

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

Molekulare Analyse der WNT Signalkaskade bei der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL)

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

vorgelegt von
Lukas Peiffer
aus Attendorn

promoviert am 17.12.2014

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln, 2014

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

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. K.-A. Kreuzer
2. Berichterstatterin: Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. C. Niemann

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.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich freundlichste Unterstützung von Herrn Professor Dr. Karl-Anton Kreuzer erhalten.

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 05.07.2014

Die vorliegende Arbeit sowie alle dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im Labor für molekulare Hämatologie und Onkologie, Klinik I für Innere Medizin des Klinikums der Universität zu Köln, von Juni 2010 bis Dezember 2013 in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. med. Karl-Anton Kreuzer von mir unter seiner Anleitung durchgeführt.

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich während der Entstehung der vorliegenden Arbeit begleitet und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Allen voran steht Herr Prof. Dr. Karl-Anton Kreuzer. Ich danke ihm für die Motivation, das sehr interessante Thema aufzugreifen, die durchgängige ausgezeichnete Betreuung und seine ständige Bereitschaft, mir Hilfe zu leisten. Seine Unterstützung hat es mir möglich gemacht, mein Forschungsthema auf nationalen und internationalen Kongressen vorzustellen.

Dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. Hallek dafür, dass ich die Laborarbeiten in der Abteilung für Innere Medizin I der Uniklinik Köln durchführen konnte.

Ein großer Dank gilt all meinen Kolleginnen und Kollegen für die unvergessliche Zeit sowohl im Labor als auch außerhalb: Dr. Felix Erdfelder, Nicole Frenz, Dr. Iris Gehrke, Elena Krämer, Sylvia Krallmann, Thomas Landwehr, Gregor Lohmann, Hanna Flamme, Cristiano Krings-Rocha, Alexandros Liakos, Dr. Julian Paesler, Luis Mario Aguirre Palma, Birgit Poetzsch, Simon Jonas Poll-Wolbeck, Dr. Inka Praulich, Christian Prinz, Joanna Schiller, Mirela Stecki, Francesca Tettamanzi, Nicole Themel, Eva Vogt und Sabine Wilgus. Danke für eure Hilfestellungen, für euer Verständnis, für eure Freundschaft, für unzählige Diskussionen und für unzählige Kaffeepausen. Besonders dankbar bin ich Simon Jonas Poll-Wolbeck, der meine Arbeit von Anfang bis Ende mit hilfreichen Überlegungen und in der praktischen Ausführung begleitet hat.

Ich danke dem Team der Birken Apotheke für die gute Zeit „außerhalb des Labors“; meinen Chefs Herrn Erik Tenberken und Frau Marion Wüst für ihre Rücksichtnahme, insbesondere wenn zeitabhängigen Versuchsreihen anstanden.

Simon Jonas Poll-Wolbeck, Hanna Flamme, Alexandros Liakos und Gregor Lohmann haben meine Arbeit unter fachlichem, mein Onkel Frank Holthoff unter sprachlichem Aspekt durchgesehen. Auch dafür danke ich sehr.

Lorin Midani danke ich für den bedingungslosen Glauben an mich und viel guten Zuspruch, insbesondere nach niederschlagenden Labortagen.

Meinen Eltern möchte ich von ganzem Herzen für ihre liebevolle Unterstützung danken und dafür dass sie mich und meine beruflichen Laufbahn immer mit viel Vertrauen und Verständnis begleitet haben.

„Sich bemühen reicht nicht“
Laborinschrift

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Die chronische lymphatische Leukämie	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2.2 Ätiologie.....	2
1.1.3 Klinisches Erscheinungsbild	2
1.1.4 Klassifikation der CLL.....	3
1.1.4.1 Zytomorphologie und Blutbild.....	3
1.1.4.2 Immunphänotyp.....	4
1.1.4.3 Risikostratifikation nach Rai und Binet.....	5
1.1.5 Prognosefaktoren	7
1.1.5.1 Der Mutationsstatus von IgV _H und die Expression von ZAP-70 und CD38.....	7
1.1.5.2 Zytogenetik.....	9
1.1.6 Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie	11
1.1.6.1 Alkylantien.....	12
1.1.6.2 Purinanaloga.....	13
1.1.6.3 Monoklonale Antikörper	14
1.1.6.4 Stammzelltransplantation.....	15
1.1.6.5 Neue Therapieansätze.....	15
1.1.7 Apoptoseresistenz.....	16
1.2 Der WNT Signalweg	17
1.2.1 Der WNT/PCP Signalweg und der WNT/Ca ²⁺ Signalweg.....	18
1.2.2 Die kanonische WNT/β-Catenin Signalkaskade.....	19
1.2.3 Der WNT-Signalweg in der Entstehung von Neoplasien.....	21
1.2.4 Die Rolle des kanonischen WNT-Signalweges in der CLL	22
1.3 Die Wirkstoffe QS11, Pyrvinium pamoat, XAV939, JSK, Trichostatin A und SAHA	23
1.4 Die HDACi der Hydroxamat-Familie	27
1.5 Hypothese und Zielsetzung der Arbeit.....	29
2 Material und Methoden.....	30
2.1 Material	30
2.1.1 Geräte	30
2.1.2 Verbrauchsmaterial	31

2.1.3 Laborkits, Assays	32
2.1.4 Antikörper	32
2.1.4.1 Primärantikörper.....	33
2.1.4.2 Sekundärantikörper.....	33
2.1.4.3. Rekombinante Proteine.....	33
2.1.5 Chemikalien, Reagenzien, Puffer, Enzyme	33
2.1.6 Wirkstoffe	35
2.1.7 Zusammensetzung und Herstellung verwendeter Flüssigkeiten.....	35
2.2 Methoden	36
2.2.1 Zellkultur	36
2.2.1.2 Isolierung von CLL-Zellen	36
2.2.1.3 Isolierung von PBMCs.....	36
2.2.1.4 Isolierung gesunder B-Zellen	37
2.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl.....	37
2.2.2 Molekularbiologische Methoden – DNS-Sequenzierung.....	38
2.2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren (RNS und DNS)	38
2.2.2.2 Polymerase Kettenreaktion	39
2.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	39
2.2.2.4 PCR der verschiedenen Zielstrukturen	40
2.2.2.5 Primer.....	41
2.2.2.6 Enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte	42
2.2.2.7 Sequenzierungs-PCR.....	43
2.2.2.8 Quantitative Echtzeit-PCR.....	44
2.2.3 Untersuchungen zur Induktion von Apoptose und Zelltod.....	45
2.2.3.1 Durchflusszytometrie.....	45
2.2.3.2 ATP Assay.....	47
2.2.3.2 Caspase 3/7 Assay	47
2.2.4 Proteinbiochemie.....	48
2.2.4.1 Zellansätze	48
2.2.4.2 Herstellung von Zell-Lysaten.....	48
2.2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	49
2.2.4.4 Western Blot.....	49
2.2.4.5 Immundetektion.....	50
2.2.5 Computerprogramme	51
2.2.6 Statistische Berechnungen.....	52
3 Ergebnisse.....	53
3.1 Analyse der wesentlichen WNT-Gene	53
3.2. Die WNT-Bibliothek.....	55
3.2.1 Die Aktivatoren der WNT-Bibliothek.....	56

3.2.2 Die Inhibitoren der WNT-Bibliothek.....	57
3.2.3 Die wirksamen Substanzen der WNT-Bibliothek.....	58
3.2.3.1 QS 11 verlängert effektiv das Überleben der CLL-Zellen.....	58
3.2.3.2 Pyrvinium pamoat – ein starker WNT-Inhibitor mit toxischen Nebeneffekten	59
3.2.3.3 XAV 939 stabilisiert den Destruktionskomplex.....	60
3.2.3.4 Der Wirkstoff JSK.....	62
3.2.3.5 Trichostatin A – die effektivste Substanz der WNT-Bibliothek	64
3.2.4 Der Wirkstoff Trichostatin A.....	66
3.2.4.1 Trichostatin A wirkt über einen Caspase-abhängigen Mechanismus	66
3.2.4.2 Der duale Wirkmechanismus von Trichostatin A.....	68
3.2.4.3 TP53-mutierte CLL-Zellen zeigen gute Ansprechraten gegenüber TSA.....	70
3.2.4.4 Stark vorbehandelte Proben zeigen keine Resistenz auf Trichostatin A	71
3.2.4.5 Additiver Effekt von Trichostatin A mit DNS-aktiven Substanzen	73
3.2.4.6 Der WNT-abhängige Aktivator QS-11 versagt bei der Viabilitätssteigerung in Kombination mit Trichostatin A.....	74
3.3 Trichostatin A zeigt ähnliche Eigenschaften wie das bereits zugelassene Medikament Vorinostat.....	76
4 Diskussion.....	78
4.1 Die Funktionalität der WNT-Signalkaskade	79
4.2 Die Aktivatoren der WNT Bibliothek.....	81
4.2 Die Inhibitoren der WNT Bibliothek	83
4.3 Trichostatin A – ein herausragender Wirkstoff	87
4.4 Die strukturellen Eigenschaften der HDAC-Inhibitoren.....	95
4.5 Ausblick	98
5 Zusammenfassung	100
6 Literaturverzeichnis.....	102
7 Vorabveröffentlichung von Ergebnissen.....	120
8 Anhang.....	121
8.1 Abbildungsverzeichnis	121
8.2 Tabellenverzeichnis	123
9 Lebenslauf	124

Abkürzungsverzeichnis

<i>abl</i>	Abelson murine leukemia viral oncogen homolog 1
APC	Adenomatous-polyposis-coli Protein
AUC	Fläche unter der Kurve
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Caspase	Cystein-Aspartat spezifische Protease
CD	cluster of differentiation
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CK1	Casein Kinase 1
°C	Grad Celsius
DAG	Diacylglycerol
DKK1	Dickkopf 1 Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	Food and drug administration
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
<i>for</i>	Vorwärts-Primer
Fzd	Frizzled-Rezeptor
G	Guanin
X	

GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 β
g	Gramm
h	Stunde
HRP	Horseradish peroxidase
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
Ig	Immunglobulin
IgV _H	Immunglobulin heavy chain variable region
i.v.	intravenös
kDa	Kilo Dalton
KI ₉₅	Konfidenzintervall (95%)
Ig	Immunglobulin
IP3	Innositoltriphosphat
κ	Kappa
L	Liter
LD ₅₀	Letale Dosis 50%
LEF1	Lymphoid enhancer-binding factor 1
λ	Lambda
M	Molar (mol/Liter)
mM	millimol/L
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
μ g	Mikrogramm
MRD	Minimal residual disease (Minimale Resterkrankung)
nm	Nanomolar
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly-(ADP-ribose)-polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PBMC	Mononukleäre Zellen des periphären Bluts (Peripheral blood mononuclear cells)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Stoffmengenkonzentration an Wasserstoffionen
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Rb1	Retinoblastomgen 1
<i>rev</i>	Rückwärts Primer
RhoA	RAS homologue gene family member A
RNS	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-associated protein kinase 1
rpm	Umdrehung pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
SNP	Einzelnukleotid Polymorphismus (Single Nucleotide Polymorphism)
SZT	Stammzelltransplantation
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween
TSA	Trichostatin A
V	Volt
WHO	Weltgesundheitsorganisation (world health organisation)
WNT	Wingless-type
ZAP-70	Zeta associated protein kinase 70

1 Einleitung

1.1 Die chronische lymphatische Leukämie

1.1.1 Definition

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) lässt sich den leukämisch verlaufenden Non-Hodgkin-Lymphomen zuordnen und zeichnet sich durch ein sehr heterogen verlaufendes Krankheitsbild aus (39). Charakteristisch für die CLL ist ein vermehrtes Auftreten von monoklonalen und morphologisch reifen, aber funktionell inkompetenten B-Zellen. Im Anfangsstadium der Erkrankung sind die CLL-Zellen im Knochenmark und peripheren Blut präsent, im späteren Verlauf ebenfalls in der Leber, der Milz und den Lymphknoten. Die Akkumulation der CLL Zellen in Leber, Milz und Lymphknoten führt zu einer Vergrößerung der Organe, die sich klinisch als Hepato- und Splenomegalie und Lymphadenopathie äußert (77). Die WHO klassifiziert die CLL als ausgereifte B-Zell Neoplasie, die sich durch Anwesenheit von CD5⁺, CD19⁺ und CD23⁺ B-Lymphozyten definiert, welche weniger als 55% der zirkulierenden B-Lymphozyten ausmachen (24). Die WHO-Klassifikation legt für die Diagnose zugrunde, dass mindestens $5 \times 10^9/L$ monoklononale B-Zellen vorhanden sein müssen, die einen CLL Phänotyp tragen, oder dass eine extramedulläre Erkrankung vorliegt. Bei erhöhten Werten unterhalb dieses Richtwertes spricht man von einer B-Zell Lymphozytose, sofern keine anderen Krankheitssymptome vorliegen (131).

1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie

1.1.2.1 Epidemiologie

Die CLL ist eine der häufigsten Leukämieformen in westlichen Ländern, insbesondere in Nordamerika und Westeuropa. Die Inzidenz für eine Erkrankung liegt bei 3,5 pro 100.000 Einwohner jedes Jahr (44). In den Vereinigten Staaten von Amerika wurden 2013 bis jetzt 15.000 Neuerkrankungen und 4000 Todesfälle durch CLL registriert (160). Die Erkrankung tritt meist im letzten Lebensdrittel auf. Die Inzidenz für eine Erkrankung steigt bei Menschen über 80 Jahren auf >30 pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Das mittlere Alter beträgt 67 bis 72 Jahre, nur etwa 10% der Patienten sind jünger als 55 Jahre (52, 81). Männer haben ein zweifach erhöhte Risiko an einer CLL zu erkranken im Vergleich zu Frauen (5,0 pro 100.000; 2,5 pro 100.000). Hinsichtlich der ethnischen Herkunft sind ebenfalls Unterschiede in der Prävalenz für CLL bekannt. Für Menschen mit afroamerikanischer Herkunft ist

die Prävalenz um 25% geringer, für Menschen aus dem asiatischen Raum sogar um 77% (49). Bei ca. 9% der Patienten zeigt sich eine familiäre Prädisposition. Die Verwandten können eine CLL, ein malignes Lymphom oder andere Leukämieformen aufweisen (akut oder chronisch) (25).

1.1.2.2 Ätiologie

Da die genaue Entstehung der CLL bis heute nicht aufgeklärt ist, werden verschiedene Theorien diskutiert. Aktuelle Untersuchungen haben das Problem, dass keine Vorläuferzellen für die CLL bekannt sind. Über die immunologische und genetische B-Zell Rezeptorfunktion lässt sich die CLL in zwei Gruppen einteilen, wobei die variable Region des Proteins IgV_H als Unterscheidungsmerkmal dient. Es wird vermutet, dass sich CLL Zellen, die einen unmutierten IgV_H Locus haben, aus frühen Entwicklungsstadien der B-Zelllinie oder aus Marginalzonen B-Zellen (MZ B-Zellen) entstehen. CLL Zellen mit mutiertem IgV_H entstehen dagegen vermutlich aus Postkeimbahnzellen, den B-Gedächtniszellen. Die Unterteilung der Zellen mit Hilfe des IgV_H Status führt zu weiteren biologischen und klinischen Unterschieden (66, 192) (vgl. 1.1.5).

In frühen Studien wurde im Gegensatz zu anderen Leukämieformen kein Zusammenhang zwischen CLL und der Einwirkung von Chemikalien, zytotoxischen Stoffen oder Strahlung festgestellt (122). Aktuelle Berichte zeigen jedoch einen Zusammenhang zwischen Chemikalienexposition und einer Erkrankung. 2013 zeigte eine retrospektive Studie ein um 17% erhöhtes Erkrankungsrisiko von US-Kriegsveteranen, die zwischen 1962 und 1971 mit dem Herbizid Agent Orange und dadurch mit dem als Verunreinigung enthaltenen Giftstoff 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin (TCDD) in Kontakt gekommen waren (6).

Ein weiterer Risikofaktor an CLL zu erkranken ist die Erkrankung eines Verwandten ersten Grades an einer hämatologischen Erkrankung, die je nach Untersuchung mit einer Inzidenz von bis zu 34% angegeben wird (19, 25, 38).

1.1.3 Klinisches Erscheinungsbild

Das klinische Erscheinungsbild der CLL ist durch einen stark variablen und heterogenen Krankheitsverlauf charakterisiert. Der Krankheitsbeginn verläuft meist langsam, wodurch kaum oder keine Symptome feststellbar sind. Oft wird die Erkrankung als Zufallsbefund während einer Routineuntersuchung durch eine

erhöhte Anzahl von Lymphozyten (Lymphozytose) im peripheren Blut festgestellt. Im weiteren Krankheitsverlauf hat der massive Anstieg der CLL-Lymphozytenzahl einen größeren Raumanpruch zur Folge. Dadurch werden die gesunden Blutzellen verdrängt und es kommt zum Abfall der Zahl der Thrombozyten (Thrombozytopenie), der Erythrozyten (Anämie) und der gesunden Lymphozyten (Leukopenie). Die so veränderten Blutwerte äußern sich durch Symptome wie erhöhter Infektanfälligkeit, Abgeschlagenheit, Gewichtsabfall, verminderter Leistungsfähigkeit und erhöhter Blutungsneigung. Des Weiteren führt der Anstieg der Lymphozytenzahl zu einer Vergrößerung der lymphatischen Organe, die sich in einer Schwellung der Lymphknoten (Lymphadenopathie), der Milz (Splenomegalie) und der Leber (Hepatomegalie) zeigt (21, 75).

Oft ist die Todesursache der Patienten im späteren Krankheitsverlauf der CLL auf die Blutbildveränderung, die damit verbundenen Organvergrößerungen und die Schwächung der Immunabwehr zurückzuführen. Die häufigste Todesursache ist die Folge einer Infektion durch Bakterien (*S. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *E. coli*) oder durch virale Infektionen, die meist in den Lungen, auf der Haut oder im Urogenitaltrakt auftreten (83, 147). Als weitere Todesursachen wurden hämolytische Anämien und damit verbundene Blutungen, vaskuläre Probleme, Kachexie und Zweitmalignome beobachtet (5, 108).

Die Diagnose wird standardmäßig durch eine zytomorphologische Untersuchung eines Blutausstriches des peripheren Blutes und eine immunophänotypische Untersuchung erhoben (14).

1.1.4 Klassifikation der CLL

1.1.4.1 Zytomorphologie und Blutbild

Die diagnostische Bestimmung und Einteilung der CLL wird mittels Blutbild und Blutausstrich vorgenommen. Für das Blutbild gilt ein Mindestwert von 5000 B-Lymphozyten/ μ l im peripheren Blut, der über einen Zeitraum von drei Monaten nachgewiesen werden muss. Liegt ein Wert von unter 5000 B-Lymphozyten/ μ l vor, so bezeichnet man den Zustand als monoklonale B-Lymphozytose (MBL), sofern keine anderen Krankheitssymptome vorliegen. Eine monoklonale B-Lymphozytose wandelt sich in 1-2% der Fälle in eine CLL um (92, 140). Die CLL weist häufig eine Infiltration des Knochenmarks durch Lymphozyten von über 30% auf (29).

Mikroskopisch lassen sich die CLL Zellen im Blutausstrich als kleine monomorphe Lymphozyten erkennen, die ein schmales, ungranuliertes Zytoplasma und einen rundlich-ovalen Zellkern zeigen. Häufig lässt sich verklumptes Chromatin erkennen. Neben den CLL B-Lymphozyten können atypische Zellen oder Prolymphozyten auftreten. Als Kriterium für das Vorliegen einer CLL ist ein Grenzwert von 55% festgelegt, mindestens aber von 10% für atypische Zellen und Prolymphozyten im peripheren Blut (36). Als zusätzliches Charakteristikum lassen sich häufig zerquetschte Zellen oder Bruchstücke davon erkennen, die „Gumprechtschen Kernschatten“. Die Gumprechtschen Kernschatten kommen ebenfalls in anderen lymphoproliferativen Erkrankungen vor und sind somit kein aussagekräftiges Einzelmerkmal für CLL (77, 79).

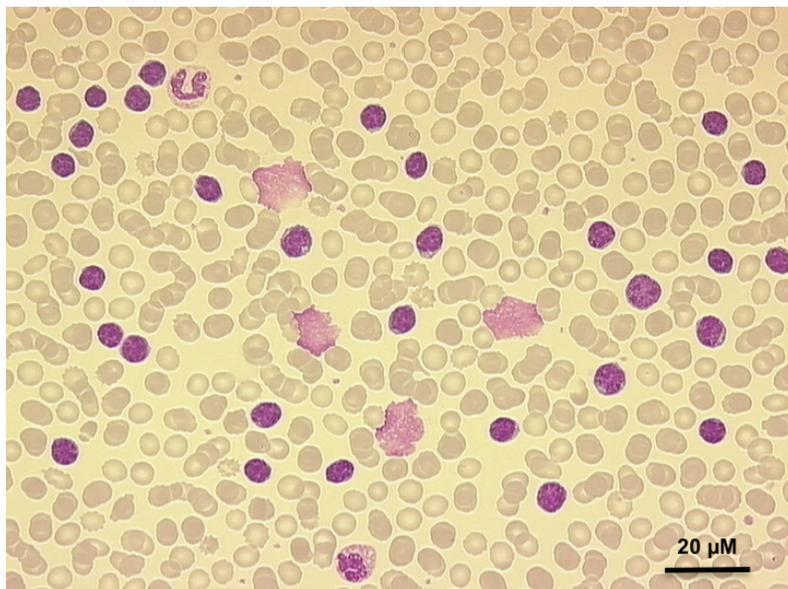


Abbildung 1: Blutausstrich eines CLL-Patienten

Die Abbildung zeigt den Blutausstrich eines CLL Patienten. Den Hauptanteil der Zellen machen die Erythrozyten aus (rund, farblos). Dazwischen lassen sich vereinzelt kleine die Thrombozyten erkennen (punktartig, farblos). Dunkellila sind die B-Lymphozyten zu sehen (ähnlich groß wie die Erythrozyten). In der Mitte sind weiterhin 4 Gumprechtsche Kernschatten zu sehen (helllila). Oben links sieht man einen stabkernigen neutrophilen (U-förmig dunkellila, helllila umrandet) und unten mittig einen segmentkernigen Granulozyt (rund dunkellila, helllila eingefasst) (Abbildung: Labor für molekulare Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Köln).

1.1.4.2 Immunphänotyp

Durch eine Immunphänotypisierung ist die sichere Identifizierung von CLL Zellen und Differenzierung von anderen Zellen im Blut möglich. Zusätzlich lässt sich die CLL von anderen Non-Hodgkin-Lymphomen abgrenzen. Mittels Durchflusszytometrie werden

verschiedene Antigene auf der B-Zell Oberfläche bestimmt. Neben dem physiologischen T-Zellmarker CD5 und dem Pan-B-Zellmarker CD19 werden die B-Zell-Marker CD20 und CD23 erfasst. Wie die B-Zellantigene CD22 und FMC7 wird der Marker CD79b nur schwach exprimiert und dient daher zur Unterscheidung von anderen CD5-positiven Lymphomen. Die Immunphänotypisierung gibt ebenfalls Auskunft über die Klonalität der malignen Lymphozyten mit Hilfe der Leichtkettenrestriktion. Monoklonale B-Zellen exprimieren nur einen Leichtkettentyp, entweder κ oder λ (29, 41, 45, 98).

Weiterhin wird die Immunphänotypisierung zur Abgrenzung anderer hämatologischer Erkrankungen genutzt, die der CLL morphologisch ähneln, wie z.B. der Prolymphozytenleukämie (PLL), der Haarzell-Leukämie (HZL), des Mantelzell-Lymphoms (MZL) und weiterer B-Zell lymphoproliferativer Erkrankungen. Die PLL unterscheidet sich z.B. durch die fehlende Expression der Oberflächenmarker CD5 und CD23, während das bei der CLL schwach exprimierte FMZ7 hier stark ausgeprägt ist. Das MZL ist durch eine CD23 Negativität von der CLL abgrenzbar (120, 155). Für die Diagnostik und Behandlung ist die genaue Unterscheidung zwingend nötig (119). Das Richter-Syndrom ist eine Erkrankung, die durch einen meist sehr schnellen Übergang von der CLL in ein aggressives, meist diffuses und großes B-Zell Lymphom gekennzeichnet ist. Durch die Transformation aus einer bestehenden CLL ist das Richter Syndrom nicht eindeutig von einer CLL zu unterscheiden (57, 149).

Sofern die Diagnose CLL nach den oben beschriebenen Methoden gesichert ist, kann eine erweiterte Diagnostik durchgeführt werden. Zu erweiterter Diagnostik zählt die Expression von CD38, ZAP-70 oder der IgV_H-Status (41, 53, 118, 139).

1.1.4.3 Risikostratifikation nach Rai und Binet

Der Krankheitsverlauf der CLL ist sehr heterogen geprägt. Allgemeine Aussagen zu Prognose und Überlebenswahrscheinlichkeit sind schwer zu treffen, weil sie von vielen Faktoren der Erkrankung abhängen. Durch diese Vielzahl an unterschiedlichen Faktoren und der Variabilität des Krankheitsverlaufes liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen einigen Monaten bis zu über zehn Jahren (52, 124).

