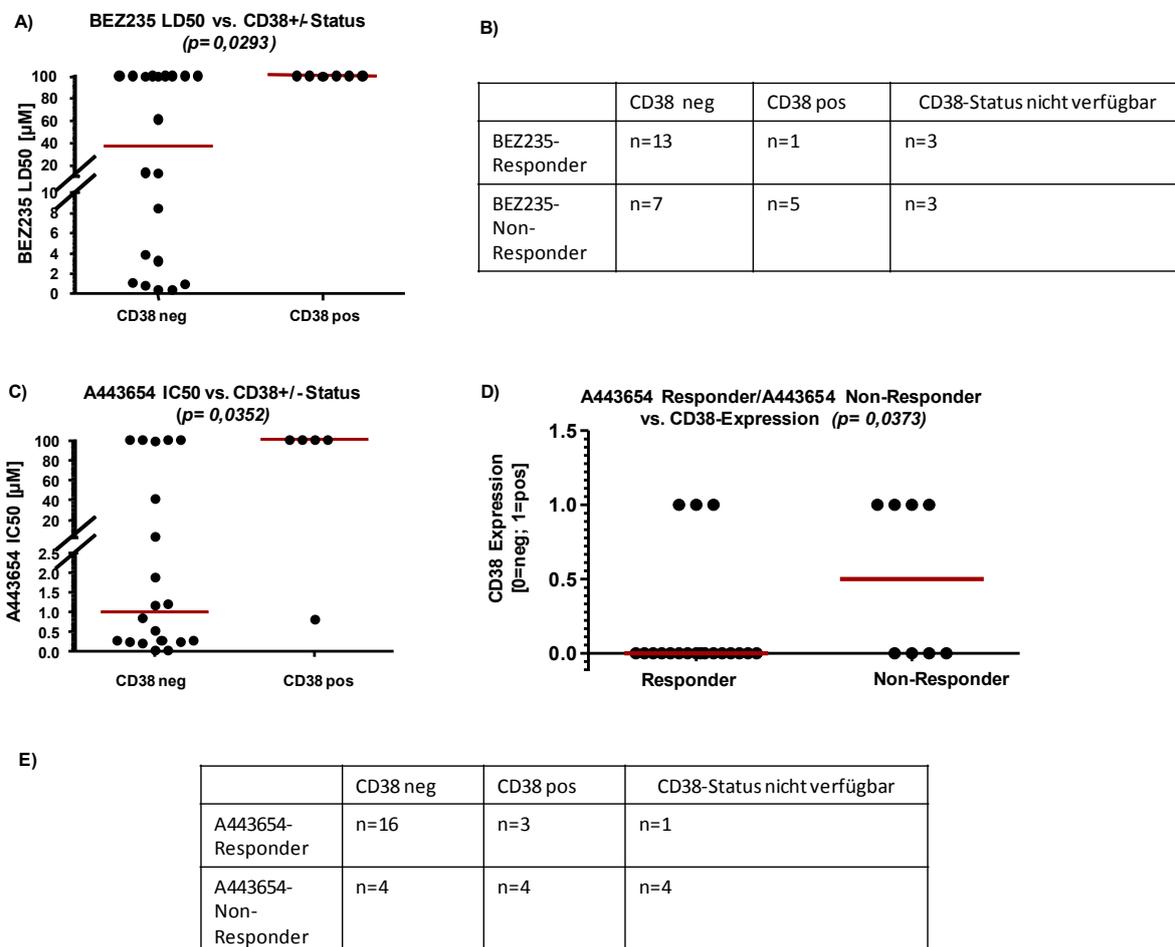
Eine Gegenüberstellung der *Responder*- und *Non-Responder-CLL-Proben*, die sich nach der Behandlung der CLL-Zellen mit A443654 ergeben hatten, ergab hinsichtlich ihres ZAP70-Status, dass die *Responder*-Gruppe vermehrt mit einer ZAP70-negativen Population signifikant assoziiert ist (siehe Abbildung 37 (F)).



**Abbildung 37: Wirksamkeit von BEZ235, Rapamycin und A443354 ist abhängig vom ZAP70-Status.** Dargestellt sind die LD50 von BEZ235 (A), die LD50 von Rapamycin (C) und die IC50 von A443654 (E) gegen die ZAP70-negativen (neg.) bzw. -positiven (pos.) Fälle. ZAP70-negative Fälle wurden mit ZAP70-positiven Fällen statistisch verglichen. In (F) wurden die *Responder*- und *Non-Responder*-CLL-Proben (basierend auf den IC50-Daten von A443654) hinsichtlich ihres ZAP70-Status statistisch gegenübergestellt. Die Anzahl an *Respondern* und *Non-Respondern* ist dem jeweiligen ZAP70-Status zugeordnet (B, D, G), inklusive der Angaben über diejenigen CLL-Proben ohne Angaben zum ZAP70-Status. Die roten Balken stellen die Mediane dar.

## CD38-Expression

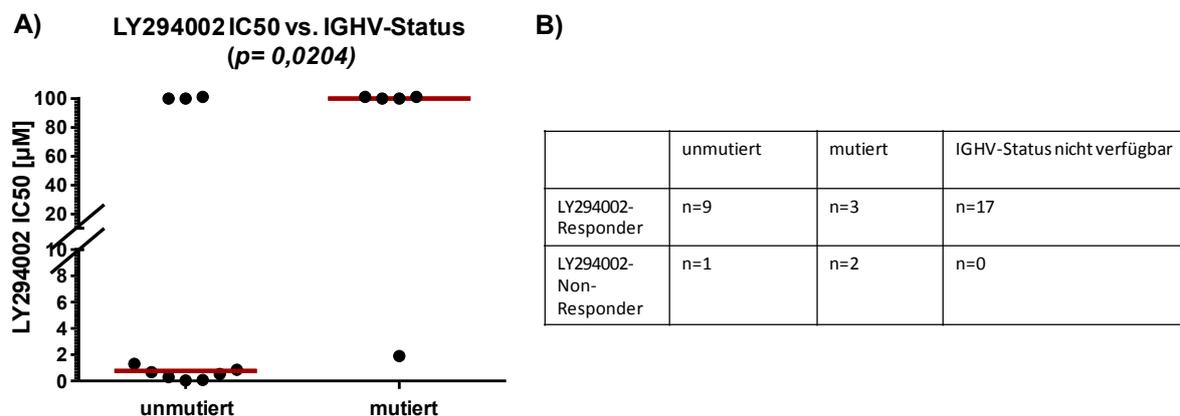
Die Wirksamkeit von BEZ235 und A443654 ist mit der CD38-Expression signifikant assoziiert (siehe Abbildung 38). BEZ235 und A443654 wirkten bei einer CD38-negativen Patientenpopulation signifikant effektiver. Für 5 CLL-Proben fehlten uns jegliche Angaben zum CD38-Status. Eine Gegenüberstellung der *Responder*- und *Non-Responder-CLL-Proben*, die sich aus der Behandlung der CLL-Zellen mit A443654 ergeben hatten, zeigten hinsichtlich ihres CD38-Status eine vermehrte CD38-negative Patientenpopulation in der *Responder*-Gruppe.



**Abbildung 38: Wirksamkeit von BEZ235 und A443354 ist abhängig vom CD38-Status.** Dargestellt sind die LD50/IC50 von BEZ235 (A) und A443654 (C) gegen die CD38-negativen (neg.) bzw. -positiven (pos.) Fälle. CD38-negative Fälle wurden mit CD38-positiven Fällen statistisch verglichen. In (D) wurden die *Responder*- und *Non-Responder-CLL-Proben* (basierend auf den IC50-Daten von A443654) hinsichtlich ihres CD38-Status statistisch gegenübergestellt. Die Anzahl an *Respondern* und *Non-Respondern* ist dem jeweiligen CD38-Status zugeordnet (B, E), inklusive der Angaben über diejenigen CLL-Proben ohne Angaben zum CD38-Status. Die roten Balken stellen die Mediane dar.

## IGHV-Mutationsstatus

Der IGHV-Mutationsstatus beeinträchtigte die Wirksamkeit von LY294002 (siehe Abbildung 39). LY294002 zeigte eine effektivere Wirksamkeit bei Patientengruppen, die ein unmutiertes IGHV-Gen aufweisen. In Abbildung 39, B wurde der Mutationsstatus der Anzahl der *Responder* und *Non-Responder* zugeordnet; für 5 CLL-Proben fehlten uns jegliche Angaben zum Mutationsstatus.

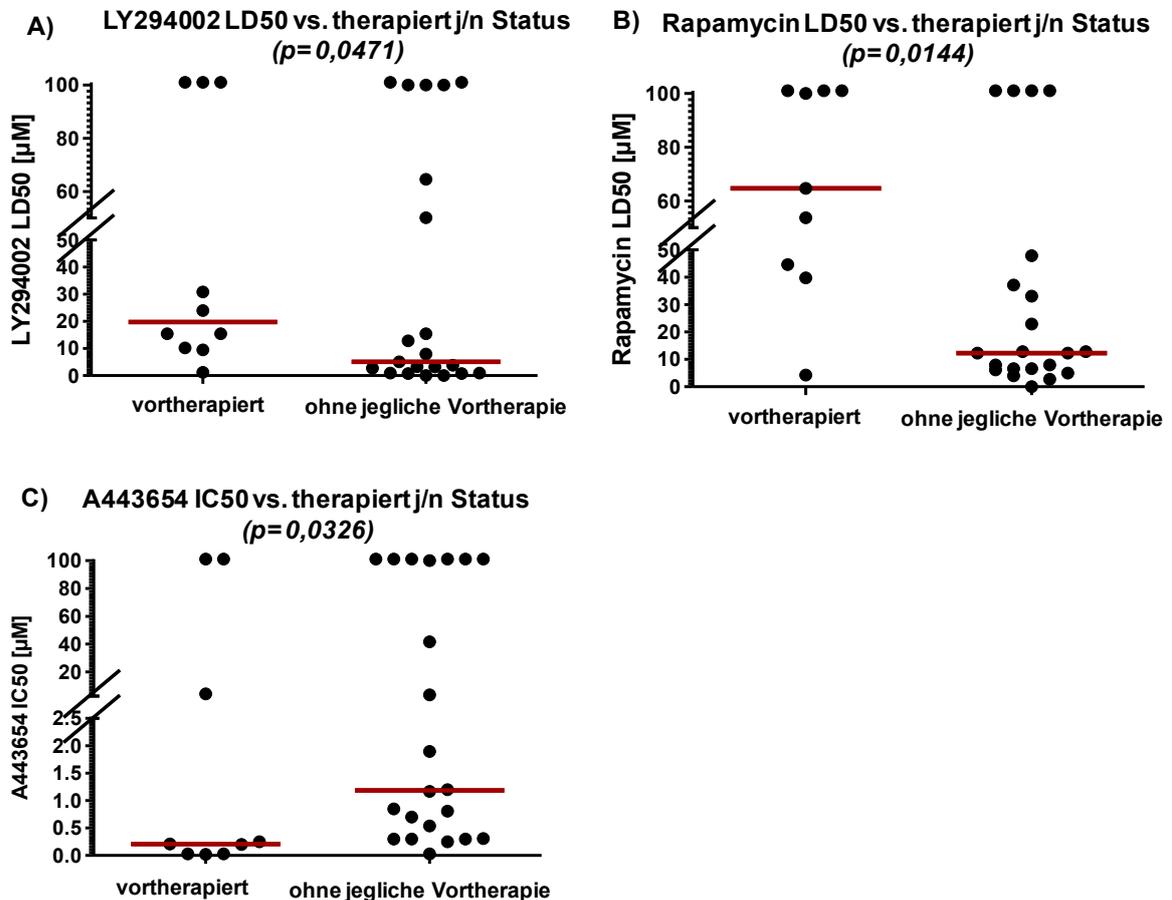


**Abbildung 39: Wirksamkeit von LY294002 ist abhängig vom IGHV-Mutationsstatus.** Dargestellt ist die IC50 von LY294002 gegen die Fälle, die ein unmutiertes bzw. mutiertes IGHV-Gen aufweisen (A). Die unmutierten Fälle wurden mit den mutierten Fällen statistisch verglichen. In (B) wurde die Anzahl an *Respondern* und *Non-Respondern* dem jeweiligen Mutationsstatus zugeordnet, inklusive der Angaben über diejenigen CLL-Proben, zu denen wir über keine Angaben zum Mutationsstatus verfügten. Die roten Balken stellen die Mediane dar.

## Vorthherapie

Einige der 32 Patienten, deren Proben zur Verarbeitung genutzt wurden, hatten bereits eine CLL-Therapie bekommen (n=9). Demgegenüber hatten 21 CLL-Patienten, deren Proben genutzt wurden, bisher keine Therapie erhalten. Leider konnten wir nicht im Detail an die Informationen gelangen, welche Therapie sie genau verabreicht bekamen und zu welchem genauen Zeitpunkt. Mit bestimmter Sicherheit bekamen die CLL-Patienten, deren Proben verarbeitet wurden, mindesten 4 Wochen vor der Probenverarbeitung keine Therapie. Aus der Statistik ließen sich lediglich einige wenige signifikante Fälle entnehmen. Bei diesen Fällen zeigte sich für LY294002 und Rapamycin eine bessere *Response* bei Patientengruppen, die noch nie gegen die CLL behandelt wurden (Abbildung 40). Dagegen

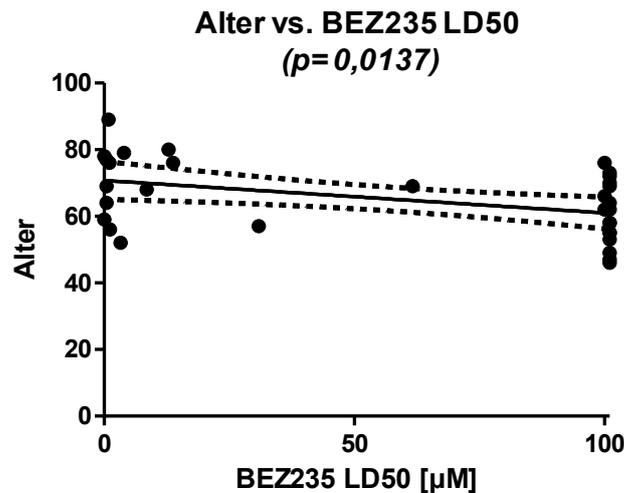
zeigt A443654 eine bessere Wirksamkeit bei Patientengruppen, die bereits gegen eine CLL behandelt wurden.



**Abbildung 40: Wirksamkeit von LY294002, Rapamycin und A443354 ist abhängig vom Therapiestatus.** Dargestellt sind die LD50/IC50 von LY294002 (A), Rapamycin (B) und A443654 (C) gegen den Therapiestatus der Patienten, die vortherapiert wurden, und derjenigen ohne jegliche Vortherapie. Die LD50/IC50-Fälle der vortherapierten Patienten wurden mit denjenigen ohne jegliche Vortherapie statistisch verglichen. Die roten Balken stellen die Mediane dar.

## Altersfaktoren

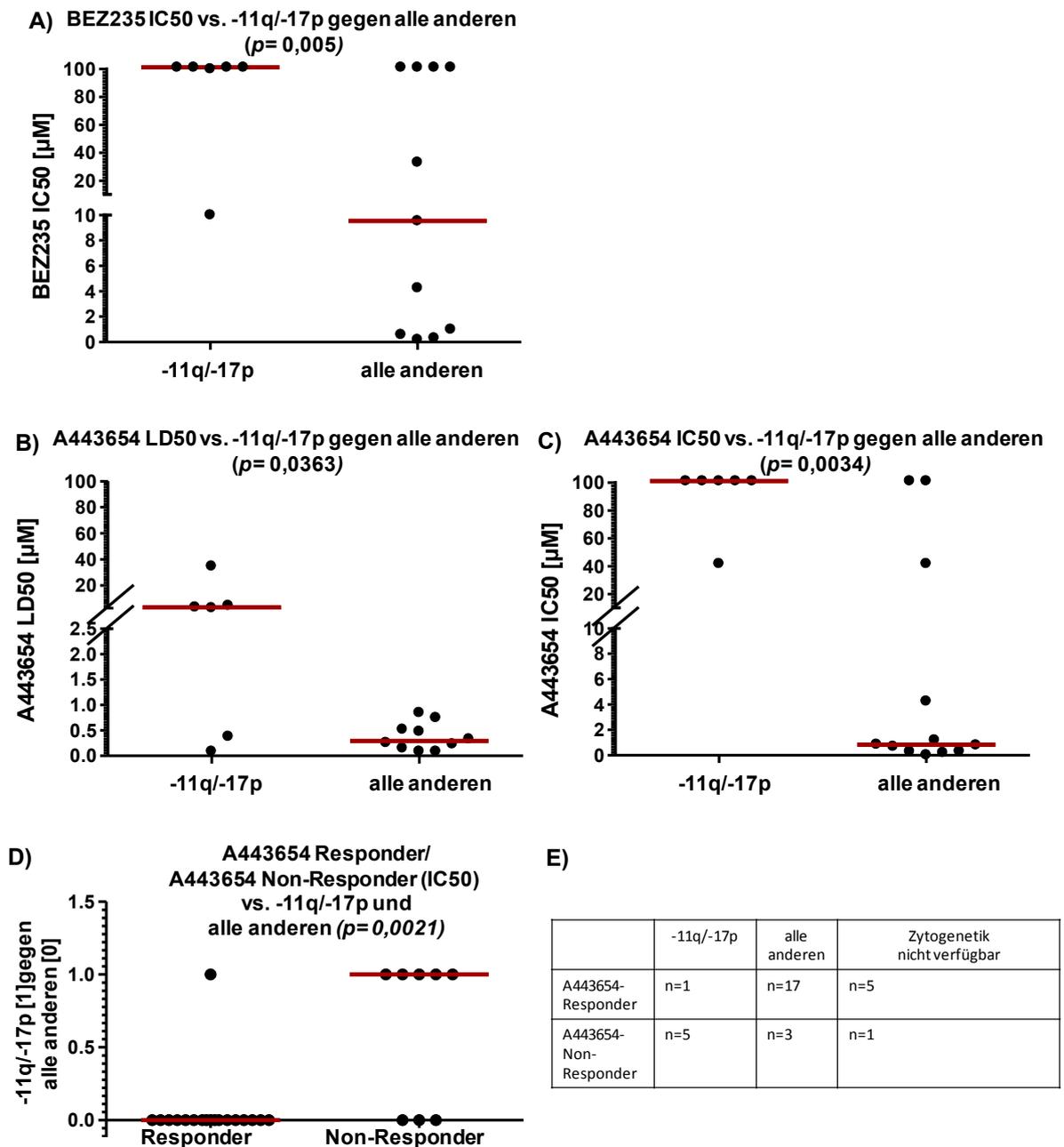
Altersabhängige Faktoren der CLL-Patienten beeinträchtigen die Wirksamkeit von BEZ235 (siehe Abbildung 41), denn BEZ235 zeigt eine bessere Wirksamkeit bei verhältnismäßig älteren Patienten (60–80 Jahre alt).



**Abbildung 41: Wirksamkeit von BEZ235 ist abhängig vom Alter der CLL-Patienten.** Statistische Darstellung des Alters gegen LD50-Werte von BEZ235 anhand einer linearen Regressionsanalyse. Abgebildet ist die Regressionsgerade. Die gestrichelten Linien stellen das 95%-ige Konfidenzintervall dar.

#### Zytopenetische Veränderungen und deren Assoziation mit der Inhibitor-Antwort

Leider war es aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten CLL-Proben ( $n=32$ ) nicht möglich, Assoziationen zwischen der *Response* der Inhibitoren mit allen zytopenetischen Gruppen als einzelne Subgruppen vorzunehmen. Wir haben diejenigen CLL-Proben, die eine 11q-/17p-Deletion aufweisen, gegen alle anderen zytopenetisch vorkommenden Veränderungen gestellt. Dadurch konnten wir Assoziationen zwischen der *Response* von BEZ235 (basierend auf den IC50-Daten; die LD50-Daten ergaben keinerlei Signifikanz) und A443654 (basierend auf den LD50/IC50-Daten) feststellen. In beiden Fällen war eine 11q-/17p-Deletion der CLL-Proben mit einer schlechten *Response* der CLL-Zellen gegenüber BEZ235 und A443654 verbunden (siehe Abbildung 42 (A, B, C)). Zudem konnten wir signifikant zeigen, dass die Gruppe der A443654-*Non-Responder* (basierend auf den IC50-Daten) vermehrt eine Deletion 11q/17p aufwies (siehe Abbildung 42 (D)).



**Abbildung 42: BEZ235 und A443654 zeigten eine schlechtere Wirksamkeit bei Vorhandensein einer 11q/-17p-Deletion im Vergleich zu allen anderen vorkommenden zytogenetischen Veränderungen.** Dargestellt sind die IC50-Daten von BEZ235 (A), die LD50/IC50-Daten von A443654 (B, C) gegen Patientengruppen, die eine -11q/-17p aufweisen, und die, die alle anderezytogenetische Formen aufweisen. LD50/IC50-Fälle von Patientengruppen, die eine -11q/-17p aufweisen, wurden mit allen anderen zytogenetisch vorkommenden Gruppen statistisch verglichen. In (D) wurden die *Responder*- und *Non-Responder-CLL-Proben* (basierend auf den IC50-Daten von A443654), die eine -11q/-17p aufweisen, statistisch allen anderen vorkommenden zytogenetischen Veränderungen gegenübergestellt. Die Anzahl an *Respondern* und *Non-Respondern* ist diesen beiden Gruppen zugeordnet (E), inklusive der Angaben zu denjenigen CLL-Proben, welche keine Angaben über deren Zytogenetik aufwiesen. Die roten Balken stellen die Mediane dar.

### 3.2.2 Die Assoziation der Ansprechrate der Inhibitoren mit TCL1A-Proteinlevel der Tumorzellen

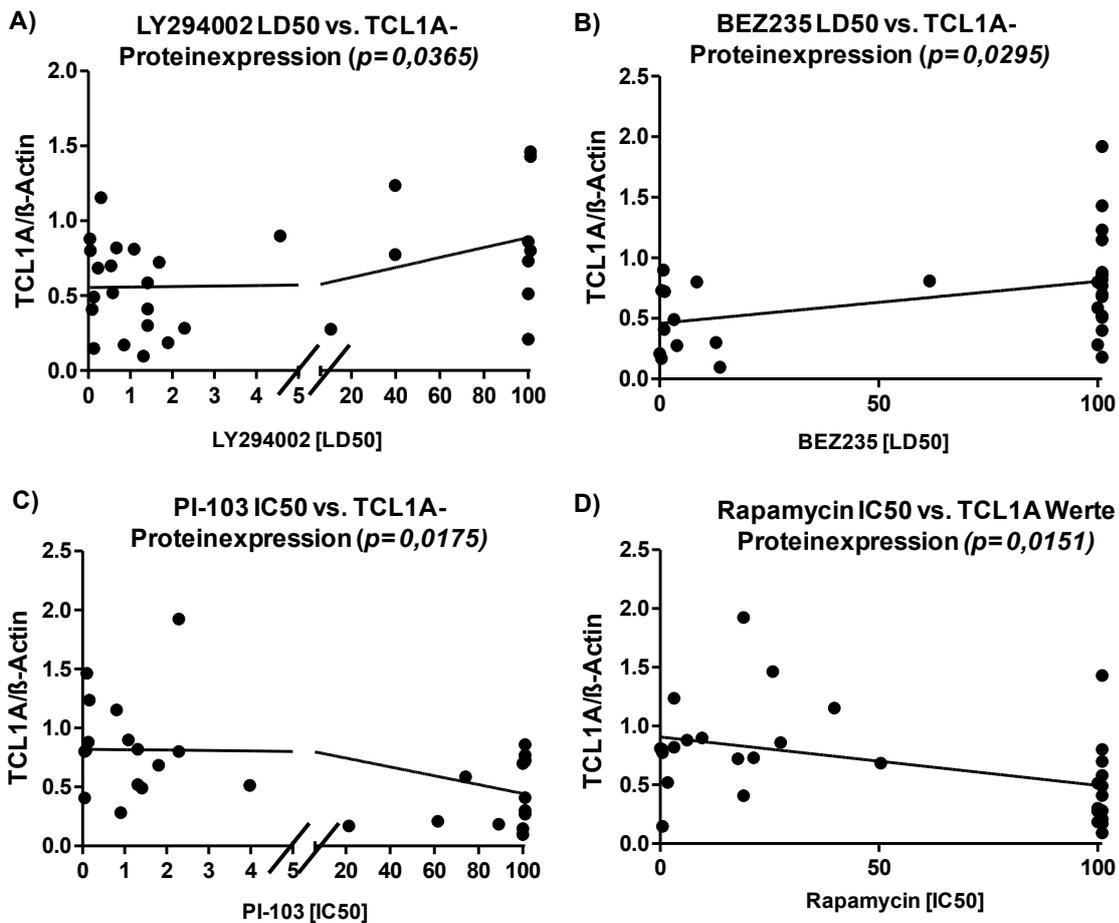
Parallel zu der Inkubation der CLL-Zellen mit den Inhibitoren über 48 h wurden unbehandelte Lysate der 32 untersuchten CLL-Proben gesammelt. Diese dienten dazu, die basalen Level an TCL1A und pAKT durch Messung der Proteinintensitäten (siehe 2.2.3.2, Seite 42) im Immunoblot zu bestimmen.

Darauffolgend wurden die ermittelten densitometrischen Werte von TCL1A mit der unterschiedlichen Wirksamkeit der Inhibitoren korreliert (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Korrelationen der LD50-/IC50-Werte mit den TCL1A-Werten.** Die signifikanten Assoziationen sind grau markiert. Bei der Bestimmung der basalen TCL1A-Level galt die DoHH2-TCL1 als Kontrolle.

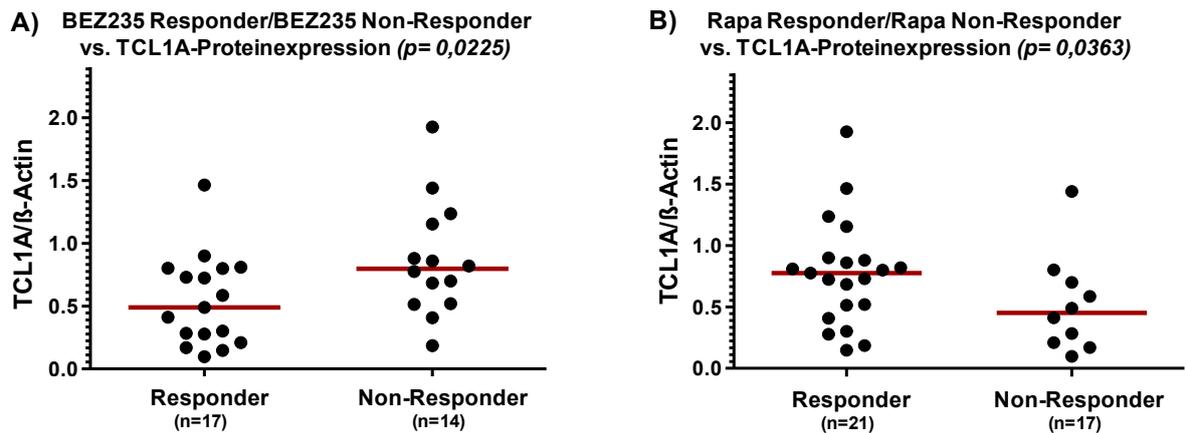
	TCL1A gegen LD50	TCL1A gegen IC50
<b>LY294002</b>	$p=0,6366$	$p=0,0365$
<b>PI-103</b>	$p=0,8060$	$p=0,0175$
<b>BEZ235</b>	$p=0,0295$	$p=0,2732$
<b>Rapamycin</b>	$p=0,2661$	$p=0,0151$
<b>A443654</b>	$p=0,9859$	$p=0,6187$
<b>Rolipram</b>	$p=0,2128$	$p=0,9287$

Die Wirksamkeit von LY294002, BEZ235, Rapamycin und PI-103 wird durch den TCL1A-Status beeinträchtigt (siehe Abbildung 43). LY294002 und BEZ235 wirkten effektiver bei niedrigen TCL1A-Level (siehe Abbildung 43 (A, B)). Diese Korrelationen haben sich aus den LD50-Werten und den TCL1A-Level ergeben; die sich aus den IC50-Werten ergebenden Korrelationen führten zu keiner Signifikanz (Abbildung nicht gezeigt, aber siehe Tabelle 6). Dagegen zeigten PI-103 und Rapamycin eine bessere Wirksamkeit bei hohen TCL1A-Level (Abbildung 43 (C,D)); diese Korrelationen haben sich aus den IC50-Werten und den TCL1A-Level ergeben; die sich aus den LD50-Werten ergebenden Korrelationen führten zu keinerlei Signifikanz (Abbildung nicht gezeigt, aber siehe Tabelle 6).



**Abbildung 43: Wirksamkeit von LY294002, BEZ235, PI-103 und Rapamycin ist abhängig vom TCL1A-Status.** Statistische Darstellung der TCL1A-Level gegen die LD50/IC50 von LY294002 (A), BEZ235 (B), PI-103 (C) und Rapamycin (D) anhand einer linearen Regressionsanalyse. Abgebildet sind die Regressionsgeraden.

Die Gegenüberstellung der *Responder*- und *Non-Responder-CLL-Proben* hinsichtlich ihrer TCL1A-Level erbrachte das Resultat, dass die *Responder*-Gruppe, die sich nach der Behandlung der CLL-Proben mit BEZ235 ergab (LD50-Daten – IC50-Daten werden nicht gezeigt, da keinerlei Signifikanz vorhanden), vermehrt niedrige TCL1A-Level aufwies (siehe Abbildung 44 (A)). Dagegen zeigten die *Responder*-Gruppen, die sich nach der Behandlung der CLL-Proben mit Rapamycin ergaben (IC50-Daten – LD50-Daten werden nicht gezeigt, da keinerlei Signifikanz vorhanden), vermehrt hohe TCL1A-Level (siehe Abbildung 44 (B)).



**Abbildung 44: Wirksamkeit von BEZ235 und Rapamycin ist abhängig vom TCL1A-Status.** Dargestellt ist eine statistische Gegenüberstellung der *Responder*- und *Non-Responder*-CLL-Proben von BEZ235 (LD50-Daten) (A) und Rapamycin (IC50-Daten) (B) hinsichtlich ihrer TCL1A-Proteinexpression, die densitometrisch im Western Blot bestimmt wurden. Die roten Balken stellen die Mediane dar.

### 3.2.3 Die Assoziationen der pAKT-Proteinlevel der Tumorzellen mit der Ansprechrates der Inhibitoren

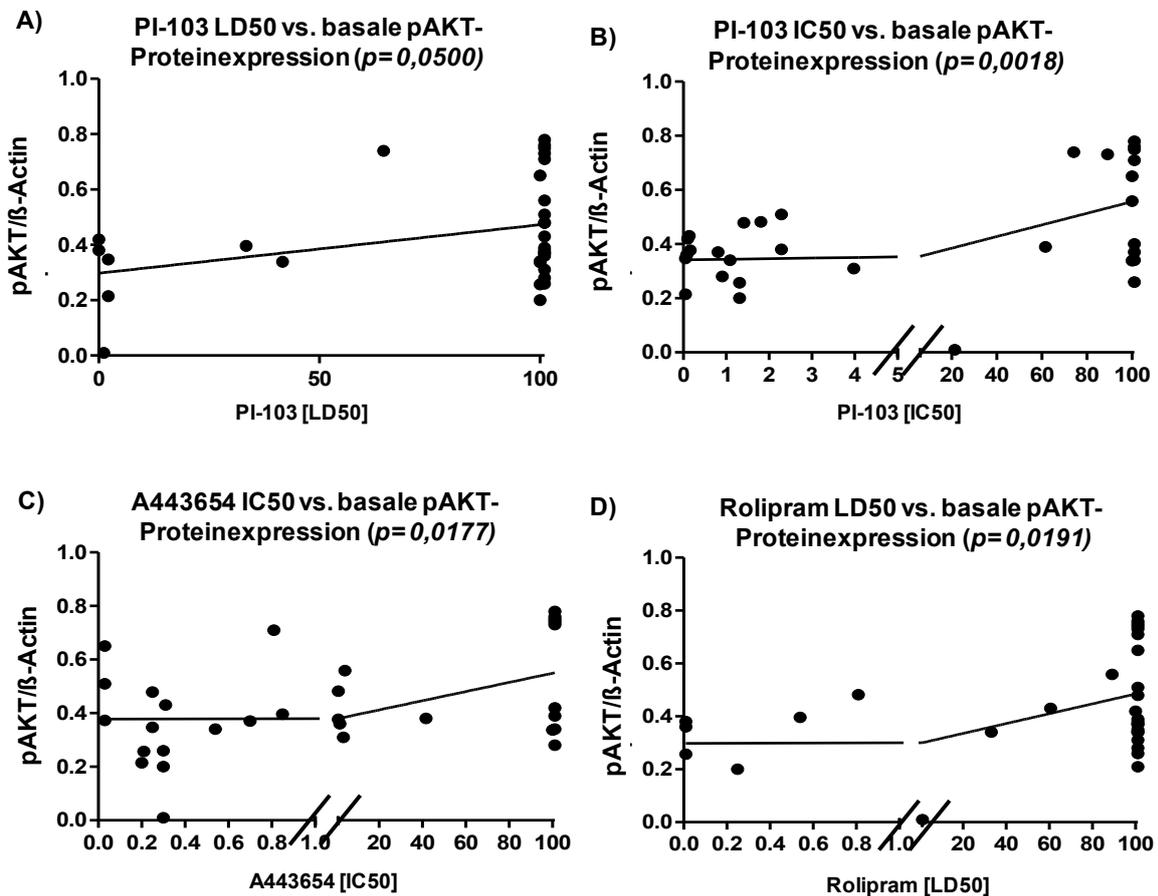
Es wurden analog ebenso die Proteinintensitäten der basalen pAKT-Level bestimmt (siehe 2.2.3.2, Seite 42), um eine Aktivierung von AKT zu überprüfen. Infolgedessen wurde überprüft, ob eine Assoziation zwischen der Aktivierung von AKT (erhöhte Level an basalen pAKT-Level) und der Wirksamkeit der Inhibitoren vorherrscht.

**Tabelle 7: Korrelationen der LD50-/IC50-Werte mit den pAKT-Werten.** Die signifikanten Fälle sind grau markiert.

	pAKT(Ser473) gegen LD50	pAKT(Ser473) gegen IC50
LY294002	$p=0,6760$	$p=0,4643$
PI-103	$p=0,0500$	$p=0,0018$
BEZ235	$p=0,8253$	$p=0,9027$
Rapamycin	$p=0,9213$	$p=0,1499$
A443654	$p=0,2112$	$p=0,0177$
Rolipram	$p=0,6881$	$p=0,0191$

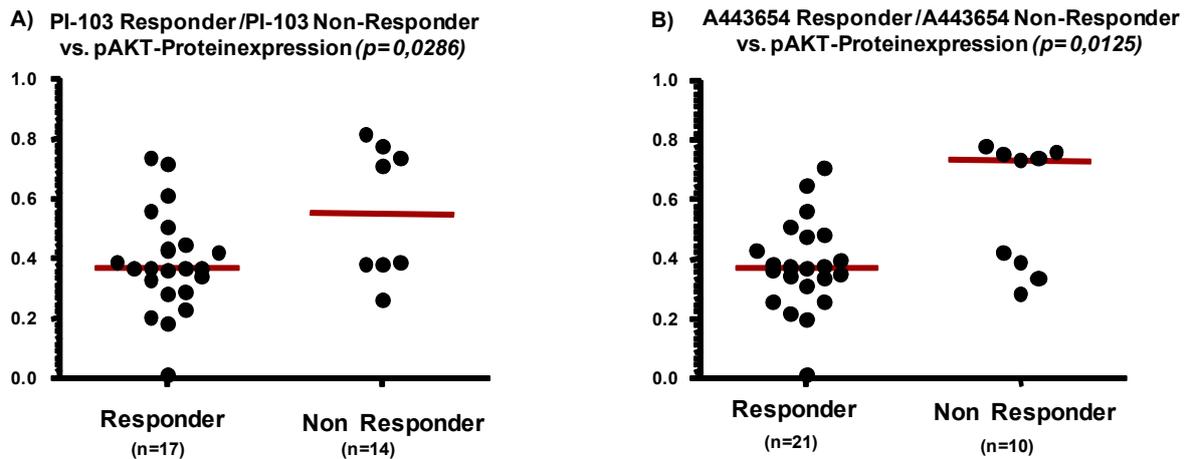
Die Wirksamkeit von PI-103, A443654 und Rolipram wird durch den pAKT-Status beeinträchtigt (Abbildung 45). PI-103, A443654 und Rolipram wirkten effektiver bei niedrigen

pAKT-Level (siehe Abbildung 45). Die Korrelationen ergaben – wie auch schon bei den Korrelationen mit den TCL1A-Level und der *Response* (siehe Tabelle 7) – teilweise unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der LD50- und IC50-Werte; in Tabelle 7 sind alle Fälle aufgelistet, auch die nicht signifikanten Fälle.



**Abbildung 45: Die *In-vitro*-Ansprechrates der CLL-Zellen gegenüber PI-103, A443654 und Rolipram ist abhängig vom pAKT-Status.** Statistische Darstellung der pAKT-Level gegen die LD50/IC50 von PI-103 (A)/(B), A443654 (C) und Rolipram (D) anhand einer linearen Regressionsanalyse. Abgebildet sind die Regressionsgeraden.

Die Gegenüberstellung der *Responder*- und *Non-Responder*-CLL-Proben hinsichtlich ihrer pAKT-Level ergab, dass die *Responder*-Gruppen, die sich aus der Behandlung der CLL-Proben mit PI-103 und A44354 ergaben, vermehrt niedrige pAKT-Level aufwiesen. Des Weiteren lieferten auch diese Korrelationen Diskrepanzen zwischen LD50 und IC50, so dass die bei der Korrelation eingesetzten LD50 oder IC50 nicht immer zu den gleichen Ergebnissen führten.

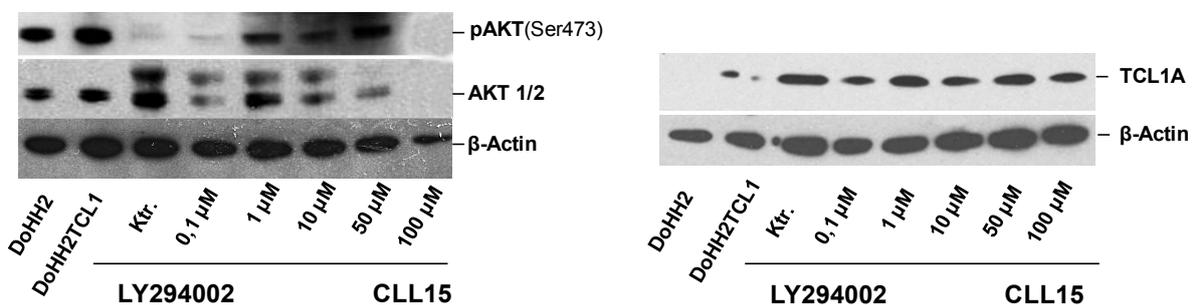


**Abbildung 46:** Die *In-vitro*-Ansprechrates der CLL-Zellen gegenüber PI-103 und A443654 ist abhängig vom pAKT-Status. Dargestellt ist eine statistische Gegenüberstellung der Responder- und Non-Responder-CLL-Proben von PI-103 (IC50-Daten) (A) und A443654 (IC50-Daten) (B) hinsichtlich ihrer pAKT-Proteinexpression. Die roten Balken stellen die Mediane dar.

### 3.3 Der Effekt auf AKT und die downstream-Moleküle ist PI3K-AKT-mTOR-Inhibitor-spezifisch.

#### PI3K-Inhibition durch LY294002 beeinflusst pAKT-Level.

CLL-Zellen wurden mit LY294002 für 48 h inkubiert; nach der Inkubation habe ich zusätzlich zur Apoptoseüberprüfung Zelllysate gesammelt, um die mechanistische Wirksamkeit des Inhibitors weiter via Western Blot ( $n=1$ ) zu analysieren.



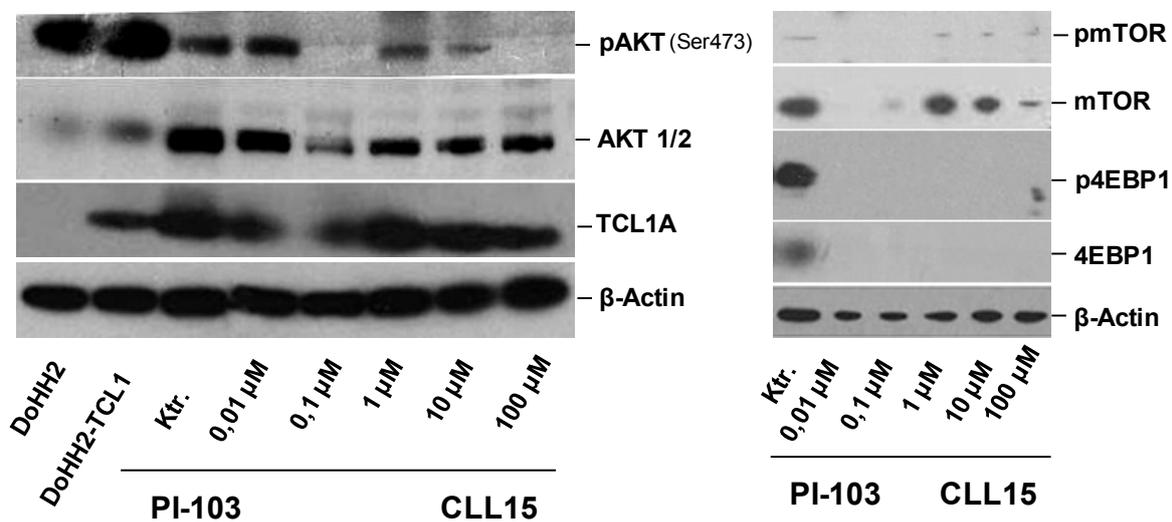
**Abbildung 47:** PI3K-Inhibition durch LY294002 wirkt sich in Form einer Senkung von pAKT aus. Die Immunoblots zeigen die Proteinlevel von pAKT, AKT1/2 und TCL1A und die jeweiligen Standards.

PI3K-Inhibition durch LY294002 wirkt sich zunächst in Form eines Anstieges von pAKT aus. Wir erreichten mit der höchsten Konzentration von LY294002 (100  $\mu$ M) eine Senkung von

pAKT. Als Ladekontrolle diente das  $\beta$ -Actin. Parallel gingen die CLL-Zellen durch den Inhibitor in Apoptose; dies wurde durch Spaltung von PARP nachgewiesen (Abbildung 26, Seite 65). Basierend auf einer LD50 von 55,98  $\mu\text{M}$  wurde dieser Fall als *Responder* charakterisiert (Abbildung 10 (Heatmap), Seite 49).

### Inhibition von mTOR und PI3K durch PI-103 wirkt sich in Gestalt einer Senkung von AKT und seiner Substrate aus.

In gleicher Weise wurden CLL-Zellen mit PI-103 für 48 h inkubiert; nach der Inkubation hat man die Zelllysate via Western Blot (n=1) analysiert.



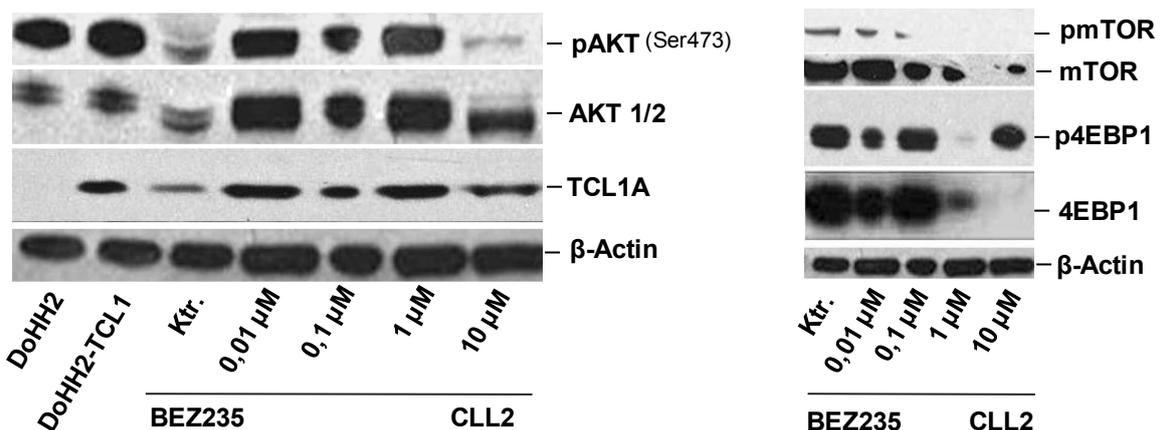
**Abbildung 48: PI3K-mTOR-Inhibition durch PI-103 wirkt sich Gestalt einer Senkung von pAKT und seiner *downstream*-Moleküle aus.** Die Immunoblots zeigen die Proteinlevel von pAKT, AKT1/2, TCL1A, pmTOR, mTOR, p4EBP1, 4EBP1 und die jeweiligen Standards.

Obwohl PI-103 in dieser CLL-Probe sowohl pAKT-Level als auch die Proteinlevel der Substrate zu senken vermag, ist dieser Fall basierend auf den *In-vitro*-LD50/IC50-Daten als Non-Responder eingestuft (Abbildung 19 (Heatmap), Seite 58). Dieser Fall wurde durch den Inhibitor ebenso nicht in Apoptose versetzt (Western-Blot-Daten nicht gezeigt). Interessanterweise wurden durch die Herauf- und Herunterregulierung von pAKT, pmTOR und mTOR die konzentrationsabhängigen Affinitätsunterschiede von PI-103 zu seinen *Targets* deutlich. In einer Konzentrationsspanne von 0,01–0,1  $\mu\text{M}$  hat PI-103 eine stärkere Affinität zu der p110 $\alpha$ -Untereinheit der PI3K (wird ebenso durch Literatur belegt, die eine IC50 von 8 nM besagt), daher werden sowohl pAKT- als auch pmTOR- und mTOR-Level gesenkt. PI-103 besitzt jedoch in einer Konzentrationsspanne von 1-10  $\mu\text{M}$  eine stärkere

Affinität zu mTORC1 (wird ebenso durch Daten aus der Literatur belegt, die eine IC<sub>50</sub> von 20 nM beschreiben), daher stiegen die pAKT-, pmTOR- und mTOR-Level an, und zwar aufgrund der positiven Rückkopplungsschleife, die durch die mTORC1-Inhibition in Gang gesetzt wird (siehe Abbildung 64). Anschließend hatten 100 µM PI-103 eine stärkere Affinität zu mTORC2 (ebenso durch die Literatur belegt, IC<sub>50</sub> von 83 nM); dadurch wurden die pAKT-, pmTOR- und mTOR-Level gesenkt.

### PI3K-mTOR-Inhibition durch BEZ235 beeinflusst AKT und die downstream-Moleküle bei niedrigen TCL1A-Level.

In gleicher Weise wurden CLL-Zellen mit BEZ235 für 48 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde via Western Blot (n=1) die Analyse der Zelllysate vorgenommen.



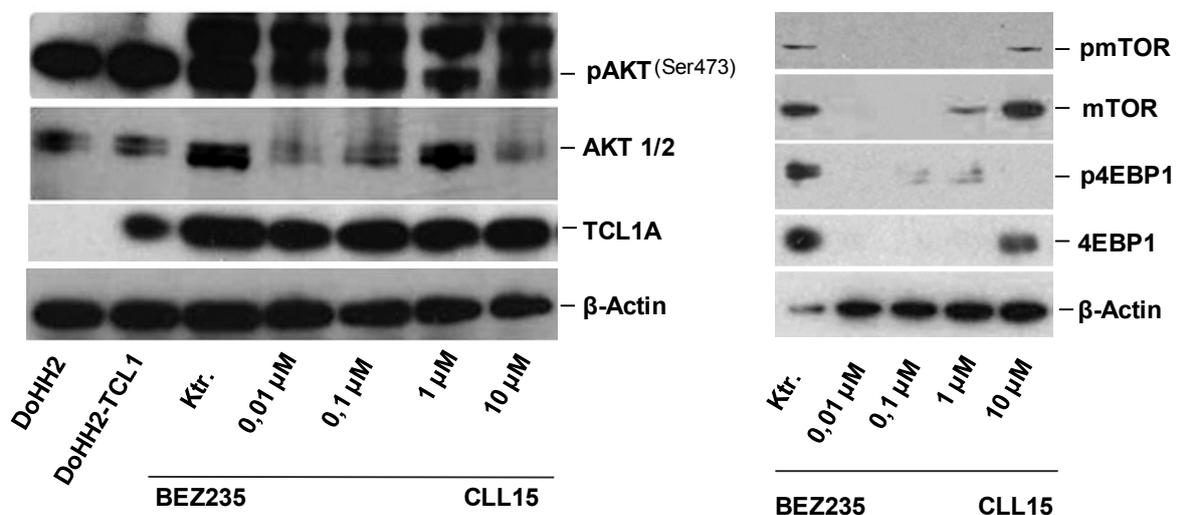
**Abbildung 49: PI3K-mTOR-Inhibition durch BEZ235 wirkt sich in Form einer Senkung von pAKT und der downstream-Moleküle bei niedrigen TCL1A-Level aus.** Die Immunoblots zeigen die Proteinlevel von pAKT, AKT1/2, TCL1A, pmTOR, mTOR, p4EBP1, 4EBP1 und die jeweiligen Standards.

Zunächst wurde ein Anstieg der pAKT-, pmTOR-/mTOR-, p4EBP1-/4EBP1-Level bei niedrigen TCL1A-Level beobachtet. Jedoch bewirkten höhere Konzentrationen an BEZ235 eine Senkung von pAKT und pmTOR/mTOR. Paradoxerweise erhöhten sich die mTOR- und p4EBP1-Level bei 10 µM BEZ235. Interessanterweise war eine dosisabhängige Abnahme von pmTOR und 4EBP1 zu beobachten. Dagegen zeigte der Blot der CLL-Probe (Abbildung 50) einen Anstieg der pmTOR- und 4EBP1-Level in höchster Dosis. Parallel wurden CLL-Zellen durch den Inhibitor in Apoptose versetzt; diese wurde durch die aktivierte Form der

Caspase 3 nachgewiesen (Abbildung 28, Seite 66). Daher ist dieser Patient basierend auf den IC50-Daten als *Responder* charakterisiert ((Heatmap), Seite 58).