Durch die Untersuchung des Blutes und der körperlichen Symptome kann eine Einteilung in klinische Stadien vorgenommen werden. Weltweit haben sich zwei

Einteilungsschemata durchgesetzt: die Stadieneinteilung nach Rai (138) von 1975, die sich eher in Nordamerika durchgesetzt hat, und nach Binet (15) von 1981, die in Europa und weiteren Ländern Anwendung findet. Die Einteilung durch Binet orientiert sich sowohl an Blutbildveränderungen, wie z.B. Hämoglobin- oder Thrombozytenwert, als auch an der Anzahl an betroffenen Lymphknotenregionen. Die Vergrößerung der Lymphknotenregion kann axillar, zervikal, inguinal und sowohl uni- als auch bilateral auftreten. Zusätzlich kann es zu einer Organvergrößerung in Form einer Hepato- oder Splenomegalie kommen. Rai orientiert sich ebenfalls an Blutbildveränderungen, bewertet allerdings Vergrößerung von Lymphknoten, Veränderung der Hämoglobinwerte und der Thrombozytenanzahl eher als absolute Werte, nicht nach ihrer Anzahl.

Beide Schemata erlauben in Kombination mit den molekulargenetischen und zytogenetischen Prognosemarkern eine Einteilung der Patienten in verschiedene Risikogruppen und ermöglichen zuverlässigere Aussagen über Behandlungsbeginn, Therapieoptionen und Therapieerfolg (76).

Der Internationale Workshop für CLL hat die Vergleichbarkeit von Rai und Binet wie folgt eingeordnet: A (0-II), B (I-II) und C (III-IV) (195).

Tabelle 1: Klinische Stadieneinteilung der CLL nach Rai

Die in der Tabelle angegebenen Werte beziehen sich auf das periphere Blut. Modifiziert nach Rai (1975) (137, 138).

Stadieneinteilung nach Rai			
Risiko	Stadium	Definition	Medianes Überleben
niedrig	0	<ul style="list-style-type: none"> • Lymphozytose >5.000/µl • Knochenmarkinfiltration >40% 	>10 Jahre
intermediär	I	<ul style="list-style-type: none"> • Lymphozytose >5.000/µl • Lymphadenopathie 	7 Jahre
	II	<ul style="list-style-type: none"> • Lymphozytose >5.000/µl • Spleno- und/oder Hepatomegalie • mit und ohne Lymphadenopathie 	
hoch	III	<ul style="list-style-type: none"> • Lymphozytose >5.000/µl • mit oder ohne Spleno-, Hepato-, Lymphadenomegalie • Anämie (Hb<11g/dl) 	1,5 Jahre
	IV	<ul style="list-style-type: none"> • Lymphozytose >5.000/µl • mit oder ohne Spleno-, Hepato-, Lymphadenomegalie • mit und ohne Anämie • Thrombozytopenie (<100.000/µl) 	

Tabelle 2: Klinische Stadieneinteilung der CLL nach Binet

Die in der Tabelle angegebenen Werte beziehen sich auf das periphere Blut. Modifiziert nach Binet (1981) (15).

Stadieneinteilung nach Binet		
Stadium	Definition	Medianes Überleben
Binet A	<ul style="list-style-type: none"> • Lymphozytose >5.000/μl • Thrombozytenzahl \geq100.000/μl • Hämoglobinkonzentration \geq10.000/μl • < 3 vergrößerte Lymphknotenregionen 	>10 Jahre
Binet B	<ul style="list-style-type: none"> • Lymphozytose >5.000/μl • Thrombozytenzahl >100.00/μl • Hämoglobinkonzentration \geq10.000/μl • \geq 3 vergrößerte Lymphknotenregionen 	5 Jahre
Binet C	<ul style="list-style-type: none"> • Lymphozytose >5.000/μl • Thrombozytenzahl <100.000/μl • Hämoglobinkonzentration <10.000/μl • unabhängig von der Anzahl der befallenen Lymphknoten 	2 Jahre

1.1.5 Prognosefaktoren

Die Verlaufsprognosen nach Rai und Binet erlauben zwar eine grobe Einteilung, der Krankheitsverlauf von Patienten innerhalb eines Stadiums kann allerdings sehr heterogen ausfallen (184). Um das klinische Stadium und die individuelle Prognose noch genauer beurteilen zu können wurden weitere biologische Marker etabliert, die sich mittels moderner Analysemethoden erfassen lassen. Die Expressionswerte des Glykoproteins CD38 und des Zeta-assoziierten Proteins 70 (ZAP-70) können durchflusszytometrisch bestimmt werden (139, 148, 158). Des Weiteren lassen sich zytogenetische Veränderungen, der Mutationsstatus von IgV_H, die Aktivität der Serum-Thymidinkinase oder der β 2-Mikroglobulinspiegel erfassen (4, 102, 125, 154).

1.1.5.1 Der Mutationsstatus von IgV_H und die Expression von ZAP-70 und CD38

Ein bedeutender Parameter zur prognostischen Einteilung der CLL stellt die Analyse des Mutationsstatus der variablen Immunglobulin Schwerketten (IgV_H) dar. Der Mutationsstatus des IgV_H-Gens ist eng verknüpft mit der Genese der CLL-Zellen und dem Entwicklungsstadium der B-Zellen, aus dem sie hervorgehen (192) (vgl. 1.1.2.2.). Studien zur Analyse des Mutationsstatus zeigen auf der einen Seite, dass Patienten mit einer Mutation des IgV_H-Gens eine im Vergleich günstigere Prognose haben, auf der anderen Seite verläuft die Krankheit bei Patienten mit einem

unmutierten IgV_H-Gen weitaus aggressiver. Dies ist häufig mit negativen zytogenetischen Merkmalen bis hin zu einer Therapieresistenz gegen Chemotherapeutika verknüpft. In einer 1999 erhobenen Studie von Hamblin et al. wurden 84 Personen auf eine Mutation des IgV_H-Gens untersucht. Dabei wurde eine Mutation als Abweichung von >2% der ursprünglichen Keimbahnsequenz definiert. Mutationen traten bei etwas über 50% der Fälle auf und führten zu einer mittleren Überlebenswahrscheinlichkeit von 95 Monaten bei unmutiertem IgV_H-Gen und 293 Monaten bei mutiertem IgV_H-Gen (41, 84).

Eine Besonderheit bildet das IgV_H-Gen 3-21. 2002 stellten Tobin et al. fest, dass eine Mutation dieses Gens einen ähnlich schlechten prognostischen Krankheitsverlauf für den Patienten bedeutet wie für Patienten mit unmutiertem IgV_H-Gen. Beobachtet wurde ein signifikant kürzeres Überleben als bei anderen vergleichbaren Mutationen (104, 169, 172).

Einen weiteren Parameter stellt die Protein-Tyrosin Kinase ZAP-70 dar. Physiologisch ist ZAP-70 Teil des Signalweges für den T-Zell Antigen Rezeptor und normalerweise auf T-Lymphozyten exprimiert (31). Rosenwald et al. konnten zeigen, dass ZAP-70 sowohl in B-Lymphom Zelllinien als auch in CLL-Zellen stark exprimiert ist (148). ZAP-70 ist über die ZAP-70 assoziierte Kinase syk mit dem B-Zell-Rezeptorweg verbunden (176). Die Expression von ZAP-70 korreliert stark mit dem Mutationsstatus des IgV_H-Gens. CLL-Zellen von Patienten, die ZAP-70 mit >20% exprimieren, tragen fast immer ein unmutiertes IgV_H-Gen. Dadurch steht der ZAP-70 Status ebenfalls mit einem negativen Krankheitsverlauf und einer schlechten Prognose in Verbindung (35, 50, 130). Die Expression von ZAP-70 bleibt während des Verlaufes der CLL Erkrankung zum größten Teil stabil (18).

Das Glykoprotein CD38 ist ein Parameter, der ebenfalls mit dem IgV_H-Gen korreliert. Eine hohe Expression von CD38 tritt meist in Verbindung mit einem unmutierten IgV_H-Gen auf (41). Im Gegensatz zu ZAP-70 kann sich die Expression von CD38 aber innerhalb des Krankheitsverlaufes verändern (85). Ibrahim et al. konnten in einer Studie mit 218 Patienten zeigen, dass eine CD38 Expression von über 20% mit einer signifikant schlechteren Überlebensrate zusammenhängt (89). Andere Untersuchungen definieren den Schwellenwert für eine CD38 Expression zwischen 5-30% (17, 105).

Als weitere serologische Parameter können die Thymidinkinaseaktivität und die β 2-Mikroglobulin-Spiegel im Serum bestimmt werden. Die Thymidinkinase ist ein

Enzym, welches an der DNA-Synthese beteiligt ist. Die messbare Konzentration korreliert mit der Teilungsaktivität von Zellen. Durch die hohen Zellteilungsraten bei malignen Erkrankungen wie der CLL ist die Thymidinkinase ein Maß für die Proliferationsaktivität und kann schon eine frühe Prognose über den Krankheitsverlauf geben (78, 121). Es gibt Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Thymidinkinasewerten und dem IgV_H-Status (115).

β2-Mikroglobulin ist ein lösliches Protein und gehört zur Familie des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC-Moleküle) der Klasse I. Alle kernhaltigen Zellen verschiedenster Gewebe exprimieren β2-Mikroglobulin auf ihrer Zelloberfläche. Als Folge eines Membranschadens ist es im Serum oder anderen Körperflüssigkeiten messbar. Die Spiegel sind unter anderem erhöht bei rheumatischen Veränderungen, Fieber, Nierenerkrankungen und hämatologischen Erkrankungen. Sie korrelieren mit den klinischen Stadien der CLL; Werte >3.5 mg/L sind ein Indikator für eine ungünstige Prognose (11, 69, 80).

1.1.5.2 Zytogenetik

In den Anfängen der Zytogenetik gestaltete sich die Untersuchung von CLL aufgrund der geringen mitotischen Aktivität *in vitro* sehr schwierig. Die Stimulation mit mitogenen Substanzen zeigte ebenfalls wenig Erfolg, teilweise begründet in der Tatsache, dass damals eingesetzte mitogene Substanzen eher für die T-Zell Stimulation ausgelegt waren (63, 163). Erste gute Erkenntnisse erlangte man Mitte der 90er Jahre durch die Einführung der „vergleichenden genomischen Hybridisierung“ (CGH, comprehensive genomic hybridisation), die es ermöglichte numerische Unterschiede, Amplifikationen und Deletionen von Chromosomenabschnitten zu untersuchen (10). Heute bedient sich die Zytogenetik der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH), mit der die Untersuchung von Interphase- und Metaphasekernen möglich ist. Aufgrund der geringen Teilungsrate ist die Analyse der Interphasekerne für die CLL sehr bedeutend. Durch die FISH Untersuchung konnten Döhner et al. 2000 genetische Veränderungen bei über 80% von 268 untersuchten Patienten feststellen (48).

Die genetischen Anomalien können den Krankheitsverlauf stark beeinflussen, entweder in Richtung eines positiven Verlaufs (13q- oder mutiertes IgVH) oder negativ (17p- oder 11q-) (191). Die häufigsten Anomalien, die im Zusammenhang mit CLL auftreten, sind Deletionen an den Chromosomen 13, 11, 6 und 17 sowie die

Trisomie 12 (48). Neben den bestimmten Einzelveränderungen ist die Prognose bei Patienten am schlechtesten, die einen komplex aberranten Karyotyp mit mehr als 3 Einzelveränderungen aufweisen (74).

Die Deletion des Chromosoms 13q (13q14) ist mit einer Wahrscheinlichkeit von 55% die häufigste genetische Anomalie der CLL. Bei dieser Mutation ist das Tumorsuppressorgen *Rb1* betroffen (47). Mutieren beide Allele, entwickeln betroffene Patienten einen Tumor der Netzhaut, das Retinoblastom. Die Prognose mit einer 13q Deletion ist mit einer mittleren Überlebensrate von 133 Monaten sogar besser als mit einem normalen Karyotyp, der mit 111 Monaten angegeben wird (48).

Die zweithäufigste Anomalie ist die 11q Deletion (11q23), die mit einer Häufigkeit von 18% angeführt wird. Die Deletion betrifft das *ATM*-Gen (Ataxia Telangiectasia Mutated). Das ATM Protein ist verantwortlich für die Überwachung von DNA-Schäden, insbesondere von Doppelstrangbrüchen. Eine Veränderung, die beide Allele betrifft, kann zu einem Funktionsverlust und zu einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika führen (162, 165). Die mittlere Überlebensrate bei einer 11q Deletion beträgt im Schnitt 79 Monate (48).

Mit 16% Wahrscheinlichkeit ist die Trisomie 12q die dritthäufigste Anomalie der CLL. Sie birgt ein mittleres Risiko und eine mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit von 114 Monaten, 3 Monate mehr als ein unmutierter Karyotyp aufweist (48).

Eine sehr schlechte Prognose wird durch eine Deletion von 17p verursacht, die mit 7% Wahrscheinlichkeit auftritt und eine mittlere Überlebensrate von nur 32 Monaten aufweist. In diesem Fall ist das Tumorsuppressorgen *TP53* betroffen. Das Gen codiert für das Protein p53, das als Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle für Zellfunktionen spielt, wie zum Beispiel Induktion der Apoptose und Kontrolle des Zellzyklus. Neben der geringen Überlebensrate tritt häufig eine Resistenz gegen Chemotherapeutika auf (46, 71, 174).

Das Chromosom 6q ist in 6% der Fälle deletiert. Diese Deletion hat eine leicht geringere Überlebensrate als ein normaler Karyotyp zur Folge (48). Patienten mit einer 6q Deletion weisen klinisch häufig eine hohe Anzahl an weißen Blutkörperchen und eine ausgeprägtere Lymphadenopathie auf. Der häufigste Subtyp ist die Deletion an 6q21, die durch eine größere Tumormasse charakterisiert ist, aber keine veränderte Überlebensrate zeigt (166).

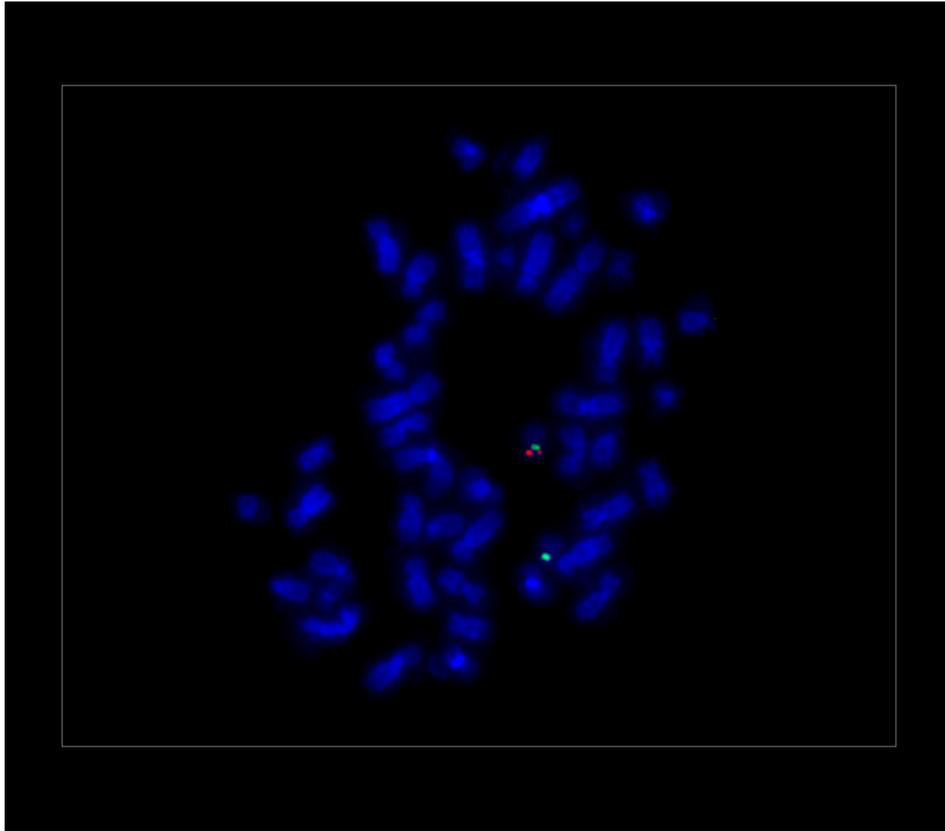


Abbildung 2: FISH-Analyse einer Patienten mit 17p-Deletion

Die Abbildung zeigt das FISH-Bild eines Patienten mit der Deletion des Chromosoms 17p. Der grüne Punkt markiert das Kontrollsignal am Zentromer des Chromosoms 17. Das rote Signal kennzeichnet den Chromosomenabschnitt 17p13, auf dem das Tumorsuppressor-Gen *TP53* liegt. Das normale Bild zeigt jeweils ein rotes neben einem grünen Signal. In der Abbildung ist das Signal 1R2G (1 rot, 2 grün) zu sehen, ein rotes Signal fehlt und markiert die Deletion an der Stelle 17p13. (Abbildung: Labor für molekulare Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Köln)

1.1.6 Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie

Die Heterogenität des Krankheitsverlaufes ist ein erschwerender Punkt in der Therapie der CLL. Die Entwicklung der Stadieneinteilung nach Rai und Binet in Kombinationen mit der Vielzahl an möglichen Prognosefaktoren erleichtert dabei die Therapieauswahl. Die Auswahl der Therapie richtet sich nach verschiedenen Gesichtspunkten, wie dem Patientenzustand (gemessen an der physischen Konstitution und eventuellen Begleiterkrankungen), dem individuell prognostizierten Risiko gemessen am genetischen Profil, oder weiteren Prognosefaktoren und dem Krankheitsstadium gemäß Rai und Binet.

Die Behandlung von Patienten lässt sich grob in 3 Gruppen unterteilen: 1. Für asymptomatische Patienten (Binet A/B, Rai 0-II) gilt die „watch and wait“ Strategie, da die Behandlung in frühen Stadien keine signifikante Lebensverlängerung bedeutet. 2. Patienten in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium (Binet C/D, Rai

III/IV) werden mit einer Chemotherapie behandelt, die aus einer Einzelsubstanz oder aus einer Kombination aus mehreren Chemotherapeutika besteht. 3. Für Patienten mit einer stark ausgeprägten CLL Erkrankung oder Hochrisikopatienten besteht neben der kombinierten Chemotherapie die Möglichkeit des Einsatzes von neuen Chemotherapeutika und/oder einer Stammzelltransplantation (79, 81).

Zytostatische Therapie

1.1.6.1 Alkylantien

Chlorambucil

Lange Zeit war Chlorambucil der Goldstandard in der Therapie der CLL. Die Substanz ist oral applizierbar, wegen der geringen Toxizität besonders für ältere Patienten eine gute Therapieoption und im Vergleich zu anderen Substanzen kostengünstig. Aufgrund der niedrigen vollständigen Remissionsraten der Chlorambucil-Monotherapie wird sie allerdings nicht mehr für junge oder körperlich fitte Patienten eingesetzt (79). Das Ansprechen auf CLL liegt bei unbehandelten Patienten bei über 80%, bei behandelten Patienten zwischen 12-57%. Der Mechanismus ist nicht vollständig aufgeklärt. Die Vernetzung der DNS scheint neben der Aktivität an RNS und Proteinen die wichtigste Eigenschaft im Bezug auf CLL zu sein. Allerdings führen häufig eine erhöhte Metabolisierungsrate, die DNS-Reparatursysteme und Detoxifikation durch erhöhte Glutathionwerte zu einer Resistenz gegen Chlorambucil (7).

Cyclophosphamid

Cyclophosphamid ist ein intravenös oder oral applizierbarer Arzneistoff, der in seiner Wirksamkeit mit Chlorambucil vergleichbar ist. Oftmals ist er ein Ersatz bei Patienten, die eine Therapie mit Chlorambucil nicht vertragen. Es tritt sehr häufig Haarausfall auf, auf der anderen Seite ist der Wirkstoff aber weniger myelosuppressiv als Chlorambucil. Er kann als Einzelsubstanz verabreicht werden, wobei sich der Einsatz heute meist auf eine Kombinationstherapie beschränkt (142).

Bendamustin

Ein jüngerer Wirkstoff ist Bendamustin, welcher chemisch gesehen ein Stickstoff-Lost Derivat darstellt und 2010 für den europäischen Markt freigegeben wurde. In Studien

war Bendamustin Chlorambucil bezogen auf die Gesamtansprechraten und das progressionsfreie Intervall überlegen (67%/22 Monate gegen 30%/8 Monate) (79).

1.1.6.2 Purinanaloga

Fludarabin

Fludarabin gehört zu den am besten untersuchten Purinanaloga in der Behandlung der CLL (64). Es hemmt sowohl die DNS-Polymerase als auch die Ribonukleotid-Reduktase und führt dadurch zur Apoptose der malignen Zellen. In einer Studie mit 500 Patienten war Fludarabin Chlorambucil in der Gesamtansprechraten und den progressionsfreien Intervall überlegen (63%/25 Monate gegen 37%/20 Monate). Fludarabin ist gut verträglich, Nebenwirkungen sind häufig hämatologischer und immunologischer Art (21). Fludarabin wird oft als Kombinationstherapie mit einem Alkylanz oder einem monoklonalen Antikörper angewendet und ist weiterhin bei therapierefraktären Patienten wirksam (54).

Cladribin

Cladribin ist strukturell sehr ähnlich zu Fludarabin und Pentostatin und teilt dieselben Wirkmechanismen. Allerdings ist die Substanz nicht so gut untersucht wie Fludarabin. Im Vergleich zu Alkylantien hat Cladribin bessere Ansprechraten. Als Einzeltherapie ist die Wirkung von Cladribin bei therapienaiven Patienten am besten. In der Praxis wird es häufig als Kombinationstherapie verabreicht (81, 94, 146).

Pentostatin

Obwohl der Wirkmechanismus nicht vollständig aufgeklärt ist, wirkt Pentostatin als Inhibitor der Adenosin-Deaminase. Diese ist verantwortlich für die Desaminierung von Desoxyadenosin (dAdo) und Adenosin (Ado) zu Desoxyinosin und Inosin. Durch die Inhibierung steigen intrazellulär die Spiegel von Desoxyadenosintriphosphat (dATP) an. Aufgrund der Dysbalance an Desoxynukleotidtriphosphaten treten vermehrt DNS Einzelstrangbrüche auf, deren Reparatur verhindert wird. Als Folge wird über p53 die Apoptose eingeleitet (94).

1.1.6.3 Monoklonale Antikörper

Rituximab

Rituximab ist ein monoklonaler und chimärer Mensch-Maus Antikörper, der spezifisch an das Epitop CD20 bindet. CD20 ist ein Glykoprotein, welches nur auf Vorläufer B-Zellen und auf reifen B-Zellen zu finden ist. CLL Zellen exprimieren meist weniger CD20 als normale B-Zellen oder B-Zellen eines folliculären Lymphoms. Rituximab kann seine Wirksamkeit durch verschiedene Mechanismen entfalten, wie durch direkte Induktion von Apoptose oder Antikörper-/Komplementsystem-vermittelte Zytotoxizität. Die Einzeltherapie mit Rituximab hat eine geringe bis mittlere Wirksamkeit und muss bei der CLL in sehr hohen Dosen erfolgen. Um die Wirksamkeit zu erhöhen wird Rituximab meist in Kombination mit Fludarabin (FR) oder Fludarabin und Cyclophosphamid (FCR) verabreicht. Die häufigsten Nebenwirkungen sind Fieber, Hautausschlag und Schüttelfrost. Daher erfolgt häufig eine Prämedikation mit Paracetamol und Antihistaminika, um die Nebenwirkungen abzumildern. (81, 93, 167)

Ofatumumab

Ein neuerer CD20-Antikörper ist Ofatumumab. Er ist ein monoklonaler humanisierter Typ 1 CD20 Antikörper und wird eingesetzt für die Behandlung von Patienten, die gegenüber Alemtuzumab und Fludarabin therapierefraktär sind. Ofatumumab zeigt eine höhere Komplementsystem-vermittelte Wirkung im Vergleich zu Rituximab. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen unter anderem Neutropenie, Lungenentzündung, Husten, Durchfall, Anämie, Übelkeit, Bronchitis, Fieber und Infektionen der oberen Atemwege. Reaktionen auf die Infusion treten bei 44% während der ersten Behandlung mit 300 mg auf und bei 29% während der zweiten Behandlung mit 2000 mg (81, 93, 110).