## PI3K-mTOR-Inhibition durch BEZ235 beeinflusst bei höheren TCL1A-Level AKT nicht.

In gleicher Weise wurden CLL-Zellen einer CLL-Probe, die basierend auf den Daten der *In-vitro*-LD50 (Abbildung 10 (Heatmap), Seite 49) als *Non-Responder* eingestuft wurde, mit BEZ235 für 48 h inkubiert. Die Zelllysate wurden ebenso via Western Blot (n=1) analysiert



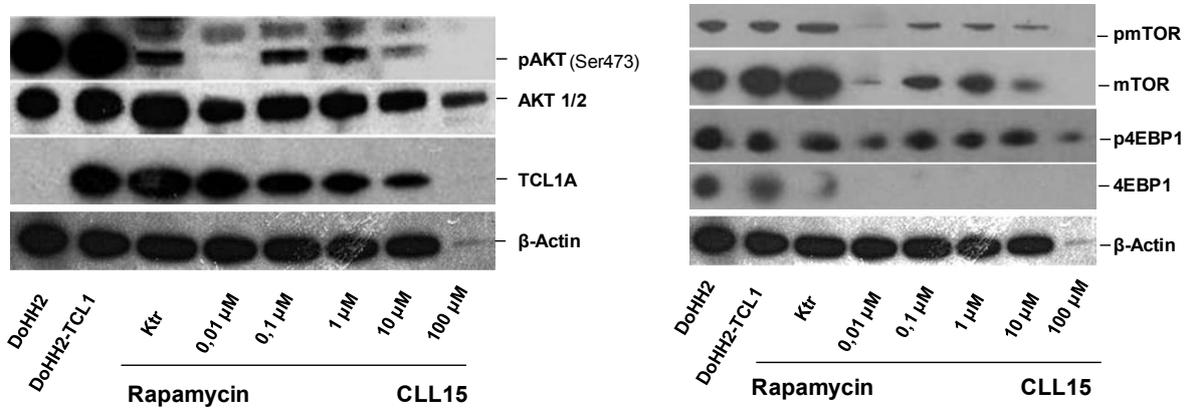
**Abbildung 50: PI3K-mTOR-Inhibition durch BEZ235 wirkt sich nicht in Form einer Senkung von pAKT bei hohen TCL1A-Level aus.** Die Immunoblots zeigen die Proteinlevel von pAKT, AKT1/2, TCL1A, pmTOR, mTOR, p4EBP1, 4EBP1 und die jeweiligen Standards.

Die PI3K-mTOR-Inhibition durch BEZ235 senkte nicht AKT bei höheren TCL1A-Level. Jedoch bewirkte BEZ235 eine Senkung von pmTOR, mTOR, p4EBP1 und 4EBP1 in niedrigen Konzentrationen. Bei höheren Konzentrationen war ein erneuter Anstieg von pmTOR, mTOR und 4EBP1 zu beobachten.

## mTOR-Inhibition durch Rapamycin wirkt sich in Gestalt einer Auf- und Abmodulation von pAKT- und der downstream-Moleküle aus.

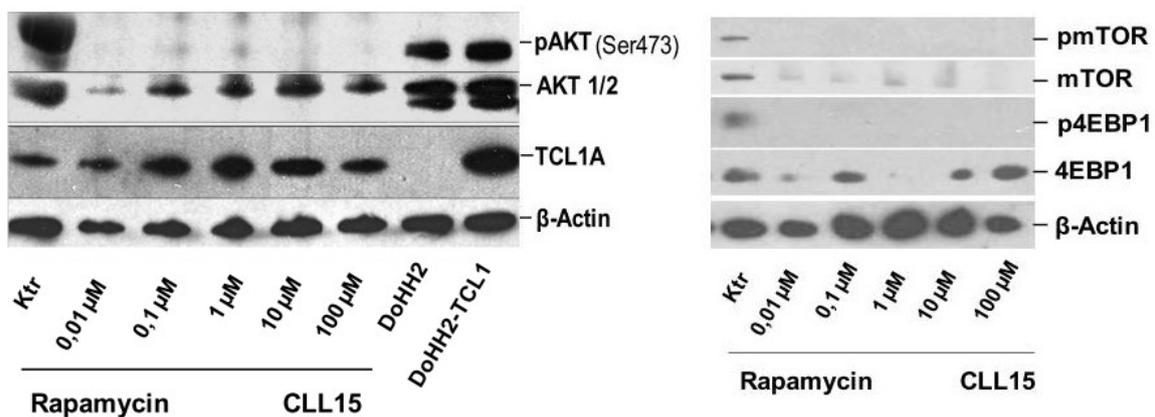
In gleicher Weise wurden im Folgenden zwei CLL-Proben untersucht, die basierend auf den *In-vitro*-Daten der LD50 (12,88 μM)/IC50 (27,54 μM) als *Responder* eingestuft wurden (Abbildung 10 (Heatmap), Seite 49 und Abbildung 19 (Heatmap), Seite 58). Die CLL-Probe (CLL 2), die nach den LD50/IC50 als *Non-Responder* eingestuft wurde (Abbildung 10

(Heatmap), Seite 49), wurde mit Rapamycin für 48 h inkubiert. Zur Analyse der Zellysate diente ebenso die Durchführung eines Western Blots.



**Abbildung 51: mTOR-Inhibition durch Rapamycin wirkt sich in Form einer Senkung von pAKT und der downstream-Moleküle aus.** Die Immunoblots zeigen die Proteinlevel von pAKT, AKT1/2, TCL1A, pmTOR, mTOR, p4EBP1, 4EBP1 und die jeweiligen Standards.

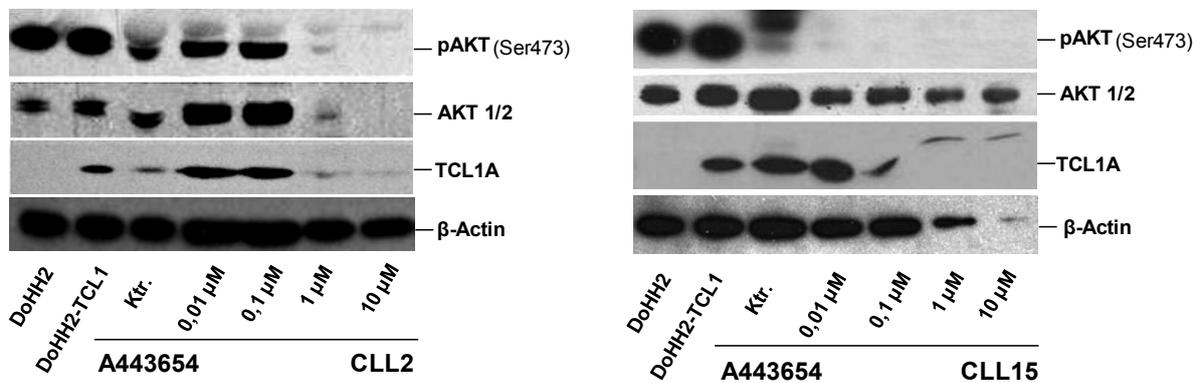
Eine mTOR-Inhibition durch Rapamycin wirkt sich in den CLL-Proben in Gestalt einer dosisabhängigen Auf- und Abmodulation von pAKT- und pmTOR-/mTOR-Level (Abbildung 51) aus. Dagegen wurden in der CLL-Probe (CLL2) pAKT-, pmTOR/mTOR- und p4EBP1-Level nur herunterreguliert (Abbildung 52).



**Abbildung 52: mTOR-Inhibition durch Rapamycin wirkt sich in Form einer Senkung von pAKT und seiner downstream-Moleküle aus.** Die Immunoblots zeigen die Proteinlevel von pAKT, AKT1/2, TCL1A, pmTOR, mTOR, p4EBP1, 4EBP1 und die jeweiligen Standards.

**Die Wirksamkeit von A443654, bereits in niedriger Konzentration den pAKT-Level zu senken.**

Abschließend wurden CLL-Zellen analog mit A443654 für 48 h inkubiert; nach der Inkubation wurden die Zelllysate via Western Blot (n=1) analysiert.



**Abbildung 53: AKT-Inhibition durch A443654 wirkt sich in Form einer Senkung von pAKT aus.** Die Immunoblots von jeweils zwei Patienten (A)/(B) zeigen die Proteinlevel von pAKT, AKT1/2 und TCL1A und die jeweiligen Standards.

Der Immunoblot in den behandelten Proben zeigt, dass sich die AKT-Inhibition durch A443654 in Form einer Senkung von pAKT auswirkt. Parallel wurden die CLL-Zellen von beiden Patienten durch den Inhibitor in Apoptose versetzt, diese sind Caspase-3-abhängig (Abbildung 30, Seite 68/Abbildung 31, Seite 69). Basierend auf den LD50/IC50-*in-vitro*-Daten wurden diese CLL-Proben als *Responder* charakterisiert (Abbildung 10, Seite 49 und Abbildung 19, Seite 58).

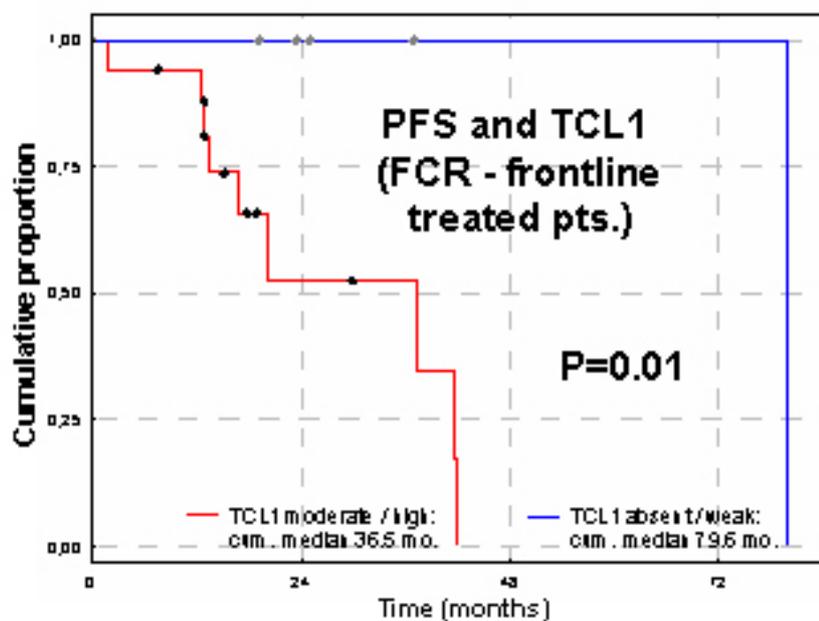
### 3.4 Beeinflusst TCL1A die Wirksamkeit der Inhibitoren?

Da das Onkogen TCL1A als mögliche Ursache für eine schlechte *Response* der Inhibitoren gegenüber den CLL-Zellen postuliert wird, wird weiter in spezifischerer Form untersucht, ob die Expression von TCL1A die Sensitivität der Inhibitoren beeinflussen kann.

#### 3.4.1 TCL1A beeinflusst die Wirkung der Standard-Chemotherapeutika *in vivo* und *in vitro*.

##### a) TCL1A führt *in vivo* zu Resistenzen gegenüber den Standard-Chemotherapeutika FCR.

Im Folgenden ist eine Kaplan-Meier-Kurve dargestellt, die das progressionsfreie Überleben von CLL-Patienten anzeigt. Diese Patienten wurden mit Fludarabin (F), Cyclophosphamid (C) und Rituximab (R) therapiert. Des Weiteren wurden die Patienten anhand ihres TCL1A-Status eingeteilt, um so den Einfluss von TCL1A zu untersuchen.



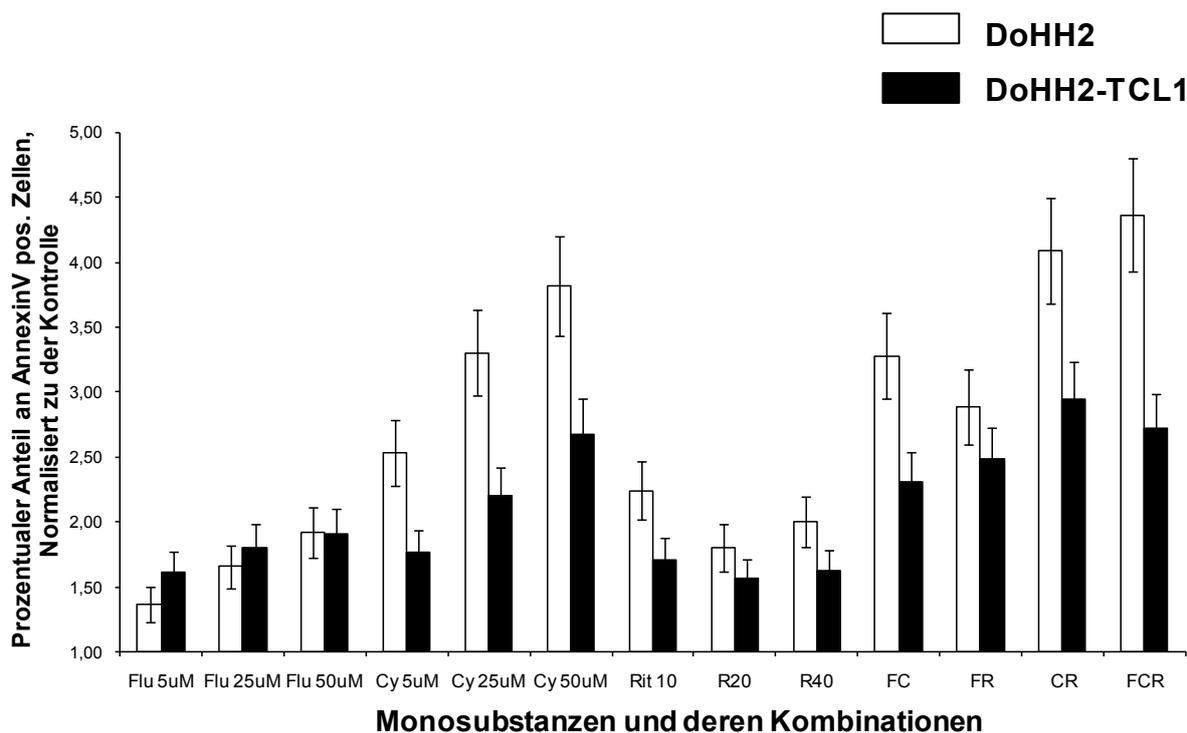
(Herling et al. Blood 2009)

**Abbildung 54: TCL1A beeinflusst die Wirksamkeit von FCR *in vivo*.** Dargestellt ist eine Kaplan-Meier-Kurve, die das progressionsfreie Überleben von CLL-Patienten anzeigt. Hierbei wurden die mit FCR behandelten Patienten nach hohem bzw. niedrigem/schwachem TCL1A eingeteilt.

Patienten, bei denen hohe TCL1-Level nachgewiesen wurden, starben früher oder hatten ein kürzeres progressionsfreies Überleben als die Patienten mit kaum nachweisbarem TCL1A.

## b) Experimenteller Transfer von TCL1A *in vitro* führt zu Resistenzen gegenüber den Standard-Chemotherapeutika FCR.

Um die Wirkung von Fludarabin (F), Cyclophosphamid (C) und Rituximab (R) auf das Zellüberleben von DoHH2- und DoHH2-TCL1-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen über 48 h mit den Monosubstanzen und den Wirkstoffkombinationen in Konzentrationen (jene sind aus der Abbildung 55 zu entnehmen) inkubiert. Der Anteil der apoptotischen Zellen wurde im Durchflusszytometer bestimmt. Die Abbildung 55 gibt die Resultate der n=3 durchgeführten Experimente wieder.

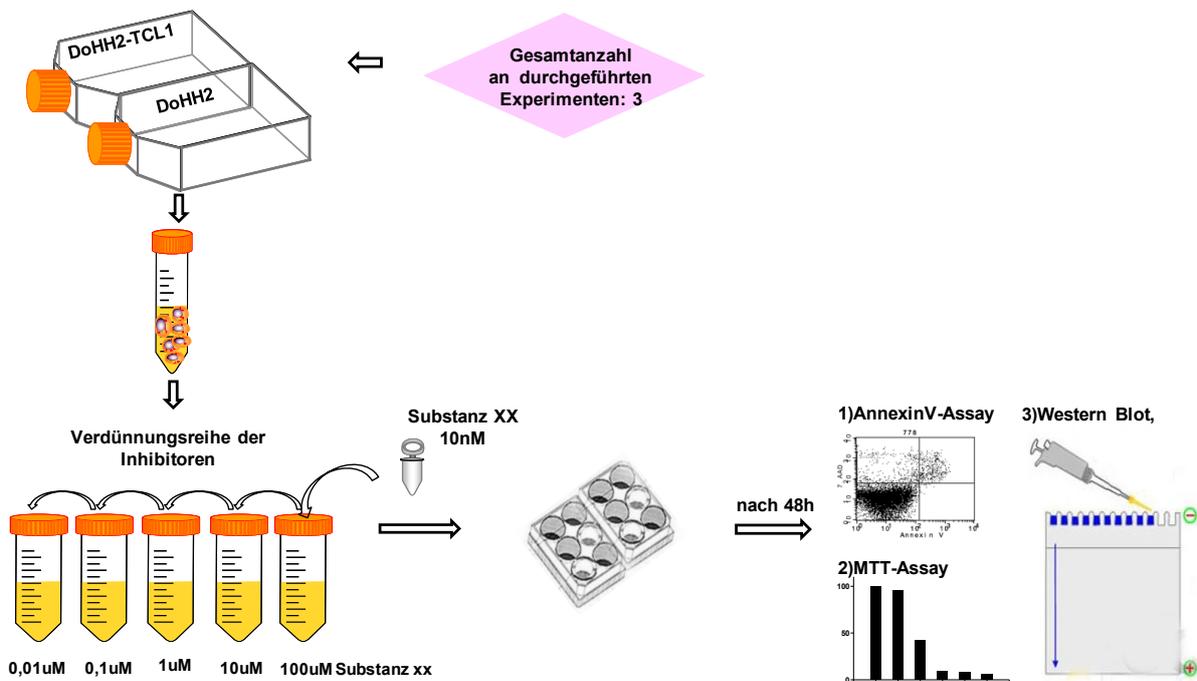


**Abbildung 55: DoHH2-TCL1-Zellen sind mit einer Resistenz gegenüber Fludarabin (F), Cyclophosphamid (C) und Rituximab (R) assoziiert.** Dargestellt ist der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen gegen die Konzentrationen der Monosubstanzen und der Wirkstoffkombinationen. Die weißen Säulen stellen DoHH2-Zellen dar, die schwarzen hingegen DoHH2-TCL1.

In den durchgeführten Experimenten zeigte sich eine verstärkte Zunahme der apoptotischen Zellen der DoHH2 im Vergleich zu DoHH2-TCL1-Zellen. Dieser Effekt erwies sich sowohl bei den Monosubstanzen als auch bei den Kombinationen der Wirkstoffe.

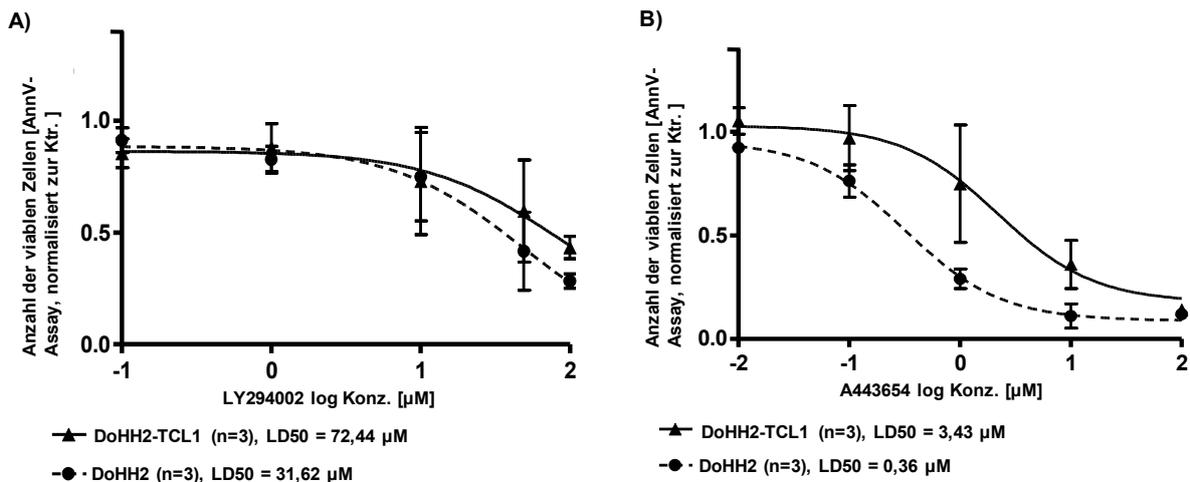
### 3.4.2 TCL1A beeinflusst die Wirksamkeit der PI3K-AKT-mTOR-Inhibitoren *in vitro*.

Als Nächstes wurden die DoHH2- und DoHH2-TCL1-Zellen mit den Inhibitoren über 48 h inkubiert. Dazu wurden die Experimente wie in Abbildung 56 geschildert durchgeführt.



**Abbildung 56:** Dargestellt ist das experimentelle Vorgehen.

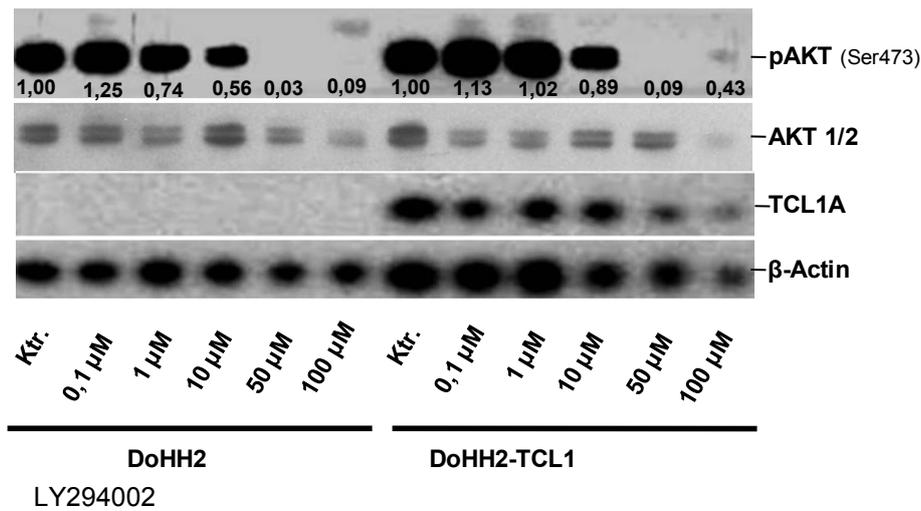
Um die Wirkung von LY294002 und A443654 auf das Zellüberleben von DoHH2 und DoHH2-TCL1 zu überprüfen, wurden die Zellen (n=3) über 48 h mit LY294002 und A443654 in Konzentrationen von 0,1 bis 100 µM inkubiert. Der Anteil der viablen Zellen wurde im Durchflusszytometer bestimmt. Die Abbildung 57 gibt die Resultate der n=3 durchgeführten Experimente wieder.



**Abbildung 57: LY294002 (A) und A443654 (B) sind wirksamer in den DoHH2-Zellen (●) als in den DoHH2-TCL1-Zellen (▲).** Dargestellt ist die relative Anzahl an viablen Zellen gegen die logarithmischen Konzentrationen der Inhibitoren. Die statistische Analyse der Diskrepanz zwischen den DoHH2- und DoHH2-TCL1 ergab keine Signifikanz ( $p=0,6667$  für LY294002,  $p=0,3095$  für A443654).

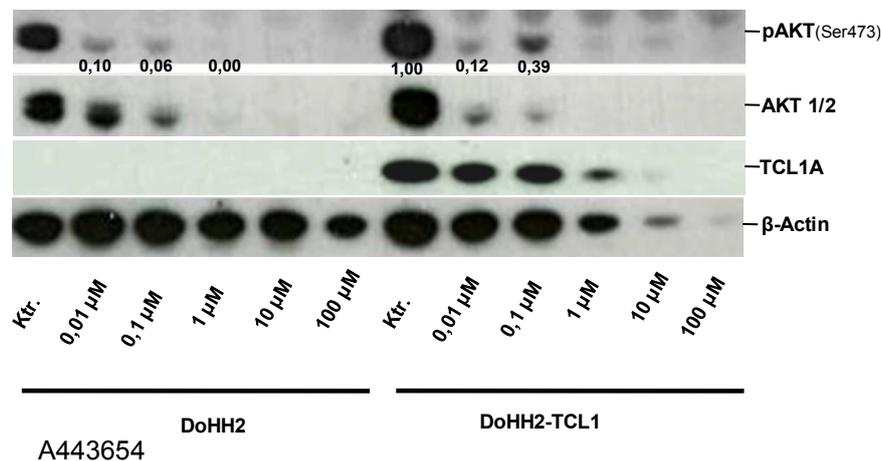
In den durchgeführten Experimenten zeigte sich eine verstärkte dosisabhängige Abnahme der Viabilität der DoHH2- im Vergleich zu den DoHH2-TCL1-Zellen, denn die LD50 lag bei 31,62  $\mu\text{M}$  bei DoHH2, bei DoHH2-TCL1-Zellen hingegen bei 72,44  $\mu\text{M}$  nach Inkubation mit LY294002. Des Weiteren lag die LD50 nach Inkubation mit A443654 bei 0,36  $\mu\text{M}$  bei DoHH2 und bei 3,41  $\mu\text{M}$  bei DoHH2-TCL1. Jedoch ergab die statistische Analyse keine Signifikanz ( $p=0,6667$  für LY294002,  $p=0,3095$  für A443654).

Zusätzlich wurden Zelllysate zu den Experimenten gesammelt, um die Wirkung der Inhibitoren weiter durch einen Immunoblot in spezifischerer Form zu untersuchen (siehe Abbildung 58 und Abbildung 59). Diese Zelllysate wurden via Western Blot analysiert.



**Abbildung 58: PI3K-Inhibition durch LY294002 wirkt sich in Form eines verspäteten Abfalls von pAKT in den TCL1-positiven Zellen aus.** Die Immunoblots zeigen die Proteinlevel von pAKT, AKT1/2 und TCL1A und die jeweiligen Standards. Die Werte der Quantifizierungen der Proteinbanden von pAKT sind hinterlegt.

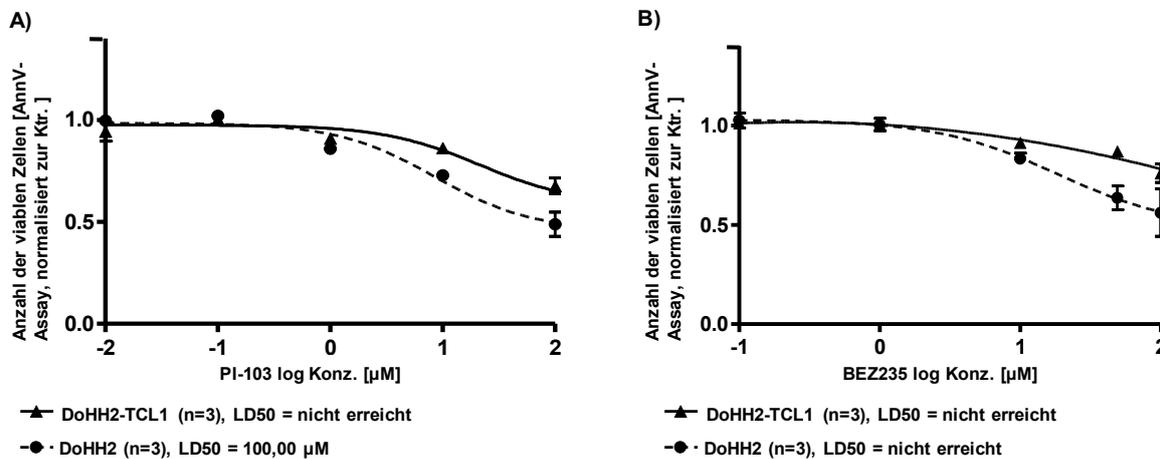
Die Immunoblots zeigen einen dezent verspäteten Abfall der pAKT-Level bei beiden TCL1-Bedingungen unter LY294002 (siehe Abbildung 58) und A443654 (siehe Abbildung 59). Dieser Effekt ist auch an der Quantifizierung der Proteinbanden zu ersehen (Quantifizierung der Proteinbanden siehe 2.2.3.2.1, Seite 42).



**Abbildung 59: Inhibition durch A443654 wirkt sich in Form eines verspäteten Abfalls von pAKT in den TCL1-positiven Zellen aus.** Die Immunoblots zeigen die Proteinlevel von pAKT, AKT1/2 und TCL1A und die jeweiligen Standards. Die Werte der Quantifizierungen der Proteinbanden von pAKT sind hinterlegt.

Um die Wirkung von PI-103 und BEZ235 auf das Zellüberleben von DoHH2 und DoHH2-TCL1 zu überprüfen, wurden die Zellen (n=3) über 48 h mit PI-103 und BEZ235 in

Konzentrationen von 0,1 bis 100  $\mu\text{M}$  inkubiert. Der Anteil der viablen Zellen wurde im Durchflusszytometer bestimmt. Die Abbildung 60 zeigt die Resultate der n=3 durchgeführten Experimente.

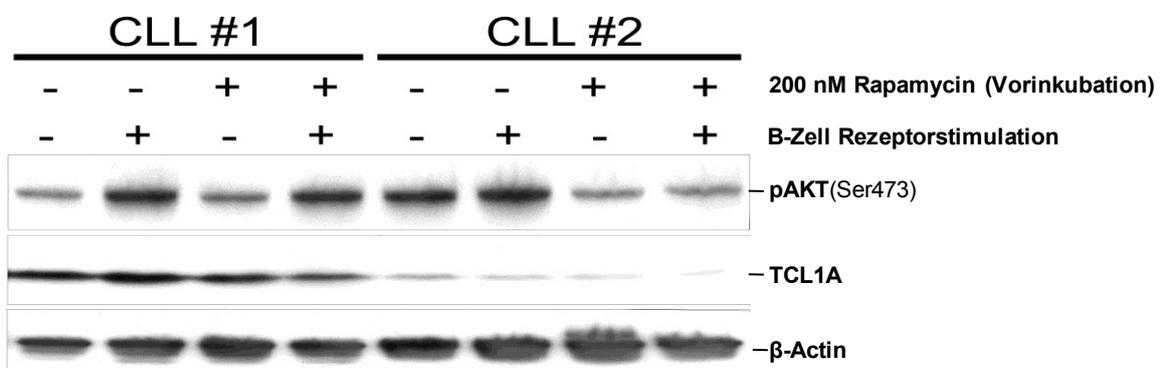


**Abbildung 60: PI-103 und BEZ235 sind geringfügig wirksamer in den DoHH2- (●) als in den DoHH2-TCL1-Zellen (▲).** Dargestellt ist die relative Anzahl an viablen Zellen gegen die logarithmischen Konzentrationen der Inhibitoren. Die statistische Analyse der Diskrepanz zwischen den DoHH2- und DoHH2-TCL1 ergab keine Signifikanz ( $p=0,700$  für PI-103,  $p=0,200$  für BEZ235).

In den untersuchten Experimenten zeigte sich eine leichte dosisabhängige Abnahme der Viabilität der DoHH2- und DoHH2-TCL1-Zellen. Die LD50 wurde mittels GraphPad Prism® ermittelt. Sie lag bei 100  $\mu\text{M}$  bei DoHH2, wurde hingegen nicht erreicht bei DoHH2-TCL1-Zellen nach Inkubation mit PI-103. Des Weiteren wurde die LD50 weder bei den DoHH2- noch bei den DoHH2-TCL1-Zellen nach Inkubation mit BEZ235 erreicht. Die statistische Analyse ergab ebenso keine Signifikanz ( $p=0,700$  für PI-103,  $p=0,200$  für BEZ235). Abschließend wurden die DoHH2- und DoHH2-TCL1-Zellen ebenso auf eine mTOR-Inhibition mit Rapamycin untersucht, jedoch ergab diese keinerlei Unterschiede zwischen DoHH2- und DoHH2-TCL1-Zellen (Daten nicht gezeigt).

### 3.4.3 Das Maß der mTOR-Inhibition durch Rapamycin ist abhängig vom TCL1A-Status und von der zellulären Aktivierung.

Darauffolgend wurden CLL-Zellen von zwei unterschiedlichen CLL-Patienten, die jeweils hohe und niedrige TCL1A-Level aufwiesen, zum Experiment herangezogen. Dabei wurden die CLL-Zellen zum einen mit Rapamycin vorbehandelt und anschließend einer BZR-Stimulation (BZR-*crosslinking* mit anti-IgM) unterzogen bzw. nur stimuliert durch anti-IgM-*crosslinking*. Eine unbehandelte Bedingung wurde als Kontrolle verwendet. Die Zelllysate wurden via Western Blot analysiert. Als Maß für die biochemischen Effekte wurde die Phosphoaktivierung von AKT herangezogen, weil wir pAKT als *Read-out* für eine erfolgreiche *Target*-Inhibition ausgewählt haben.



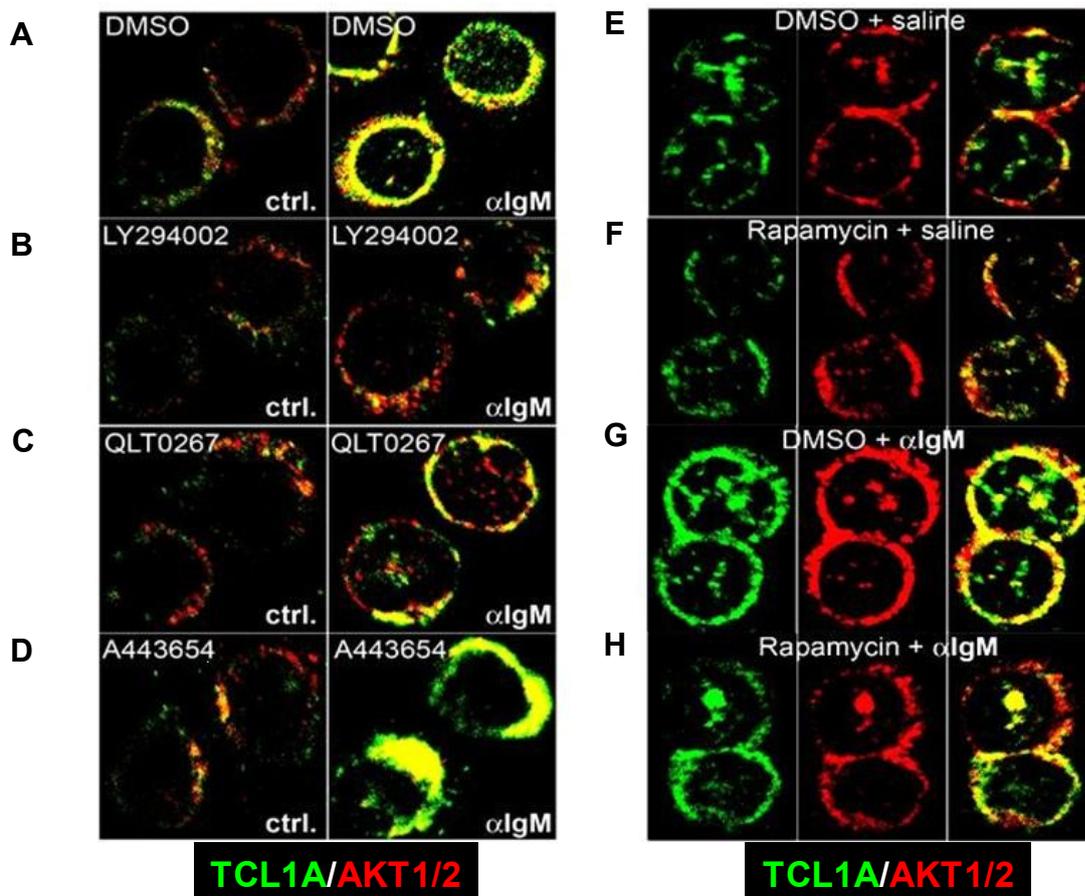
**Abbildung 61: Die pAKT-Level nach mTOR-Inhibition sind abhängig von der TCL1A Expressionsstärke und der zellulären Aktivierung.** Dargestellt ist ein Immunoblot von Zelllysaten zweier CLL-Patienten, jeweils mit hohen und niedrigen TCL1A-Level. Die Zellen wurden entweder aktiviert oder mit Rapamycin behandelt oder sie wurden nach vorheriger Inkubation mit Rapamycin einer BZR-Stimulation unterzogen. Die Proteinlevel von pAKT(Ser473), TCL1A und die jeweiligen Standards sind abgebildet.

Die Effekte auf pAKT scheinen nach BZR-Stimulation und mTOR-Inhibition mit den TCL1A-Level und mit der zellulären Aktivierung in Zusammenhang zu stehen.

### 3.4.4 Die selektive Inhibition von AKT beeinflusst die Bildung der TCL1A-AKT-Komplexe

In der konfokalen Mikroskopie wird deutlich, dass der TCL1A-AKT-Komplex durch spezifische PI3K-AKT-mTOR-Inhibitoren verhindert wird. CLL-Zellen wurden zum einen nur mit anti-IgM für 2 h stimuliert; es bildete sich ein TCL1A-AKT-Komplex (Abbildung 62 A). Zum anderen behandelten wir die CLL-Zellen vorher mit dem PI3K-Inhibitor (LY294002), der *upstream* vom Signalweg inhibiert, und stimulierten sie anschließend mit anti-IgM für 2 h

(Abbildung 62 B). Dies führte dazu, dass die Bildung des TCL1A-AKT-Komplexes verhindert wurde. Darauffolgend wurden die CLL-Zellen zunächst mit einem PDK2-Inhibitor (QLTO267) vorbehandelt, der den direkten Schritt der AKT-Aktivierung inhibiert, und anschließend mit anti-IgM für 2 h simuliert (Abbildung 62 C). Erneut wurde diese TCL1A-AKT-Komplex-Bildung durch den PDK2-Inhibitor verhindert. Im nächsten Fall wurden die CLL-Zellen mit dem AKT-Inhibitor (A443654) vorbehandelt, der *downstream* vom AKT inhibiert, und anschließend mit anti-IgM für 2 h stimuliert (Abbildung 62 D). Infolgedessen kam es zu einer Akkumulation dieses TCL1A-AKT-Komplexes, wenn man *downstream* vom AKT inhibiert. Im letzten Fall wurden die CLL-Zellen mit dem mTOR-Inhibitor (Rapamycin) vorbehandelt und anschließend wurde eine Stimulation mit anti-IgM für 2 h durchgeführt (Abbildung 62 H). Auch auf diesem Wege wird diese TCL1A-AKT-Komplex-Bildung verhindert.



**Abbildung 62:** CLL-Zellen wurden mit den spezifischen Inhibitoren (LY294002, QLT0267, A443654, Rapamycin) vorbehandelt und anschließend mit anti-IgM für 2 h stimuliert. In dieser konfokalen Abbildung wurde TCL1A grün und AKT1/2 rot gefärbt. Die Überdeckung von TCL1A und AKT1/2 ergibt dann gelb. (A) Links sind unbehandelte CLL-Zellen als Kontrolle abgebildet und rechts wurden CLL-Zellen für 2 h durch anti-IgM-crosslinking stimuliert. Es bildete sich ein TCL1A-AKT-Komplex. (B) Links sind jeweils unbehandelte CLL-Zellen abgebildet und inhibiert man oberhalb des PI3K-Signalweges mit dem PI3K-Inhibitor LY204002 (B) oder einem PDK2-Inhibitor (QLT0267) (C) und stimuliert anschließend mit anti-IgM-crosslinking, verhindert man diese TCL1A-AKT-Komplexbildung. (D) Links sind erneut unbehandelte CLL-Zellen abgebildet. Führt man nun eine Inhibition unterhalb des PI3K-Signalweges mit dem AKT-Inhibitor A443654 durch bei anschließender Stimulierung mit anti-IgM-crosslinking, führt dies zu einer Akkumulation dieser TCL1A-AKT-Komplexbildung (D). In (E) sind unbehandelte CLL-Zellen abgebildet, es bildet sich kein TCL1A-AKT-Komplex. (F) zeigt eine Behandlung der CLL-Zellen mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin; auch hier bildet sich kein TCL1A-AKT-Komplex. (G) CLL-Zellen werden mit anti-IgM-crosslinking stimuliert, es bildet sich ein TCL1A-AKT-Komplex. (H) CLL-Zellen werden zunächst mit Rapamycin vorbehandelt und anschließend durch anti-IgM-crosslinking stimuliert. Auf diese Weise wird die TCL1A-AKT-Komplexbildung verhindert.

### 4. Diskussion

Die CLL ist eine heterogene Erkrankung, die einen variablen Krankheitsverlauf aufweist. Ungeachtet der Tatsache, dass sich die Therapieoptionen in den letzten Jahren verbessert haben, stirbt immer noch eine dysproportional große Anzahl an Patienten an der Erkrankung. Aufgrund von bestehenden Resistenzen der Chemotherapeutika gegen CLL-Zellen, von schweren Nebenwirkungen der Chemotherapeutika an sich oder auch von resistenten Fällen müssen neue Therapieoptionen entwickelt werden, die dies überwinden.

Pathogenetisch hat die Interaktion der CLL-Zellen mit dem sogenannten Mikromilieu eine enorme Bedeutung für das Überleben und die Proliferation der CLL. Bei dieser Interaktion ist der BZR sehr bedeutsam; er ist essentiell für das Überleben und die Expansion des CLL-Klones (21). Womöglich ist diese Interaktion auch für die vorkommenden Resistenzen nach einer Chemotherapie verantwortlich (21). Die Aktivierung bzw. Stimulierung des BZR durch anti-IgM aktiviert/phosphoryliert die SYK-Kinasen, die wiederum die Tyrosinkinase PI3K/AKT aktivieren (90, 137). Das Onkogen TCL1A reguliert als AKT-Koaktivator die BZR-Signalweiterleitung in der CLL (75, 77,78, 154, 172). Es wurde gezeigt, dass das Onkogen TCL1A mit dem AKT-Signalweg interagiert, indem es an die PH-Domäne von AKT bindet und dessen Aktivität steigert (107, 139, 153). TCL1A ist in der CLL als Marker schlechter Prognose bekannt (78). Es ist in 80 % der CLL-Fälle exprimiert, besonders in der IGHV-unmutierten und ZAP70-aggressiv verlaufenden Form (78).

Der AKT-Signaltransduktionsweg hat eine zentrale Bedeutung für Wachstum, Proliferation und Überleben von Zellen (123). Der Einfluss von AKT auf das Zellüberleben in der CLL wurde bereits gezeigt (214, 151). In vielen Tumoren – zum Beispiel in der CLL – ist dieser konstitutiv aktiv (214), so dass Proliferation, Wachstum und Überleben in noch stärkerem Maße stattfinden.

Jedoch wurde durch andere Wissenschaftler nachgewiesen, dass AKT auch nicht konstitutiv aktiv vorliegen kann (7, 167). 16 von 32 in dieser Arbeit untersuchten Proben von CLL-Patienten zeigten ebenfalls erhöhte Basallevel von phosphoryliertem AKT.

Eine konstitutive Aktivierung kann eine anhaltende Aktivität des BZR-Signalweges als Ursache haben, aber auch Mutationen in dem PI3K-AKT-mTOR-Signalweg, die bekannt sind und die gegebenenfalls zu Therapieresistenzen führen können (120). Zum Beispiel sind Mutationen von PTEN in malignen Erkrankungen bekannt (67, 86, 173), jedoch nicht in der CLL. PTEN fungiert als negativer Regulator des PI3K-Signalweges, indem es die Umwandlung von PIP<sub>2</sub> in PIP<sub>3</sub> verhindert. Ein nicht funktionsfähiges PTEN bedeutet eine

überschüssige Aktivierung des PI3K-AKT-Signalweges. Markman et al. haben gezeigt, dass die häufigsten Mutationen im PI3K-Signalweg Anomalitäten in PTEN und in PIK3CA darstellen (124). Bei PIK3CA handelt es sich um das Gen, welches für die Kodierung von p110 $\alpha$  zuständig ist (124). Mutationen in PIK3CA sind in Brust-, Kolorektal- und Endometrialkrebs bekannt. Yuan et al. zeigten eine Koexistenz der Mutation in PIK3CA und PTEN in Brust-, Endometrial- und Kolonkrebs (210). Außerdem sind Mutationen in der PH-Domäne von AKT bekannt, die zu einer Aktivitätssteigerung von AKT führen können (24, 119). Brown et al. fanden eine PIK3CA-Amplifikation, die ebenfalls Ursache einer Aktivierung im PI3K-AKT-Signalweg sein könnte (18). Durch die auftretende Mutation wird die PH-Domäne von AKT länger an der Plasmamembran gehalten (24). Die häufigste Mutation von AKT ist eine Mutation in dem AKT1 namens E17K (24, 120). Jedoch scheint ein anderer Sachverhalt für den Überschuss an AKT1 in der CLL und AML verantwortlich zu sein (120, 211), denn Zenz et al. haben 106 CLL- und 95 AML-Patienten auf diese Mutation untersucht und diese nicht nachweisen können (211). Kienle et al. stellten einen Zusammenhang zwischen einer vermehrten Aktivität von AKT1 und einer auftretenden 13q-Deletion in der CLL her (95). Es sind ebenfalls Mutationen im mTOR-Komplex bekannt (73). Alle oben thematisierten Mutationen führen zu Resistenzen in der Standardtherapie der CLL (95).

Aufgrund dessen stellt die Blockade des AKT-Signalweges mittels verschiedener Inhibitoren einen vielversprechenden Ansatz neuerer Therapieoptionen in der CLL dar (214, 109, 153, 176). Andere Forscher haben bereits gezeigt, dass der Einsatz von PI3K- und AKT-Inhibitoren effektiv das Überleben der Tumorzellen stoppen und Apoptose induzieren kann (8,16, 42, 43, 81).

Die nach einer BZR-Aktivierung induzierte Interaktion zwischen den CLL-Zellen und dem Mikromilieu (7), die zu Wachstum und Überleben der CLL-Zellen führt, sollte inhibiert werden. Dies erreicht man mit Inhibitoren von SYK, der PI3K/AKT- oder CXCR4-Antagonisten (20, 124, 156). Aus diesem Grund bietet sich die BZR-Signalweiterleitung als gutes Angriffsziel in der Therapie der CLL an (20).

Das Konzept dieser Arbeit war es, mittels Inhibitoren, die verschiedene Wirkmechanismen aufweisen, effektiv den PI3K-AKT-mTOR-Signalweg zu inhibieren und dabei zu zeigen, ob TCL1A die Sensitivität der Substanzen gegenüber CLL-Zellen beeinflusst.

### 4.1 PI3K-AKT-mTOR-Inhibition in der CLL und der Einfluss von TCL1A auf die Wirksamkeit der Inhibitoren

#### 4.1.1 Die Apoptoseinduktion durch PI3K-AKT-mTOR-Inhibitoren variiert in der CLL.

Die Ergebnisse dieser Dissertation haben gezeigt, dass PI3K-AKT-mTOR-Inhibition *in vitro* Apoptose in der CLL induziert und die Viabilität gesenkt wird. Dabei wurde gezeigt, dass die *downstream*-Inhibition durch A443654 sich als am wirksamsten erwiesen hat. Durch seinen speziellen Wirkmechanismus, *downstream* im Signalweg anzugreifen, erzielte ich die Induktion von Apoptose in allen 32 untersuchten CLL-Patienten. Andere Forscher untersuchten bereits, dass AKT-Inhibitoren die PI3K-AKT-Kaskade effektiver inhibieren können als alle anderen Inhibitoren, die einen anderen Wirkmechanismus aufweisen (5, 108). Diese haben ein Peptid (AKT-in) entwickelt, das an die AKT-Bindestelle bindet und sowohl AKT als auch dessen Substrate reguliert (80). Dieses Peptid mimickt den  $\beta$ A-Strang von TCL1A, bindet an AKT und inhibiert die Kinaseaktivität von AKT. Andere Forscher untersuchten den AKT-Inhibitor API-1, der sehr selektiv AKT durch Bindung an die PH-Domäne von AKT inhibiert (97). Dadurch wird die Membrantranslokation von AKT verhindert. API-1 inhibiert auch alle drei Isoformen von AKT. Dagegen besitzt es keine Wirksamkeit gegenüber der PI3K, PDPK1 und mTOR. Diese Gruppe zeigte, dass API-1 auch wirksam ist, wenn der AKT-Signalweg konstitutiv aktiv ist. Des Weiteren hat es ebenfalls Wirksamkeit gezeigt bei Vorhandensein der Mutation in AKT1 (E17K). Kim et al. illustrierten ebenfalls, dass API-1 Apoptose in Tumorzelllinien induziert und den Zellzyklus stoppt. Darüber hinaus wiesen sie gleichfalls die Wirksamkeit von API-1 *in vivo* nach und konnten zeigen, dass der Inhibitor das Wachstum von Tumoren in sogenannten „*nude mice*“ inhibieren konnte. Jedoch liegen bisher keine Daten zu API-1 in der CLL vor.

mTOR-Inhibition durch Rapamycin hat ebenfalls in allen 32 untersuchten Fällen Apoptose induziert. Die *In-vitro*-Experimente haben gezeigt, dass niedrige nanomolare Konzentrationen an Rapamycin weder Apoptose noch Viabilität senken konnten. Dies steht auch in Einklang mit der existierenden Literatur, da andere Gruppen gleichermaßen festgestellt haben, dass erst hohe Dosen an Rapamycin Apoptose in der CLL induzieren können (206). Diese Tatsache ist auch an der Dosiswirkungskurve (Abbildung 15, Seite 54) zu erkennen. Die Apoptoserate steigt in den mit Rapamycin behandelten CLL-Zellen, gesunden B-Zellen und PBMC in einem steilen Verlauf an (Abbildung 15, Seite 54). Jedoch ist dieses Phänomen nicht bei den anderen Inhibitoren festzustellen. Decker et al. haben gezeigt, dass 50 ng/mL Rapamycin Apoptose in der CLL induzieren können, jedoch

ausschließlich nach vorheriger Stimulation mit IL2 (Interleukin2) (74, 61). Ohne eine vorherige Stimulation konnte durch Rapamycin bei niedrigen Konzentrationen keine Apoptose nachgewiesen werden. mTOR-Inhibitoren der ersten Generation haben zum Nachteil, dass sie ausschließlich mTORC1 inhibieren. Dadurch kann keine effektive Blockade erreicht werden, da mTORC2 als PDK2 AKT an Ser473 phosphoryliert (175). Dagegen zeigten Sabatini et al., dass eine längere Inkubation der Zellen mit Rapamycin auch mTORC2 inhibiert, jedoch ist dieses Ergebnis vom Zelltyp abhängig (174).