Alemtuzumab

Alemtuzumab (früher Campath-1H) ist ein humanisierter IgG1-Antikörper, der gegen das Oberflächenantigen CD52 gerichtet ist. CD52 wird auf B- und T-Zell Lymphomen exprimiert. Bei der Monotherapie mit Alemtuzumab werden Ansprechraten von 33-53% erreicht. Die mittlere Ansprechdauer liegt bei 8.7 bis 15.4 Monaten bei Patienten, die bereits ein ausgeprägtes Krankheitsbild aufwiesen, eine Vorbehandlung mit alkylierenden Arzneistoffen erhalten haben oder sich

therapierefraktär gegenüber einer Fludarabin-Behandlung zeigten. Darüber hinaus ist Alemtuzumab eine effektive Therapieoption für Patienten, die eine Deletion auf Chromosom 11 oder 17 oder eine Mutation von *TP53* aufweisen. Als schwerwiegende Nebenwirkung kann es zu einer Immunsuppression kommen, die im weiteren Verlauf zu akuten Infektionen führen kann (79, 81). Mitte 2012 hat die Vertreiberfirma für den europäischen Markt trotz guter Wirksamkeit die Marktzulassung zurückgegeben. Zugelassen ist es in Zukunft nur noch für MS (Multiple Sklerose) und damit nur noch als *Off-Label-Use* verfügbar (56).

1.1.6.4 Stammzelltransplantation

Mit Hilfe der hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) ist es möglich, Patienten mit Knochenmarks- oder Immundefekten gesunde Stammzellen eines Spenders zu applizieren, um die physiologische Funktion des Knochenmarks wiederherzustellen. Dabei sind zwei Arten von Transplantationen möglich: Sind Spender und Empfänger zwei Personen, spricht man von einer allogenen Transplantation, werden dem Spender die eigenen Stammzellen transplantiert spricht man von einer autologen Transplantation. Als Vorbehandlung für eine Stammzelltransplantation werden die körpereigenen hämatopoetischen Stammzellen durch eine Chemotherapie oder Bestrahlung zerstört. Danach werden die gesunden Stammzellen appliziert, um sich im Knochenmark anzusiedeln.

Bei der CLL gilt die autologe Stammzelltransplantation als einzige potentiell kurative Therapie für Hochrisiko- und terapierefraktäre Patienten, obwohl sie sonst keine besseren Ergebnisse als eine Chemotherapie aufweist (52, 70).

1.1.6.5 Neue Therapieansätze

Neue und verbesserte Wirkstoffe und eine Behandlungsstrategie mit einer Kombination aus synergistischen Therapeutika haben die Behandlungsmöglichkeiten im Laufe der letzten Jahre stark verbessert. Trotz verlängerter Zeitabstände zu einem Rezidiv und besseren Remissionsraten bleibt die CLL aber weiterhin eine unheilbare und teils sehr schwer behandelbare Erkrankung. Für eine zukünftige verbesserte medikamentöse Therapie der CLL sind Wirkstoffe mit diversen Angriffspunkten in Erprobung. Obinutuzumab (GA101) stellt einen neuen monoklonalen, humanisierten CD20 Antikörper der 2. Generation dar, der durch das sogenannte Glykoengineering optimiert wurde. Mit Idealisib (CAL-101) befindet sich

ein neuer Kinase-Inhibitor in der klinischen Prüfung, der oral verfügbar ist und durch Inhibierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase Apoptose in CLL-Zellen induziert. Ibrutinib, ebenfalls ein Kinase-Inhibitor, ist ein oral verfügbarer Inhibitor von BTK (Bruton Tyrosin Kinase). Durch die Inhibierung von BTK werden daraufhin die Aktivierung von überlebensfördernden Signalkaskaden wie NF- κ B oder die MAP-Kinase über Src gehemmt. Über diesen Weg kann Ibrutinib Apoptose in CLL-Zellen induzieren und zeigt sich in ersten Untersuchungen signifikant wirksam bei rezidivierenden oder therapierefraktären Fällen. Die Bcl-2-Inhibitoren ABT-263 und ABT-199 sind ebenfalls oral verfügbar und können diverse Mitglieder der Bcl-Familie inhibieren, die normalerweise die Apoptose hemmen. ABT-263 führte in ersten Untersuchungen zu teils schwerwiegenden Thrombozytopenien, sodass mit ABT-199 ein jüngerer Wirkstoff mit besserem Nebenwirkungsprofil entwickelt wurde. Zu den immunmodulatorischen Wirkstoffen zählt Lenalidomid, ein struktureller Abkömmling des Thalidomids. Lenalidomid ist zu Behandlung des Multiplen Myeloms zugelassen, zeigt sich aber ebenfalls gut wirksam bei Hochrisiko-Patienten mit CLL.

Eine weitere Substanzklasse stellen die CDK-Inhibitoren (Cyclin-abhängige Kinase) dar. Durch Inhibition der CDK wird die Expression kurzlebiger Proteine, unter anderem antiapoptotischer Proteine, erniedrigt. Vertreter dieser Substanzklasse sind Dinaciclib (SCH727965) und Flavopiridol (HMR-1275), die sich derzeit in klinischen Studien befinden und bislang eine gute Wirkung auf CLL-Zellen aufweisen (42, 79, 82).

1.1.7 Apoptoseresistenz

Der Apoptose-Signalweg ist ein essentieller Prozess für alle Zellen des menschlichen Körpers. Er reguliert den geordneten Zelltod und ist verantwortlich für die genomische Stabilität. Viele einzelne Zellsignale können die Apoptose beeinflussen, unter anderem Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine oder Toxine. In CLL-Zellen ist der Apoptose-Signalweg jedoch gestört. Die CLL-Zellen können der Apoptose entgehen und ihr Überleben pathologisch verlängern. Der genaue Mechanismus der Apoptoseresistenz ist bis heute nicht vollständig geklärt. (9, 101).

CLL-Zellen haben nur eine mäßig erhöhte mitotische Aktivität. Die Zellen im peripheren Blut ruhen größtenteils in der G₀-Phase oder zu einem kleinen Teil in der G₁-Phase des Zellzyklus (129). Für die veränderte Apoptosefunktion können mehrere Faktoren verantwortlich sein.

Ein möglicher Faktor ist das Protein p53 bzw. das Gen *TP53*, ein wichtiger Teil des apoptotischen Systems, welches bei 7% der Patienten deletiert und/oder mutiert ist (vgl. 1.1.5.2). Eine Mutation von *TP53* führt zu einem aggressiven Krankheitsverlauf in Kombination mit einer schlechten Prognose und häufig zu einer Resistenz gegen Chemotherapeutika. Eine *TP53*-Mutation oder eine 17p-Deletion ist mit einer Häufigkeit von 25-50% für therapierefraktäre Fälle verantwortlich (181, 190).

Ebenfalls sind einige anti-apoptische Proteine in CLL-Zellen stark exprimiert. Ein Beispiel ist das Protein Bcl-2, welches die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und dadurch die Einleitung der Apoptose hemmen kann (132, 156). Die Expression eines weiteren Proteins der Bcl-Familie, des ebenfalls anti-apoptischen Proteins Mcl-1, korreliert stark mit dem Fehlschlagen einer vollständigen Remission (101).

Aus der Familie der die Apoptose verhindernden Proteine (IAP, Inhibitors of Apoptosis) ist das Protein XIAP in der CLL überexprimiert. XIAP kann direkt in den Caspase-Signalweg über eine Hemmung von PARP eingreifen (20, 43, 157).

Neben den beschriebenen Einflüssen auf die Apoptose in den CLL-Zellen können weitere Signalwege, wie der WNT Signalweg, der NFκB Signalweg oder die MAP-Kinase-Kaskade eine Rolle spielen (28, 134).

1.2 Der WNT Signalweg

Der WNT Signalweg umfasst eine Familie von 19 Molekülen, die sogenannten WNTs, die unter Säugetieren hochkonserviert und unter physiologischen Bedingungen für eine Vielzahl an Funktionen verantwortlich sind. Die größte Rolle spielt der Signalweg in der embryonalen Entwicklung, in der er Prozesse wie zum Beispiel Zellproliferation, Zellmigration oder die Achsenformung reguliert (22). In adulten Zellen ist der Signalweg meist vollkommen abgeschaltet. Die Entdeckung des WNT Signalweges geht auf Nusse und Vamus zurück, die 1982 ein neues murines Onkogen entdeckten, das sie *int1* (integration 1) nannten. Das Protein und seine Bedeutung wurden in weiterführenden Arbeiten an *Drosophila melanogaster* genauer erforscht. In *Drosophila melanogaster* war *int1* für die Segmentpolarität während der embryonalen Entwicklung verantwortlich. Aus einer Mutante dieses Genbereiches gingen Individuen ohne Flügel hervor, die in der Konsequenz als „*wingless*“ bezeichnet wurden. Die Namensgebung wurde dahin verändert, dass *int* in WNT (Wingless-related integration site)-Gene umbenannt wurden, was ebenfalls die

Proteine betraf (128, 145). Drei Arten des WNT Signalweges wurden bisher identifiziert: der kanonische WNT Signalweg, der WNT/Ca²⁺- und der Planare Zell-Polaritäts-Signalweg (WNT/PCP). Die klassischen WNT Moleküle (WNT 1, 3a, 8 und 8b) aktivieren den Signalweg durch die kanonische WNT Kaskade, während die nicht-klassischen WNT Moleküle (WNT 4, 5 und 11) die Kaskade durch Aktivierung der nicht-kanonischen Signalwege (WNT/Ca²⁺ und WNT/PCP) starten. Der klassische kanonischen WNT Signalweg ist ein wichtiger Bestandteil in der Embryogenese und Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen und auf diesem Gebiet sehr gut erforscht (23, 97, 128, 143).

1.2.1 Der WNT/PCP Signalweg und der WNT/Ca²⁺ Signalweg

Der WNT/PCP Signalweg wird durch Bindung von WNT-Proteinen an den Frizzled-Rezeptor aktiviert, der weitergehend das Protein Dishevelled (Dvl) rekrutiert und an die Plasmamembran anlagert. Ausgehend von Dishevelled kann die Kaskade über die GTPasen Rho oder Rac weiterlaufen. Rho kann über die Rho-kinase ROCK das Zytoskelett beeinflussen, während Rac über die MAP-Kinase JNK und im weiteren Verlauf im Nukleus über den Transkriptionsfaktor c-Jun die Transkription von Genen reguliert (97, 177) (siehe Abb. 3).

Der WNT/Ca²⁺ Signalweg wird ebenfalls durch die Anwesenheit von WNT-Proteinen initiiert. Die WNT-Proteine binden an den Frizzled-Rezeptor, wodurch über eine Rekrutierung von Dishevelled die Phospholipase C (PLC) aktiviert wird. Aktivierung der Phospholipase C führt zur Produktion der Second-Messenger Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) durch Hydrolyse von Membran-Phospholipiden. DAG und IP3 können, teilweise über die Freisetzung Calcium-Ionen am endoplasmatischen Retikulum, die Protein Kinase C (PKC) aktivieren, welche für die Regulation von Zellfunktionen wie Apoptose, Motilität oder Differenzierung verantwortlich ist (97, 106) (s. Abb. 3).

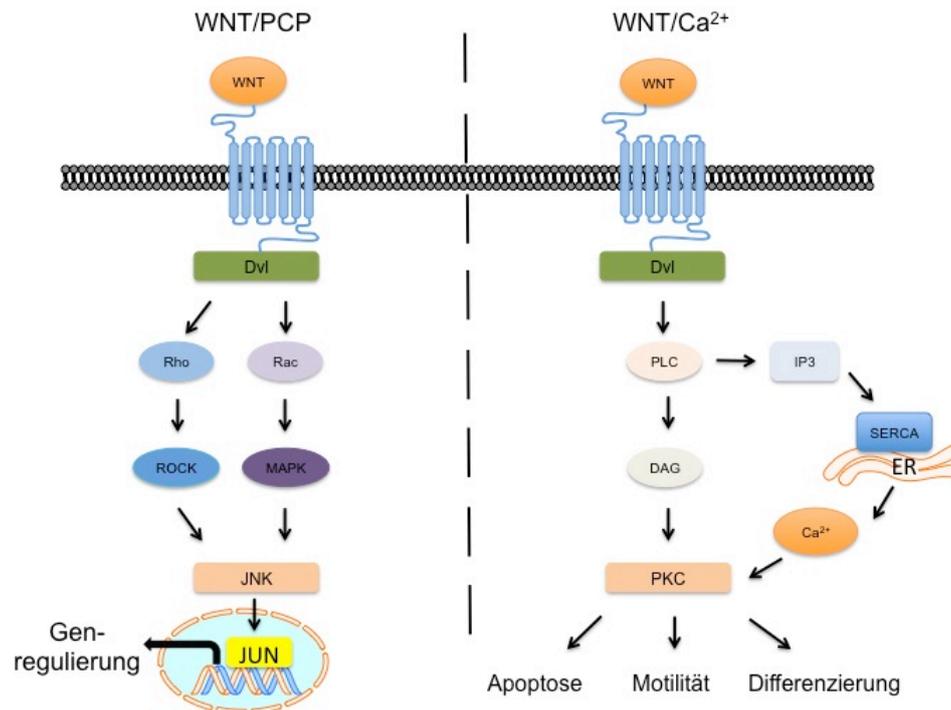


Abbildung 3: Der WNT/PCP Signalweg und der WNT/ Ca²⁺ Signalweg

Eigene Abbildung modifiziert nach Khan et al. 2006 unter Verwendung von motifolio® Vorlagen.

1.2.2 Die kanonische WNT/ β -Catenin Signalkaskade

Von den drei verschiedenen WNT-Signalkaskaden ist der kanonische Signalweg am besten untersucht. Den Mittelpunkt der kanonischen WNT-Signalkaskade bildet das Protein β -Catenin. In Abwesenheit von WNT-Proteinen steht der Abbau von β -Catenin im Zytoplasma im Vordergrund. Der Frizzled-Rezeptor durchzieht die Zellmembran mit sieben Transmembran-Domänen und verbindet den extrazellulären Raum mit dem Zytoplasma. Ebenfalls in der Zellmembran liegt der Korezeptor LRP 5/6 (lipoprotein receptor related protein 5/6), der im inaktiven Zustand nicht an den Frizzled-Rezeptor gebunden ist. LRP 5/6 kann zusätzlich in seiner Funktion durch Bindung von DKK1 (Dickkopf-related protein 1) an den Korezeptor inhibiert werden (116). Im Zytoplasma formt sich ein Multiproteinkomplex, der so genannte Destruktions-Komplex, welcher sich aus mehreren Proteinen mit verschiedenen Funktionen zusammensetzt. Das Protein Axin fungiert als Gerüstbildner. Daran gebunden werden die Kinase GSK3 β (Glykogen Synthase Kinase 3 β) und APC (Adenomatous-poliposis-coli Protein). Über den Destruktionskomplex wird freies β -Catenin aus dem Zytoplasma über einen dualen Kinasemechanismus durch die Hilfskinase CKI α (Casein Kinase 1 α) zuerst an Ser45 und dann durch GSK3 β an

Ser33, Ser37 und Thr41 phosphoryliert. Die Phosphorylierung initiiert die Ubiquitinierung und dadurch den Abbau in Proteasomen (1).

In Anwesenheit von WNT-Proteinen können die LRP5/6 Korezeptoren an den Frizzled-Rezeptor binden. Die Bildung des WNT/FZD/LRP-Komplexes aktiviert so das Dishevelled Protein. Dishevelled initiiert eine Phosphorylierung von LRP5/6 durch CKI und GSK3 β . Diese Phosphorylierung bildet eine Bindestelle für Axin. Es kommt im weiteren Verlauf zu einer Bindung des Destruktionskomplexes an den Rezeptor, womit die Abbaufunktion des Komplexes verhindert wird (188, 189). Freies β -Catenin kann im Zytoplasma akkumulieren und wird in den Nukleus transportiert. Im Nukleus initiiert β -Catenin mit den Transkriptionsfaktoren LEF-1 (lymphoid enhancer-binding factor-1) und den TCFs (T-cell specific transcription factors) die Transkription von WNT-spezifischen Zielgenen, die z.B. an der Proliferation oder Differenzierung beteiligt sind (33, 97, 144).

Neben ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren in Kombination mit β -Catenin können die LEF- und TCF-Proteine als Korepressoren fungieren. Dazu binden sie an die Transkriptions-Korepressoren Groucho und TLE (transducin-like enhancer of split proteins). Diese Proteine können selbst nicht mit der DNS interagieren, sondern brauchen für ihre Wirkungsentfaltung andere Proteine mit Bindungsfunktion. Die Gro/TLE Familie ist für eine Reihe von entwicklungsphysiologischen Funktionen verantwortlich (27). Die Funktion der Korepression ist nicht genau bekannt, aber sie scheint, ebenso wie die Aktivierung mit β -Catenin, mit dem Acetylierungsstatus von Histonen und der damit verbundenen Histon-Deacetylase Aktivität in Verbindung zu stehen (2, 13) (s. Abb. 4).

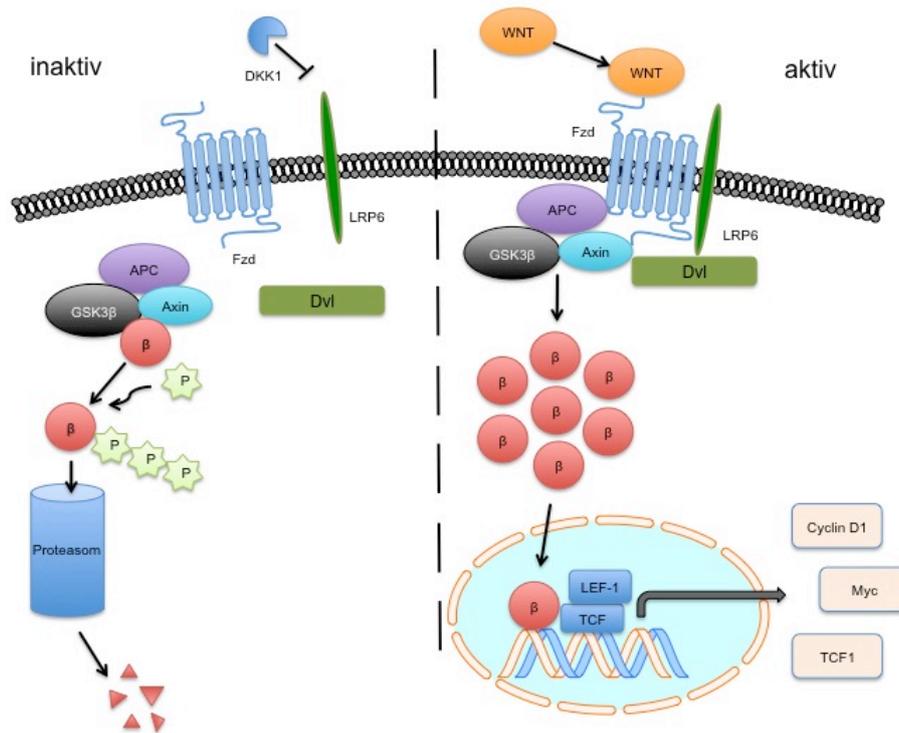


Abbildung 4: Die WNT/β-Catenin Signalkaskade

Eigene Abbildung modifiziert nach Khan et al. 2006 und Cadigan 2008 unter Verwendung von motifolio® Vorlagen.

1.2.3 Der WNT-Signalweg in der Entstehung von Neoplasien

Betrachtet man die verschiedenen essentiellen Funktionen des WNT-Signalwegs in Bezug auf Entwicklungsprozesse während der Zellentwicklung und der Homöostase in adulten Zellen, ist eine Rolle in der Entstehung von Neoplasien naheliegend. Einen ersten Hinweis fanden Rubinfeld et al. 1997 mit einer Stabilisation von β-catenin durch einen genetischen Defekt in einer Melanom-Zelllinie (150). Im Laufe der Zeit wurden Veränderungen von β-Catenin für Ovarial-, Hepatozelluläre- und Magenkarzinome beschrieben. Heute sind verschiedene Teile des WNT-Signalweges für ihre Beteiligungen an der Entstehung von malignen Erkrankungen bekannt. Eine sehr gut erforschte Beteiligung des WNT-Signalweges ist bei der Entstehung von soliden Tumoren über das Protein APC beschrieben. Bei der autosomal dominant vererbten Erkrankung FAP (Familiäre adenomatöse Polyposis) treten in über 80% der Fälle somatische Mutationen im APC-Gen auf, die in der Entstehung eines meist unvollständigen und nicht funktionalen Proteins münden können. Pathophysiologisch entwickeln die Erkrankten einen massiven Befall von Polypen im Dickdarm, die unbehandelt fast immer die Entwicklung eines Kolonkarzinoms zur Folge haben (58).

Außer APC sind Axin, LEF-1, LRP5/6 oder TCF in der Entstehung von Neoplasien beschrieben. Veränderungen des Korezeptors LRP5/6 treten im Zusammenhang mit Tumoren der Schilddrüse, aber auch bei nicht malignen Erkrankungen auf, wie zum Beispiel Koronarerkrankungen oder Osteoporose. Mutationen mit Funktionsverlust von Axin sind für hepatozellulären Karzinomen beschrieben (33, 135).

Darüber hinaus scheint der WNT-Signalweg eine Rolle in der Entstehung von Leukämien zu spielen. Sowohl bei leukämische Erkrankungen des lymphatischen als auch des myeloischen Systems gibt es Hinweise auf eine Beteiligung verschiedener Teile des WNT-Signalweges. Beim Krankheitsbild der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) konnte gezeigt werden, dass die Expression von LEF1 einen Einfluss auf die Krankheitsprognose und das Therapieansprechen hat (107). Ebenso wurden für das myeloische Krankheitsbild, die akute myeloische Leukämie (AML), variierende Expressionen von β -Catenin beschrieben, die mit der Überlebensdauer und der Rückfallwahrscheinlichkeit korrelieren (187). Patienten mit Multiplen Myelom (MM) zeigen häufig eine hohe Expression des Proteins DKK1, das innerhalb des WNT-Signalweges als Inhibitor des Korezeptors LRP5/6 fungiert. DKK1 inhibiert bei Patienten die Differenzierung Osteoblasten und wird mit Knochenauflösung innerhalb der Erkrankung in Verbindung gebracht (170).

1.2.4 Die Rolle des kanonischen WNT-Signalweges in der CLL

Neben verschiedenen anderen hämatologischen Erkrankungen wurde ebenfalls in der CLL eine Veränderung der WNT/ β -Catenin Signalkaskade gezeigt. 2003 konnte die Arbeitsgruppe von Lu et al. zeigen, dass die Expressionslevel verschiedener WNT-Proteine (WNT3, 5b, 6, 10a, 14 und 16) und des Frizzled-Rezeptors 3 (Fzd3) in CLL-Zellen im Vergleich zu gesunden B-Zellen und PBMCs stark erhöht waren. Durch Beeinflussung der Signalkaskade mit spezifischen Wirkstoffen konnte ein Zusammenhang zwischen dem WNT-Signalweg und dem Überleben der CLL Zellen *in vitro* demonstriert werden. Durch Hemmung der Kinase GSK3 β mit dem Inhibitor SB-216763 und den daraus folgenden Funktionsverlust des Destruktionskomplexes zeigte sich eine Induktion von β -Catenin, die mit einer erhöhten Überlebensrate der CLL Zellen verknüpft war. Darüber hinaus wurde über eine Inhibition der WNT/ β -Catenin Kaskade mit dem nichtsteroidalen Antirheumatikum (NSAR) R-Etodolac die Apoptose in den CLL-Zellen ausgelöst. Eine spätere Arbeit zeigt die Herabregulation von WNT-Zielgenen in CLL-Zellen durch das Diuretikum Ethacrynsäure. Dieses

fungiert als WNT-Inhibitor und bindet LEF-1. In der Folge wird über diese Bindung der LEF-1/ β -Catenin-Komplex destabilisiert und die Expression von WNT-Zielgenen herunterreguliert. Diese Untersuchungen legen nahe, dass durch die Beeinflussung der WNT/ β -Catenin-Kaskade neue Therapieansätze für die Behandlung der CLL möglich sind (113, 114).

Im weiteren Verlauf konnten Lu et al. zeigen, dass der Transkriptionsfaktor LEF-1 und in der Konsequenz das Zielgen Cyclin D1 überexprimiert sind (114). Ähnliche Ergebnisse wurden von zwei anderen Arbeitsgruppen belegt. Erdfelder et al. konnten zeigen, dass zum einen LEF-1 in CLL-Zellen überexprimiert wird und dass zum anderen die LEF-1 Expression eng mit dem Vorhandensein von ZAP-70, hohen Lymphozytenzahlen im peripheren Blut und der Prognose korrelieren (55).

Die Arbeitsgruppe um Gutierrez et al. zeigte ebenfalls die Überexpression von LEF-1 in CLL. Sowohl in mutierten als auch in unmutierten Proben von CLL-Zellen zeigte sich eine erhöhte Aktivität des WNT-Signalweges gegenüber gesunden B-Zellen (73).

In einigen Fällen zeigen CLL-Zellen ein Problem bei der Inhibierung der Ko-Rezeptors LRP6 durch das DKK1-Protein. Obwohl die CLL-Zellen erhöhte Expression von DKK1 *in vivo* aufweisen, scheint die Anwesenheit von hohen Mengen an DKK1 den WNT-Signalweg bei CLL-Zellen *in vitro* nicht zu hemmen, was auf eine Veränderung der Bindestelle am Korezeptor oder am Ligand DKK1 hindeuten könnte (59).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass CLL-Zellen durch eine erhöhte Expression verschiedener WNT-Proteine und spezifischer Zielgene charakterisiert sind. Durch Veränderungen einzelner Komponenten zeigt sich eine mögliche Beeinflussung der Zellentwicklung in Richtung Überleben oder Apoptose. Durch diesen direkten Einfluss ist der WNT-Signalweg ein potentiell Ziel für die Entwicklung neuer Wirkstoffe.