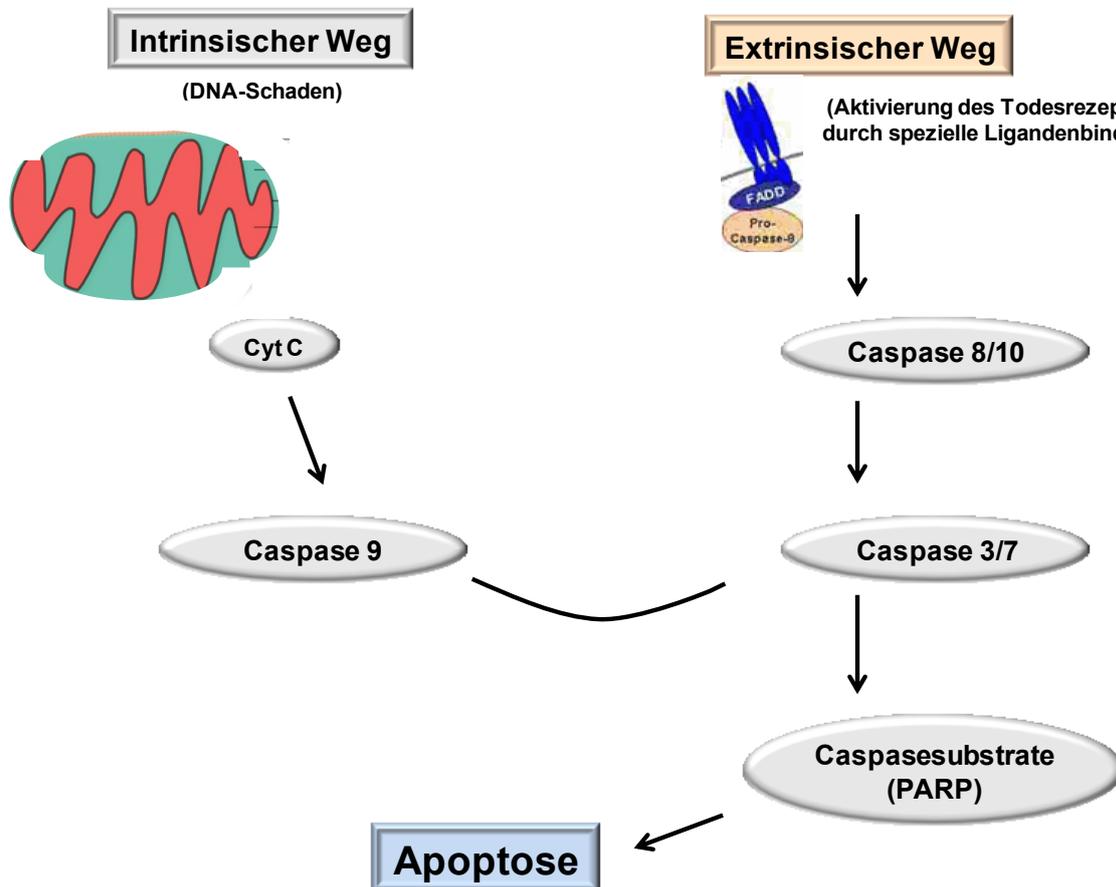
Die dualen PI3K-mTOR-Inhibitoren – wie die hier in dieser Arbeit untersuchten PI-103 und BEZ235 – bieten gegenüber den reinen mTOR-Inhibitoren Vorteile, da sie mTORC1, mTORC2 und die PI3K inhibieren. Diese induzierten hier bereits bei niedrigen mikromolaren Konzentrationen Apoptose (LD50 lag bei ca. 3–5  $\mu\text{M}$ ) und senkten die Viabilität (IC50 lag bei ca. 5–7  $\mu\text{M}$ ) in der CLL; zu diesem Resultat kamen auch andere Forscher (43).

LY294002 als einer der ersten PI3K-Inhibitoren induzierte im Rahmen dieser Untersuchungen ebenfalls Apoptose in der CLL. Es kamen auch andere Wissenschaftler zu der Erkenntnis, dass LY294002 Wirksamkeit in der CLL und anderen Krebserkrankungen gezeigt hat (158). Im Vergleich zu den dualen PI3K-Inhibitoren – BEZ235 und PI-103 – gab es unter den mit LY294002 behandelten CLL-Zellen keine *Non-Responder*. Eine mögliche Erklärung dafür könnte der Wirkmechanismus liefern, denn LY294002 ist ein reiner PI3K-Inhibitor und BEZ235/PI-103 inhibieren sowohl PI3K, mTORC1 und mTORC2 jeweils mit konzentrationsabhängigen Affinitätsunterschieden.

### 4.1.2 Nachweis der induzierten Apoptose

Apoptose kann über einen intrinsischen oder extrinsischen Weg ausgelöst werden (siehe Abbildung 63). Der intrinsische Weg wird durch physikalische oder chemische Reize ausgelöst und läuft über die Mitochondrien ab. BCL-2-Proteine initiieren die Freisetzung von Cytochrom C. Cytochrom C wiederum initiiert die Aktivierung der Procaspase 9, die die Effektorcaspasen 3 und 7 aktiviert. Die Effektorcaspasen führen zum Beispiel durch Spaltung von PARP (Haupt-Caspasesubstrat) die Apoptose aus. Dagegen wird der extrinsische Weg durch Ligandenbindung an einem Todesrezeptor eingeleitet. Die Ligandenbindung aktiviert den Todesrezeptor und es wird ein Proteinkomplex gebildet; dieser Komplex umfasst auch die Procaspasen 8 und 10. Die Procaspase 8 wird gespalten und aktiviert; sie kann so nach Freisetzung selbst Effektorcaspasen aktivieren. Caspase 8 gehört zu den Initiatorcaspasen, die die Effektorcaspasen (3/7/6) aktivieren. Dies führt zu einer kaskadenartigen Aktivierung von verschiedenen Spaltprodukten, wie zum Beispiel PARP. Somit münden beide Wege in

der Aktivierung der Caspase 3 und 7 und somit in der Ausführung der Apoptose. Stiles et al. konnten demonstrieren, dass die Inhibierung der PI3K-AKT-mTOR-Signalweiterleitung für gewöhnlich mit der Aktivierung des intrinsischen apoptotischen Signalweges assoziiert ist (190).



**Abbildung 63: Apoptotische Signalweiterleitung**

Die durch A443654 induzierte Apoptose konnte durch die Spaltung von Caspase 3 weiter charakterisiert werden. William et al. zeigten, dass A443654 Apoptose in Jurkat-Zelllinien durch Aktivierung von Caspase 2, -3, -6, -8 und -9 auslöst (59). Durch Caspase 3/7 konnte hier ebenfalls die durch das Rapamycin ausgelöste Apoptose weiter charakterisiert werden. Hayun et al. fanden ebenfalls heraus, dass Rapamycin die Aktivität von Caspase 9, -3 und -7 steigert und somit die Apoptose durch den intrinsischen Weg ausgelöst wird (74).

Die Inhibition durch die dualen Inhibitoren, BEZ235 und PI-103, löste Apoptose durch Spaltung von Caspase 3 und PARP aus. Sowohl Serra als auch Baumann et al. stellten fest, dass BEZ235 Apoptose durch den Nachweis von Caspase 3 und -9 induzierte (9, 182). Chiarini et al. konnten zeigen, dass PI-103 Apoptose durch eine erhöhte Aktivität von Caspase 3 und -9 nachweisen ließ (29).

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass die Spaltung von PARP durch LY294002 einen Hinweis auf die Art des induzierten Zelltodes gab, nämlich durch Apoptose. Andere Wissenschaftler konnten belegen, dass PI3K-Inhibition durch LY294002 zu erhöhten Aktivitäten von Caspase 8 führte (158). Andere Wissenschaftler gelang es, zu zeigen, dass die Inhibierung der PI3K-AKT-mTOR-Signalweiterleitung für gewöhnlich mit der Aktivierung des intrinsischen apoptotischen Signalweges assoziiert ist (190).

### 4.1.3 Die untersuchten Inhibitoren wirken zielgerichtet und spezifisch.

Bezüglich der Targetspezifität konnte ich zeigen, dass der AKT-Inhibitor A443654, der *downstream* vom AKT-Signalweg angreift, sich als am wirksamsten erwiesen hat, denn pAKT-Level konnten bereits bei niedrigen mikromolaren Konzentrationen effektiv gesenkt werden. Das ist darauf zurückzuführen, dass die *downstream*-Inhibition dem System die Möglichkeit nimmt, durch Rückkopplungsmechanismen Kompensationen vorzunehmen, denn A443654 induziert Phosphorylierung an Serin473 unabhängig von mTORC1 (71). Aus diesem Grund war die Reduzierung von pAKT im Immunoblot durch A443654 sehr effektiv.

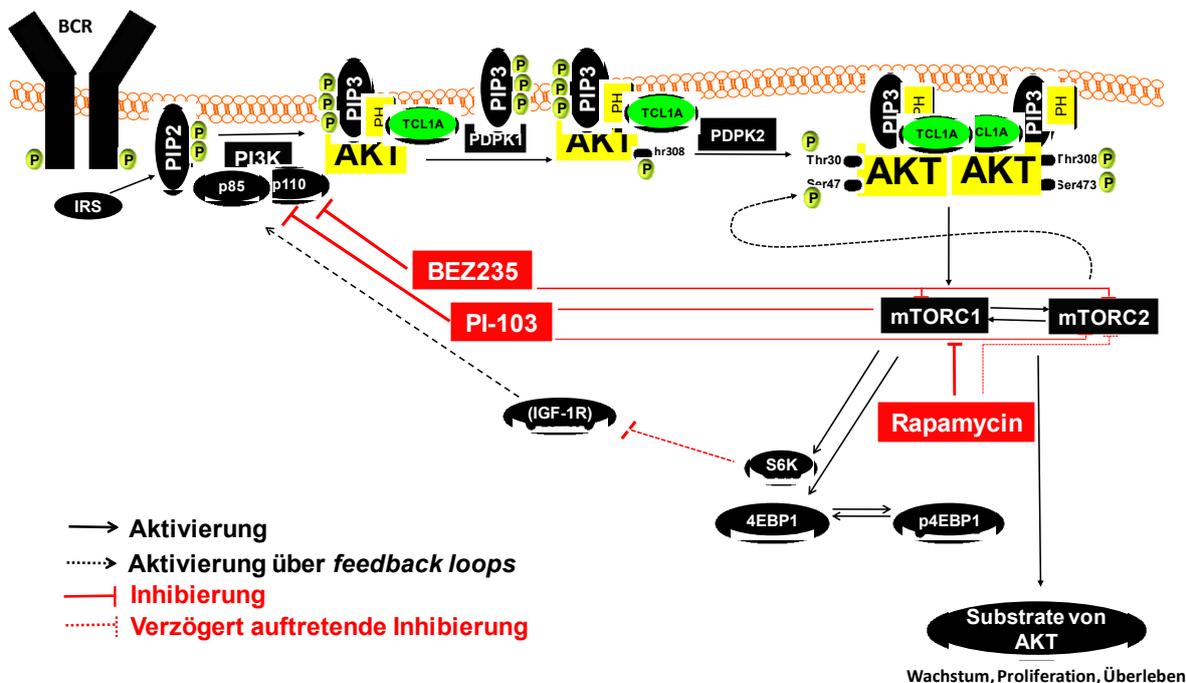
Im Rahmen dieser Experimentenreihe bedingte die AKT-Inhibition durch A443654 keine vorübergehende Hyperphosphorylierung von AKT. Andere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die Behandlung von Zellen mittels A443654 zunächst paradoxerweise eine Hyperphosphorylierung bedingt (143). Bei höheren Konzentrationen wird pAKT vollständig reduziert. Es werden zwei mögliche Mechanismen diskutiert, durch die es zu dieser vorübergehenden Hyperphosphorylierung durch A443654 kommen kann. So wird diskutiert, dass sie durch einen sogenannten extrinsischen Weg ausgelöst werden kann. Dabei wird die Signalkaskade mit eingeschlossen. Okuzumi et al. haben die Frage untersucht, ob A443654 wie die mTOR-Inhibitoren *feedback loops* auslösen kann. Dies könnte zum Beispiel durch Inhibition bestimmter Kinasen geschehen; diesen Mechanismus bezeichneten die Wissenschaftler als den extrinsischen Weg, der diese Hyperphosphorylierung bedingen könnte. Sie gingen auch der Überlegung nach, ob das Phänomen der Hyperphosphorylierung womöglich gar nichts mit der Signalkaskade zu tun hat, sondern durch direkte Bindung von A443654 an die ATP-Bindestelle von AKT ausgelöst werden kann. Diese Möglichkeit wird von den Wissenschaftlern als der intrinsische Weg bezeichnet. Geringe Mengen an A443654 sollen die Empfindsamkeit der PH-Domäne von AKT erhöhen, so dass dieser in der Lage ist, mehr PIP<sub>3</sub> zu binden. Dadurch wiederum wird die Membranlokalisierung begünstigt, was schließlich dazu führt, dass die Aktivierung von AKT bzw. deren Phosphorylierung erhöht wird. Membranlokalisierung ist aber keine hinreichende

Bedingung, um eine Hyperphosphorylierung zu induzieren. Schlussfolgernd gelangten Okuzumi et al. zu dem Resultat, dass die vorübergehende Hyperphosphorylierung durch A443654 durch den intrinsischen Weg ausgelöst wird.

Die Targetspezifität von Rapamycin der dualen Inhibitoren wurde durch die Level an mTOR/pmTOR und 4EBP1/p4EBP1 in dieser Arbeit nachgewiesen.

Die dualen Inhibitoren zeigen mechanistische Vorteile gegenüber den reinen mTOR-Inhibitoren und zwar in dem Sinne, dass die Rückkopplungsmechanismen verhindert oder abgeschwächt werden können.

Über mTOR-Inhibitoren wird berichtet, dass sie über den IGF-1-Rezeptor Rückkopplungsmechanismen auslösen können (142). Dazu werden im Rahmen einer ausschließlichen mTORC1-Inhibierung positive Rückkopplungsschleifen über den IGF-1R ausgelöst, die zu einer erneuten Aktivierung von AKT führen (2, 142). Dies wird in der folgenden Abbildung deutlich:



**Abbildung 64: PI3K-AKT-mTOR-Signalweg.** BZR-Stimulation, die zu Wachstum, Proliferation und Überleben führt. TCL1A fungiert dabei als AKT-Koaktivator. mTORC2 kann als PDK2 fungieren, indem es pAKT an Serin473 phosphoryliert. Parallel kann TCL1A indirekt als PDK2 fungieren, indem sich jeweils zwei Komplexe aus TCL1A gebunden an die PH-Domäne von AKT *vercrosslinken* und sich gegenseitig phosphorylieren. TCL1A fungiert als aktivitätssteigernde Komponente. Veranschaulicht ist eine detailliertere Darstellung des Wirkmechanismus von PI-103, BEZ235 und Rapamycin, inklusive der sich aus der mTOR-Inhibition ergebenden „positiven Rückkopplungsschleife“.

Die S6 Kinase stellt ein Substrat von mTOR dar, somit wird nach einer mTOR-Inhibition die S6 Kinase inaktiviert. Die S6 Kinase hemmt im aktiven Zustand IRS-1 (*Insulin Receptor*

*Substrate-1*), dieser bewirkt im aktiven Zustand über den IGF-1-Rezeptor eine Aktivierung des PI3K-Signalweges. Unsere Daten zeigen keine IGF-1R-Expression in der CLL (nicht publizierte Daten), jedoch belegte die Forschungsarbeit von Schillaci et al., dass in 50 % der CLL-Fälle eine IGF-1R-Expression vorliegen kann (177). Nach mTOR-Inhibition wird die S6-Kinase inaktiviert, infolgedessen kann IRS-1 nicht gehemmt werden. Dies führt zu einem positiven Rückkopplungsmechanismus, indem trotz mTOR-Inhibition der PI3K-Signalweg aktiviert wird (Abbildung 64) (90, 142). Die zusätzliche Inhibierung der p110 $\alpha$ -Untereinheit durch einen PI3K-Inhibitor verhindert diese AKT-Aktivierung. Daher ist es sinnvoll, duale PI3K-Inhibitoren zu entwickeln, die mTOR und PI3K inhibieren. Infrage kämen hier im Rahmen dieser Arbeit BEZ235 oder PI-103 (118). Eine andere Möglichkeit wäre die Kombination eines mTOR-Inhibitors mit einem IGF-1R-Inhibitor. Diese Kombination verhindert die durch das Rapamycin ausgelöste Aktivierung des PI3K-Signalweges.

Diese Beobachtung konnte ich in meiner Dissertation auch bedingt zeigen, denn durch die unterschiedlichen Affinitäten der dualen Inhibitoren zu deren *Targets* waren geringfügig bei den dualen Inhibitoren ebenfalls diese positiven Rückkopplungsmechanismen zu beobachten. Serra et al. verdeutlichten, dass die Auslösung der *feedback loops* abhängig von der Konzentration, von der Dauer der Inkubation von BEZ235 mit den Zellen und vom Zelltyp zu sein scheint (182). So zeigten meine Ergebnisse, dass BEZ235 bei niedrigeren Konzentrationen eine stärkere Affinität zu der mTOR-Einheit aufwies und bei höheren Konzentrationen die duale Inhibition einsetzte (siehe Abbildung 49). Serra et al. kamen bei der Untersuchung von BEZ235 in Brustkrebszelllinien zu demselben Ergebnis. Sie fanden heraus, dass BEZ235 bei < 100 nmol/L mTOR inhibiert wurde und bei ca. 500 nmol/L die duale Inhibition einsetzte (182). Raynaud et al. haben gezeigt, dass PI-103 mit einer Konzentration von 2 nmol/L die p110 $\alpha$ -Untereinheit inhibierte und mTORC1 bei einer Konzentration von 5  $\mu$ mol/L inhibiert wurde (167). Cho et al. verglichen in einer Arbeit Rapamycin und BEZ235 miteinander und veranschaulichten die mechanistischen Vorteile der dualen Inhibitoren (32).

Ihnen gelang es, zu zeigen, dass durch die dualen Inhibitoren diese positiven Rückkopplungsmechanismen teilweise kompensiert werden konnten. Die Kompensation erreicht leider keinen Wert von 100 %, da die dualen Inhibitoren konzentrationsabhängig Affinitätsunterschiede zu ihren Angriffsstellen aufweisen. Trotzdem erweisen sich die dualen PI3K-mTOR-Inhibitoren, wie zum Beispiel PI-103 und BEZ235, *in vitro* als vorteilhafter (32), ebenfalls in der T-ALL (T-Zell-akute lymphatische Leukämie) (194). Zudem haben sich die dualen Inhibitoren gegenüber den reinen PI3K-Inhibitoren (LY294002) durchgesetzt. Die Begründung ist, dass die Inhibition *upstream* vom Signalweg keine Gewährleistung dafür bietet, dass die Kaskade eine Umgehung der Inhibition findet. Diese Aussage unterstützten

auch die Immunoblots, die auf Proteinebene zur Analyse der Phosphorylierung von AKT intendiert waren. Da LY294002 nur an der PI3K inhibiert, wurden pAKT-Level nicht erfolgreich minimiert, wie das zum Beispiel bei der Anwendung der dualen PI3K-mTOR-Inhibitoren der Fall war. Interessanterweise konnten Plate et al. bei gleichzeitig erhöhter Aktivität von Caspase 8 durch PI3K-Inhibition mittels LY294002 keine Reduktion von pAKT nachweisen (158).

#### 4.1.4 Ist das zytotoxische Potential gegen gesunde Zellen gerichtet?

Die Untersuchung der Wirkung der Inhibitoren auf die gesunden B-Zellen und gesunden PBMC ergab, dass durch A443654, Rapamycin und LY294002 auch gesunde Zellen in Apoptose gingen. A443654 zeigte ca. eine LD50 = 10 µM und eine IC50 = 4,78 µM gegenüber gesunden B-Zellen bzw. PBMC. Rapamycin veranschaulichte eine LD50 = 74,13 µM gegenüber gesunden B-Zellen und eine LD50 = 57,54 µM/IC50 = 100 µM gegenüber gesunden PBMC. LY294002 zeigte eine IC50 = 87,10 µM gegenüber gesunden PBMC. Dagegen erwiesen sich die dualen PI3K-Inhibitoren – BEZ235 und PI-103 – vergleichsweise wirkungslos gegenüber gesunden B-Zellen und PBMC (Abbildung 12, Seite 51 und Abbildung 13, Seite 52). A443654 wurde bisher nur *in vitro* und *in vivo* an Mäusen untersucht (185), es gibt noch keine klinische Anwendung. Die Ergebnisse aus dem „PC<sub>3</sub> prostata xenograft model“ zeigten ein reduziertes Tumorstadium durch Gabe von A443654 in Kombination mit Paclitaxel (185). Die alleinige Gabe von Paclitaxel konnte das nicht bewirken. Damit wird angedeutet, dass AKT-Inhibitoren Resistenzen in der Tumorthherapie gegenüber Standard-Chemotherapeutika brechen können. Auch andere Gruppen konnten zeigen, dass A443654 – dosisabhängig – die AKT-abhängige Signaltransduktion *in vivo* inhibiert (119). Das Fortschreiten der Tumorausbreitung konnte verlangsamt werden, sowohl mit A443654 als Monotherapie als auch in Kombination mit Paclitaxel oder Rapamycin. Da A443654 in den *In-vitro*-Experimenten auch Einfluss auf gesunde Zellen hatte, wäre das mutmaßlich der Grund, warum A443654 bisher nicht in der klinischen Anwendung untersucht wird.

Eine Phase-I-Studie mit dem AKT-Inhibitor MK-2206 wurde abgeschlossen (205, 148). MK-2206 ist ein allosterisch wirksamer AKT-Inhibitor. Durch seine Bindung an AKT bewirkt er Konformationsänderungen in dem Protein. MK-2206 inhibiert sowohl die AKT-Aktivität als auch die Aktivierung von AKT (112). Präklinische *In-vitro*-Untersuchungen zeigten eine stärkere Wirksamkeit von MK-2206 in Kombination mit Erlotinib, Lapatinib, Doxorubicin, Docetaxel und 5-Fluorouracil (205, 79). Derzeit sind über 10 Phase-II-Studien im Umlauf, die

MK-2206 oder die Kombination aus MK2206 mit anderen zytotoxischen Substanzen oder mit anderen zielgerichteten Inhibitoren in der Krebstherapie an multiplen Tumoren untersuchen (<http://clinicaltrials.gov/ct2/results>).

#### **4.1.4.1 Die klinische Anwendung von Rapamycin und dessen Derivate sind mit einer hohen Toxizitätsrate verbunden.**

Rapamycin und dessen Derivate werden bereits in Phase-I-Studien eingesetzt, jedoch ist der limitierende Faktor hier die hohe Toxizität (44). Die Wirkung von Rapamycin in den *In-vitro*-Experimenten an gesunden Zellen hat dies bereits vermuten lassen (44, unsere Daten zeigen das ebenfalls, siehe Abbildung 15 und Abbildung 23). Ein Derivat von Rapamycin, der Wirkstoff Everolimus, wurde in einer Phase-II-Studie mit einer Dosierung von 5 mg/Tag verabreicht (3). Jedoch musste auch diese Studie aufgrund von auftretenden Toxizitäten abgebrochen werden, wie dies auch bei der Studie mit Rapamycin der Fall war (44). Dagegen wird ein weiteres Derivat, das Temsirolimus, gut vertragen; dieser Wirkstoff scheint bislang der vielversprechendste in der klinischen Anwendung zu sein (206).

#### **4.1.4.2 Vielversprechende klinische Ansätze der PI3K-Inhibitoren in der CLL und anderen Tumorerkrankungen**

Da die dualen PI3K-Inhibitoren in unseren Studien gegenüber den gesunden Zellen kaum messbare Wirksamkeit zeigten, würde man zu der Vermutung gelangen, dass sie sich für die klinische Anwendung gut eignen.

Cal-101 wird bereits erfolgreich in klinischer Anwendung in der CLL in Kombination mit Rituximab und/oder Bendamustin erprobt (62, 64).

BEZ235 wird derzeit bezüglich seines optimalen Dosierungsschemas 1x/d vs. 2x/d pharmakokinetisch untersucht.

Erste Ansätze in Phase-I/II-Studien mit BEZ235 an soliden Tumoren haben sich als erfolgreich erwiesen (122) (siehe auch *Abstract 3005, Asco Annual Meeting, 2010*). BEZ235 wurde relativ gut vertragen und die – beispielsweise bei den mTOR-Inhibitoren beobachteten – Toxizitäten blieben aus (siehe *Abstract 3005, Asco Annual Meeting, 2010*). Maira et al. zeigten eine dosisabhängige Antitumoraktivität *in vivo* und zwar in Tumorexograft-Zellen mit einer fehlenden Funktion von PTEN (121). Daher sprechen viele Argumente dafür, dass die dualen PI3K-mTOR-Inhibitoren die reinen mTOR-Inhibitoren in der klinischen Anwendung ersetzen könnten, ebenso in der AML (25, 122). Dagegen zeigte PI-103 aufgrund von

pharmakokinetischen Nachteilen – wie ein schneller Metabolismus – keinerlei Erfolge in der klinischen Anwendung (166).

### 4.1.5 TCL1A-/pAKT-Level beeinflussen die Wirksamkeit der Inhibitoren.

Zudem wurde hier ebenfalls untersucht, ob der TCL1A-Status die Wirksamkeit der Inhibitoren beeinflusst. Die *In-vitro*-Untersuchungen an CLL-Zellen haben ergeben, dass die Wirksamkeit von LY294002 und BEZ235 durch TCL1A herabgesetzt wird. Potentielle erste klinische Anwendungen von BEZ235 sollten daher das *Response Stratum* „TCL1A“ prospektiver testen. Unsere *In-vitro*-Untersuchungen an Zelllinien haben ergeben, dass TCL1A die Wirksamkeit von LY294002 und A443654 herabsetzt. Jedoch ergab die statistische Analyse keine Signifikanz ( $p=0,6667$  für LY294002,  $p=0,3095$  für A443654). Daher wäre es fragwürdig, ob wegen der großen Varianz überhaupt von einem Unterschied gesprochen werden kann. Es wurde keine Korrelation bezüglich der Wirksamkeit von A443654 mit dem TCL1A-Status an den CLL-Zellen gefunden. Möglicherweise spielen in CLL-Zellen andere Faktoren bezüglich der Wirksamkeit von A443654 eine Rolle.