1.3 Die Wirkstoffe QS11, Pyrvinium pamoat, XAV939, JSK, Trichostatin A und SAHA

QS11

Die Substanz QS11 wirkt über eine Inhibition von ARFGAP1 (GTPase activating protein of ADP-ribosylation factor 1), wobei der Mechanismus nur teilweise aufgeklärt ist. Die Proteinfamilie der ARFGAPs reguliert die ARF-Proteine (small GTPase ADP-

ribosylation factors). Innerhalb der Klasse der Säugetiere existieren sechs verschiedene ARFs, die für zahlreiche biologische Prozesse verantwortlich sind, unter anderem für den Vesikel-Transport und die Organisation des Zytoskeletts. ARFGAPs sind für die Inaktivierung von ARF über eine Hydrolyse des gebundenen GTPs verantwortlich. QS11 entfaltet seine Wirkung über die Inhibition von ARFGAP, wodurch es zu einem Anstieg der Menge an aktiviertem ARF kommt und dadurch zur Translokation von β -Catenin. Dadurch wirkt QS11 als WNT-Aktivator, die Wirkung ist allerdings abhängig von der Anwesenheit von WNT Molekülen (193).

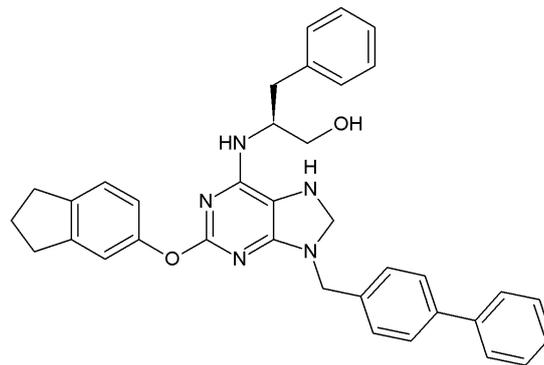


Abbildung 5: Die Struktur von QS11

((2S)-2-[2-(Indan-5-yloxy)-9-(1,1'-biphenyl-4-yl)methyl]-9H-purin-6-ylamino]-3-phenylpropan-1-ol)

Pyrvinium pamoat

Der Wirkstoff Pyrvinium pamoat ist ein zugelassener Arzneistoff aus der Gruppe der Antihelminthika. Darüber hinaus ist er als starker Inhibitor des WNT-Signalweges beschrieben. Während in älteren Publikationen eine Aktivierung der Prä-Kinase $CKI\alpha$ als Wirkmechanismus beschrieben wurde, gibt es nach neueren Erkenntnissen keine Prä-Kinase-Aktivierung, sondern eine Aktivierung der Kinase GSK3 und eine Herabregulierung von Akt und der Proteinkinase B (PKB). Für den Wirkstoff sind inhibierende Eigenschaften für die Proliferation von Myeloma- und leukämischen Zellen beschrieben (87, 178)

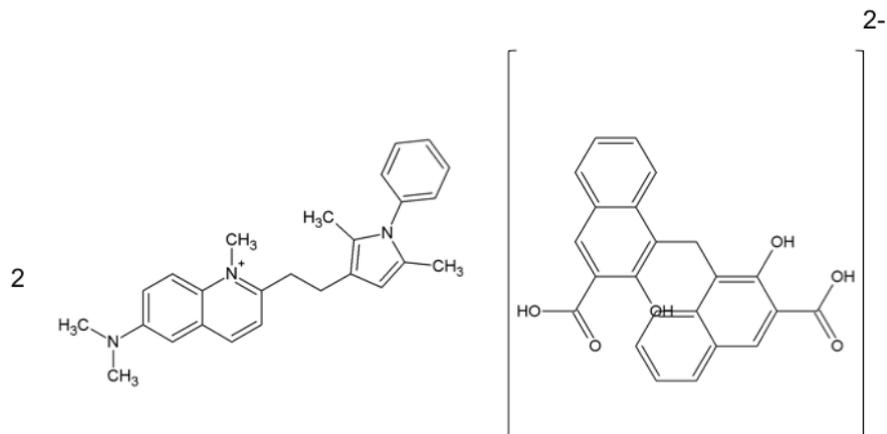


Abbildung 6: Die Struktur von Pyrvinium pamoat

(6-(Dimethylamino)-2-[2-(2,5-dimethyl-1-phenyl-1H-pyrrol-3-yl)ethenyl]-1-methyl-4,4'-methylenebis[3-hydroxy-2-naphthalenecarboxylate])

XAV939

XAV939 inhibiert die Enzyme Tankyrase 1 und 2. Die Tankyrasen sind eine innerhalb von vielen Spezies evolutionär konservierter Proteinklassen. Sie sind physiologisch an den menschlichen Telomeren lokalisiert und können an TRF1 (telomeric repeat binding factor-1), einen negativen Regulator der Telomerlänge, binden und diesen beeinflussen. In Bezug auf den WNT-Signalweg konnte in HEK293 Zellen gezeigt werden, dass XAV939 durch Inhibierung der Tankyrasen Axin stabilisieren kann und zusätzlich die proapoptotischen Proteine der PARP-Familie hemmt, die eine Struktur ähnlich den Tankyrasen aufweisen. *In vitro* wurde gezeigt, dass XAV939 das Wachstum der DLD-1 Kolonkazinom-Zelllinie hemmen kann, die β -Catenin-abhängig ist (88).

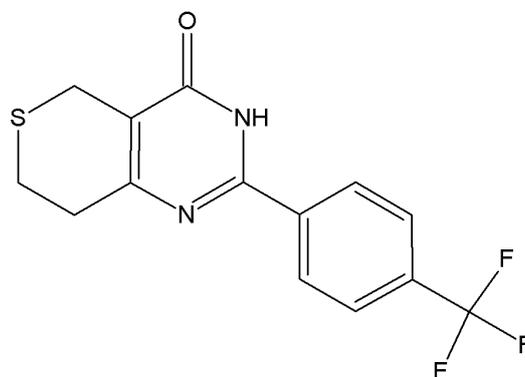


Abbildung 7: Die Struktur von XAV939

(3,5,7,8-Tetrahydro-2-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-4H-thiopyrano[4,3-d]pyrimidin-4one)

JSK

JSK ist ein Prodrug, welches als Stickstoffdonator fungiert. Stickstoffmonoxid (NO) kann bei AML-Zellen das Zellwachstum hemmen und Apoptose induzieren. Es wird *in vivo* im Tierversuch gut vertragen und als Prodrug wahrscheinlich mit Hilfe von Glutathion/Glutathion-S-Transferase über einen Schwefel-abhängigen Mechanismus aktiviert (159). In leukämischen Zelllinien zeigte JSK eine Reduktion von β -Catenin und Cyclin D1 im Nukleus, während die Spiegel im Zytoplasma unverändert blieben (126).

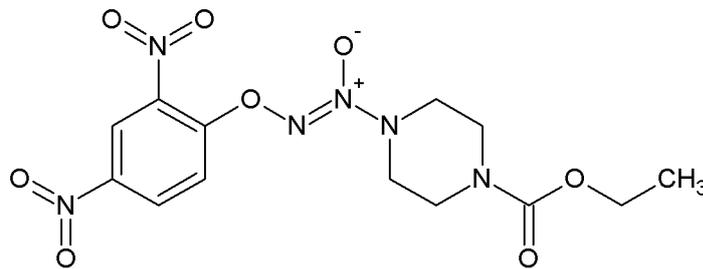


Abbildung 8: Die Struktur von JSK

(O²-(2,4-Dinitrophenyl) 1-[(4-ethoxycarbonyl)piperazin-1-yl]diazene-1,2-diolate)

Trichostatin A

Trichostatin A (TSA) ist ein natürlich vorkommender Wirkstoff, der zuerst 1975 isoliert und beschrieben wurde. Er wurde zu Beginn aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert und ist ein antifungizides Antibiotikum, welches gegen Trichophyten und eine andere Pilzarten wirksam ist. Später konnten Yoshida et al. zeigen, dass TSA als potenter Inhibitor der Histondeacetylase in diversen Zelllinien fungiert. In Fibroblasten von Ratten bewirkt TSA eine Zyklusarretierung in der G1- und G2-Phase. In Brustkarzinomzellen zeigte TSA *in vitro* und eine starke antiproliferative Wirkung durch eine Hyperacetylierung an Histon H4. Bei der Ratte als Tiermodell zeigt es bei einem Versuch mit Mammakarzinomzellen sowohl gute Verträglichkeit (zwischen 500 μ g/kg und 5mg/kg) als auch eine Effektivität gegenüber den Karzinoma-Zellen (173, 179, 185). In Kolonkarzinom-Zellen zeigte sich unter Behandlung mit Trichostatin A eine starke Expression des Proteins DKK1, welches über den Korezeptor LRP5/6 regulierenden Einfluss auf den WNT-Signalweg ausübt (161).

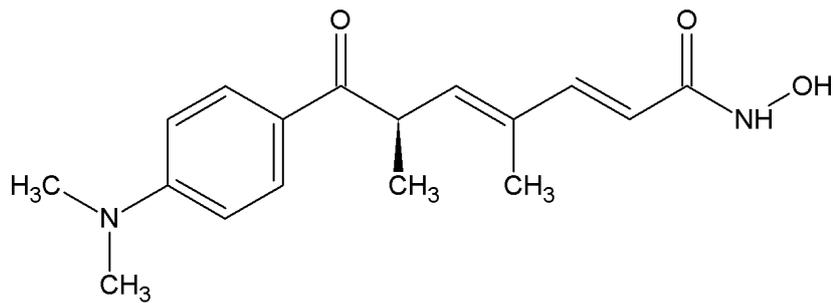


Abbildung 9: Die Struktur von Trichostatin A

(TSA, [R-(E,E)]-7-[4-(Dimethylamino)phenyl]-N-hydroxy-4,6-dimethyl-7-oxo-2,4-heptadienamide)

SAHA

SAHA (Suberoylanilid-Hydroxamsäure) ist unter dem Wirkstoffnamen Vorinostat für die Behandlung des kutanen T-Zell Lymphoms (CTCL) zugelassen. SAHA ist ebenfalls ein Histondeacetylase-Inhibitor (HDACi), der oral verfügbar ist. Die häufigsten Nebenwirkungen sind Thrombozytopenie, Durchfall, Übelkeit, Müdigkeit und Geschmackstörungen. SAHA inhibiert die enzymatische Aktivität der Klasse I Histondeacetylasen (HDAC1, 2 und 3) und der Klasse II (HDAC6) im nanomolaren Bereich ($IC_{50} < 86 \text{ nm}$) (91).

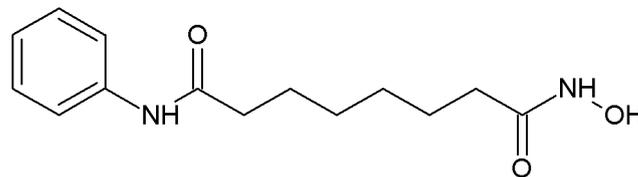


Abbildung 10: Die Struktur von SAHA

(Vorinostat, N-hydroxy-N'-phenyl-octanediamide)

1.4 Die HDACi der Hydroxamat-Familie

Die Gruppe der Histon-Deacetylase Inhibitoren (HDACi) lässt sich gemäß der chemischen Eigenschaften in insgesamt fünf große Gruppen einordnen. Zu diesen Gruppen zählen die kurzkettigen Fettsäuren, die Hydroxamate, die Benzamide, die zyklischen Tetrapeptide und die elektrophilen Ketone.

Trichostatin A gehört zu den Hydroxamaten, die chemisch gesehen aus drei Teilen aufgebaut sind. Sie besitzen eine Deckel-Struktur (capping group), ein Kohlenstoff-Verbindungsstück (carbon linker) und einen Metall-bindenden Teil (metal binding moiety). Innerhalb der Hydroxamat-Gruppe ist bisher ein Arzneistoff zur Behandlung am Menschen zugelassen. 2006 ließ die amerikanische FDA (Food and Drug

Administration) den Wirkstoff Vorinostat (chemische Abkürzung: SAHA) zur Behandlung des kutanen T-Zell Lymphoms zu.

In der unten stehenden Abbildung 11 sind die strukturellen Gemeinsamkeiten von drei Vertretern der Hydroxamat-Gruppe zu sehen. Neben Trichostatin A und Vorinostat ist die Substanz Panobinostat zu sehen, die sich momentan in der klinischen Phase III zur Behandlung von kutanem T-Zell Lymphom und Hodgkin-Lymphom befindet.

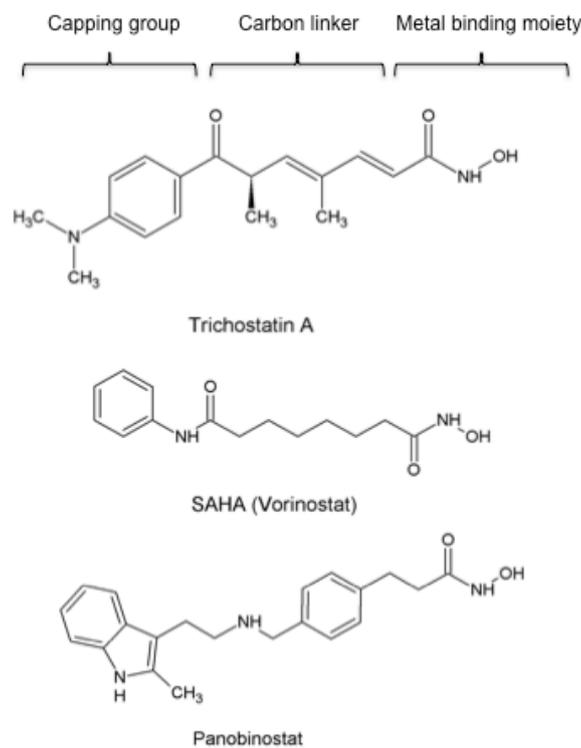


Abbildung 11: Strukturelle Übersicht von Substanzen der Hydroxamat-Familie

1.5 Hypothese und Zielsetzung der Arbeit

In den einleitenden Kapiteln dieser Arbeit wurde die Bedeutung des WNT-Signalweges bei der Entstehung von verschiedenen Krankheiten, insbesondere der hämatologischen Erkrankungen, beschrieben. Vieles deutet darauf hin, dass der abnormen Aktivierung der WNT-Kaskade eine große Bedeutung bei der Entstehung der CLL zukommt. Daher befasst sich diese Arbeit mit der Bedeutung der einzelnen Bestandteile für den WNT-Signalweg, ihrer Funktionalität, möglichen Funktionsstörungen und der Suche nach neuen Zielstrukturen für kommende Wirkstoffentwicklungen.

Folgende Fragestellungen werden experimentell behandelt:

1. Sind die Gene der Proteine des Destruktionskomplexes, der Transkriptionsfaktoren und des Hauptproteins β -Catenin intakt oder sind Mutationen in der CLL vorhanden?
2. Ist es möglich, einzelne Proteine der Signalkaskade mit Wirkstoffen zu beeinflussen und eine Funktionsänderung der CLL Zellen zu erreichen?
3. Sind einzelne Proteine spezifische Angriffspunkte für eine mögliche Wirkstoffentwicklung?
 - a. Ist es möglich, einen spezifischen WNT-Wirkstoff für CLL Zellen ohne Wirkung/Nebenwirkung auf andere Zelltypen oder gesunde Zellen zu finden?
 - b. Wie funktioniert der Wirkmechanismus in CLL Zellen? Wie hoch ist die Effektivität, Selektivität und Toxizität der Wirkstoffe gegenüber CLL Zellen und gesunden Zellpopulationen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysenwaage	TE153S Sartorius, Göttingen, Deutschland
	Kern 440-45, Albstadt, Deutschland
Durchflusszytometer	Beckmann Coulter Galios, Krefeld, Deutschland
Fotoentwickler	Curix 60, Agfa, Mortsel, Belgien
Gelelektrophorese	Hoefer HE33 Mini Horizontal Submarine Unit, Holliston, USA
Netzgerät	BioRad Power Pac 1000, München, Deutschland
Immunoblotsystem	Xcell II Blot Module, Invitrogen, Carlsbad, USA
Netzgerät	peqPower 300V, Peqlab, Erlangen Deutschland
Light Cycler	LightCycler® 2.0 Instrument, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Light Cycler Carousel Centrifuge 2.0	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Luminometer	Beckmann Coulter Paradigm® Detection Platform, Krefeld, Deutschland
	MicroLumatPlus, EG&G Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
Mikroskop	Axiolab, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
PCR Thermocycler	T3000, Analytik Jena, Jena, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Pipettus Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
pH-Meter	pH Level 1, inoLab, Weilheim, Deutschland
Schüttler	MTS4, Ika, Staufen, Deutschland
Sterilwerkbank	HLB 2448, Heraeus, Hanau, Deutschland
Wasseraufbereitung	Millipore Elix Advantage, Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	GFL-1004, Gesellschaft für Labor- technik, Großburgwedel, Deutschland
Zentrifugen	Biofuge pico, Heraeus, Hanau, Deutschland Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland Labofuge 400R pico, Heraeus, Hanau, Deutschland
2.1.2 Verbrauchsmaterial	
FACS Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
FACS Isoflow	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
FlowClean Cleaning Agent	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Kryoröhrchen 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Leucosep® Zentrifugenröhrchen	Greiner, Solingen, Deutschland
PCR Strips	Biozym Scientific GmbH, Hess, Deutschland
PCR Sequencing Strips	Greiner, Solingen, Deutschland
Pipettenspitzen 1µl-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PVDF-Membran Immobilion®	Millipore, Darmstadt, Deutschland

2 Material und Methoden

Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Rotilabo-Blottingpapiere 1,0 mm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sterile Plastikpipetten 5/10/25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkultur Multiwell-Platten 6-well, 12-well, 24-well, 96-well	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner, Solingen, Deutschland

2.1.3 Laborkits, Assays

Big Dye Terminator 3.1 sequencing kit	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
CellTiter-Glo® Luminescent cell viability assay	Promega, Mannheim, Deutschland
Caspase-Glo®-3/7 assay	Promega, Mannheim, Deutschland
ExoSap-IT kit	USB, Ohio, USA
Fast Start PCR Mastermix	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
MACS B cell isolation kit II	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
RNA Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RosetteSep B cell enrichment cocktail	Stemcell Technologies, Köln, Deutschland
Vivaspin 500	Sartorius Stedim, Göttingen, Deutschland
WNT pathway library	Enzo Lifesciences, Lörrach, Deutschland

2.1.4 Antikörper

Die Lagerung der Antikörper erfolgte gemäß der Herstelleranweisung bei 4°C oder gefroren bei -20°C.

2.1.4.1 Primärantikörper

Acetyl-Histon H4 (Lys12) #2591	CellSignaling, Massachusetts, USA
β-actin #A5316	Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland
APC #1701-1	Epitomics, Burlingame, USA
AXIN1 #2087	CellSignaling, Massachusetts, USA
PARP #9542	CellSignaling, Massachusetts, USA

2.1.4.2 Sekundärantikörper

Anti-rabbit IgG, HRP-linked #7074	CellSignaling, Massachusetts, USA
HRP donkey anti-rabbit #406401	Biolegend, London, England
HRP goat anti-mouse #405306	Biolegend, London, England

2.1.4.3. Rekombinante Proteine

Annexin V-FITC	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
----------------	-------------------------------------

2.1.5 Chemikalien, Reagenzien, Puffer, Enzyme

7-AAD Lösung	Biolegend, London, United Kingdom
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Annexin V Binding Buffer	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bendamustin	Mundipharma, Limburg a.d. Lahn, Deutschland
Complete mini® Tabletten	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland
Dulbecco's PBS	PAA, Cölbe, Deutschland
dNTP Mix 10M	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fötale Kälberserum (FCS) Gold	PAA, Cölbe, Deutschland
Flow-Check Pro Fluorospheres	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland

2 Material und Methoden

Fludarabin	Actavis, München, Deutschland
GeneRuler 100kB	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
HEPES	Gibco, Carlsbad, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
JSK	Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland
Kochsalzlösung (0.9%)	Braun, Melsungen, Deutschland
Lymphocyte® LSM 1077	PAA, Cölbe, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mammalian Protein Extraction (M-PER)	Thermo Fischer, Keicestershire, United Kingdom
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE® Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Oligo Hexamer dT	Invitrogen, Carlsbad, USA
PBS-Tabletten	Gibco, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe, Deutschland
Ponceau-Rot	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PhosphoStop® Tabletten	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Protein Standard Micro	Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland
Proteinstandard „Leiter“	Spectra BR Multicolor Broadrange Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Pursept-A Express	Merz, Frankfurt, Deutschland
Revert Aid Premium	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
RNAseH	Invitrogen, Carlsbad , USA

Roti®-Block (10x)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Free Stripping Buffer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Nanoquant	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640-Medium + L-Glutamin	PAA, Cölbe, Deutschland
RNA later	Qiagen, Hilden, Deutschland
RT Buffer 5x	Fermentas, Vilnius, Litauen
SAHA (Vorinostat)	Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland
Salzsäure (37%)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
SuperSignal West Femto Chemoluminescent Substrate	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Sybr® Green PCR Mix	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Trichostatin A	Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland
XAV939	Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland

2.1.6 Wirkstoffe

Die Wirkstoffe der WNT-Bibliothek wurden in DMSO zu einer Stammkonzentration von 100 µM gelöst und zu gewünschten Konzentrationen verdünnt. Die Einzelwirkstoffe Trichostatin A, JSK, XAV939 und SAHA wurden ebenfalls in DMSO gelöst und aliquotiert. Die Wirkstoffe Bendamustin und Fludarabin lagen gelöst in Kochsalzlösung (0,9%) vor und wurden mit steriler Kochsalzlösung weiterverdünnt. Alle Wirkstofflösungen wurden bei -20°C gelagert.

2.1.7 Zusammensetzung und Herstellung verwendeter Flüssigkeiten

Kulturmedium:

10% (V/V) FCS, 1% Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10mg/ml) in RPMI-1640 Medium (Zubereitung unter sterilen Bedingungen und anschließende Lagerung bei 4°C)

PBS: 1 Tablette auf 500 ml bidestilliertes Wasser (pH-Einstellung auf 7.4)

TBS: 6,05 g Tris (50 mM) und 8,76 g NaCl (150 mM) in 800 ml Wasser (pH-Einstellung 7,5) mit 1 M HCl und auf 1 Liter mit Wasser auffüllen

TBST: 1 ml Tween 20 in 1 Liter TBS Puffer lösen

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Aufarbeitung des Patientenmaterials:

2.2.1.2 Isolierung von CLL-Zellen

Alle Untersuchungen wurden gemäß der World Medical Association Declaration of Helsinki (6th revision, Seoul, Southkorea, 2008) durchgeführt und sind durch die Ethikkommission der Uniklinik Köln genehmigt (Genehmigung Nr. 11-319). Alle Arbeitsschritte wurden steril mit Hilfe des Laminar-Airflow-Systems sowie sterilen Reagenzien und Gefäßen durchgeführt. Das Blut für die Zellisolierung wurde als Vollblut durch Venenpunktion gewonnen und nach der Entnahme durch die CLL Biobank Köln innerhalb von 24 h aufgearbeitet. Vor Arbeitsbeginn wurden die Reagenzien auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Die CLL-Zellen wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation separiert. Dafür wurde das Vollblut zunächst mit RosetteSep® in einer Konzentration von 40 µl pro ml Vollblut versetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. RosetteSep® ist ein Antikörper Cocktail der während der Inkubation nicht gewünschte Blutbestandteile miteinander vernetzt und sogenannte Immunorosetten bildet. Nach der Inkubation wird das Blut mit PBS/2%FCS zu gleichen Teilen verdünnt und vorsichtig auf eine vorgelegte Menge Lymphocyte Separation Medium, einem hydrophilen Polymer mit einem Gewicht von 400.000 Dalton, aufgeschichtet. Das Lymphocyte Medium hat eine Dichte von 1,077 g/ml (bei 20°C). Bei der Dichtegradienten-Zentrifugation im Anschluss (1500 rpm, 15 min, RT, ohne Bremse) sedimentieren nicht benötigte Blutbestandteile und es bildet sich ein Ring zwischen Lymphocyte und dem Medium, der die B-Zellen enthält. Diese Ringschicht wird vorsichtig abgenommen, nochmals mit der doppelten Menge PBS/2% FCS gewaschen und abzentrifugiert (1200 rpm, 10 min, RT). Das Zellpellet wird in RPMI Medium (10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) aufgenommen.

2.2.1.3 Isolierung von PBMCs

Das Blut wurde analog zum CLL-Blut durch Venenpunktion im EDTA-Röhrchen gewonnen. Der Aufreinigungsprozeß ist ebenfalls mit dem der CLL Zellen vergleichbar, jedoch entfällt das Versetzen mit RosetteSep®. Die Zellen werden direkt mit PBS/2% FCS vermischt und auf das Lymphocyte-Medium geschichtet.

2.2.1.4 Isolierung gesunder B-Zellen

Gesunde B-Zellen wurden ebenfalls aus Vollblut gewonnen. Zur Zellseparation wurde das B-Cell Isolation Kit II verwendet. Das Prinzip der B-Zellen Isolation mit diesem Kit ist eine Negativ-Selektion von Nicht-B-Zellen. Dazu wird das Blut mit einem Cocktail aus Biotin-konjugierten monoklonalen Antikörpern ($10\mu\text{l}$ pro 10^7 Zellen) versetzt und für 10 Minuten im Kühlschrank ($2-8^\circ\text{C}$) inkubiert. Danach gibt man pro 10^7 Zellen $20\mu\text{l}$ monoklonale Anti-Biotin Antikörper, die an MicroBeads gebunden sind zum Ansatz hinzu und inkubiert für 15 Minuten im Kühlschrank. Die Zellen werden danach mit Puffer (PBS/0,5% BSA/2mM EDTA) gewaschen und bei 1200 rpm 10 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wird erneut in Puffer aufgenommen. Die Säule zur Separation wird in den dazugehörigen MACS Magneten eingespannt und mit Puffer mehrfach befeuchtet. Danach wird die Zellmischung auf die Säule gegeben. Die B-Zellen wurden als separate Fraktion in Form des durchlaufenden Fluids aufgefangen, während die an MicroBeads konjugierten restlichen Zellen in der Säule magnetisch gebunden wurden. Nach zweimaligem Waschen erhält man die reinen B-Zellen als Eluat.

2.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl wurde teils manuell und teils automatisiert durchgeführt. Für die manuelle Zählmethode wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Die Zählkammer ist in 4 Quadranten eingeteilt. Die zu erfassende in PBS gelöste Zellsuspension wurde in 2 Konzentrationen (1:20, 1:200) nacheinander pro Quadrant der Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Mittels Trypanblaufärbung im Verhältnis 1:1 können dabei tote Zellen ausgeschlossen werden. Dabei erscheinen tote Zellen farbig, da lebende Zellen den Farbstoff aktiv ausschleusen können. Die Zellzahl wurde folgendermaßen berechnet:

$$N = n * 10000 * F$$

N = Zellzahl/ml Medium

n = Mittelwert der Einzelwerte aus den 4 Quadranten

F = Verdünnungsfaktor

Die automatisierte Zählung der Zellzahl und die Viabilität wurde mit dem Vi-Cell XR Zellzähler von Beckmann Coulter bestimmt. Dazu wurden $50\mu\text{l}$ Probe mit RPMI

Medium auf 500µl aufgefüllt. Der Zellzähler vermisst von dieser 1:10 Verdünnung mit Hilfe digitaler Bildtechnologie die Zellzahl und bestimmt mittels Trypanblau Färbung die Viabilität.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden – DNS-Sequenzierung

2.2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren (RNS und DNS)

Die Extraktion von RNS erfolgte mit Hilfe des RNA Plus Mini Kit gemäß der Anleitung des Herstellers. Für die Gewinnung wurden jeweils 1×10^7 Zellen verwendet, die nach der Inkubation mit Lyse Puffer/1% Dithiothreitol lysiert wurden. Die Konzentration und Reinheit der RNS wurde mit dem Eppendorf® BioPhotometer® photometrisch bestimmt. Das Biophotometer vermisst die Probe bei 260 nm, um für die Konzentration der Nukleinsäuren zusätzlich bei 230, 280, 320 nm und den Quotienten E_{260}/E_{280} und E_{260}/E_{230} zu analysieren. Durch diese Wellenlängen und Quotienten werden Verunreinigungen, z.B. durch Proteine und Salze, ausgeschlossen. Die PCR auf RNS Basis wurde für GSK3β, LEF1 und β-Catenin sowie für die quantitative PCR verwendet.

Nach der Extrahierung der RNS wurde diese in komplementäre DNS (cDNA) transkribiert. Dafür wurde eine PCR-Mischung (Random Hexamer Primer (0,75 µl), dNTP Mix 10 mM (1,5 µl), 5xRT Buffer (6 µl), Ribolock (0,5 µl) und Revert Aid Premium Reverse Transkriptase (1µl)) zur RNS gegeben und bei folgendem Temperaturprogramm reagiert:

Tabelle 3: Temperaturprogramm für cDNS Gewinnung mit Hilfe der reversen Transkriptasereaktion

Schritt	Temperatur	Zeit
1	RT	10 min
2	50°C	30 min
3	85°C	5 min

Genomische DNS wurde mit dem QIAmp DNA Mini Kit von Qiagen gemäß der Anleitung aus 1×10^7 Zellen extrahiert. Die Konzentration und Reinheit wurde analog zur RNS bestimmt. Die PCR zu APC und AXIN1 wurde mit genomischer DNS durchgeführt.

Die DNS und cDNS wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.2 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion ist ein Verfahren, um eine geringe Menge eines definierten Abschnitts von DNS zu vervielfältigen. Dazu werden die DNS, zwei Primer, DNA-Polymerase, Magnesium-Ionen für die Funktion der Polymerase, freie Nukleotide und Pufferlösung in einem bestimmten Verhältnis gemischt. Die in dieser Arbeit verwendeten Verhältnisse sind im Folgenden aufgelistet. Die PCR findet in einem Thermocycler, in diesem Fall dem biometra Thermocycler T3000, nach einem definierten Temperaturprogramm statt. Zuerst wird der DNS Doppelstrang bei ca. 95°C denaturiert (engl. melting). Danach wird auf ca. 55-65°C abgekühlt (je nach Schmelzpunkt der Primer) und es kommt zur Anlagerung der Primer (engl. annealing). Im dritten Schritt wird die Temperatur auf die optimale Gradzahl für die Polymerase erhöht, im Fall der verwendeten Taq-Polymerase auf 72°C. Die Polymerase verlängert die getrennten Stränge vom 3'-Ende der Primer aus mit den freien Nukleotiden. Die drei Temperaturzyklen werden mehrfach wiederholt, bis die gewünschte Menge an DNS amplifiziert ist. Die verwendeten Primer wurden mit dem Programm Primer3 für die jeweilige DNS erstellt, wobei darauf geachtet wurde, dass diese spezifisch binden und sich Primerpaare in den Schmelzpunkten ähnlich waren.

2.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Produkte der PCR können mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und der Größe nach zugeordnet werden. Zur Analyse der DNS-Fragmente wurde ein 1%iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurde Agarosepulver mit TAE-Puffer eingewogen und in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Verdampfter Puffer wurde nach dem Erhitzen ersetzt. Zum Agarosegemisch wurde der Farbstoff Ethidiumbromid hinzugefügt (6 µl auf 100 ml) und dann zum Aushärten in einen Träger gegossen. Während der Elektrophorese wird eine konstante Spannung angelegt (120 V für 45 min) wodurch die negativ geladene DNS im elektrischen Feld in Richtung Kathode wandert. Dabei trennt sich die DNS ihrer Größe nach durch die Agarosematrix auf. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNS und verändert dadurch das Absorptionsspektrum, ein Effekt der durch UV-Licht sichtbar zu machen ist. Die Größe der DNS lässt sich gegen die als Standard aufgetragene DNS-Leiter ablesen.

2.2.2.4 PCR der verschiedenen Zielstrukturen

Die Ansätze für die PCR wurden wie folgt zusammengemischt:

Tabelle 4: Zusammensetzung der PCR-Ansätze

Reagenzien	Menge
Roche Master Mix	12,5 µl
Primer <i>for</i> (Stock 10 µM) / Primer <i>rev</i>	1 µl
cDNS	3 µl
Wasser (PCR-Qualität)	7,5 µl

Vor der jeweiligen PCR wurde ein Mastermix mit den Reagenzien vorbereitet. Dabei wurden überall 5% mehr Reagenz berechnet, um eventuelle Pipetten- oder Pipettierfehler auszugleichen.

Die Temperaturprogramme wurden an die jeweiligen Primer angepasst:

Tabelle 5: Temperaturprogramm für APC

Zyklus	Temperatur	Zeit
Zyklus 1 1x	95°C	4 min
Zyklus 2 10x	95°C	30 sec
	52°C	30 sec
	72°C	45 sec
Zyklus 3 30x	95°C	30 sec
	50°C	30 sec
	72°C	7 min
Ende	10°C	Pause

Tabelle 6: Temperaturprogramm für Axin

Zyklus	Temperatur	Zeit
Zyklus 1 1x	95°C	4 min
Zyklus 2 10x	95°C	30 sec
	55°C	30 sec
	72°C	45 sec
Zyklus 3 30x	95°C	30 sec
	53°C	30 sec
	72°C	7 min
Ende	10°C	Pause

Tabelle 7: Temperaturprogramm für GSK3 β

Zyklus	Temperatur	Zeit
Zyklus 1 1x	95°C	4 min
Zyklus 2 45x	95°C	30 sec
	62°C	30 sec
	72°C	45 sec
Zyklus 3	72°C	7 min
Ende	10°C	Pause

Tabelle 8: Temperaturprogramm für LEF1

Zyklus	Temperatur	Zeit
Zyklus 1 1x	95°C	4 min
Zyklus 2 55x	95°C	30 sec
	63°C	30 sec
	72°C	45 sec
Zyklus 3	72°C	7 min
Ende	10°C	Pause

Tabelle 9: Temperaturprogramm für β -Catenin

Zyklus	Temperatur	Zeit
Zyklus 1 1x	95°C	4 min
Zyklus 2 45x	95°C	30 sec
	60°C	30 sec
	72°C	45 sec
Zyklus 3	72°C	7 min
Ende	10°C	Pause

2.2.2.5 Primer

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) hergestellt. Die Primer wurden nach Erhalt direkt mit Wasser für PCR-Zwecke rekonstituiert und zu einer Stammlösung von 100 μ M verdünnt. Alle Primer und weiteren Verdünnungen wurden bei -20°C gelagert.

Tabelle 10: Übersicht der Sequenzierungsprimer und der dazugehörigen Schmelztemperaturen

	Primersequenz	Schmelztemperatur
APC (1061) <i>for</i>	5'-GCCGACCTAGCCCATAAAAT-3'	56,8°C
APC (1061) <i>rev</i>	5'-CCCGTGACCTGTATGGAGAA-3'	56,7°C
APC (1309) <i>for</i>	5'-TGCCACTTGCAAAGTTTCTTC-3'	56,9°C
APC (1309) <i>rev</i>	5'-TGTCTGAGCACCCTTTTGG-3'	56,4°C
APC (1450) <i>for</i>	5'-GCTCAGACACCCAAAAGTCC-3'	56,4°C
APC (1450) <i>rev</i>	5'-CACTCAGGCTGGATGAACAA-3'	55,5°C
AXIN <i>for</i>	5'-GTGAGGACGGCGATCCAT-3'	57,6°C
AXIN <i>rev</i>	5'-GTGGACGTGGTGGTGGAC-3'	58,0°C
GSK3 β <i>for</i> 1	5'-GCTTTTGGCAGCATGAAAGT-3'	57,2°C
GSK3 β <i>rev</i> 1	5'-AGGCTAAACTTCGGAACAGC-3'	55,9°C
GSK3 β <i>for</i> 2	5'-TCGCCATCAAGAAAGTATTGC-3'	55,6°C
GSK3 β <i>rev</i> 2	5'-CGAAACATTGGGTTCTCCTC-3'	55,5°C
GSK3 β <i>for</i> 3	5'-ACAGACGCTCCCTGTGATTT-3'	56,5°C
GSK3 β <i>rev</i> 3	5'-TTTGCTCCCTTGTGGAGTT-3'	56,6°C
GSK3 β <i>for</i> 4	5'-TTTCCAGGGGATAGTGGTGT-3'	55,7°C
GSK3 β <i>rev</i> 4	5'-TTGAGTGGTGAAGTTGAAGAGTG-3'	55,5°C
LEF1 <i>for</i> 1	5'-CCCTTCCAACCTCTCCTTTCC-3'	56,6°C
LEF1 <i>rev</i> 1	5'-CCTGGAGAAAAGTGCTCGT-3'	63,2°C
LEF1 <i>for</i> 2	5'-CCAGATGGAGGCCTCTACCA-3'	56,1°C
LEF1 <i>rev</i> 2	5'-CCAGCCAAGAGGTGGGGTG-3'	56,8°C
β -Catenin <i>for</i>	5'-GGGTATTTGAAGTATACCATAACAAC-3'	51,6°C
β -Catenin <i>rev</i>	5'-CAGGGAACATAGCAGCTCGT-3'	57,1°C

2.2.2.6 Enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte

Die erhaltenen Produkte der PCR wurden mit Hilfe von ExoSAP-IT® enzymatisch aufgereinigt. ExoSAP-IT® besteht aus einer Mischung von Exonuklease I und Shrimp Alkaline Phosphatase, die direkt zum PCR Produkt gegeben wird (2 μ l auf 10 μ l PCR-Produkt). In einer thermisch angeregten Reaktion zersetzt die Exonuklease I überschüssige Primer und die Shrimp Alkaline Phosphatase dephosphoryliert

restliche dNTPs. Im letzten Schritt wird ExoSAP® bei 80°C inaktiviert. Für die Reaktion wurde ebenfalls der Thermocycler T3000 benutzt.

Tabelle 11: Temperaturprogramm für die enzymatische Aufreinigung der PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
1	37°C	15 min
2	80°C	15 min
3	4°C	Pause

2.2.2.7 Sequenzierungs-PCR

Die Sequenzierung der vervielfältigten DNS aus der PCR erfolgte durch die Kettenabbruch-Methode nach Sanger im CCG (Cologne Center for Genomics, Köln, Deutschland). In einer erneuten PCR sind zuvor die enzymatisch aufgereinigten PCR-Produkte zusammen mit speziellen Reagenzien in Form des BigDye® Terminator 3.1 Sequencing Kits und Sequenzierungsbehältnissen für die anschließende Bearbeitung im CCG vorbereitet worden.

Tabelle 12: PCR-Ansatz für die Sequenzierungs-PCR gemäß CCG-Vorgaben

	Volumen in µl
BigDye® Terminator 3.1	0.25
5 x BigDye Sequenzierungs-Puffer	2.25
Primer <i>for/rev</i>	0.25
PCR-Produkt	2
Wasser für PCR	5.25

Tabelle 13: Temperaturprogramm der Sequenzierungs-PCR

Zyklus	Temperatur	Zeit
Zyklus 1 1x	95°C	1 min
Zyklus 2 40x	95°C	20 sec
	55°C	20 sec
	60°C	3 min
Zyklus 3	4°C	Ende

Die Analyse im CCG erfolgte durch das Kapillarelektrophoresegerät ABI 3730 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Bei der Sequenzierung nach Sanger werden Nukleosidtriphosphate (NTP) in veränderter Form als Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP) gekoppelt an einen Fluoreszenzfarbstoff zur

PCR hinzugefügt. Durch das Fehlen der Hydroxygruppe kann bei der Polymerisation kein Nukleotid mehr angehängt werden und die Kettenreaktion bricht ab. Dadurch erhält man Fragmente verschiedener Länge, die am Ende jeweils ein mit Farbstoff versehenes ddNTP tragen. Im Kapillarelektrophoresegerät werden die Produkte aufgetrennt und durch Fluoreszenzanregung mittels eines Lasers detektiert. Die Computersoftware errechnet durch die Signale die Position der Basen und kann die Basenabfolge als Chromatogramm darstellen. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit dem Programm Sequence Scanner von Applied Bioscience.

2.2.2.8 Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR ermöglicht die Analyse der RNS/DNS-Menge in einer Probe. Dazu wird der Fluoreszenz-Farbstoff Sybr® Green zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Er kann mit der DNS interkalieren und so als Anstieg der Fluoreszenzemission erfasst werden. Am Ende jedes einzelnen Zyklus werden die Fluoreszenz-Signale gemessen und erlauben auf diese Weise die Quantifizierung der PCR Produkte. Für die Messung wurde der Light Cycler verwendet. Als Referenz-Gen diente *abl*, als Negativkontrolle wurde eine Wasserprobe gemacht.

Tabelle 14: Ansatz für die Quantitative PCR

Reagenz	Volumen in µl
Sybr® Green	10
Primer <i>for/rev</i> 0.5µM	0.5
Wasser für PCR	8
DNS	1

Tabelle 15: Temperaturprogramm für die qualitative PCR von DKK1 und ABL

Zyklus	Temperatur	Zeit
Zyklus 1 1x	95°C	15 min
Zyklus 2 50x	95°C	15 sec
	58°C	20 sec
	72°C	20 sec
Zyklus 3 1x (Schmelzkurve)	95°C	20 sec
	65°C	20 sec
	bis 95°C	0,1°C/sec
	40°C	Ende

Tabelle 16: Übersicht der Sequenzierungsprimer und der dazugehörigen Schmelztemperaturen für die qualitative PCR

	Primersequenz	Schmelztemperatur
DKK <i>for</i>	TGGTCCAAGATCTGTAAACCTGTCC	60.4°C
DKK <i>rev</i>	CTGGCTTGATGGTGATCTTTCTGTA	59.0°C
ABL <i>for</i>	TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT	58.8°C
ABL <i>rev</i>	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA	58.2°C

2.2.3 Untersuchungen zur Induktion von Apoptose und Zelltod

2.2.3.1 Durchflusszytometrie

Prinzip

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, um Zellen unterschiedlicher Art oder unterschiedlichen Zustands in einer Suspension zu unterscheiden. Das Durchflusszytometer besteht aus einer dünnen Kapillare aus Glas oder Quarz, welche die Zellsuspension per Vakuum durchläuft. In der Kapillare passieren die Zellen eine Reihe von nacheinander angeordneten Laserstrahlen. Je nach Geräteklasse besteht ein Durchflusszytometer aus einem Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FCS), einem Seitenstreulicht (sideward scatter, SSC) und mehreren Fluoreszenzkanälen. Mit dem Vorwärtsstreulicht wird die Beugung des Lichtes gemessen, die Informationen über die Zellgröße gibt. Das Seitwärtsstreulicht misst die Brechung des Lichtes im rechten Winkel und gibt Informationen über die Zellgranularität und die Zellkomplexität. Mittels der Fluoreszenzkanäle können verschiedene Fluoreszenzfarben erfasst werden. Für eine solche Erfassung werden die Zellen mit Farbstoffen oder Farbstoff-tragenden Proteinen verbunden. Für die durchflusszytometrische Messung wurde eine Kombination aus FITC-Annexin V und 7-Aminoactinomycin (7-AAD) verwendet. Annexin V ist ein Calcium-abhängiges Protein mit einer hohen Bindungsaffinität zu Phosphatidylserin. Phosphatidylserin ist normalerweise im Inneren der Zelle an die Zellmembran gebunden. Kommt es allerdings zu einem Zellschaden, wird die Membran durchlässig und Phosphatidylserin verlagert sich nach außen. Annexin V ist an Fluorescein Isothiocyanat (FITC) gebunden, welches als Fluorochrom fungiert. FITC wird mit einem Argonlaser der Wellenlänge 488 nm angeregt und ist mit einem Emissionsmaximum von 519 nm messbar. 7-AAD ist ein Peptid, welches als Farbstoff eingesetzt wird. Es kann mit DNS interkalieren und bindet spezifisch zwischen Guanin und Cytosin. Viable Zellen kann 7-AAD nicht färben, da es nicht

durch eine intakte Zellmembran nicht passieren kann. 7-AAD wird ebenfalls bei 488 nM angeregt und zeigt ein Emissionsmaximum von 647 nM. Daraus ergibt sich bei einer Doppelfärbung mit FITC-Annexin-V und 7-AAD, dass intakte Zellen ein negatives Signal auf beide Farbstoffe zeigen (doppelt negativ), frühapoptotische Zellen einfach positiv auf FITC-Annexin-V (und negativ auf 7-AAD) und spätapoptotische Zellen doppelt positiv auf beide Farbstoffe sind.

Bestimmung der Apoptose mittels Durchflusszytometer

Zur Apoptosemessung der Zellen wurden 500.000 Zellen auf eine 96-Well-Platte ausgesät und in RPMI Medium für den jeweiligen Zeitraum inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen abgenommen und in FACS Röhren gegeben. Die Zellen wurden insgesamt zweimal gewaschen, einmal mit PBS und einmal mit Annexin Binding Buffer zu je 500 μ l, und danach bei RT mit 1200 rpm für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Mischung aus 50 μ l Annexin Binding Buffer, 3 μ l 7-AAD und 3 μ l FITC-Annexin-V versetzt und 15 min in Dunkelheit bei RT inkubiert. Kurz vor der Messung wurden die Röhren mit je 450 μ l Binding Buffer aufgefüllt, gemischt und vermessen.

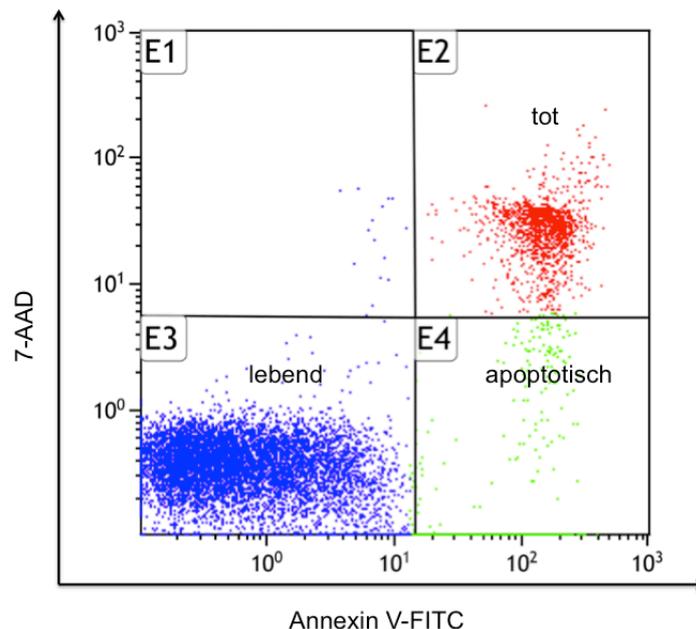


Abbildung 12: Induktion von Apoptose in CLL-Zellen durch Trichostatin A

Die Abbildung zeigt als Beispiel für Apoptoseinduktion einen Dot Blot nach der durchflusszytometrischen Analyse der CLL-Zellen, die für 48 Stunden mit Trichostatin inkubiert und anschließend mit Annexin V-FITC/7-AAD gefärbt wurden. Dabei sind doppelt-negative Zellen als lebend definiert, Annexin V-FITC positive Zellen als apoptotische Zellen und doppelt positive als spätapoptotische bzw. tote Zellen.

2.2.3.2 ATP Assay

Mittels ATP Assay lässt sich die Anzahl an viablen Zellen in einer Zellsuspension bestimmen. Das Prinzip beruht auf der Quantifizierung des vorhandenen ATP (Adenosintriphosphat), welches als Energieträger ein Zeichen für eine metabolisch aktive Zelle darstellt. Aktiver Teil des ATP Assay ist „Beetle luciferin“, welches mittels Katalysierung durch das Enzym Luciferase und Magnesium mono-oxygeniert wird. Dabei wird Sauerstoff und ATP verbraucht bzw. zu AMP (Adenosinmonophosphat) umgesetzt. Als Endprodukt dieser Reaktion wird Licht emittiert, welches luminometrisch detektiert und vermessen werden kann.

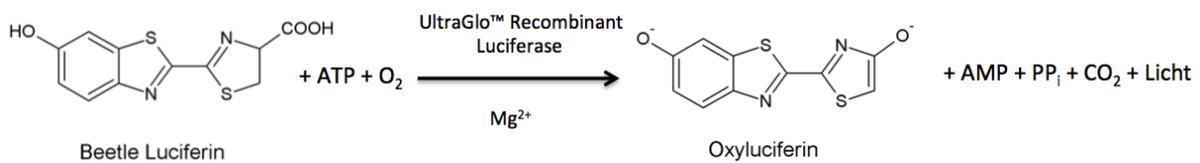


Abbildung 13: Reaktionsgleichung der Luciferase-Reaktion

Bestimmung der Viabilität mittels ATP Assay

Für die Vermessung der Viabilität wurden je 80.000 Zellen in 100 µl RPMI Medium mit der zu vermessenden Substanzen gelöst und für 24h im Brutschrank inkubiert. Das CellTiter-Glo® Substrat lag als Pulver und Lösung vor, wurde bei -20°C gelagert und kurz vor der Benutzung rekonstituiert. Das CellTiter-Glo® wurde 1:1 zu der Zellsuspension gegeben (100 µl), vermischt und für 15 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Die Lumineszenz wurde mit der PARADIGM® Detection Platform erfasst.

2.2.3.2 Caspase 3/7 Assay

Das Caspase-Glo® 3/7 Assay ist ein Lumineszenz-Assay, welches zur Bestimmung der Effektorcaspasen 3 und 7 dient. Das Substrat für den Assay, das sensitiv für Caspaseaktivität, Luziferaseaktivität und Zellyse ist, enthält eine tetrapeptidische Sequenz (DEVD). Wird die Caspase-Glo®-Lösung zu der Zellsuspension gegeben, erfolgt eine Zellyse und Caspasen-abhängige Spaltung des Subtrates. Das gespaltene Substrat wird zusammen mit ATP und Sauerstoff durch die UltraGlo® Luciferase umgesetzt, wodurch eine messbare Lichtemission auftritt.