Dagegen wurde die Wirkung von PI-103 und Rapamycin durch die Anwesenheit von TCL1A an CLL-Zellen eher verbessert. PI-103 hat als dualer Inhibitor zunächst eine stärkere Affinität zu der mTORC1-Einheit als zu der p110 $\alpha$ -Untereinheit der PI3K. TCL1A bewirkt die Aktivierung von AKT und zwar durch seine Bindung an die PH-Domäne von AKT. Dies führt gegebenenfalls dazu, dass die Wirkung von PI-103, zunächst mTORC1 zu inhibieren, gesteigert wird, wenn der AKT-Signalweg aktiv ist. Die Daten aus dieser Arbeit zeigen, dass PI-103 bei erhöhten basalen pAKT-Level eine bessere Wirkung zeigt. Demgegenüber weist BEZ235 keinerlei Korrelation der basalen pAKT-Level mit der Wirksamkeit auf. Serra et al. konnten bei der Untersuchung von BEZ235 in der AML auch keinerlei Korrelation mit der biochemischen Aktivität von BEZ235 feststellen (182). Als mögliche Erklärung könnten die unterschiedlichen, konzentrationsabhängigen Affinitäten von BEZ235 und PI-103 dienen. BEZ235 weist zunächst eine höhere Affinität zu der p110 $\alpha$ -Untereinheit der PI3K als zu der mTOR-Einheit auf (113). Ist die AKT-Kaskade aktiviert, inhibiert PI-103 effektiv den Signalweg an mTORC1, wohingegen BEZ235 zuerst die p110 $\alpha$ -Einheit inhibieren würde. Dies führt nicht zu einer effektiven Inhibierung des Signalweges. Daher verbessert TCL1A (Koaktivator von AKT) die Wirksamkeit von PI-103, wohingegen die Wirksamkeit von BEZ235 durch TCL1A herabgesetzt wird. Rapamycin als mTOR-Inhibitor reagiert ähnlich wie PI-103, da es ebenfalls im Falle einer Aktivierung von AKT durch TCL1A eine hohe Wirksamkeit zeigt. Das macht deutlich, dass LY294002 und BEZ235 sich ähnlich sind, da sie

zunächst eine stärkere Affinität zu der PI3K aufweisen, wohingegen PI-103 und Rapamycin ähnliche Charakteristika zeigen, da sie eine stärkere Affinität zu der mTORC1-Einheit aufweisen.

Die bessere Wirksamkeit von BEZ235 in Gegenwart von geringen TCL1A-Level resultierte aus den Ergebnissen, die aus dem AnnexinV-Assay stammen, denn nur die LD50-Werte von BEZ235 ergaben eine Assoziation mit TCL1A-Level. Dagegen führten die IC50-Werte von LY294002, PI-103 und Rapamycin zu einer Assoziation mit TCL1A-Expression. Außerdem ergaben nur die IC50-Werte von A443654 eine Assoziation mit pAKT-Level. Mögliche Ursachen dieser Diskrepanzen zwischen LD50 und IC50 könnten zum einen die relative geringe Anzahl an untersuchten Proben von Patienten sein. Eine höhere Anzahl an Proben hätte zu einer besseren statistischen Auswertung führen können. Zum anderen könnte es auch an den unterschiedlichen *Readouts* gelegen haben. Durch den AnnexinV-Assay werden proapoptotische Effekte erfasst, wohingegen durch den MTT-Assay, welcher metabolische Aktivität und damit Viabilität misst, eher antiproliferative Wirkungen abgebildet werden. Ein weiterer bekannter Zusammenhang besteht zur Autophagie, ein alternativer potentieller Effekt von pharmakologisch induziertem Zellstress. Autophagie ist die primäre Antwort bei mangelnder Nährstoffversorgung. Sie dient dazu, das Energiegleichgewicht der Zellen aufrechtzuerhalten, und sichert das Überleben der Zellen. Dabei werden zelleigene Organellen und Proteine verdaut, somit phagozytiert („frisst“) sich die Zelle selbst. Autophagie ist demnach eine Art ‚alternativer Zelltod‘. Sie wird besonders durch mTOR-Inhibitoren aktiviert (193). Herrscht ein Defekt in der Apoptose vor, ist oft die Autophagie hochreguliert (132). Autophagie wurde in dieser Arbeit jedoch weder qualitativ noch quantitativ gemessen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Beeinflussung der Wirksamkeit der Inhibitoren durch TCL1A begründet und zwar durch dessen Interaktion mit AKT.

Die PI3K-AKT-mTOR-Inhibitoren dienen auch als Werkzeuge, um weitere mechanistische Untersuchungen auf dem Gebiet AKT oder TCL1A vorzunehmen.

---

## 4.2 Bedeutung der Ergebnisse für die experimentellen Therapieansätze in der CLL

### 4.2.1 Assoziation der Wirksamkeit der Inhibitoren mit etablierten prognostischen Faktoren wie klinisch-pathologische Tumor-Parametern

Insgesamt zeigen sowohl unsere Daten als auch die anderer Forscher, dass PI3K-AKT-mTOR-Inhibitoren einen guten Ansatz bieten, die aktuellen Therapieoptionen in der CLL zu verbessern. Der BZR-Signalweg spielt eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der CLL. Es wurden Assoziationen der BZR-Signalweiterleitung mit prognostischen Faktoren (CD38, ZAP70) und Thyrosinkinase (LYN, SYK, AKT, PI3K) entdeckt (39, 110, 137, 176, 211). Wir fanden bei der pharmakologischen *In-vitro*-Inhibierung von SYK durch den R406-Inhibitor auf das Zellüberleben in der CLL heraus, dass CLL-Zellen von CLL-Patienten mit niedrigeren Serum- $\beta$ 2-Mikroglobulinwerten nach Inkubation mit R406 mit einer besseren Ansprechrate assoziiert sind (159). Frühere Forschungen durch andere haben gezeigt, dass R406 das Zellüberleben und die Migration von CLL-Zellen nach vorheriger B-Zell-Aktivierung inhibiert (161).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Wirksamkeit der Inhibitoren an CLL-Zellen mit derartigen Parametern assoziiert ist. Zu diesen Faktoren gehören zum Beispiel ZAP70-Expression, CD38-Expression, Lymphozytenverdopplungszeit, Mutationsstatus der IGHV-Gene oder das Binet-Stadium. In dieser Arbeit konnte keine Korrelation zwischen der Zytogenetik und der Wirksamkeit festgestellt werden. Die Anzahl der untersuchten Patienten war nämlich zu niedrig, um Gruppen unterschiedlicher Zytogenetik bilden zu können und diese mit der Wirksamkeit zu korrelieren. Zhuna et al. fanden heraus, dass die Sensitivität des AKT-Inhibitionsmittels A443654 mit einer p53-Dysfunktion und einer Deletion 17p/11q in der CLL assoziiert ist (214). A443654 zeigte sich als weniger sensitiv bei den CLL-Proben (n=26), die eine p53-Dysfunktion und eine Deletion 17p/11q aufwiesen. Jedoch konnte keine weitere Korrelation mit anderen prognostischen Markern festgestellt werden (214).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass Proben von CLL-Patienten, die eine 11q/17p-Deletion aufwiesen, im Vergleich zu allen anderen zytogenetisch vorkommenden Gruppen mit einer schlechten Sensitivität gegenüber BEZ235 und A443654 assoziiert waren. Da unsere Patientendaten keine genauen Angaben über den Zeitpunkt der Stadieneinteilung beinhalteten, wäre es zu unreflektiert, Schlussfolgerungen aus den Responosedaten der Inhibitoren zu ziehen.

Des Weiteren wurden hier die Proben der Patienten auch nicht auf Mutationen im BZR-Signalweg untersucht, um wiederum Korrelationen mit der Inhibitor-Wirksamkeit zu

untersuchen. Brown et al. haben eine genomische Analyse von 161 CLL-Proben mit „*Affymetrix 6.0 SNP arrays*“ durchgeführt (18). Die Daten wurden mit Hilfe von „*gene expression profiles*“ analysiert. In drei CLL-Proben haben sie Amplifikationen im PIKC3CA-Gen gefunden. Diese auftretende Amplifikation ist assoziiert mit einer erhöhten Expression von ZAP70 und CD38. Sie haben keine weiteren Punktmutationen in dem Bereich finden können. Die PIKC3CA-Amplifikation könnte die Ursache einer Aktivierung im PI3K-AKT-Signalweg sein (18). Fan et al. haben den Nachweis erbracht, dass PI-103 ebenso eine Wirkung in solchen Zelllinien zeigte, in denen PTEN und p53 funktionslos sind (60). Die Auswirkung dieser Mutationen bestand in einer Aktivierung von AKT. Des Weiteren zeigten auch Chapuis et al., dass BEZ235 in Tumorzelllinien wirksam war, bei denen PTEN funktionslos ist (25). Ebenso induzierte BEZ235 Apoptose in Brustkrebszelllinien, welche eine PIK3CA-Mutation enthielten (16). Diese auftretenden Mutationen verleihen eine gewisse Resistenz gegenüber Standard-Chemotherapeutika, daher erweisen sich die dualen PI3K-Inhibitoren in diesen Fällen als gute therapeutische Maßnahme. Yu et al. haben gezeigt, dass Veränderungen in dem RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg für eine fehlende Wirksamkeit der PI3K-Inhibition verantwortlich sind (208).

### **4.2.2 Umgehung von Resistenzen durch PI3K-AKT-mTOR-Inhibitoren gegenüber der Standard-Chemotherapie**

TCL1A ist als Adaptermolekül im BZR-Signalweg involviert und erfährt auch während der B-Zell-Rezeptorreifung eine kontrollierte Regulation. Der PI3K-AKT-Signalweg wird unmittelbar nach Aktivierung des BZR aktiviert. Eine Aktivierung des BZR-Signalweges durch – beispielsweise – Mutationen führt zu einer fehlenden Wirksamkeit der Standard-Chemotherapeutika (17, 33). Diese Resistenz könnte zukünftig durch PI3K-AKT-mTOR-Inhibitoren umgangen werden, zumal die Kombination aus einem Standard-Chemotherapeutikum und einem PI3K-AKT-mTOR-Inhibitor bereits Anwendung in klinischen Studien gefunden hat und diese Kombination sehr vielversprechend ist (84).

Die konstitutive Aktivierung der PI3K-AKT-mTOR-Kaskade kann durch den speziellen Inhibitor erfolgreich inhibiert werden, so dass an diesem Punkt sogar die Standardtherapeutika erneute Wirksamkeit zeigen könnten. Auf die Weise soll auch das Risiko aufkommender Toxizitäten minimiert werden. Shi et al. zeigten eine synergistische Wirkung von A443654 mit Topoisomerase I- und II-Inhibitoren in humanen Tumorzelllinien (185). Everolimus wird in einer Phase-I-II-Studie mit Cyclophosphamid an Patienten mit metastasierendem Nierenzellkarzinom kombiniert verabreicht; dabei konnte bereits ein

längeres PFS gezeigt werden (85). Shi et al. haben entdeckt, dass die Kombination aus Rapamycin und Cisplatin die Apoptoserate intensiviert und die Wirksamkeit von Cisplatin steigert (178). Nishioka et al. fanden heraus, dass die Kombination aus mTOR-Inhibition und einem Histon-Deacetylase-Inhibitor Wachstum und Differenzierung von AML-Zellen *in vitro* verhindert (138).

Serra et al. zeigten, dass BEZ235 sowohl in mutierten Zellen als auch in nicht mutierten Zellen Wirksamkeit zeigte. Diese Mutationen wurden im p110 $\alpha$ -Bereich, E545K und H1047R identifiziert. Dies ist wichtig für die klinische Anwendung von BEZ235 in der AML (182). Möglicherweise könnte man sich diesen Vorteil auch in der CLL zunutze machen.

T-ALL-Zellen zeigen in 85 % der Fälle eine konstitutive Aktivierung der PI3K-Signalweiterleitung, so dass der Einsatz der PI3K-AKT-mTOR-Inhibitoren eine gute therapeutische Maßnahme darstellt. So konnten Chiarini et al. zeigen, dass BEZ235 die auftretende Resistenz gegenüber Vincristin in Jurkat-Zellen überwinden konnte (30). Die Jurkat-Zellen wurden dabei mit MS-5-Stromazellen in Kokultur gehalten, um die Gegebenheiten im Mikromilieu zu reproduzieren. Kim et al. veranschaulichten, dass BEZ235 gute Wirksamkeit im MCL (Mantle cell lymphoma, Mantelzelllymphom) – in dieser ist der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg konstitutiv aktiv – gezeigt hat (67). Des Weiteren entwickelten sie eine MCL-Zelllinie, die erhöhte Level an phosphoryliertem AKT und mTOR aufwies. Diese MCL-Zelllinie reagierte resistent auf Bortezomib. Jedoch konnte man durch die Kombination aus Bortezomib und BEZ235 das Wachstum dieser Zelllinie verhindern bzw. inhibieren. BEZ235 zeigte eine synergistische Eigenschaft mit Bortezomib und hob die Resistenz der Zellen gegenüber den konventionellen Standard-Chemotherapeutika auf (67). PI-103 zeigte ebenfalls *in vitro* synergistische Wirkung in Kombination mit Vincristin in der T-ALL (29). Eine konstitutive Aktivierung der PI3K als Ursache für eine auftretende Resistenz gegenüber zytotoxischen Substanzen wurde in Brustkrebszellen, Lungen- und Ovarialkarzinomen gezeigt (17, 33, 84). Möglicherweise ließe sich diese auch in der CLL zunutze machen, wenn man vorher den Aktivierungszustand der PI3K in Erfahrung bringen könnte. Hierzu existiert eine fortlaufende Kontroverse, ob und über welche Mechanismen eine konstitutive Aktivierung der PI3K-AKT in der CLL vorliegt. Es gibt Ergebnisse, die für eine konstitutive Aktivierung der PI3K-AKT in der CLL sprechen, wohingegen andere Ergebnisse in gegenteiliger Weise zu interpretieren sind. Möglicherweise liegt es an der Heterogenität der CLL, dass beide Zustände postuliert werden. Cuni et al. zeigten, dass eine erhöhte Aktivität von NF- $\kappa$ B in CLL-Zellen mit erhöhten basalen Aktivitäten von RAF-MEK-ERK und/oder dem PI3K-AKT-Signalweg assoziiert ist (37, 203). An frisch isolierten CLL-Zellen zeigten sie, dass AKT konstitutiv phosphoryliert vorliegt und die NF- $\kappa$ B-Aktivität erhöht ist. Plate et al. bestätigten diese Forschungsergebnisse, indem auch sie zeigten, dass CLL-Zellen erhöhte

basale pAKT-Level aufweisen und dass AKT konstitutiv phosphoryliert vorliegt (158). Dabei wurde die Kinaseaktivität von AKT gemessen. Sie zeigten sowohl eine anhaltende Phosphorylierung an Serin473 als auch an Threonin308. Liegt AKT nun im aktivierten Zustand vor, ist die PI3K nicht weiter zur Aufrechterhaltung der AKT-Aktivität erforderlich. Ihre Arbeiten zeigten auch, dass in einem solchen Fall die PI3K-Inhibition mittels LY294002 keinerlei Wirkung zeigte. Sie konnten auch widerlegen, dass, wenn AKT konstitutiv aktiv vorliegt, die *downstream*-Substrate von AKT ebenfalls aktiviert vorliegen. Bichi et al. veranschaulichten, dass eine erhöhte anhaltende AKT-Aktivität mit der TCL1A-Expression in der CLL assoziiert ist (11). Ringhausen und Barragan et al. zeigten das Gegenteil – nämlich dass AKT nicht konstitutiv aktiv in der CLL vorliegt (7, 167). Sie wiesen eine erhöhte basale Aktivität der PI3K nach; Ringhausen et al. belegten sogar, dass die PI3K konstitutiv aktiv in der CLL vorliegt, jedoch ohne erhöhte Aktivität von AKT. Ringhausen et al. maßen die Kinaseaktivität von AKT und stellten dabei fest, dass weder AKT an Serin473 noch an Threonin308 phosphoryliert vorliegt (167). Im Endeffekt scheint nicht ganz klar zu sein, ob die Phosphorylierung an AKT von der PI3K abhängig ist. Aufgrund dessen lässt sich ebenso nicht eindeutig folgern, ob pAKT als geeigneter *Read-out* der erfolgreichen *In-vitro*-Targetinhibition fungiert. Systematischere Untersuchungen müssen dies etablieren.

Der mTOR-Komplex gilt als negativer Regulator der Autophagie (89). Er behindert den Prozess der Autophagie dadurch, dass die „Autophagiekaskade“ nicht in Gang gesetzt wird. Die Hyperphosphorylierung von Proteinen, die für die Initiierung der Autophagie verantwortlich ist, wird verhindert. Takeuchi et al. veranschaulichten in Glioma-U87MG- und T98G-Zellen, dass Rapamycin durch mTOR-Inhibition Autophagie zu induzieren vermag, jedoch keine Apoptose (193). Morselli et al. zeigten, dass in Stresssituationen die mTOR-Aktivität herunterreguliert zu sein scheint, dagegen eine hohe Autophagieaktivität vorherrscht (132). Des Weiteren wird postuliert, dass Autophagie durch BEZ235 in T-ALL-Zellen aktiviert wird (30, 132). Der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg ist bedeutsam für die Inhibition der Autophagie (132, 116). Neue Studien zur Simulierung der Tumorgenese durch konstitutive Aktivierung der PI3K-AKT-Signalweiterleitung zeigen, dass diese mit der Fähigkeit verknüpft ist, vor allem Autophagie und nicht etwa Apoptose zu inhibieren (132). Damit wäre ein weiterer Grund des besonderen therapeutischen Nutzens der PI3K-AKT-mTOR-Inhibitoren angesprochen. Möglicherweise führt diese unterdrückte Autophagie auch zu Resistenzen gegenüber der Standardtherapie, die durch den Einsatz von PI3K-AKT-mTOR-Inhibitoren eingeschränkt werden könnte. Dieser klare Nutzen der Inhibitoren lässt sich gegebenenfalls auch auf die CLL übertragen.

TCL1A ist als Marker einer aggressiven Verlaufsform und schlechten Prognose in der CLL bekannt und in vielen CLL-Fällen exprimiert (75, 77, 78, 154, 172). Auch dies spricht für den

Einsatz der PI3K-AKT-mTOR-Inhibitoren, die den Signalweg inhibieren, mit welchem TCL1A interagiert und dessen Signal verstärkt.

Aber auch selektive AKT-Inhibitoren sind potentiell sehr wirksam, da sie abwärts von AKT angreifen und somit die Kaskade am effektivsten inhibieren können. Jedoch zeigte A443654 hier auch Wirkung gegen gesunde Zellen. Daher sollten AKT-Inhibitoren verstärkt in präklinischen Studien untersucht werden, um Daten zur Verträglichkeit erheben zu können.

### 4.3 Ausblick

Der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg gewinnt immer mehr Bedeutung in der Therapie der Non-Hodgkin-Lymphome. Denn mit der Kombination aus Rapamycin/Analoga, den innovativen PI3K-mTOR-Inhibitoren und AKT-Inhibitoren mit zytotoxischen Substanzen, verschafft man sich Vorteile in der Therapie (171). Durch diese alternativen Therapiestrategien können Resistenzen gegenüber der Standard-Chemotherapie behoben werden. Die Entwicklung neuer Inhibitoren, die effektiv den Signalweg inhibieren und eine höhere Spezifität und eine bessere Wirksamkeit zeigen, sollten im Fokus stehen; wie zum Beispiel Cal-101, BEZ235 oder MK-2206. Durch diese neue Therapiestrategie soll ebenso die Kapazität erhöht werden, neue Biomarker zu identifizieren, um geeignetere Behandlungsoptionen zu gewährleisten. Zum Beispiel wäre es sehr hilfreich, den Aktivierungszustand oder Mutationen in dem PI3K-AKT-mTOR-Signalweg am Patienten in Erfahrung zu bringen.

Auf diesem Wege sollen ebenso vorkommende Resistenzen behoben werden (170).

### 5. Zusammenfassung

Der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg spielt eine bedeutende Rolle in der Regulierung von malignem Zellwachstum. Oftmals ist dieser Signalweg in Tumorzellen aktiviert, zum Beispiel durch auftretende Mutationen oder Mikromilieu-Reize, was eine Resistenz gegenüber Standard-Chemotherapien bedingen kann. Das Onkogen TCL1A fungiert als Koaktivator von AKT, indem es eine physikalische Interaktion mit AKT eingeht. Eine Überexpression von TCL1A wurde in der CLL und der T-PLL nachgewiesen. Zudem gilt TCL1A als Marker schlechter Prognose in diesen Entitäten und ist oftmals für den aggressiven Krankheitsverlauf verantwortlich. Aus diesem Grund stellt die Blockade des PI3K-AKT-mTOR-Signalweges eine attraktive Strategie dar, um das Zellüberleben in der CLL zu verhindern. Im Rahmen dieser Arbeit wurden spezifische PI3K-AKT-mTOR-Inhibitoren verwendet. LY294002, PI-103, BEZ235, Rapamycin, A443654 und Rolipram/cAMP wurden auf Überleben und Apoptose in CLL-Proben untersucht. Da die CLL eine sehr heterogene Erkrankung ist, fiel die Ansprechrate der Inhibitoren gegenüber den CLL-Proben recht unterschiedlich aus. Genauer gesagt gab es Gruppen von *Respondern* und *Non-Respondern*, die anhand ihrer LD50 bzw. IC50 definiert wurden. Dabei zeigten sich die Inhibitoren insgesamt als sehr CLL-spezifisch, da gesunde Kontrollen kaum durch die Wirkung der Inhibitoren erfasst wurden. Weiterhin wurden die *Responder-* und *Non-Responder-CLL-Proben* anhand ihrer klinisch-pathologischen Patienten- und Tumorparameter, ihres TCL1A-Status und anhand der basalen pAKT-Level charakterisiert. Zum Beispiel zeigte LY294002 gegenüber CLL-Proben mit unmutierten IGHV-Genen eine bessere Wirksamkeit. Außerdem zeigte der duale PI3K-Inhibitor BEZ235 eine bessere Wirksamkeit gegenüber CLL-Proben, die sich als CD38- und ZAP70-negativ erwiesen. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass *in vitro* die Wirksamkeit von LY294002 und BEZ235 an CLL-Zellen durch höhere TCL1A-Level herabgesetzt wurde. Zu diesem Zweck wurde weiter anhand von Zelllinien untersucht, ob TCL1A die Wirksamkeit der Inhibitoren beeinträchtigt. Anschließend wurde noch gezeigt, durch welchen Mechanismus TCL1A die Wirksamkeit beeinträchtigt, nämlich durch Bildung eines TCL1A-AKT-Komplexes.

Insgesamt deuten die Resultate dieser Arbeit darauf hin, dass der PI3K-AKT-mTOR-Signalweg, in welchem auch TCL1A interagiert, ein gutes therapeutisches Potential zur zielgerichteten Behandlung der CLL besitzt.

Genauere Untersuchungen in der Zukunft müssen Subgruppen von Patienten identifizieren, in denen derartige Inhibitoren vorteilhaft bzw. aufgrund fehlender Wirksamkeit unnötig sind.

### 6. Literaturverzeichnis

1. Aleskog, A., M. Norberg, P. Nygren, L. Rickardson, M. Kanduri, G. Tobin, M. Aberg, M. G. Gustafsson, R. Rosenquist, and E. Lindhagen. 2008. Rapamycin shows anticancer activity in primary chronic lymphocytic leukemia cells in vitro, as single agent and in drug combination. *Leukemia & lymphoma* 49:2333-2343.
2. Alessi, D. R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen, and B. A. Hemmings. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15:6541-6551.
3. Amato, R. J., J. Jac, S. Giessinger, S. Saxena, and J. P. Willis. 2009. A phase 2 study with a daily regimen of the oral mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) in patients with metastatic clear cell renal cell cancer. *Cancer* 115:2438-2446.
4. Armoiry, X., G. Aulagner, and T. Facon. 2008. Lenalidomide in the treatment of multiple myeloma: a review. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics* 33:219-226.
4. Bain, J., L. Plater, M. Elliott, N. Shpiro, C. J. Hastie, H. McLauchlan, I. Klevernic, J. S. Arthur, D. R. Alessi, and P. Cohen. 2007. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *The Biochemical journal* 408:297-315.
6. Balfour, J. A., and K. L. Goa. 2001. Bendamustine. *Drugs* 61:631-638; discussion 639-640.
7. Barragan, M., B. Bellosillo, C. Campas, D. Colomer, G. Pons, and J. Gil. 2002. Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 99:2969-2976.
8. Barragan, M., C. Campas, B. Bellosillo, and J. Gil. 2003. Protein kinases in the regulation of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 44:1865-1870.
9. Baumann, P., S. Mandl-Weber, F. Oduncu, and R. Schmidmaier. 2009. The novel orally bioavailable inhibitor of phosphoinositol-3-kinase and mammalian target of rapamycin, NVP-BEZ235, inhibits growth and proliferation in multiple myeloma. *Exp Cell Res* 315:485-497.
10. Bernal, A., R. D. Pastore, Z. Asgary, S. A. Keller, E. Cesarman, H. C. Liou, and E. J. Schattner. 2001. Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood* 98:3050-3057.