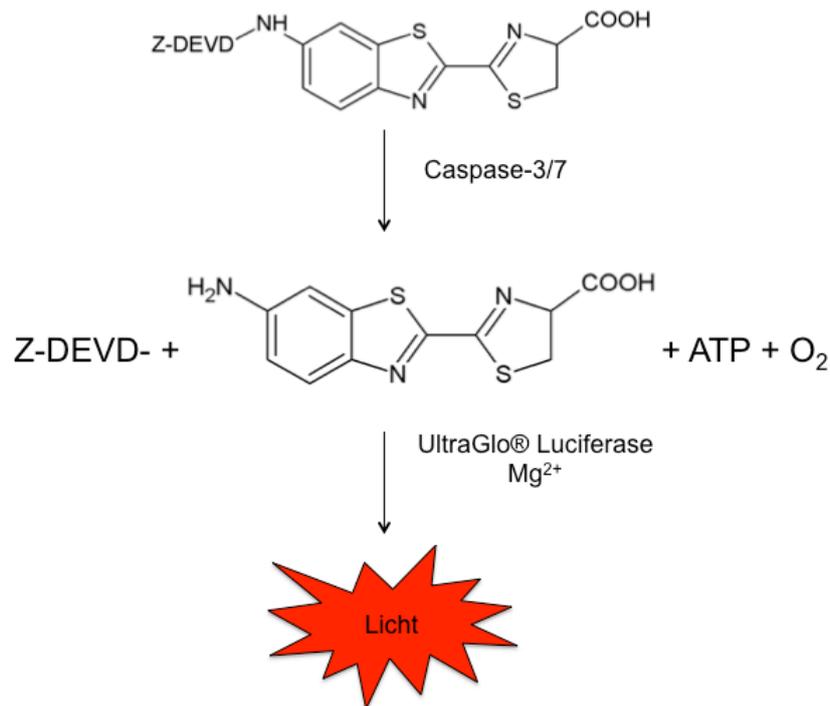


Abbildung 14: Reaktionsgleichung der Luciferase-Reaktion zur Bestimmung der Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7

Die Zellen wurden vergleichbar zum ATP Assay zu 80.000 Zellen pro Vertiefung auf eine 96-Loch-Platte aufgetragen und nach Inkubationszeit von 24 h im Brutschrank mit den zu testenden Substanzen vermessen. Dazu wurde das Caspase-Glo® Assay rekonstituiert und 1:1 zu den Zellen gegeben (100 µl). Nach 1 h bei RT auf dem Schüttler wurde die Lumineszenz mit dem MicroLumat Plus gemessen.

2.2.4 Proteinbiochemie

2.2.4.1 Zellansätze

Für die Analyse der in den Zellen enthaltenen Proteine wurden pro Western Blot-Ansatz je 1×10^7 Zellen in RPMI Medium in Multiwellplatten pipettiert, weitergehend mit dem Wirkstoff behandelt und je nach Versuch für einen definierten Zeitraum bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Als Kontrollen wurden jeweils eine unbehandelte Probe und für DMSO-gelöste Wirkstoffe eine mit DMSO behandelte Probe verwendet.

2.2.4.2 Herstellung von Zell-Lysaten

Nach der Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen durch mehrfaches Pipettieren vollständig von der Multiwellplatte abgelöst und in ein 1.5 ml Reagiergefäß überführt. Die Zellen wurden bei 4.000 U/min für 4 min bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen erneut in kaltem PBS aufgenommen. Nach zweimaligem

Waschen mit PBS wurden die Zellen in 600 µl M-PER Lysepuffer/6 µl DTT aufgenommen. Der M-PER Lysepuffer besteht aus 10 ml M-PER Lösung, die mit je einer Tablette Proteaseinhibitor und PhospoStop versetzt wurde. Nach diesem Schritt konnten die Zellen bei -20°C kurzzeitig eingefroren oder direkt weiterverarbeitet werden. Im nächsten Schritt wurden die lysierten Zellbestandteile bei 13.000 U/min und 4°C für 15 min abzentrifugiert. Die Proteinsuspension wurde als Überstand abgenommen und entweder direkt verwendet oder bei -20°C gelagert.

2.2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die einzelnen Proben können durch unterschiedliche Expression ungleiche Proteinmengen enthalten. Um vergleichbare Ergebnisse im Western Blot zu erhalten, wurden zuerst die Proteinmengen der einzelnen Proben mit Hilfe der Proteinbestimmung nach Bradford errechnet. Dabei wird der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 verwendet, der mit Proteinen einen Komplex bildet und eine Verschiebung des Absorptionsspektrums von 470nm zu 595nm bewirkt. Diese Verschiebung kann photometrisch bestimmt und mithilfe einer Standardreihe die Proteinmenge errechnet werden. Als Standard wurde Protein Standard Micro verwendet, der zu 1, 2, 5, 10, 25, 50, 75 und 100 µg/ml verdünnt wurde. Aus der Standardreihe wurden je 50 µl auf eine 96-Well Photometerplatte aufgetragen. Von den zu vermessenden Zell-Lysaten wurden eine 1:5 und eine 1:10 Verdünnung mit Wasser hergestellt und mit je 50 µl aufgetragen. Nach Zugabe von 200 µl Roti®-Nanoquant wurden die Proben durch Pipettieren gut vermischt und 5 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Mit der Beckmann Coulter Paradigm® Detection Platform wurden die Proben im Anschluss bei 450 und 595 nm vermessen. Durch den Quotienten der optischen Dichte $OD_{595/450}$ kann man mit dem Proteinstandard eine lineare Funktion errechnen und im Weiteren die Proteinmengen der Proben bestimmen.

2.2.4.4 Western Blot

Die Analyse spezifischer Proteine wurde mittels Western Blot durchgeführt. Beim Western Blot werden Proteine zunächst ihrer Größe entsprechend durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Dazu werden die Proteine der Zelllysate mit SDS (Natriumdodecylsulfat) gemischt und zur Denaturierung der Proteine aufgekocht. Während der Gelelektrophorese wird ein

elektrisches Feld an der Kammer angelegt und die Proteine wandern im Gel zur Kathode. Dabei können kleine Proteine schneller durch das elektrische Feld wandern, als große, was zur Auftrennung führt. Danach werden die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid) Membran geblottet. Hier wird ebenfalls ein elektrisches Feld angelegt, womit die Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen werden. Dies ermöglicht eine längere Fixierung der aufgetrennten Proteine. Auf der PVDF Membran können die Proteine im nächsten Schritt per Chemolumineszenzreaktion durch Farbstoff-tragende Antikörper detektiert werden. Die zuvor hergestellten Proteinlysate (vgl. 2.2.4.2) wurden aufgetaut und zur Denaturierung der Proteine mit je 18µl Protein mit 6µl NuPage® LDS Sample Buffer für 10 min bei 90°C aufgeköcht. Für die Gelelektrophorese wurden die Elektrophoresekammern der Firma Invitrogen benutzt. Als Verbrauchsmaterial wurden NuPage® LDS Sample Buffer, NuPage® MES SDS Running Buffer (20x), NuPage® Sample Reducing Agent (10x), 4-12% NuPage® Bis-Tris Fertiggele und NuPage® Antioxidant verwendet. Als Proteinstandard wurde die Spectra BR Multicolor Broadrange Protein-Leiter verwendet. Nach der Auftrennung der Proteine im Gel wurden selbige auf eine PVDF Membran unter Verwendung der Invitrogen Kammer mit NuPage® Transfer Puffer und Invitrogen Schwämmen transferiert. Der Transfer fand bei 30 V für 1 h statt. Nach dem Transfer wurden die Proteine bei 80°C im Trockenschrank für 10 min fixiert und per Ponceau-Rot-Färbung die vollständige Übertragung überprüft.

2.2.4.5 Immundetektion

Die Immundetektion ermöglicht es, zuvor aufgetrennte Proteine durch eine Antikörperreaktion mit gekoppelten Farbstoffen sichtbar zu machen. Dafür wurde die Membran zur Sättigung unspezifischer Bindestellen für 1 h in einer Block-Lösung inkubiert. Die Zusammensetzung der Lösung wurde nach der Anleitung des jeweiligen Antikörpers gewählt und bestand entweder aus Roti-Lösung, PBS/5%BSA oder PBS/5%Milchpulver. Zum Waschen der Membran zwischen den einzelnen Schritten wurde 3x kurz (10 sek) und 3x lang (10 min) mit einer Lösung aus TBST gespült. Für die Inkubation mit dem Erst-Antikörper wurde die Membran bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler mit der Antikörperlösung bedeckt. Nach erneutem Waschen wurde mit dem Zweit-Antikörper bei RT für 1 h inkubiert. Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte mit SuperSignal® Luminol Solution nach einer 1:1

Mischung der beiden Reagenzien. Die mit Luminol benetzte Membran wurde danach in eine Filmkassette eingeklebt und in der Dunkelkammer mit einem Film bedeckt. Der Film wurde in einem Foto-Entwickler entwickelt, wobei der Film nacheinander eine Entwickler-Lösung, eine Fixier-Lösung und ein Wasserbad durchläuft. Nach der Entwicklung des Films wurden die Banden des Proteinmarkers markiert, um so die Proteine entsprechend ihrer Molekülgröße zu ordnen.

Verdünnungen der Antikörper:

Primäre Antikörper

Acetyl-Histon H4 1:1000

β -actin 1:10000

APC 1:500

AXIN1 1:1000

PARP 1:1000

Sekundäre Antikörper

Anti-rabbit IgG 1:1000

HRP donkey anti-rabbit 1:2000

HRP goat anti-mouse 1:2000

HRP donkey anti-rabbit 1:2000

HRP donkey anti-rabbit 1:2000

2.2.5 Computerprogramme

Chemsketch (12.01)

ACD/Labs, Toronto, Kanada

GIMP (2.8.4)

GNOME, Groton, USA

GraphPad Prism (5.01)

GraphPad Software, La Jolla, USA

Heatmap-Builder (1.1)

Stanford University, Stanford, USA

Kaluza (1.2)

Beckmann Coulter, Krefeld,
Deutschland

Light Cycler Software (5.32)

Roche, Grenzach-Wyhlen,
Deutschland

Mac OS X (10.6.8)

Apple, Cupertino, USA

Microsoft Office Professional 2011

Microsoft, Redmont, USA

Parallels (6.0.12106)

Parallels Inc., Renton, USA

SequenceScanner (1.0)

Life Technologies, Darmstadt,
Deutschland

Windows XP mit SP3

Microsoft, Redmont, USA

Zotero (4.0.13)

Center for History and New Media,
Fairfax, USA

2.2.6 Statistische Berechnungen

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit Hilfe des Statistikprogramms GraphPad Prism 5. Bei Experimenten mit einer Stichprobenanzahl größer als 3 wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Standardfehler wie folgt berechnet:

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 = Anzahl der Stichproben

x_i = Einzelmesswert

Standardabweichung SD:

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

\bar{x} = arithmetischer Mittelwert

x_i = Einzelmesswert

n = Anzahl der Stichproben

Standardfehler des Mittelwertes σ_n :

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

SD = Standardabweichung

n = Anzahl der Stichproben

Das Ergebnis der LD₅₀ wurde anhand der folgenden Formel berechnet:

Nichtlineare Regression zur Ermittlung der LD₅₀:

$$y(x) = \frac{100}{1 + 10^{(\log EC_{50} \cdot \text{Steigungskoeffizient})}}$$

y = veränderter Wert prozentual zur Kontrolle

x = Logarithmus der Substanzkonzentration

Signifikanzprüfung:

Die Signifikanz der Ergebnisse wurde, sofern nicht anders angegeben, bei Berechnungen zwischen zwei unabhängigen Gruppen mithilfe des zweiseitigen, ungepaarten Student's t-test errechnet. Dabei wurden Unterschiede von $p < 0.05$ als signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der wesentlichen WNT-Gene

Wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, spielt der WNT-Signalweg in verschiedenen Erkrankungen eine besondere Rolle. Mutationen des WNT-Signalweges sind in unterschiedlichen neoplastischen Krankheitsbildern bekannt, wie zum Beispiel dem Kolonkarzinom. Aufgrund dieser Fakten wurden essentielle Bestandteile der kanonischen WNT-Signalkaskade auf Fehler in ihren Gensequenzen untersucht, welche sich im weiteren Verlauf auf die Protein-/Enzymproduktion und deren Funktionalität auswirken können. Dazu wurden die Hauptbestandteile des Destruktionskomplexes wie APC, der Gerüstbildner AXIN1 und die Kinase GSK3 β sequenziert. Weiterhin wurden β -Catenin als Mittelpunkt der Kaskade und der Transkriptionsfaktor LEF1 analysiert. Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der Genbereiche, wie zum Beispiel Länge oder Anzahl der Introns und Exons, wurden die Primer und die verwendete Sequenzgrundlage (genomische DNS oder DNS aus mRNS) angepasst. APC ist mit 2.843 Aminosäuren ein vergleichsweise großes Protein für eine Sequenzierung, Hilfestellung geben jedoch wichtige Mutationsstellen aus dem Krankheitsbild der FAP (Familiären adenomatösen Polyposis). Drei Abschnitte sind in der FAP besonders häufig betroffen. Dazu zählen die Abschnitte um die Aminosäuren 1061 und 1309, bei denen gehäuft Keimbahnmutationen auftreten, und die Abschnitte um 1309 und 1450, die in somatischen Zellen durch häufige Mutationen auffallen. Sie liegen jeweils auf einem Exon und wurden für die Analyse von APC ausgewählt, da sie ebenfalls Bindestellen für β -Catenin enthalten. Die Sequenzierung von APC erfolgte auf Basis genomischer DNS. Insgesamt wurden 41 Proben von CLL Patienten sequenziert, bei denen keine Mutationen gefunden wurden. Innerhalb des dritten Sequenzbereiches fand sich bei 5 Proben ein SNP (single nucleotide polymorphism), bei dem ein Guanin durch ein Adenosin in der Sequenz ersetzt worden ist. Dabei wurde das ursprüngliche Codon ACG zu ACA, die allerdings beide für die Aminosäure Threonin codieren.

AXIN1 stellt als Gerüstbildner die Verbindung zwischen APC und GSK3 β her. Hier wurde die für die Funktion essentielle β -Catenin-Bindestelle zwischen den Aminosäuren 464-496 mit insgesamt 96 Basen untersucht. Die Sequenzierung konnte aufgrund der günstigen Lage auf einem Exon ebenfalls mit genomischer DNS durchgeführt werden. Innerhalb einer untersuchten Gruppe von 41 Proben fanden sich keine Änderungen innerhalb dieses Sequenzbereiches.

Die Sequenzierung von β -Catenin, LEF1 und GSK3 β wurde mit cDNS durchgeführt, die zuvor aus mRNA mithilfe der Reversen Transkriptase synthetisiert wurde.

Das Protein β -Catenin liegt durch die aberrante WNT-Aktivierung in erhöhter Menge vor. Ein möglicher Grund ist ein gestörter Abbau durch das Proteasom. β -Catenin wird für die Ubiquitinierung an 4 Aminosäuren durch die Kinasen GSK3 β und CKI α phosphoryliert. Mit der Sequenzierung eines Abschnittes der Aminosäuren 1-95 (Basen 1-285) wurden gleichzeitig die Phosphorylierungsstellen Ser33, Ser34, Thr41 und Ser45 auf Mutationen untersucht. Insgesamt wurden 9 Proben analysiert, die jedoch keine Abweichung von der kanonischen Sequenz aufwiesen.

Die Kinasefunktion von GSK3 β verteilt sich fast über die ganze Sequenz (Aminosäuren 56-340, Basen 168-1020). Aufgrund der Länge wurden für die Sequenzierung 4 Primerpaare verwendet. Der Bereich der Kinasefunktion zeigte bei 6 untersuchten Proben keine Veränderung.

Der Transkriptionsfaktor LEF1 enthält eine relativ große Bindedomäne (Aminosäuren 1-213, Basen 1-639) für den Interaktionspartner β -Catenin. Durch die hohen Expressionslevel an LEF1 in der CLL wurde die gesamte Sequenz untersucht. Bei insgesamt 8 Proben zeigte sich jedoch kein Fehler in der Sequenzanalyse.

Tabelle 17: Übersicht über die untersuchten Gen-Bereiche für wichtige Bestandteile des WNT-Signalweges

Gen	Bereich (Aminosäure)	SNP	Mutationen	Proben
APC	um 1061	0	0	41
	um 1309	0	0	41
	um 1450	5	0	41
AXIN1	464-496	0	0	41
β -Catenin	1-95	0	0	9
GSK3 β	volle Länge	0	0	6
LEF1	volle Länge	0	0	8

3.2. Die WNT-Bibliothek

Für die Untersuchung des Einflusses verschiedener Bestandteile der WNT-Signalkaskade auf die CLL wurde eine Substanz-Bibliothek mit Wirkstoffen getestet, deren Angriffspunkte an verschiedenen Zielen innerhalb der Signalkaskade liegen. Die Bibliothek bestand aus 75 Substanzen, die entweder zugelassene Arzneimittelwirkstoffe oder Testsubstanzen waren. Alle Substanzen waren durch ihre bekannten Zielstrukturen oder Hinweise in der Literatur entweder direkt oder über Umwege mit der WNT-Signalkaskade verbunden. Die Zielstrukturen der Substanzen lagen teilweise im oberen Bereich der Kaskade, das heißt außerhalb der Zelle oder im Rezeptorbereich (11 Aktivatoren, 15 Inhibitoren), teilweise im Zytoplasma um den Destruktionskomplex herum (14 Aktivatoren, 9 Inhibitoren) und einige zielten auf die Transkriptionsvorgänge um den Nukleus und innerhalb des Nukleus (2 Aktivatoren, 22 Inhibitoren). Einen ersten Überblick über die Wirkung der einzelnen Substanzen ergab die Durchführung eines ATP-Assay, bei dem der Gehalt an ATP als Maß für das Zellüberleben analysiert wurde. Die Substanzbibliothek wurde in 4 Konzentrationen von 100 nM bis 100 µM eingesetzt und die Untersuchung für CLL-Zellen, gesunde PBMCs und gesunde B-Zellen durchgeführt. Als Kontrolle dienten jeweils eine unbehandelte Probe und eine mit DMSO behandelte Probe.

3.2.1 Die Aktivatoren der WNT-Bibliothek

Als Aktivatoren wurden alle Substanzen definiert, die entweder über eine Aktivierung oder über eine Inhibition ihrer Zielstruktur einen aktivierenden Einfluss auf die WNT-Signalkaskade besaßen. Innerhalb der Bibliothek wurden 26 Substanzen als Aktivatoren eingeordnet.

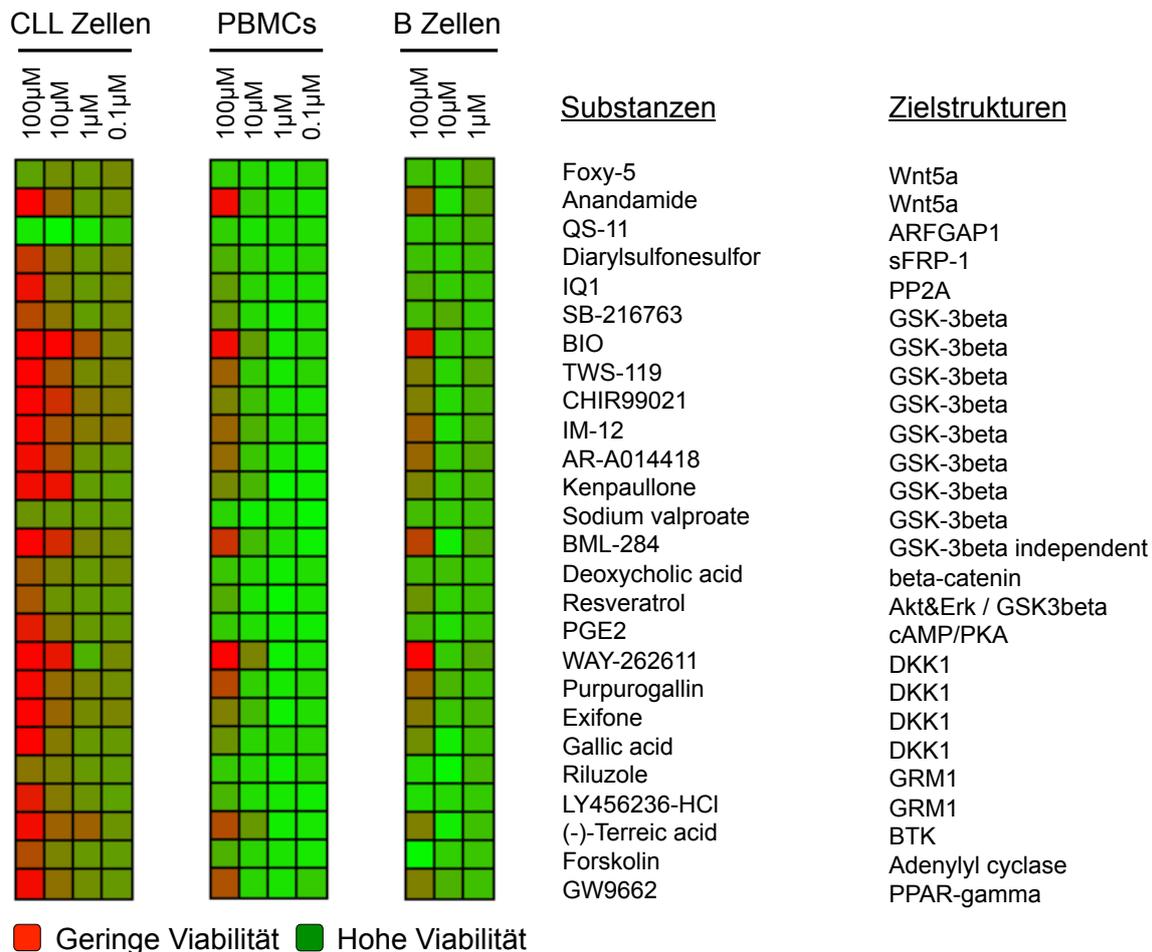


Abbildung 15: Die WNT-Bibliothek – Aktivatoren

Die Visualisierung als Heatmap zeigt den Einfluss der Wirkstoffe auf das Zellüberleben anhand eines ATP-Assay, wobei grün eine hohe und rot eine niedrige Viabilität markiert. Die Messung wurde nach 24-stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen in Konzentrationen von 100 nM bis 100 µM für sowohl CLL-Zellen als auch für gesunde PBMCs und B-Zellen durchgeführt. n(CLL) = 4, n(PBMC) = 4, n(B-Zellen) = 3. Das Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Simon Poll-Wolbeck durchgeführt. CLL = Chronische lymphatische Leukämie (Patienten), PBMC = Periphere mononukleäre Blutzellen von gesunden Spendern, B-Zellen = aufgereinigte B-Zellen gesunder Spender

Der Großteil der Aktivatoren zeigte einen negativen Einfluss auf die Viabilität der CLL-Zellen, während der Einfluss auf die beiden gesunden Zellpopulationen bis auf wenige Ausnahmen sehr gering war (siehe Abb. 14). Wirkstoffe mit essentiellen Zielstrukturen innerhalb der Kaskade wie die Kinase GSK3β, der Inhibitor des

Korezeptors DKK1 oder β -catenin selbst zeigten kaum oder sehr oft keinen Effekt. Die interessanteste Substanz der Gruppe bildete QS-11, welches eine stark überlebenssteigernde Wirkung auf die CLL Zellen gezeigt hat, ohne jedoch einen Effekt auf die gesunden Zellen auszuüben.

3.2.2 Die Inhibitoren der WNT-Bibliothek

Innerhalb der Gruppe der Inhibitoren, das heißt der Substanzen mit einer inhibitorischen Wirkung auf die WNT-Signalkaskade, wurden 49 Substanzen analysiert.

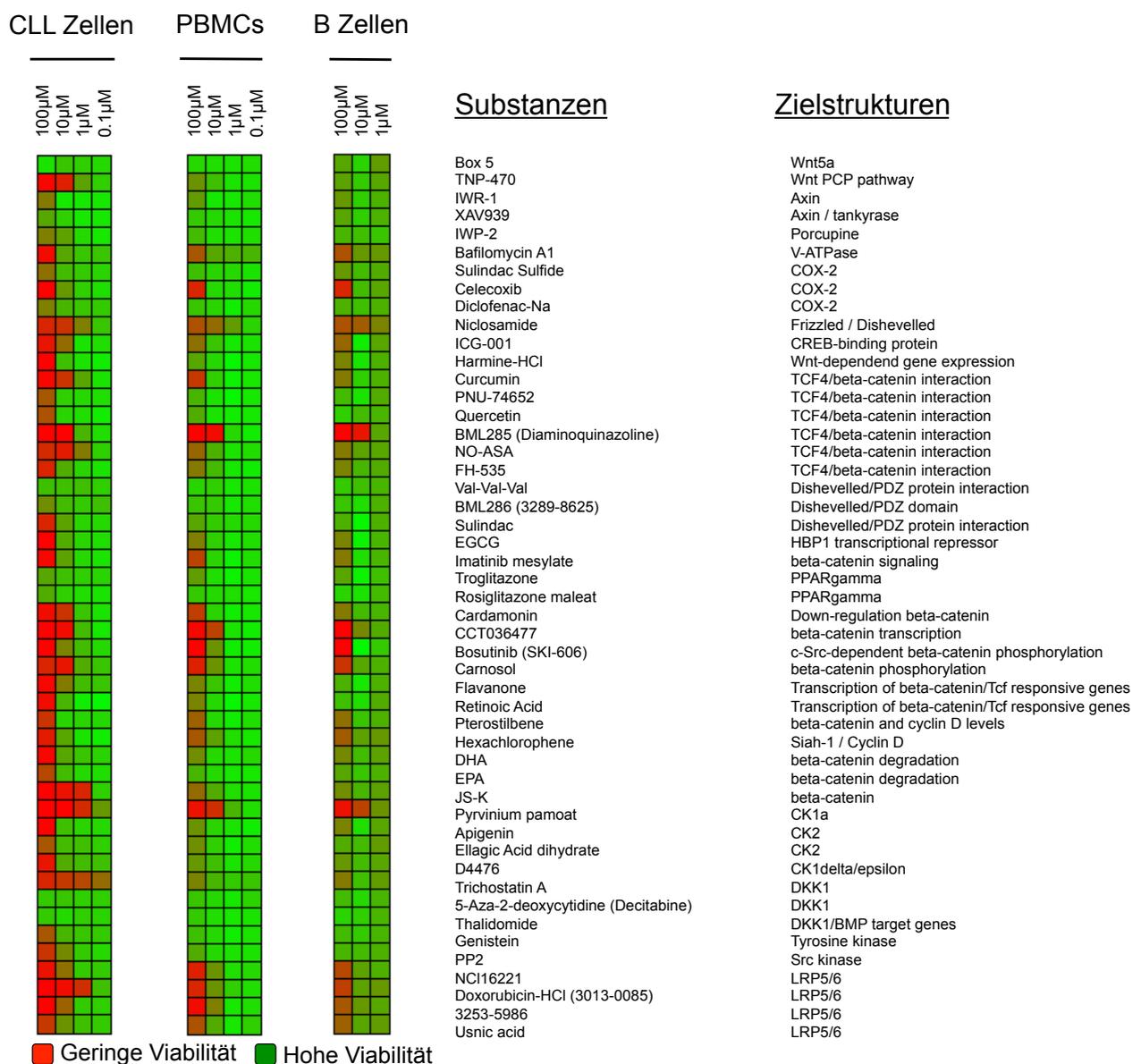


Abbildung 16: Die WNT-Bibliothek – Inhibitoren

Die Visualisierung als Heatmap zeigt den Einfluss der Wirkstoffe auf das Zellüberleben anhand eines ATP-Assay, wobei grün eine hohe und rot eine niedrige Viabilität markiert. Die Messung wurde nach 24 stündiger Inkubation mit den Wirkstoffen in Konzentrationen von

100 nM bis 100µM für sowohl CLL-Zellen, als auch für gesunde PBMCs und B-Zellen durchgeführt. n(CLL) = 4, n(PBMC) = 4, n(B-Zellen) = 3. Das Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Simon Poll-Wolbeck durchgeführt. CLL = Chronische lymphatische Leukämie (Patienten), PBMC = Periphere mononukleäre Blutzellen von gesunden Spendern, B-Zellen = aufgereinigte B-Zellen gesunder Spender

Die Gruppe der Inhibitoren beinhaltet mehrere Substanzen mit stark minderndem Einfluss auf das Überleben der CLL Zellen (siehe Abb. 15). Dieser Effekt kann bei Substanzen wie TNP-470, NO-ASA, JSK, Pyrvinium pamoat, Trichostatin A oder Doxorubicin beobachtet werden. Die Ziele der wirksamen Substanzen waren sehr verschieden und an unterschiedlichen Stellen entlang der Signalkaskade zu finden, wie DKK1, CK1 α , β -catenin, LRP 5/6 oder auch über eine andere Kaskade wie dem WNT/PCP-Signalweg.

3.2.3 Die wirksamen Substanzen der WNT-Bibliothek

3.2.3.1 QS 11 verlängert effektiv das Überleben der CLL-Zellen

Innerhalb der Gruppe der WNT-Aktivatoren hob sich die Substanz QS-11 gegenüber den anderen Substanzen durch einen ausgeprägten überlebensfördernden Effekt ab (siehe Abb. 14). CLL-Zellen, die aus dem peripheren Blut extrahiert werden, sind durch eine kurze Überlebenszeit *in vitro* gekennzeichnet, die meist zwischen 2 bis 4 Tagen liegt, wobei je nach Untersuchung in den ersten 30 Stunden teilweise über 20% der Zellen in die Apoptose übergehen. Zur näheren Untersuchung des Effektes von QS-11 auf das Zellüberleben wurde die Überlebensrate von CLL-Zellen und gesunden PBMCs nach 48-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von QS-11 durchflusszytometrisch bestimmt. Auf der Kontrollseite wurden die PBMCs von drei gesunden Spendern untersucht. Hier zeigte sich, korrelierend mit dem Ergebnis des ATP-Assay in 3.2.1, kein signifikanter Einfluss auf das Überleben der Zellen, weder positiv noch negativ.

Die CLL-Zellen zeigten nach 24 Stunden eine Steigerung der Überlebensrate auf bis zu 125% (siehe Abb. 16).

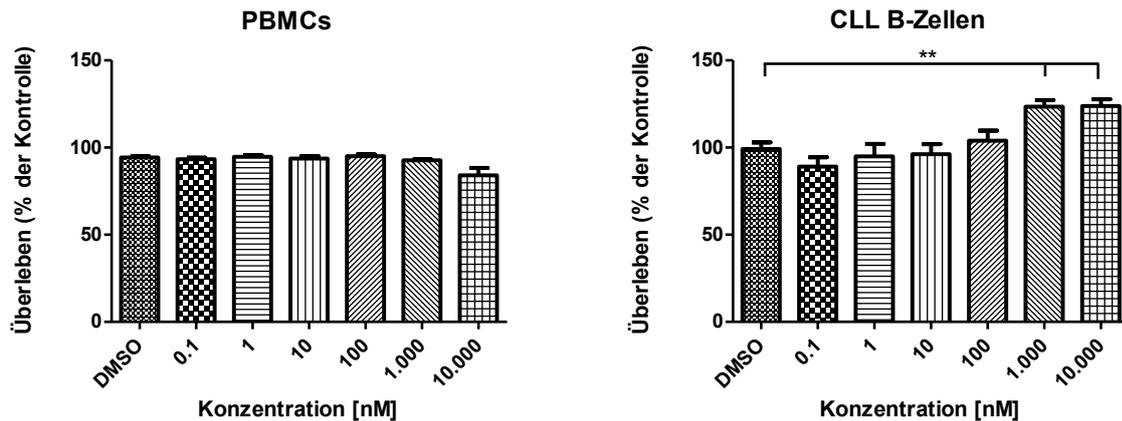


Abbildung 17: QS-11 steigert das Überleben von CLL-Zellen

Die Abbildung zeigt den überlebensfördernden Effekt von QS-11 auf CLL-Zellen. Als Vergleich wurden gesunden PBMCs gemessen. Alle Zellen wurden für 48h mit QS-11 in Konzentrationen von 0,1 nM bis 10.000 nM behandelt und im Brutschrank inkubiert. Das Zellüberleben wurde mit AnnexinV-FITC/7-AAD Färbung durchflusszytometrisch vermessen, wobei der Anteil der doppelt negativ gefärbten Zellen als „lebend“ definiert war. $n(\text{PBMC}) = 3$, $n(\text{CLL}) = 6$, ** wurde als $p < 0,01$ definiert

3.2.3.2 Pyrvinium pamoat – ein starker WNT-Inhibitor mit toxischen Nebeneffekten

Der Wirkstoff Pyrvinium pamoat wurde früher als Inhibitor der Prä-Kinase $\text{CKI}\alpha$ beschrieben, die zusammen mit der Kinase $\text{GSK3}\beta$ für die Phosphorylierung von β -Catenin zuständig ist.

Für Pyrvinium pamoat wurde bereits an verschiedenen neoplastischen Zellen/Zelllinien eine starke inhibitorische Wirkung auf die Zell-Viabilität beschrieben. In Bezug auf CLL-Zellen wurde das Überleben nach Behandlung mit Pyrvinium pamoat in Konzentrationen von 1 bis 1.000 nM nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden durchflusszytometrisch bestimmt. Pyrvinium pamoat zeigte eine starke Induktion der Apoptose mit einer LD_{50} von $0,64 \mu\text{M}$ (siehe Abb. 17). Im ATP-Assay der WNT-Bibliothek besaß der Wirkstoff allerdings eine toxische Wirkung auf die gesunden Zellpopulationen im Konzentrationsbereich 10 bis $100 \mu\text{M}$. Aufgrund der Toxizität wurden weitere Untersuchungen Pyrvinium pamoat zugunsten der folgenden weniger toxischen Substanzen verlagert.

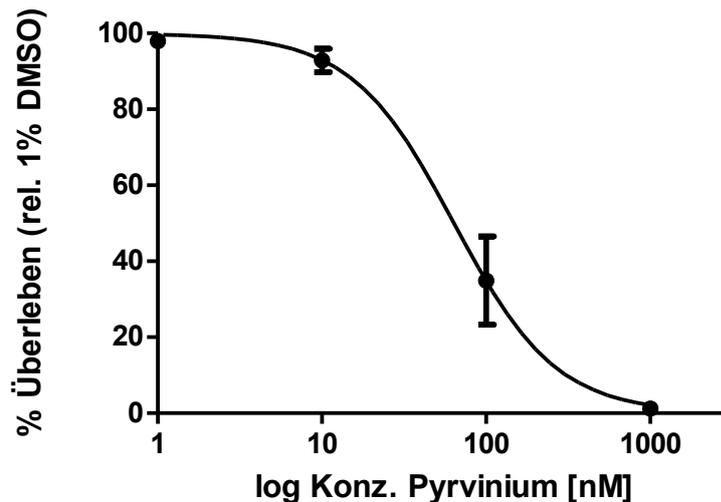


Abbildung 18: Pyrvinium pamoat induziert Apoptose in CLL Zellen

Die Abbildung zeigt die durchflusszytometrische Messung des Zellüberlebens nach 24 Stunden. Der Anteil der als „lebend“ definierten Zellen wurde als AnnexinV-FITC/7-AAD doppelt negativ bestimmt. Die verwendeten Konzentrationen lagen bei 1, 10, 100 und 1.000 nM. Die ermittelte LD₅₀ für CLL Zellen liegt bei 0,64 µM (KI₉₅:45,1 bis 90,03 µM, n = 4).

3.2.3.3 XAV 939 stabilisiert den Destruktionskomplex

Der Tankyrase Inhibitor XAV 939 ist im Zusammenhang mit dem WNT-Signalweg durch eine Stabilisierung von AXIN1 in der humanen Kolon Adenokarzinom Zelllinie SW480 beschrieben. Eine derartige Stabilisierung bildet einen interessanten Ansatz, da AXIN1 als Gerüstbildner und somit als essentieller Teil des Destruktionskomplexes fungiert. Für eine Untersuchung eines Effektes von XAV939 auf CLL-Zellen wurden je 1×10^7 CLL Zellen mit XAV939 in Konzentrationen von 0.1 nM bis 50 µM für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die behandelten Zellen wurden lysiert und die Proteine per Western Blot analysiert.

In Abbildung 19 lässt sich erkennen, dass XAV939 eine Stabilisierung von AXIN1 induziert, die mit steigender Wirkstoffkonzentration zunimmt. Weitergehend wurde untersucht, ob die vermehrte Expression von AXIN1 auch einen Effekt auf den Destruktionskomplex ausübt. Dazu wurde ebenfalls im Western Blot die Expression von APC analysiert. Es zeigte sich, dass APC mit steigender Konzentration an XAV939 und Stabilisierung von AXIN1 ebenfalls stärker exprimiert wird.

Der Wirkungsgrad des Destruktionskomplexes wurde allerdings durch die hohen AXIN1- und APC-Werte nicht verändert, wie es sich durch die Untersuchung von phosphoryliertem β-Catenin zeigte. Die Proteinmengen von Phospho-β-Catenin, welches durch den Destruktionskomplex zuvor phosphoryliert wurde, um eine

Ubiquitinierung zu ermöglichen, blieben über alle Konzentrationsänderungen konstant.

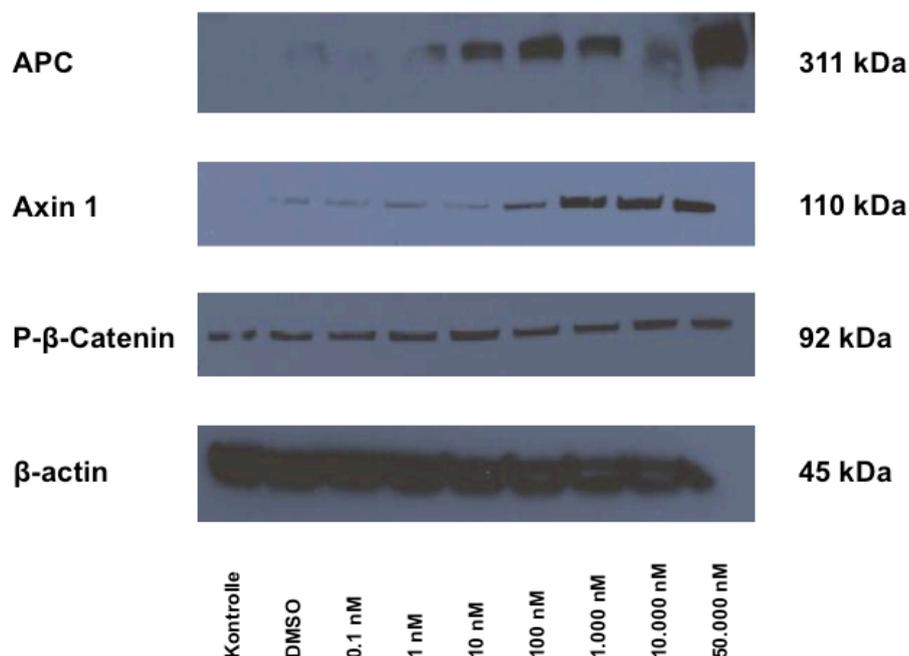


Abbildung 19: Der Effekt von XAV939 auf die Proteine des WNT-Signalweges

Die Abbildung zeigt die Proteinexpression von AXIN1, APC und Phospho-β-Catenin gegen β-actin als Kontrollbande. APC und Axin1 zeigen mit steigender Konzentration immer stärkere Proteinexpression. Für den Abbau aktiviertes Phospho-β-Catenin bleibt in seinen Proteinmengen konstant.

Bei der Analyse der WNT-Bibliothek durch den ATP-Assay zeigte XAV939 kein Einfluss auf das Überleben der CLL-Zellen (siehe Abb. 14). Zur Kontrolle wurde das Überleben der Zellen nach Inkubation mit XAV939 durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Abb. 20). Dazu wurden die gleichen Konzentrationen wie in Abbildung 18 verwendet. Nach 24-stündiger Inkubation zeigte sich kein Effekt auf das Überleben der Zellen, wie bereits in der WNT-Bibliothek in Form des ATP-Assay zu sehen war.

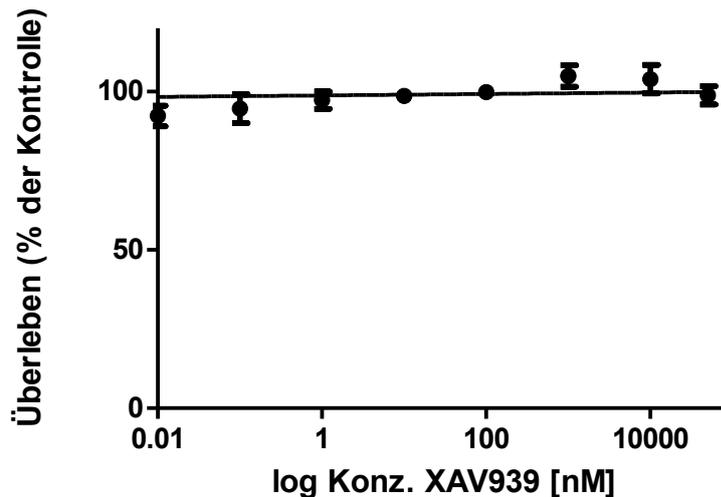


Abbildung 20: XAV939 zeigt keinen Einfluss auf die Viabilität der CLL Zellen

Die Abbildung zeigt das Überleben der Zellen, wobei der als „lebend“ definierte Anteil per Durchflusszytometer als AnnexinV-FITC/7-AAD doppelt negative Zellen bestimmt wurde. Die verwendeten Konzentrationen waren equivalent zu Abbildung 19 von 0.1 nM bis 50 μ M. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit dem Wirkstoff inkubiert. XAV939 zeigte keinen Einfluss auf das Zellüberleben (n=4).

3.2.3.4 Der Wirkstoff JSK

JSK zeigte in der WNT-Bibliothek einen stark minimierenden Effekt auf die Viabilität der CLL Zellen, ohne größeren Effekt auf die gesunden Zellpopulationen zu haben. Um den Effekt des Stickstoffdonators genauer zu untersuchen, wurde das Zellüberleben durchflusszytometrisch bei zwei Zeitpunkten bestimmt, nach 24 und nach 48 Stunden.

Nach 24 stündiger Inkubationen zeigte sich, wie in Abbildung 18 erkennbar, eine LD_{50} von 5.15 μ M für die CLL Zellpopulation und eine LD_{50} von 18.03 μ M für die gesunden PBMCs (siehe Abb. 21). Damit entstand ein therapeutisches Fenster mit einem Unterschied der beiden LD_{50} -Werte um den Faktor 3,6.

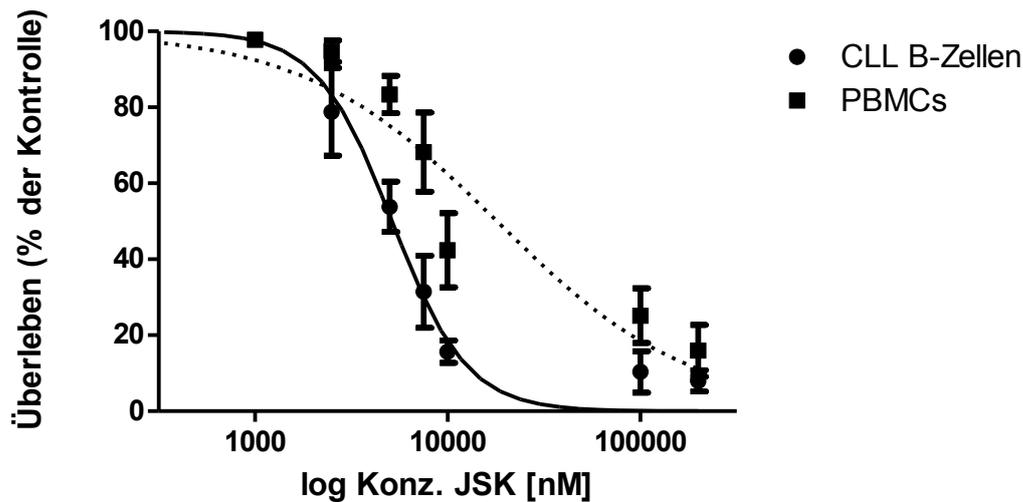


Abbildung 21: JSK induziert Apoptose in CLL-Zellen nach 24 Stunden

Die Abbildung zeigt die durchflusszytometrische Messung des Zellüberlebens nach 24 Stunden. Der Anteil der als „lebend“ definierten Zellen wurde als AnnexinV-FITC/7-AAD doppelt negativ bestimmt. Die Zellen wurden mit Konzentrationen von 1 nM bis 200 μ M behandelt. Die ermittelte LD_{50} liegt für CLL Zellen bei $5.15 \pm 0.86 \mu$ M, für die gesunden PBMCs liegt die LD_{50} bei $18.03 \pm 9.89 \mu$ M.

Im Weiteren wurde die Wirkung von JSK auf beide Zellpopulationen nach 48 Stunden bestimmt, um festzustellen, ob eine Verschiebung der LD_{50} oder eine Veränderung des therapeutischen Fensters erfolgt (siehe Abb. 22). Die LD_{50} der gesunden Zellpopulation sinkt von 18.03 μ M nach 24 stündiger Inkubation auf 8.11 μ M nach 48 Stunden. Damit nähern sich die Werte für CLL-Zellen und PBMCs einander stark an und das therapeutische Fenster verkleinert sich auf ein Minimum.

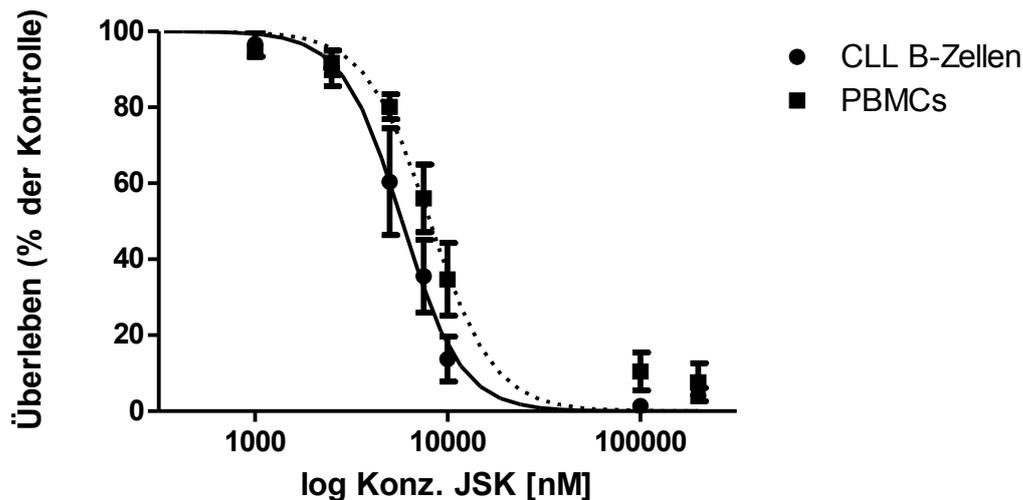


Abbildung 22: Die LD₅₀-Werte der beiden Populationen nähern sich nach 48 Stunden einander an

Die Abbildung zeigt die durchflusszytometrische Messung des Zellüberlebens nach 48 Stunden. Der Anteil der als „lebend“ definierten Zellen wurde als AnnexinV-FITC/7-AAD doppelt negativ bestimmt. Der Konzentrationsbereich entspricht Abbildung 21. Die ermittelte LD₅₀ für CLL Zellen liegt bei $5,8 \pm 0,77 \mu\text{M}$, bei den gesunden PBMCs liegt die LD₅₀ bei $8,11 \pm 0,99 \mu\text{M}$.

3.2.3.5 Trichostatin A – die effektivste Substanz der WNT-Bibliothek

Neben JSK zeigte der HDAC Inhibitor Trichostatin A (TSA) im ATP-Assay der WNT-Bibliothek einen mindernden Effekt auf die Viabilität der CLL Zellen in allen Konzentrationen. Die Veränderung hinsichtlich der Viabilität der gesunden Zellpopulationen blieb gering (siehe Abb. 15).

Um den Effekt von TSA auf die Zellen genauer zu betrachten, wurde das Überleben mittels Durchflusszytometrie nach 24 und 48 Stunden ermittelt. Wie in Abbildung 23 zu erkennen ist, hatte TSA nach 24-stündiger Inkubation wenig Auswirkung auf das Zellüberleben. Die LD₅₀ lag für die CLL-Zellen im relativ hohen Bereich von $166,7 \mu\text{M}$, während TSA bei der gesunden Population der PBMCs fast keine Auswirkung zeigte. Es lag mit einer ermittelten LD₅₀ von $3,7 \text{ mM}$ im millimolaren Bereich.