11. Bichi, R., S. A. Shinton, E. S. Martin, A. Koval, G. A. Calin, R. Cesari, G. Russo, R. R. Hardy, and C. M. Croce. 2002. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6955-6960.
12. Binet, J. L., A. Auquier, G. Dighiero, C. Chastang, H. Piguet, J. Goasguen, G. Vaugier, G. Potron, P. Colona, F. Oberling, M. Thomas, G. Tchernia, C. Jacquillat, P. Boivin, C. Lesty, M. T. Duault, M. Monconduit, S. Belabbes, and F. Gremy. 1981. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48:198-206.
13. Binet, J. L., M. Lepoprier, G. Dighiero, D. Charron, P. D'Athis, G. Vaugier, H. M. Beral, J. C. Natali, M. Raphael, B. Nizet, and J. Y. Follezu. 1977. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer* 40:855-864.
14. Bologna, L., E. Gotti, M. Manganini, A. Rambaldi, T. Intermesoli, M. Introna, and J. Golay. 2011. Mechanism of action of type II, glycoengineered, anti-CD20 monoclonal antibody GA101 in B-chronic lymphocytic leukemia whole blood assays in comparison with rituximab and alemtuzumab. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186:3762-3769.
15. Boonstra, J. G., K. van Lom, A. W. Langerak, W. J. Graveland, P. J. Valk, J. Kraan, M. B. van 't Veer, and J. W. Gratama. 2006. CD38 as a prognostic factor in B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL): comparison of three approaches to analyze its expression. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* 70:136-141.
16. Brachmann, S. M., I. Hofmann, C. Schnell, C. Fritsch, S. Wee, H. Lane, S. Wang, C. Garcia-Echeverria, and S. M. Maira. 2009. Specific apoptosis induction by the dual PI3K/mTor inhibitor NVP-BEZ235 in HER2 amplified and PIK3CA mutant breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:22299-22304.
17. Brognard, J., A. S. Clark, Y. Ni, and P. A. Dennis. 2001. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res* 61:3986-3997.
18. Brown, J. R., M. Hanna, B. Tesar, L. Werner, N. Pochet, J. M. Asara, Y. E. Wang, P. Dal Cin, S. M. Fernandes, C. Thompson, L. Macconail, C. J. Wu, Y. Van de Peer, M. Correll, A. Regev, D. Neuberg, and A. S. Freedman. 2012. Integrative Genomic Analysis Implicates Gain of PIK3CA at 3q26 and MYC at 8q24 in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res* 18:3791-3802.
19. Brunn, G. J., J. Williams, C. Sabers, G. Wiederrecht, J. C. Lawrence, Jr., and R. T. Abraham. 1996. Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO J* 15:5256-5267.
20. Burger, J. A. 2012. Inhibiting B-cell receptor signaling pathways in chronic lymphocytic leukemia. *Current hematologic malignancy reports* 7:26-33.

21. Burger, J. A. 2011. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011:96-103.
22. Burger, J. A., and J. Hoellenriegel. 2011. Phosphoinositide 3'-kinase delta: turning off BZR signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Oncotarget* 2:737-738.
23. Byrd, J. C., T. S. Lin, J. T. Dalton, D. Wu, M. A. Phelps, B. Fischer, M. Moran, K. A. Blum, B. Rovin, M. Brooker-McEldowney, S. Broering, L. J. Schaaf, A. J. Johnson, D. M. Lucas, N. A. Heerema, G. Lozanski, D. C. Young, J. R. Suarez, A. D. Colevas, and M. R. Grever. 2007. Flavopiridol administered using a pharmacologically derived schedule is associated with marked clinical efficacy in refractory, genetically high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109:399-404.
24. Carpten, J. D., A. L. Faber, C. Horn, G. P. Donoho, S. L. Briggs, C. M. Robbins, G. Hostetter, S. Boguslawski, T. Y. Moses, S. Savage, M. Uhlik, A. Lin, J. Du, Y. W. Qian, D. J. Zeckner, G. Tucker-Kellogg, J. Touchman, K. Patel, S. Mousses, M. Bittner, R. Schevitz, M. H. Lai, K. L. Blanchard, and J. E. Thomas. 2007. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 448:439-444.
25. Chapuis, N., J. Tamburini, A. S. Green, C. Vignon, V. Bardet, A. Neyret, M. Pannetier, L. Willems, S. Park, A. Macone, S. M. Maira, N. Ifrah, F. Dreyfus, O. Herault, C. Lacombe, P. Mayeux, and D. Bouscary. 2010. Dual inhibition of PI3K and mTORC1/2 signaling by NVP-BEZ235 as a new therapeutic strategy for acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 16:5424-5435.
26. Chen, K. F., H. L. Chen, W. T. Tai, W. C. Feng, C. H. Hsu, P. J. Chen, and A. L. Cheng. 2011. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway mediates acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 337:155-161.
27. Chen, L., J. Apgar, L. Huynh, F. Dicker, T. Giago-McGahan, L. Rassenti, A. Weiss, and T. J. Kipps. 2005. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 105:2036-2041.
28. Chen, L., G. Widhopf, L. Huynh, L. Rassenti, K. R. Rai, A. Weiss, and T. J. Kipps. 2002. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100:4609-4614.
29. Chiarini, F., F. Fala, P. L. Tazzari, F. Ricci, A. Astolfi, A. Pession, P. Pagliaro, J. A. McCubrey, and A. M. Martelli. 2009. Dual inhibition of class IA phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin as a new therapeutic option for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 69:3520-3528.

30. Chiarini, F., C. Grimaldi, F. Ricci, P. L. Tazzari, C. Evangelisti, A. Ognibene, M. Battistelli, E. Falcieri, F. Melchionda, A. Pession, P. Pagliaro, J. A. McCubrey, and A. M. Martelli. 2010. Activity of the novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 against T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 70:8097-8107.
31. Chiorazzi, N., and M. Ferrarini. 2011. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* 117:1781-1791.
32. Cho, D. C., M. B. Cohen, D. J. Panka, M. Collins, M. Ghebremichael, M. B. Atkins, S. Signoretti, and J. W. Mier. 2010. The efficacy of the novel dual PI3-kinase/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 compared with rapamycin in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 16:3628-3638.
33. Clark, A. S., K. West, S. Streicher, and P. A. Dennis. 2002. Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* 1:707-717.
34. Cohen, E. E. 2008. mTOR: the mammalian target of replication. *J Clin Oncol* 26:348-349.
35. Cramer, P., and M. Hallek. 2011. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia-what do we need to know? *Nature reviews. Clinical oncology* 8:38-47.
36. Crespo, M., F. Bosch, N. Villamor, B. Bellosillo, D. Colomer, M. Rozman, S. Marce, A. Lopez-Guillermo, E. Campo, and E. Montserrat. 2003. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 348:1764-1775.
37. Cuni, S., P. Perez-Aciego, G. Perez-Chacon, J. A. Vargas, A. Sanchez, F. M. Martin-Saavedra, S. Ballester, J. Garcia-Marco, J. Jorda, and A. Durantez. 2004. A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 18:1391-1400.
38. Dalle, S., L. Reslan, T. Besseyre de Horts, S. Herveau, F. Herting, A. Plesa, T. Friess, P. Umana, C. Klein, and C. Dumontet. 2011. Preclinical studies on the mechanism of action and the anti-lymphoma activity of the novel anti-CD20 antibody GA101. *Molecular cancer therapeutics* 10:178-185.
39. Dal Porto, J. M., S. B. Gauld, K. T. Merrell, D. Mills, A. E. Pugh-Bernard, and J. Cambier. 2004. B cell antigen receptor signaling 101. *Molecular immunology* 41:599-613.

40. Damle, R. N., F. Ghiotto, A. Valetto, E. Albesiano, F. Fais, X. J. Yan, C. P. Sison, S. L. Allen, J. Kolitz, P. Schulman, V. P. Vinciguerra, P. Budde, J. Frey, K. R. Rai, M. Ferrarini, and N. Chiorazzi. 2002. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* 99:4087-4093.
41. Damle, R. N., T. Wasil, F. Fais, F. Ghiotto, A. Valetto, S. L. Allen, A. Buchbinder, D. Budman, K. Dittmar, J. Kolitz, S. M. Lichtman, P. Schulman, V. P. Vinciguerra, K. R. Rai, M. Ferrarini, and N. Chiorazzi. 1999. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94:1840-1847.
42. de Frias, M., D. Iglesias-Serret, A. M. Cosialls, L. Coll-Mulet, A. F. Santidrian, D. M. Gonzalez-Girones, E. de la Banda, G. Pons, and J. Gil. 2009. Akt inhibitors induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* 94:1698-1707.
43. de Frias, M., D. Iglesias-Serret, A. M. Cosialls, D. M. Gonzalez-Girones, A. Perez-Perarnau, C. Rubio-Patino, T. Ruckle, M. Camps, A. F. de Sevilla, E. de la Banda, G. Pons, and J. Gil. 2010. Isoform-selective phosphoinositide 3-kinase inhibitors induce apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 150:108-111.
44. Decker, T., M. Sandherr, K. Goetze, M. Oelsner, I. Ringshausen, and C. Peschel. 2009. A pilot trial of the mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitor RAD001 in patients with advanced B-CLL. *Ann Hematol* 88:221-227.
45. Del Poeta, G., L. Maurillo, A. Venditti, F. Buccisano, A. M. Epiceno, G. Capelli, A. Tamburini, G. Suppo, A. Battaglia, M. I. Del Principe, B. Del Moro, M. Masi, and S. Amadori. 2001. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 98:2633-2639.
46. Dhodapkar, M., A. Tefferi, J. Su, and R. L. Phyllyk. 1993. Prognostic features and survival in young adults with early/intermediate chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): a single institution study. *Leukemia* 7:1232-1235.
47. Dighiero, G. 2005. CLL biology and prognosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:278-284.
48. Dighiero, G., and J. L. Binet. 1996. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology and cell therapy* 38 Suppl 2:S41-61.
49. DiGiuseppe, J. A., and M. J. Borowitz. 1998. Clinical utility of flow cytometry in the chronic lymphoid leukemias. *Semin Oncol* 25:6-10.
50. Dohner, H., K. Fischer, M. Bentz, K. Hansen, A. Benner, G. Cabot, D. Diehl, R. Schlenk, J. Coy, S. Stilgenbauer, and et al. 1995. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 85:1580-1589.

51. Dohner, H., S. Stilgenbauer, A. Benner, E. Leupolt, A. Krober, L. Bullinger, K. Dohner, M. Bentz, and P. Lichter. 2000. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343:1910-1916.
52. Dohner, H., S. Stilgenbauer, K. Dohner, M. Bentz, and P. Lichter. 1999. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med (Berl)* 77:266-281.
53. Dohner, H., S. Stilgenbauer, M. R. James, A. Benner, T. Weilguni, M. Bentz, K. Fischer, W. Hunstein, and P. Lichter. 1997. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 89:2516-2522.
54. Dreger, P., P. Corradini, E. Kimby, M. Michallet, D. Milligan, J. Schetelig, W. Wiktor-Jedrzejczak, D. Niederwieser, M. Hallek, and E. Montserrat. 2007. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia* 21:12-17.
55. Eichhorst, B., M. Dreyling, T. Robak, E. Montserrat, and M. Hallek. 2011. Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 22 Suppl 6:vi50-54.
56. Elter, T., P. Borchmann, H. Schulz, M. Reiser, S. Trelle, R. Schnell, M. Jensen, P. Staib, T. Schinkothe, H. Stutzer, J. Rech, M. Gramatzki, W. Aulitzky, I. Hasan, A. Josting, M. Hallek, and A. Engert. 2005. 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. *J Clin Oncol* 23:7024-7031.
57. Extermann, M., J. Overcash, G. H. Lyman, J. Parr, and L. Balducci. 1998. Comorbidity and functional status are independent in older cancer patients. *J Clin Oncol* 16:1582-1587.
58. Fais, F., F. Ghiotto, S. Hashimoto, B. Sellars, A. Valetto, S. L. Allen, P. Schulman, V. P. Vinciguerra, K. Rai, L. Z. Rassenti, T. J. Kipps, G. Dighiero, H. W. Schroeder, Jr., M. Ferrarini, and N. Chiorazzi. 1998. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *The Journal of clinical investigation* 102:1515-1525.
59. Fala, F., W. L. Blalock, P. L. Tazzari, A. Cappellini, F. Chiarini, G. Martinelli, A. Tafuri, J. A. McCubrey, L. Cocco, and A. M. Martelli. 2008. Proapoptotic activity and chemosensitizing effect of the novel Akt inhibitor (2S)-1-(1H-Indol-3-yl)-3-[5-(3-methyl-2H-indazol-5-yl)pyridin-3-yl]oxyprop an2-amine (A443654) in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Mol Pharmacol* 74:884-895.

60. Fan, Q. W., Z. A. Knight, D. D. Goldenberg, W. Yu, K. E. Mostov, D. Stokoe, K. M. Shokat, and W. A. Weiss. 2006. A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer Cell* 9:341-349.
61. Foster, D. A., and A. Toschi. 2009. Targeting mTOR with rapamycin: one dose does not fit all. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 8:1026-1029.
62. Flinn IW, B. J., Furman RR, et al. 2009. Evidence of clinical activity in a phase I study of CAL-101, an oral P110isoform-selective inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, in patients with relapsed or refractory B-cell malignancies. *Blood*. 2009;114:380. *Blood*. 2009; 114:380.
63. Francis, S., M. Karanth, G. Pratt, J. Starczynski, L. Hooper, C. Fegan, C. Pepper, D. Valcarcel, D. W. Milligan, and J. Delgado. 2006. The effect of immunoglobulin VH gene mutation status and other prognostic factors on the incidence of major infections in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 107:1023-1033.
64. Furman, R., J. Byrd, J. Brown, S. Coutre, D. Benson, N. Wagner-Johnston. 2010. CAL-101, an isoform-selective inhibitor of phosphatidylinositol 3 kinase p110 $\delta$ , demonstrates clinical activity and pharmacodynamic effects in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia [abstract]. *Blood* 2010;116:31.
65. Gandhi, V., and W. Plunkett. 2002. Cellular and clinical pharmacology of fludarabine. *Clinical pharmacokinetics* 41:93-103.
66. Gharbi, S. I., M. J. Zvelebil, S. J. Shuttleworth, T. Hancox, N. Saghir, J. F. Timms, and M. D. Waterfield. 2007. Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *The Biochemical journal* 404:15-21.
67. Gronbaek, K., J. Zeuthen, P. Guldborg, E. Ralfkiaer, and K. Hou-Jensen. 1998. Alterations of the MMAC1/PTEN gene in lymphoid malignancies. *Blood* 91:4388-4390.
68. Hallek, M., I. Langenmayer, C. Nerl, W. Knauf, H. Dietzfelbinger, D. Adorf, M. Ostwald, R. Busch, I. Kuhn-Hallek, E. Thiel, and B. Emmerich. 1999. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 93:1732-1737.
69. Hallek, M., and N. Pflug. 2010. Chronic lymphocytic leukemia. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 21 Suppl 7:vii154-164.
70. Hallek, M., L. Wanders, M. Ostwald, R. Busch, R. Senekowitsch, S. Stern, H. D. Schick, I. Kuhn-Hallek, and B. Emmerich. 1996. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* 22:439-447.

71. Han, E. K., J. D. Levenson, T. McGonigal, O. J. Shah, K. W. Woods, T. Hunter, V. L. Giranda, and Y. Luo. 2007. Akt inhibitor A-443654 induces rapid Akt Ser-473 phosphorylation independent of mTORC1 inhibition. *Oncogene* 26:5655-5661.
72. Hanada, M., D. Delia, A. Aiello, E. Stadtmauer, and J. C. Reed. 1993. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 82:1820-1828.
73. Hardt, M., N. Chantaravisoot, and F. Tamanoi. 2011. Activating mutations of TOR (target of rapamycin). *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 16:141-151.
74. Hayun, R., E. Okun, A. Berrebi, L. Shvidel, L. Bassous, B. Sredni, and U. Nir. 2009. Rapamycin and curcumin induce apoptosis in primary resting B chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 50:625-632.
75. Herling, M., K. A. Patel, E. D. Hsi, K. C. Chang, G. Z. Rassidakis, R. Ford, and D. Jones. 2007. TCL1 in B-cell tumors retains its normal b-cell pattern of regulation and is a marker of differentiation stage. *Am J Surg Pathol* 31:1123-1129.
76. Herling, M., K. A. Patel, J. Khalili, E. Schlette, R. Kobayashi, L. J. Medeiros, and D. Jones. 2006. TCL1 shows a regulated expression pattern in chronic lymphocytic leukemia that correlates with molecular subtypes and proliferative state. *Leukemia* 20:280-285.
77. Herling, M., K. A. Patel, M. A. Teitell, M. Konopleva, F. Ravandi, R. Kobayashi, and D. Jones. 2008. High TCL1 expression and intact T-cell receptor signaling define a hyperproliferative subset of T-cell prolymphocytic leukemia. *Blood* 111:328-337.
78. Herling, M., K. A. Patel, N. Weit, N. Lilienthal, M. Hallek, M. J. Keating, and D. Jones. 2009. High TCL1 levels are a marker of B-cell receptor pathway responsiveness and adverse outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 114:4675-4686.
79. Hirai, H., H. Sootome, Y. Nakatsuru, K. Miyama, S. Taguchi, K. Tsujioka, Y. Ueno, H. Hatch, P. K. Majumder, B. S. Pan, and H. Kotani. 2010. MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics* 9:1956-1967.
80. Hiromura, M., F. Okada, T. Obata, D. Auguin, T. Shibata, C. Roumestand, and M. Noguchi. 2004. Inhibition of Akt kinase activity by a peptide spanning the betaA strand of the proto-oncogene TCL1. *J Biol Chem* 279:53407-53418.

81. Hoellenriegel, J., S. A. Meadows, M. Sivina, W. G. Wierda, H. Kantarjian, M. J. Keating, N. Giese, S. O'Brien, A. Yu, L. L. Miller, B. J. Lannutti, and J. A. Burger. 2011. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 118:3603-3612.
82. Hofbauer, S. W., J. D. Pinon, G. Brachtl, L. Haging, W. Wang, K. Johrer, I. Tinhofer, T. N. Hartmann, and R. Greil. 2010. Modifying akt signaling in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Cancer Res* 70:7336-7344.
83. Hoyer, K. K., M. Herling, K. Bagrintseva, D. W. Dawson, S. W. French, M. Renard, J. G. Weinger, D. Jones, and M. A. Teitell. 2005. T cell leukemia-1 modulates TCR signal strength and IFN-gamma levels through phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C pathway activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175:864-873.
84. Hu, L., J. Hofmann, Y. Lu, G. B. Mills, and R. B. Jaffe. 2002. Inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase increases efficacy of paclitaxel in in vitro and in vivo ovarian cancer models. *Cancer Res* 62:1087-1092.
85. Huijts, C. M., S. J. Santegoets, A. J. van den Eertwegh, L. S. Pijpers, J. B. Haanen, T. D. de Gruijl, H. M. Verheul, and H. J. van der Vliet. 2011. Phase I-II study of everolimus and low-dose oral cyclophosphamide in patients with metastatic renal cell cancer. *BMC cancer* 11:505.
86. Hyun, T., A. Yam, S. Pece, X. Xie, J. Zhang, T. Miki, J. S. Gutkind, and W. Li. 2000. Loss of PTEN expression leading to high Akt activation in human multiple myelomas. *Blood* 96:3560-3568.
87. Ibrahim, S., I. Jilani, S. O'Brien, A. Rogers, T. Manshour, F. Giles, S. Faderl, D. Thomas, H. Kantarjian, M. Keating, and M. Albitar. 2003. Clinical relevance of the expression of the CD31 ligand for CD38 in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 97:1914-1919.
88. Ibrahim, S., M. Keating, K. A. Do, S. O'Brien, Y. O. Huh, I. Jilani, S. Lerner, H. M. Kantarjian, and M. Albitar. 2001. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 98:181-186.
89. Jung, C. H., S. H. Ro, J. Cao, N. M. Otto, and D. H. Kim. 2010. mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters* 584:1287-1295.
90. Julien, L. A., A. Carriere, J. Moreau, and P. P. Roux. 2010. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol* 30:908-921.

91. Kath, R., K. Blumenstengel, H. J. Fricke, and K. Hoffken. 2001. Bendamustine monotherapy in advanced and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Journal of cancer research and clinical oncology* 127:48-54.
92. Kawauchi, K., T. Ogasawara, and M. Yasuyama. 2002. Activation of extracellular signal-regulated kinase through B-cell antigen receptor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *International journal of hematology* 75:508-513.
93. Keating, M. J., N. Chiorazzi, B. Messmer, R. N. Damle, S. L. Allen, K. R. Rai, M. Ferrarini, and T. J. Kipps. 2003. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:153-175.
94. Keating, M. J., I. Flinn, V. Jain, J. L. Binet, P. Hillmen, J. Byrd, M. Albitar, L. Brettman, P. Santabarbara, B. Wacker, and K. R. Rai. 2002. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood* 99:3554-3561.
95. Kienle, D., T. Katzenberger, G. Ott, D. Saupe, A. Benner, H. Kohlhammer, T. F. Barth, S. Holler, J. Kalla, A. Rosenwald, H. K. Muller-Hermelink, P. Moller, P. Lichter, H. Dohner, and S. Stilgenbauer. 2007. Quantitative gene expression deregulation in mantle-cell lymphoma: correlation with clinical and biologic factors. *J Clin Oncol* 25:2770-2777.
96. Kim, A., S. Park, J. E. Lee, W. S. Jang, S. J. Lee, H. J. Kang, and S. S. Lee. 2012. The dual PI3K and mTOR inhibitor NVP-BE235 exhibits anti-proliferative activity and overcomes bortezomib resistance in mantle cell lymphoma cells. *Leukemia research* 36:912-920.
97. Kim, D., M. Sun, L. He, Q. H. Zhou, J. Chen, X. M. Sun, G. Bepler, S. M. Sebti, and J. Q. Cheng. 2010. A small molecule inhibits Akt through direct binding to Akt and preventing Akt membrane translocation. *J Biol Chem* 285:8383-8394.
98. Kitada, S., J. Andersen, S. Akar, J. M. Zapata, S. Takayama, S. Krajewski, H. G. Wang, X. Zhang, F. Bullrich, C. M. Croce, K. Rai, J. Hines, and J. C. Reed. 1998. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* 91:3379-3389.
99. Klein, U., and R. Dalla-Favera. 2010. New insights into the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in cancer biology* 20:377-383.
100. Kluin-Nelemans, H. C., J. Limpens, J. Meerabux, G. C. Beverstock, J. H. Jansen, D. de Jong, and P. M. Kluin. 1991. A new non-Hodgkin's B-cell line (DoHH2) with a chromosomal translocation t(14;18)(q32;q21). *Leukemia* 5:221-224.

101. Knauf, W. U., T. Lissichkov, A. Aldaoud, A. Liberati, J. Loscertales, R. Herbrecht, G. Juliusson, G. Postner, L. Gercheva, S. Goranov, M. Becker, H. J. Fricke, F. Huguet, I. Del Giudice, P. Klein, L. Tremmel, K. Merkle, and M. Montillo. 2009. Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 27:4378-4384.
102. Krober, A., T. Seiler, A. Benner, L. Bullinger, E. Bruckle, P. Lichter, H. Dohner, and S. Stilgenbauer. 2002. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100:1410-1416.
103. Kulathu, Y., E. Hobeika, G. Turchinovich, and M. Reth. 2008. The kinase Syk as an adaptor controlling sustained calcium signalling and B-cell development. *EMBO J* 27:1333-1344.
104. Kunstle, G., J. Laine, G. Pierron, S. Kagami Si, H. Nakajima, F. Hoh, C. Roumestand, M. H. Stern, and M. Noguchi. 2002. Identification of Akt association and oligomerization domains of the Akt kinase coactivator TCL1. *Mol Cell Biol* 22:1513-1525.
105. Kuraishy, A. I., S. W. French, M. Sherman, M. Herling, D. Jones, R. Wall, and M. A. Teitell. 2007. TORC2 regulates germinal center repression of the TCL1 oncoprotein to promote B cell development and inhibit transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10175-10180.
106. Kwong, Y. L., J. Pang, L. M. Ching, H. W. Liu, R. H. Liang, and L. C. Chan. 1994. Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia. An interphase cytogenetic study by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 72:83-85.
107. Laine, J., G. Kunstle, T. Obata, and M. Noguchi. 2002. Differential regulation of Akt kinase isoforms by the members of the TCL1 oncogene family. *J Biol Chem* 277:3743-3751.
108. Lankester, A. C., G. M. van Schijndel, C. E. van der Schoot, M. H. van Oers, C. J. van Noesel, and R. A. van Lier. 1995. Antigen receptor nonresponsiveness in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 86:1090-1097.
109. Lerner, A., D. H. Kim, and R. Lee. 2000. The cAMP signaling pathway as a therapeutic target in lymphoid malignancies. *Leuk Lymphoma* 37:39-51.
110. Limon, J. J., and D. A. Fruman. 2010. B cell receptor signaling: picky about PI3Ks. *Science signaling* 3:pe25.

111. Lin, T. S., A. S. Ruppert, A. J. Johnson, B. Fischer, N. A. Heerema, L. A. Andritsos, K. A. Blum, J. M. FLYNN, J. A. Jones, W. Hu, M. E. Moran, S. M. Mitchell, L. L. Smith, A. J. Wagner, C. A. Raymond, L. J. Schaaf, M. A. Phelps, M. A. Villalona-Calero, M. R. Grever, and J. C. Byrd. 2009. Phase II study of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia demonstrating high response rates in genetically high-risk disease. *J Clin Oncol* 27:6012-6018.
112. Lindsley, C. W., S. F. Barnett, M. Yaroschak, M. T. Bilodeau, and M. E. Layton. 2007. Recent progress in the development of ATP-competitive and allosteric Akt kinase inhibitors. *Current topics in medicinal chemistry* 7:1349-1363.
113. Liu, P., H. Cheng, T. M. Roberts, and J. J. Zhao. 2009. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 8:627-644.
114. Liu, Q., C. Thoreen, J. Wang, D. Sabatini, and N. S. Gray. 2009. mTOR Mediated Anti-Cancer Drug Discovery. *Drug discovery today. Therapeutic strategies* 6:47-55.
115. Liu, T. C., P. M. Lin, J. G. Chang, J. P. Lee, T. P. Chen, and S. F. Lin. 2000. Mutation analysis of PTEN/MMAC1 in acute myeloid leukemia. *American journal of hematology* 63:170-175.
116. Liu, T. J., D. Koul, T. LaFortune, N. Tiao, R. J. Shen, S. M. Maira, C. Garcia-Echeverria, and W. K. Yung. 2009. NVP-BEZ235, a novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor, elicits multifaceted antitumor activities in human gliomas. *Molecular cancer therapeutics* 8:2204-2210.
117. Longo, P. G., L. Laurenti, S. Gobessi, S. Sica, G. Leone, and D. G. Efremov. 2008. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 111:846-855.
118. LoPiccolo, J., G. M. Blumenthal, W. B. Bernstein, and P. A. Dennis. 2008. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat* 11:32-50.
119. Luo, Y., A. R. Shoemaker, X. Liu, K. W. Woods, S. A. Thomas, R. de Jong, E. K. Han, T. Li, V. S. Stoll, J. A. Powlas, A. Oleksijew, M. J. Mitten, Y. Shi, R. Guan, T. P. McGonigal, V. Klinghofer, E. F. Johnson, J. D. Levenson, J. J. Bouska, M. Mamo, R. A. Smith, E. E. Gramling-Evans, B. A. Zinker, A. K. Mika, P. T. Nguyen, T. Oltersdorf, S. H. Rosenberg, Q. Li, and V. L. Giranda. 2005. Potent and selective inhibitors of Akt kinases slow the progress of tumors in vivo. *Molecular cancer therapeutics* 4:977-986.
120. Mahmoud, I. S., M. A. Sughayer, H. A. Mohammad, A. S. Awidi, E. L.-K. MS, and S. I. Ismail. 2008. The transforming mutation E17K/AKT1 is not a major event in B-cell-derived lymphoid leukaemias. *British journal of cancer* 99:488-490.

121. Maira, S. M. 2011. PI3K inhibitors for cancer treatment: five years of preclinical and clinical research after BEZ235. *Molecular cancer therapeutics* 10:2016.
122. Maira, S. M., F. Stauffer, J. Brueggen, P. Furet, C. Schnell, C. Fritsch, S. Brachmann, P. Chene, A. De Pover, K. Schoemaker, D. Fabbro, D. Gabriel, M. Simonen, L. Murphy, P. Finan, W. Sellers, and C. Garcia-Echeverria. 2008. Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Molecular cancer therapeutics* 7:1851-1863.
123. Manning, B. D., and L. C. Cantley. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261-1274.
124. Markman, B., R. Dienstmann, and J. Tabernero. 2010. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway--beyond rapalogs. *Oncotarget* 1:530-543.
125. Martelli, A. M., C. Evangelisti, F. Chiarini, and J. A. McCubrey. 2010. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients. *Oncotarget* 1:89-103.
126. Maxwell, C. R., S. J. Kanos, T. Abel, and S. J. Siegel. 2004. Phosphodiesterase inhibitors: a novel mechanism for receptor-independent antipsychotic medications. *Neuroscience* 129:101-107.
127. Meyers, J. A., D. W. Su, and A. Lerner. 2009. Chronic lymphocytic leukemia and B and T cells differ in their response to cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182:5400-5411.
128. Misra, U. K., S. J. Kaczowka, and S. V. Pizzo. 2008. Interaction between TCL1 and Epac1 in the activation of Akt kinases in plasma membranes and nuclei of 8-CPT-2-O-Me-cAMP-stimulated macrophages. *Cell Signal* 20:130-138.
129. Mockridge, C. I., K. N. Potter, I. Wheatley, L. A. Neville, G. Packham, and F. K. Stevenson. 2007. Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of CLL defined by VH-gene mutational status. *Blood* 109:4424-4431.
130. Montserrat, E., F. Bosch, and C. Rozman. 1997. B-cell chronic lymphocytic leukemia: recent progress in biology, diagnosis, and therapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 8 Suppl 1:93-101.
131. Montserrat, E., J. Sanchez-Bisono, N. Vinolas, and C. Rozman. 1986. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* 62:567-575.
132. Morselli, E., L. Galluzzi, O. Kepp, J. M. Vicencio, A. Criollo, M. C. Maiuri, and G. Kroemer. 2009. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochimica et biophysica acta* 1793:1524-1532.

133. Muzio, M., B. Apollonio, C. Scielzo, M. Frenquelli, I. Vandoni, V. Boussiotis, F. Caligaris-Cappio, and P. Ghia. 2008. Constitutive activation of distinct BZR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood* 112:188-195.
134. Nedellec, S., Y. Renaudineau, A. Bordron, C. Berthou, N. Porakishvili, P. M. Lydyard, J. O. Pers, and P. Youinou. 2005. B cell response to surface IgM cross-linking identifies different prognostic groups of B-chronic lymphocytic leukemia patients. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174:3749-3756.
135. Nicholson, K. M., and N. G. Anderson. 2002. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 14:381-395.
136. Nightingale, G. 2011. Ofatumumab: a novel anti-CD20 monoclonal antibody for treatment of refractory chronic lymphocytic leukemia. *The Annals of pharmacotherapy* 45:1248-1255.
137. Niiro, H., and E. A. Clark. 2002. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nature reviews. Immunology* 2:945-956.
138. Nishioka, C., T. Ikezoe, J. Yang, H. P. Koeffler, and A. Yokoyama. 2008. Blockade of mTOR signaling potentiates the ability of histone deacetylase inhibitor to induce growth arrest and differentiation of acute myelogenous leukemia cells. *Leukemia* 22:2159-2168.
139. Noguchi, M., V. Ropars, C. Roumestand, and F. Suizu. 2007. Proto-oncogene TCL1: more than just a coactivator for Akt. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21:2273-2284.
140. O'Brien, S., and A. Osterborg. 2010. Ofatumumab: a new CD20 monoclonal antibody therapy for B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia* 10:361-368.
141. O'Brien, S. M., C. C. Cunningham, A. K. Golenkov, A. G. Turkina, S. C. Novick, and K. R. Rai. 2005. Phase I to II multicenter study of oblimersen sodium, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 23:7697-7702.
142. O'Reilly, K. E., F. Rojo, Q. B. She, D. Solit, G. B. Mills, D. Smith, H. Lane, F. Hofmann, D. J. Hicklin, D. L. Ludwig, J. Baselga, and N. Rosen. 2006. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* 66:1500-1508.
143. Okuzumi, T., D. Fiedler, C. Zhang, D. C. Gray, B. Aizenstein, R. Hoffman, and K. M. Shokat. 2009. Inhibitor hijacking of Akt activation. *Nat Chem Biol* 5:484-493.

144. Oscier, D. G., M. Fitchett, and T. J. Hamblin. 1988. Chromosomal abnormalities in B-CLL. *Nouv Rev Fr Hematol* 30:397-398.
145. Oscier, D. G., J. Stevens, T. J. Hamblin, R. M. Pickering, R. Lambert, and M. Fitchett. 1990. Correlation of chromosome abnormalities with laboratory features and clinical course in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 76:352-358.
146. Osterborg, A., M. J. Dyer, D. Bunjes, G. A. Pangalis, Y. Bastion, D. Catovsky, and H. Mellstedt. 1997. Phase II multicenter study of human CD52 antibody in previously treated chronic lymphocytic leukemia. European Study Group of CAMPATH-1H Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol* 15:1567-1574.
147. Packham, G., and F. Stevenson. 2010. The role of the B-cell receptor in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Seminars in cancer biology* 20:391-399.
148. Pal, S. K., K. Reckamp, H. Yu, and R. A. Figlin. 2010. Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer. *Expert opinion on investigational drugs* 19:1355-1366.
149. Park, S., N. Chapuis, V. Bardet, J. Tamburini, N. Gallay, L. Willems, Z. A. Knight, K. M. Shokat, N. Azar, F. Viguie, N. Ifrah, F. Dreyfus, P. Mayeux, C. Lacombe, and D. Bouscary. 2008. PI-103, a dual inhibitor of Class IA phosphatidylinositide 3-kinase and mTOR, has antileukemic activity in AML. *Leukemia* 22:1698-1706.
150. Park, S., N. Chapuis, J. Tamburini, V. Bardet, P. Cornillet-Lefebvre, L. Willems, A. Green, P. Mayeux, C. Lacombe, and D. Bouscary. 2010. Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 95:819-828.
151. Pekarsky, Y., C. Hallas, and C. M. Croce. 2001. The role of TCL1 in human T-cell leukemia. *Oncogene* 20:5638-5643.
152. Pekarsky, Y., C. Hallas, A. Palamarchuk, A. Koval, F. Bullrich, Y. Hirata, R. Bichi, J. Letofsky, and C. M. Croce. 2001. Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nur77. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3690-3694.
153. Pekarsky, Y., A. Koval, C. Hallas, R. Bichi, M. Tresini, S. Malstrom, G. Russo, P. Tsichlis, and C. M. Croce. 2000. Tc11 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3028-3033.
154. Pekarsky, Y., A. Palamarchuk, V. Maximov, A. Efanov, N. Nazaryan, U. Santanam, L. Rassenti, T. Kipps, and C. M. Croce. 2008. Tc11 functions as a transcriptional regulator and is directly involved in the pathogenesis of CLL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:19643-19648.

155. Pekarsky, Y., U. Santanam, A. Cimmino, A. Palamarchuk, A. Efanov, V. Maximov, S. Volinia, H. Alder, C. G. Liu, L. Rassenti, G. A. Calin, J. P. Hagan, T. Kipps, and C. M. Croce. 2006. Tc1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res* 66:11590-11593.
156. Petlickovski, A., L. Laurenti, X. Li, S. Marietti, P. Chiusolo, S. Sica, G. Leone, and D. G. Efremov. 2005. Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 105:4820-4827.
157. Phelps, M. A., T. S. Lin, A. J. Johnson, E. Hurh, D. M. Rozewski, K. L. Farley, D. Wu, K. A. Blum, B. Fischer, S. M. Mitchell, M. E. Moran, M. Brooker-McEldowney, N. A. Heerema, D. Jarjoura, L. J. Schaaf, J. C. Byrd, M. R. Grever, and J. T. Dalton. 2009. Clinical response and pharmacokinetics from a phase 1 study of an active dosing schedule of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 113:2637-2645.
158. Plate, J. M. 2004. PI3-kinase regulates survival of chronic lymphocytic leukemia B-cells by preventing caspase 8 activation. *Leuk Lymphoma* 45:1519-1529.
159. Popal, W., J. Boucas, A. A. Peer-Zada, and M. Herling. 2010. Pharmacologic interception in T-cell leukemia 1A associated pathways as a treatment rationale for chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 51:1375-1378.
160. Pro, B., B. Leber, M. Smith, L. Fayad, J. Romaguera, F. Hagemeister, A. Rodriguez, P. McLaughlin, F. Samaniego, J. Zwiebel, A. Lopez, L. Kwak, and A. Younes. 2008. Phase II multicenter study of oblimersen sodium, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with rituximab in patients with recurrent B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 143:355-360.
161. Quiroga, M. P., K. Balakrishnan, A. V. Kurtova, M. Sivina, M. J. Keating, W. G. Wierda, V. Gandhi, and J. A. Burger. 2009. B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406. *Blood* 114:1029-1037.
162. Rai, K. R., B. L. Peterson, F. R. Appelbaum, J. Kolitz, L. Elias, L. Shepherd, J. Hines, G. A. Threatte, R. A. Larson, B. D. Cheson, and C. A. Schiffer. 2000. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343:1750-1757.
163. Rai, K. R., A. Sawitsky, E. P. Cronkite, A. D. Chanana, R. N. Levy, and B. S. Pasternack. 1975. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46:219-234.

164. Rassenti, L. Z., L. Huynh, T. L. Toy, L. Chen, M. J. Keating, J. G. Gribben, D. S. Neuberg, I. W. Flinn, K. R. Rai, J. C. Byrd, N. E. Kay, A. Greaves, A. Weiss, and T. J. Kipps. 2004. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 351:893-901.
165. Rassenti, L. Z., S. Jain, M. J. Keating, W. G. Wierda, M. R. Grever, J. C. Byrd, N. E. Kay, J. R. Brown, J. G. Gribben, D. S. Neuberg, F. He, A. W. Greaves, K. R. Rai, and T. J. Kipps. 2008. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 112:1923-1930.
166. Raynaud, F. I., S. Eccles, P. A. Clarke, A. Hayes, B. Nutley, S. Alix, A. Henley, F. Di-Stefano, Z. Ahmad, S. Guillard, L. M. Bjerke, L. Kelland, M. Valenti, L. Patterson, S. Gowan, A. de Haven Brandon, M. Hayakawa, H. Kaizawa, T. Koizumi, T. Ohishi, S. Patel, N. Saghir, P. Parker, M. Waterfield, and P. Workman. 2007. Pharmacologic characterization of a potent inhibitor of class I phosphatidylinositide 3-kinases. *Cancer Res* 67:5840-5850.
167. Ringshausen, I., C. Peschel, and T. Decker. 2005. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition in chronic lymphocytic B-cell leukemia: a new therapeutic option. *Leukemia & lymphoma* 46:11-19.
168. Ringshausen, I., F. Schneller, C. Bogner, S. Hipp, J. Duyster, C. Peschel, and T. Decker. 2002. Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta. *Blood* 100:3741-3748.
169. Rodriguez, A., R. Villuendas, L. Yanez, M. E. Gomez, R. Diaz, M. Pollan, N. Hernandez, P. de la Cueva, M. C. Marin, A. Swat, E. Ruiz, M. A. Cuadrado, E. Conde, L. Lombardia, F. Cifuentes, M. Gonzalez, J. A. Garcia-Marco, and M. A. Piris. 2007. Molecular heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia is dependent on BZR signaling: clinical correlation. *Leukemia* 21:1984-1991.
170. Roper, J., M. P. Richardson, W. V. Wang, L. G. Richard, W. Chen, E. M. Coffee, M. J. Sinnamon, L. Lee, P. C. Chen, R. T. Bronson, E. S. Martin, and K. E. Hung. 2011. The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BE235 induces tumor regression in a genetically engineered mouse model of PIK3CA wild-type colorectal cancer. *PLoS one* 6:e25132.
171. Sabatini, D. M. 2006. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* 6:729-734.

172. Said, J. W., K. K. Hoyer, S. W. French, L. Rosenfelt, M. Garcia-Lloret, P. J. Koh, T. C. Cheng, G. G. Sulur, G. S. Pinkus, W. M. Kuehl, D. J. Rawlings, R. Wall, and M. A. Teitell. 2001. TCL1 oncogene expression in B cell subsets from lymphoid hyperplasia and distinct classes of B cell lymphoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 81:555-564.
173. Sakai, A., C. Thieblemont, A. Wellmann, E. S. Jaffe, and M. Raffeld. 1998. PTEN gene alterations in lymphoid neoplasms. *Blood* 92:3410-3415.
174. Sarbassov, D. D., S. M. Ali, S. Sengupta, J. H. Sheen, P. P. Hsu, A. F. Bagley, A. L. Markhard, and D. M. Sabatini. 2006. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 22:159-168.
175. Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali, and D. M. Sabatini. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y.)* 307:1098-1101.
176. Schatz, J. H. 2011. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in non-Hodgkin's lymphoma: results, biology, and development strategies. *Current oncology reports* 13:398-406.
177. Schillaci, R., A. Galeano, D. Becu-Villalobos, O. Spinelli, S. Sapia, and R. F. Bezares. 2005. Autocrine/paracrine involvement of insulin-like growth factor-I and its receptor in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 130:58-66.
178. Scott, S. D. 1998. Rituximab: a new therapeutic monoclonal antibody for non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer practice* 6:195-197.
179. Sehgal, S. N., H. Baker, and C. Vezina. 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *The Journal of antibiotics* 28:727-732.
180. Sehgal, S. N., and C. C. Bansbach. 1993. Rapamycin: in vitro profile of a new immunosuppressive macrolide. *Annals of the New York Academy of Sciences* 685:58-67.
181. Semichon, M., H. Merle-Beral, V. Lang, and G. Bismuth. 1997. Normal Syk protein level but abnormal tyrosine phosphorylation in B-CLL cells. *Leukemia* 11:1921-1928.
182. Serra, V., B. Markman, M. Scaltriti, P. J. Eichhorn, V. Valero, M. Guzman, M. L. Botero, E. Llonch, F. Atzori, S. Di Cosimo, M. Maira, C. Garcia-Echeverria, J. L. Parra, J. Arribas, and J. Baselga. 2008. NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Res* 68:8022-8030.

183. Shanafelt, T. D., T. Lin, S. M. Geyer, C. S. Zent, N. Leung, B. Kabat, D. Bowen, M. R. Grever, J. C. Byrd, and N. E. Kay. 2007. Pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab regimen in older patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 109:2291-2298.
184. Shi, Y., A. Frankel, L. G. Radvanyi, L. Z. Penn, R. G. Miller, and G. B. Mills. 1995. Rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin in vitro. *Cancer Res* 55:1982-1988.
185. Shi, Y., X. Liu, E. K. Han, R. Guan, A. R. Shoemaker, A. Oleksijew, K. W. Woods, J. P. Fisher, V. Klinghofer, L. Lasko, T. McGonigal, Q. Li, S. H. Rosenberg, V. L. Giranda, and Y. Luo. 2005. Optimal classes of chemotherapeutic agents sensitized by specific small-molecule inhibitors of akt in vitro and in vivo. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 7:992-1000.
186. Siebert, R., S. Gesk, S. Harder, S. Plotz, P. Matthiesen, W. Grote, B. Schlegelberger, B. Jandrig, U. H. Grasmow-Wendler, S. Scherneck, A. Rosenwald, and G. Ott. 1998. Deletions in the long arm of chromosome 10 in lymphomas with t(14;18): a pathogenetic role of the tumor suppressor genes PTEN/MMAC1 and MXI1? *Blood* 92:4487-4489.
187. Simonsson, B., L. Wibell, and K. Nilsson. 1980. Beta 2-microglobulin in chronic lymphocytic leukaemia. *Scand J Haematol* 24:174-180.
188. Stauffer, F., P. Holzer, and C. Garcia-Echeverria. 2005. Blocking the PI3K/PKB pathway in tumor cells. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents* 5:449-462.
189. Stevenson, F. K., and F. Caligaris-Cappio. 2004. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 103:4389-4395.
190. Stiles, B. L. 2009. PI-3-K and AKT: Onto the mitochondria. *Advanced drug delivery reviews* 61:1276-1282.
191. Stilgenbauer, S., K. Dohner, M. Bentz, P. Lichter, and H. Dohner. 1998. Molecular cytogenetic analysis of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol* 76:101-110.
192. Stilgenbauer, S., D. Winkler, G. Ott, C. Schaffner, E. Leupolt, M. Bentz, P. Moller, H. K. Muller-Hermelink, M. R. James, P. Lichter, and H. Dohner. 1999. Molecular characterization of 11q deletions points to a pathogenic role of the ATM gene in mantle cell lymphoma. *Blood* 94:3262-3264.
193. Takeuchi, H., Y. Kondo, K. Fujiwara, T. Kanzawa, H. Aoki, G. B. Mills, and S. Kondo. 2005. Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer research* 65:3336-3346.

194. Tamburini, J., N. Chapuis, V. Bardet, S. Park, P. Sujobert, L. Willems, N. Ifrah, F. Dreyfus, P. Mayeux, C. Lacombe, and D. Bouscary. 2008. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways. *Blood* 111:379-382.
195. Tiwari, S., H. Dong, E. J. Kim, L. Weintraub, P. M. Epstein, and A. Lerner. 2005. Type 4 cAMP phosphodiesterase (PDE4) inhibitors augment glucocorticoid-mediated apoptosis in B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) in the absence of exogenous adenylyl cyclase stimulation. *Biochemical pharmacology* 69:473-483.
196. Virgilio, L., M. G. Narducci, M. Isobe, L. G. Billips, M. D. Cooper, C. M. Croce, and G. Russo. 1994. Identification of the TCL1 gene involved in T-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12530-12534.
197. Vlahos, C. J., W. F. Matter, K. Y. Hui, and R. F. Brown. 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269:5241-5248.
198. Wachtel, H. 1983. Potential antidepressant activity of rolipram and other selective cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase inhibitors. *Neuropharmacology* 22:267-272.
199. Wierda, W. G., T. J. Kipps, J. Mayer, S. Stilgenbauer, C. D. Williams, A. Hellmann, T. Robak, R. R. Furman, P. Hillmen, M. Trneny, M. J. Dyer, S. Padmanabhan, M. Piotrowska, T. Kozak, G. Chan, R. Davis, N. Losic, J. Wilms, C. A. Russell, and A. Osterborg. 2010. Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 28:1749-1755.
200. Wierda, W. G., S. Padmanabhan, G. W. Chan, I. V. Gupta, S. Lisby, and A. Osterborg. 2011. Ofatumumab is active in patients with fludarabine-refractory CLL irrespective of prior rituximab: results from the phase 2 international study. *Blood* 118:5126-5129.
201. Wierda, W. G., S. O'Brien, X. Wang, S. Faderl, A. Ferrajoli, K. A. Do, J. Cortes, D. Thomas, G. Garcia-Manero, C. Koller, M. Beran, F. Giles, F. Ravandi, S. Lerner, H. Kantarjian, and M. Keating. 2007. Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109:4679-4685.
202. Wiestner, A., A. Rosenwald, T. S. Barry, G. Wright, R. E. Davis, S. E. Henrickson, H. Zhao, R. E. Ibbotson, J. A. Orchard, Z. Davis, M. Stetler-Stevenson, M. Raffeld, D. C. Arthur, G. E. Marti, W. H. Wilson, T. J. Hamblin, D. G. Oscier, and L. M. Staudt. 2003. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 101:4944-4951.

203. Wyczechowska, D., and K. Fabianowska-Majewska. 2003. The effects of cladribine and fludarabine on DNA methylation in K562 cells. *Biochemical pharmacology* 65:219-225.
204. Xu, N., Y. Lao, Y. Zhang, and D. A. Gillespie. 2012. Akt: a double-edged sword in cell proliferation and genome stability. *Journal of oncology* 2012:951724.
205. Yap, T. A., L. Yan, A. Patnaik, I. Fearen, D. Olmos, K. Papadopoulos, R. D. Baird, L. Delgado, A. Taylor, L. Lupinacci, R. Riisnaes, L. L. Pope, S. P. Heaton, G. Thomas, M. D. Garrett, D. M. Sullivan, J. S. de Bono, and A. W. Tolcher. 2011. First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 29:4688-4695.
206. Yee, K. W., Z. Zeng, M. Konopleva, S. Verstovsek, F. Ravandi, A. Ferrajoli, D. Thomas, W. Wierda, E. Apostolidou, M. Albitar, S. O'Brien, M. Andreeff, and F. J. Giles. 2006. Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 12:5165-5173.
207. Yellen, P., M. Saqcena, D. Salloum, J. Feng, A. Preda, L. Xu, V. Rodrik-Outmezguine, and D. A. Foster. 2011. High-dose rapamycin induces apoptosis in human cancer cells by dissociating mTOR complex 1 and suppressing phosphorylation of 4E-BP1. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 10:3948-3956.
208. Yu, K., L. Toral-Barza, C. Shi, W. G. Zhang, and A. Zask. 2008. Response and determinants of cancer cell susceptibility to PI3K inhibitors: combined targeting of PI3K and Mek1 as an effective anticancer strategy. *Cancer biology & therapy* 7:307-315.
209. Yuan, T. L., and L. C. Cantley. 2008. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27:5497-5510.
210. Yuan, T. L., G. Wulf, L. Burga, and L. C. Cantley. 2011. Cell-to-cell variability in PI3K protein level regulates PI3K-AKT pathway activity in cell populations. *Curr Biol* 21:173-183.
211. Zanesi, N., R. Aqeilan, A. Drusco, M. Kaou, C. Sevignani, S. Costinean, L. Bortesi, G. La Rocca, P. Koldovsky, S. Volinia, R. Mancini, G. Calin, C. P. Scott, Y. Pekarsky, and C. M. Croce. 2006. Effect of rapamycin on mouse chronic lymphocytic leukemia and the development of nonhematopoietic malignancies in Emu-TCL1 transgenic mice. *Cancer research* 66:915-920.
212. Zenz, T., K. Dohner, T. Denzel, H. Dohner, S. Stilgenbauer, and L. Bullinger. 2008. Chronic lymphocytic leukaemia and acute myeloid leukaemia are not associated with AKT1 pleckstrin homology domain (E17K) mutations. *Br J Haematol* 141:742-743.

213. Zhu, W. H., A. Majluf-Cruz, and G. A. Omburo. 1998. Cyclic AMP-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram and RO-20-1724 promoted apoptosis in HL60 promyelocytic leukemic cells via cyclic AMP-independent mechanism. *Life sciences* 63:265-274.
214. Zhuang, J., S. F. Hawkins, M. A. Glenn, K. Lin, G. G. Johnson, A. Carter, J. C. Cawley, and A. R. Pettitt. 2010. Akt is activated in chronic lymphocytic leukemia cells and delivers a pro-survival signal: the therapeutic potential of Akt inhibition. *Haematologica* 95:110-118.
215. Zupo, S., L. Isnardi, M. Megna, R. Massara, F. Malavasi, M. Dono, E. Cosulich, and M. Ferrarini. 1996. CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. *Blood* 88:1365-1374.

## 7. Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

### Originalarbeiten:

**Popal, W., J. Boucas, A.A. Peer-Zada, and M. Herling. 2010.** Pharmacologic interception in T-cell leukemia 1A associated pathways as a treatment rationale for chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 51:1375-1378.

### Poster / Vorträge auf internationalen Meetings

**Popal, W., J. Boucas, P. Mayer, N. Lilienthal, N. Weit and M. Herling. 2009.** Targeting the PI3K-AKT pathway in CLL as a strategy to intercept in TCL1-mediated oncogenic signaling. *Abstract, IWCLL Meeting, Barcelona*.

**Popal, W., J. Boucas, P. Mayer, M. Stiefelhagen, N. Lilienthal, N. Weit and M. Herling. 2011.** Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in CLL as a strategy to intercept in TCL1A-mediated oncogenic signalling. *Abstract, DGHO, Basel*.