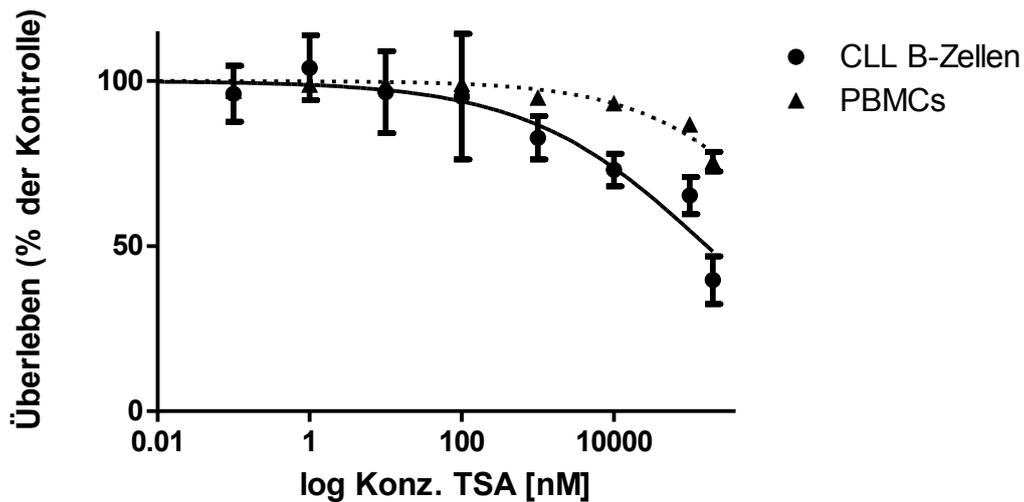


Abbildung 23: Trichostatin A zeigt einen geringen Effekt auf gesunde und kranke Zellpopulationen nach 24 Stunden

Die Abbildung zeigt die durchflusszytometrische Messung des Zellüberlebens nach 24 Stunden. Der Anteil der als „lebend“ definierten Zellen wurde als AnnexinV-FITC/7-AAD doppelt negativ bestimmt. Die verwendeten Konzentrationen lagen bei 0,1, 1, 10, 100, 1.000, 10.000, 100.000 und 200.000 nM. Die ermittelte LD₅₀ für CLL Zellen liegt bei 166,7 (KI₉₅: 40,3 bis 689,1 µM, n = 4), bei den gesunden PBMCs liegt die LD₅₀ bei 3,7 mM (KI₉₅: 1,2 bis 11,2 mM, n = 3).

Nach 48 h war ein deutlicher Effekt von TSA auf die CLL-Zellen zu erkennen. Während die Auswirkungen auf die gesunden PBMCs mit einer LD₅₀ 145.22 µM noch relativ gering waren, zeigte sich für TSA eine starke Apoptose-induzierende Wirkung, die durch einen niedrigen LD₅₀-Wert von 0,27 µM gekennzeichnet war (siehe Abb. 24). Die Selektivität von TSA für CLL Zellen ist gegenüber gesunden Zellen vielfach erhöht. Sichtbar wird dies durch den Unterschied zwischen den LD₅₀-Werten um das über 500-fache.

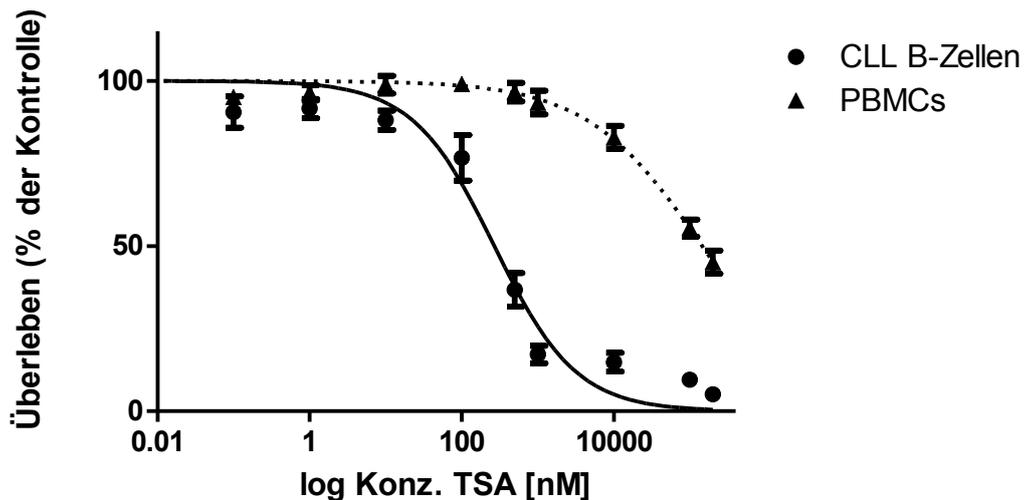


Abbildung 24: TSA induziert Apoptose nach 48 Stunden mit einem geringen Einfluss auf gesunde Zellen

Die Abbildung zeigt die durchflusszytometrische Messung des Zellüberlebens nach 24 Stunden. Der Anteil der als „lebend“ definierten Zellen wurde als AnnexinV-FITC/7-AAD doppelt negativ bestimmt. Die verwendeten Konzentrationen lagen bei 0,1, 1, 10, 100, 500, 1.000, 10.000, 100.000 und 200.000 nM. Die ermittelte LD_{50} für CLL Zellen liegt bei 0,27 μM (KI_{95} : 0,20 bis 0,35 μM , $n = 10$), bei den gesunden PBMCs liegt die LD_{50} bei 145,22 μM (KI_{95} : 112,03 bis 188,24 μM , $n = 3$).

3.2.4 Der Wirkstoff Trichostatin A

Aufgrund seiner Wirksamkeit auf CLL-Zellen mit einer geringen Toxizität auf gesunde Zellpopulationen stellt Trichostatin A eine interessante Substanz für weitergehende Untersuchungen dar. Zu den Hauptfragestellungen zählt die Aufklärung des Wirkmechanismus, des Mechanismus des Zelltodes und die mögliche Optimierung der Molekülstruktur.

3.2.4.1 Trichostatin A wirkt über einen Caspase-abhängigen Mechanismus

Zellen können auf verschiedene Arten dem Zelltod unterliegen. Dabei werden grob der programmierte Zelltod mit der Apoptose im Mittelpunkt und die Nekrose unterschieden.

Entscheidende Schritte im Prozess der Apoptose sind die Aktivierung der Caspasen (*Cystein-ASpartat spezifische ProteASE*) und die Spaltung von PARP (*Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase*). Das System der Caspasen basiert auf einer komplexen Kaskade aus Initiator-Caspasen und Effektor-Caspasen, die durch Spaltung aktiviert werden. Die Caspasen beinhalten ein Cystein als aktives Zentrum, welches nach der Aktivierung die Peptidbindungen C-terminal von Aspartat spalten kann.

Um den Wirkungsmechanismus von Trichostatin A auf die CLL-Zellen zu untersuchen, wurde ein Caspase-3/7 Assay durchgeführt, um die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 zu bestimmen. Die Behandlung von CLL Zellen mit Trichostatin A zeigt eine starke Aktivität der Caspasen 3 und 7 in vier Konzentrationen. Diese lagen um die zuvor bestimmte LD₅₀ von Trichostatin A. Als Kontrolle dienten DMSO-behandelte CLL-Zellen (vgl. 3.2.3.5, siehe Abb. 25).

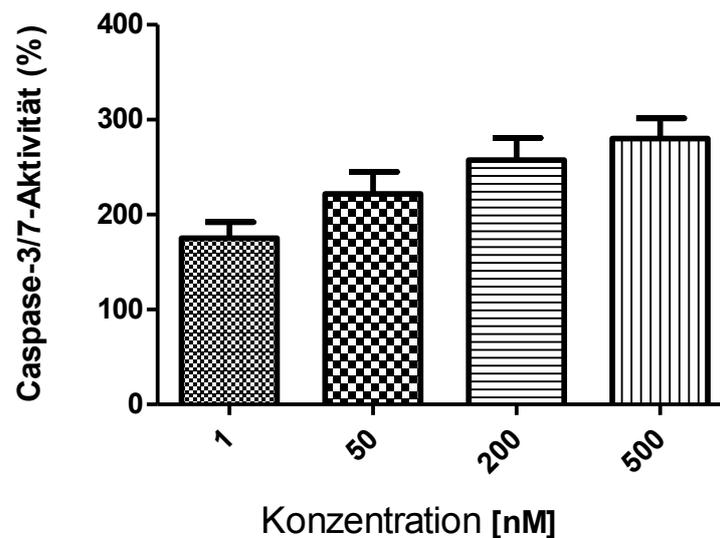


Abbildung 25: Aktivität der Caspasen 3 und 7 in CLL-Zellen nach Behandlung mit TSA

Die Abbildung zeigt die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 in CLL Zellen nach Behandlung mit TSA für 24 Stunden. Für die Behandlung wurden vier Konzentrationen um die LD₅₀ von TSA gewählt. Mit steigender Konzentration der Wirkstoffmenge verdoppelte sich die Aktivität der Caspasen bis auf ca. 280% verglichen mit einer DMSO-behandelten Kontrolle (n=3).

Als Kontrolle für die Caspase-abhängige Apoptose wurde die Expression von PARP mittels Western Blot Analyse detektiert. Das Enzym PARP ist Teil des Endpunktes in der Caspase-Signalkaskade und wird durch aktivierte Caspase 3 gespalten. Dadurch verliert PARP die Enzymaktivität, die unter anderem für die DNA-Reparatur verantwortlich ist.

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an Trichostatin A und nach anschließender Analyse mittels Immunoblot wurde besonders bei hohen Konzentrationen vermehrt gespaltenes PARP-Protein detektiert (siehe Abb. 26). Die Spaltung von PARP verlief von der Intensität ausgehend relativ zur Wirkstoffkonzentration von TSA.

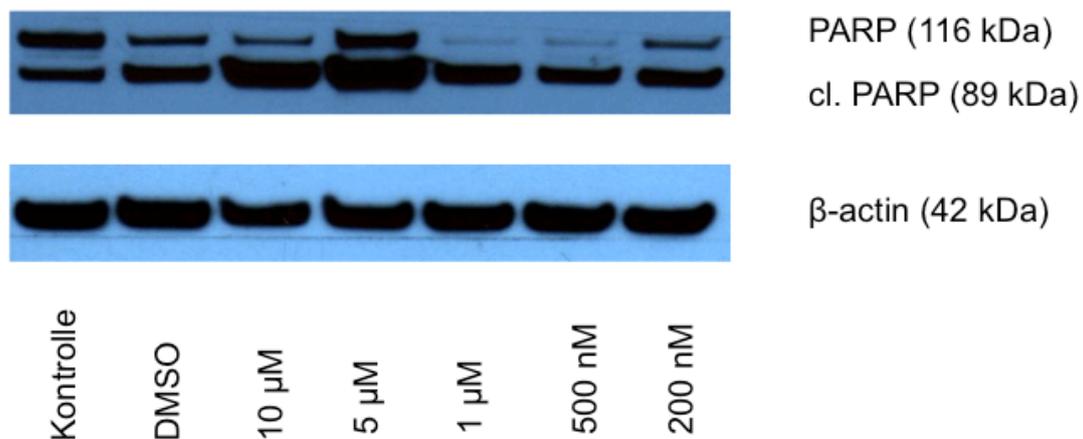


Abbildung 26: Die Spaltung von PARP als Kontrolle für Caspase-Aktivität

Die Abbildung zeigt die Immunoblot-Analyse von PARP in CLL Zellen nach einer Behandlung mit Trichostatin A für 24 Stunden. Besonders in hohen Konzentrationen von TSA ist eine Verschiebung des intakten PARP-Proteins hin zur gespaltenen Form zu erkennen (cl. steht für cleaved, d.h. gespaltenes Protein-Fragment). Insgesamt wurde die Spaltung von PARP in 3 unabhängigen Proben nachgewiesen.

3.2.4.2 Der duale Wirkmechanismus von Trichostatin A

Für den Naturstoff Trichostatin A wurde in Säugerzellen eine selektive Inhibierung der Histon-Deacetylasen (HDAC) der Klasse I und II beschrieben (185). Histon-Deacetylasen sind Enzyme, die über eine Veränderung der Histone die Transkription und im weiteren den Zellzyklus und die Entwicklung beeinflussen können. Ihre Funktion besteht darin, an der N-terminalen Aminosäure Lysin eine Acetyl-Gruppe zu entfernen. Die Deacetylierung bewirkt eine Ladungsveränderung des Moleküls Lysin, wodurch sich die Affinität zum polaren Phosphat-DNS-Gerüst erhöht. Die enge Bindung zwischen DNS-Strang und Histonen führt zu einer Herabregulation der Transkription, da die Transkriptionsfaktoren keine Bindestellen mehr finden können.

Für eine nähere Untersuchung des Wirkmechanismus in CLL Zellen wurde der Acetylierungsstatus durch eine Immunoblot-Analyse bestimmt. Dazu wurde die Acetylierung an einem der fünf Haupthistone, dem Histon H4, durch einen gegen das Lysin 12 gerichteten Antikörper detektiert. Die CLL Zellen wurden zuvor für 24 Stunden mit zwei Wirkstoffkonzentrationen von TSA inkubiert (siehe Abb. 27).

Sowohl für CLL Zellen, die mit 1 μ M inkubiert wurden, als auch für die Inkubation der zehnfachen Wirkstoffmenge zeigte sich eine starke Acetylierung von Histon H4.

Trichostatin A kann in CLL Zellen die Histon-Deacetylase inhibieren und den Acetylierungsstatus verändern.

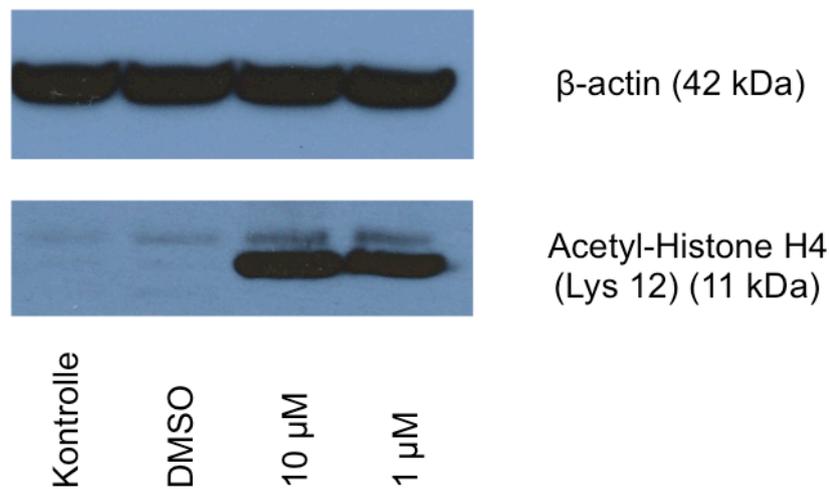


Abbildung 27: Die Inhibition der Histon-Deacetylase durch Trichostatin A

Die Abbildung zeigt die Inhibition der Histon-Deacetylase am Histon H4 durch eine Immunoblot-Analyse. Die verwendeten CLL Zellen wurden 24 Stunden mit TSA in den Konzentrationen 1 und 10 μ M inkubiert. In beiden Konzentrationen ließ sich im Gegensatz zu den Kontrollen das acetylierte Histon H4 nachweisen. Insgesamt konnte die Inhibition der Histon-Deacetylase bei drei verschiedenen Proben gezeigt werden.

Ein weiterer Angriffspunkt für Trichostatin A stellt das Protein DKK1 dar. Physiologisch fungiert DKK1 als Substrat für den Korezeptor LRP6. Durch Bindung an den Rezeptor kann die Rekrutierung von LRP6 durch den Frizzled-Rezeptor verhindert werden. Als Folge wird der Destruktionskomplex nicht durch den Frizzled-Rezeptor gebunden, sondern verbleibt im Zytoplasma und kann β -Catenin binden und phosphorylieren.

Nach einer Inkubation mit 1 und 10 μ M zeigte sich in der quantitativen PCR-Analyse eine Verdoppelung der relativen mRNA-Expression von DKK1 im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 28).

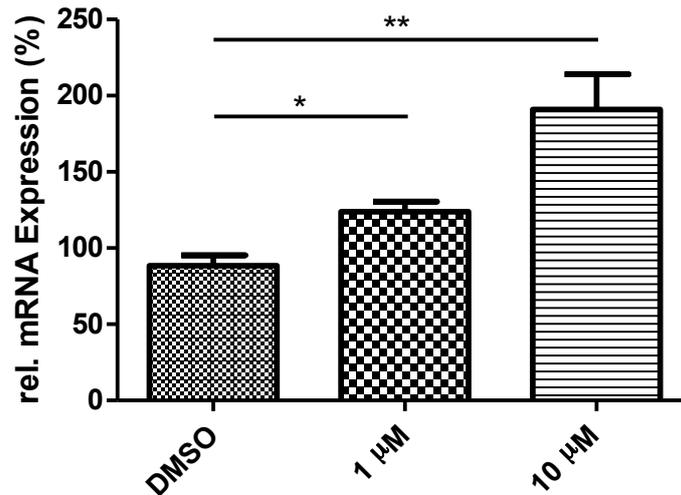


Abbildung 28: Die mRNA-Expression von DKK1 ist nach TSA-Behandlung erhöht

Gezeigt ist die Veränderung der mit quantitativer PCR gemessenen mRNA-Expression in CLL-Zellen nach Inkubation mit TSA für 24 Stunden. Trichostatin A wurde in den Konzentrationen 1 und 10 µM appliziert und zeigt eine mehr als doppelt so starke Expression verglichen mit der DMSO-behandelten Kontrolle. Als Referenz diente *abl*. (* = $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n = 5$)

3.2.4.3 TP53-mutierte CLL-Zellen zeigen gute Ansprechraten gegenüber TSA

Die Mutation des p53-Signalweges spielt eine zentrale Rolle in der Entstehung von Resistenzen gegen eine Behandlung durch Chemotherapie bei CLL Patienten gemäß den Leitlinien. Dabei ist sehr häufig eine Resistenz gegenüber alkylierenden Substanzen zu beobachten. Des Weiteren ist eine Mutation von *TP53* assoziiert mit einer sehr schlechten Überlebensrate.

Aufgrund dieser Problematik steigen die Anforderungen an neue Wirkstoffe, da die Behandlung von Hochrisikopatienten, hier am Beispiel einer *TP53*-Mutation, momentan nicht zufriedenstellend möglich ist.

Um die Möglichkeit der Therapie von *TP53*-mutierten CLL Zellen mit TSA zu untersuchen, wurden mittels Stickstoff kryokonservierte Proben aus der CLL-Biobank rekonstituiert und durchflusszytometrisch nach 48-stündiger Inkubation bei verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen vermessen. Als Kontrolle wurden rekonstituierte Kryo-Proben von CLL Zellen ohne entsprechende Mutation benutzt (siehe Abb. 29).

Als Nebeneffekt der Rekonstitution war zu beobachten, dass die LD_{50} -Werte der beiden Gruppen insgesamt etwas niedriger lagen, als die der frisch isolierten Zellen. Die Ansprechraten sowohl der mutierten als auch der unmutierten Zellen lagen in einem akzeptablen Bereich. Die LD_{50} -Werte dieses Versuches lagen im ähnlichen

Bereich (47,25 nM für mutierte Proben und 94,57 für unmutierte Proben), insgesamt aber unter dem LD₅₀-Wert von frisch isolierten CLL Zellen mit 268,2 nM.

Zusammenfassend ließ sich erkennen, dass *TP53*-mutierte CLL Zellen keine Resistenz gegen die Behandlung mit Trichostatin A aufwiesen und Trichostatin A, sowohl bei mutierten, als auch bei unmutierten CLL Zellen effektiv Apoptose induzierte.

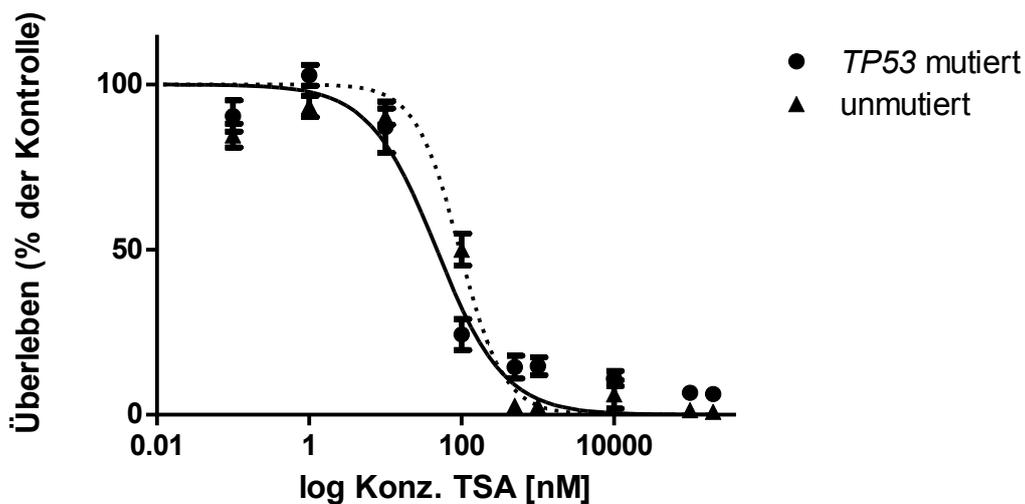


Abbildung 29: *TP53*-mutierte CLL Zellen sprechen gut auf die Behandlung mit TSA an

Die Abbildung zeigt die Dosis-Wirkungskurve für eine Behandlung von CLL Zellen, die eine *TP53*-Mutation tragen und eine Vergleichsgruppe ohne entsprechende Mutation. In der Kurve wurde eine durchflusszytometrische Messung des Zellüberlebens nach 48 Stunden berechnet und aufgetragen. Der Anteil der als „lebend“ definierten Zellen wurde als AnnexinV-FITC/7-AAD doppelt negativ bestimmt. Die LD₅₀ der CLL Zellen mit einer Mutation lag bei 47,25 nM (KI_(95%) 31,39 bis 71,11 nM, n = 3), bei den unmutierten CLL Zellen lag die LD₅₀ bei 94,57 nM (KI_(95%) 74,81 bis 119,5 nM, n = 3).

3.2.4.4 Stark vorbehandelte Proben zeigen keine Resistenz auf Trichostatin A

Neben der Resistenz-Entwicklung gegenüber Chemotherapie, unter anderem durch bekannte Mutationsmuster, ist die Resistenzentstehung bei Patienten, die bereits eine konventionelle Therapie erhalten haben, ein weiteres Problem. Dabei lässt sich vielfach feststellen, dass Patienten, die innerhalb von 2 Jahren nach einem Therapiezyklus einen Rückfall erleiden, ein deutlich schlechteres Ansprechen auf eine weitere Therapie zeigen. Dieses Phänomen ist häufig gekoppelt mit einem verkürzten Gesamtüberleben. Die Mechanismen der Resistenzentstehung sind auch in diesem Fall nicht vollständig geklärt, jedoch scheint die Entstehung ähnlich der der Mutationsfälle im vorigen Absatz zu verlaufen.

Aufgrund dieser Problematik sind für die zukünftige Behandlung der CLL die Entwicklung von Wirkstoffen wichtig, die diese Mechanismen umgehen und eine zuverlässige Behandlungsoption darstellen. Um die Möglichkeit der Therapie von vorbehandelten Patienten zu untersuchen, wurden Proben ausgewählt, die in der Vergangenheit eine konventionelle Chemotherapie aus mindestens vier Zyklen erhalten haben. Die Chemotherapie setzte sich zusammen aus einer Behandlung mit den Substanzkombinationen Fludarabin(F)/Cyclophosphamid(C)/Rituximab(R), FR, Bendamustin(B)/R oder FC.

Der Vergleich von unbehandelten mit vorbehandelten Probe nach einer 48-stündigen Inkubation mit Trichostatin A in Konzentrationen von 200 μM bis 0.1 nM zeigt einen fast identischen LD_{50} -Wert (vorbehandelt: 287,5 nM, unbehandelt: 268,2 nM) für beide Gruppen (siehe Abb. 30). Die starke Vorbehandlung der CLL Zellen mit konventioneller Chemotherapie führt nicht zu einer Resistenz gegenüber der Behandlung mit Trichostatin A.

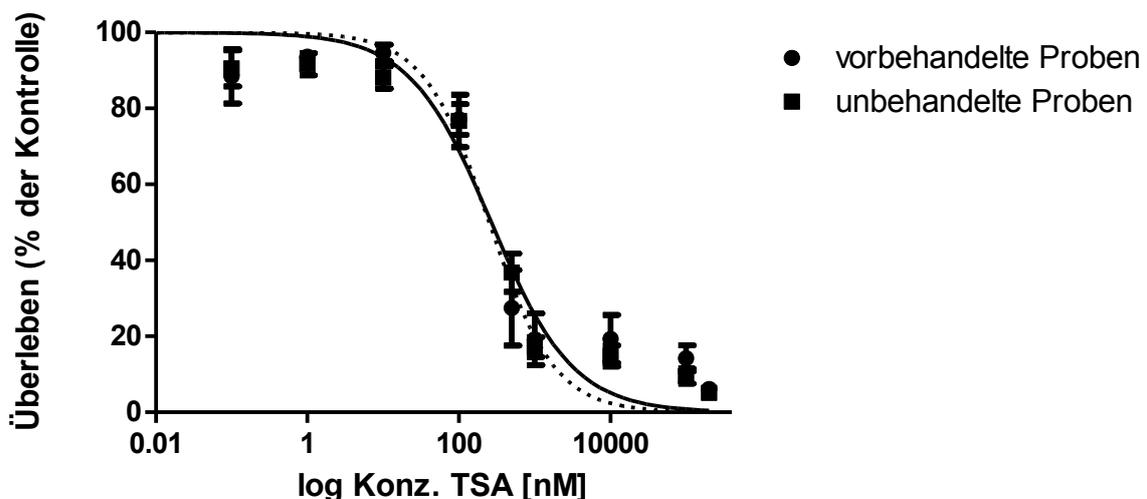


Abbildung 30: Stark vorbehandelte Patienten zeigen gleiche Ansprechraten auf Behandlung mit TSA wie therapienaive Patienten

Die Abbildung zeigt die Dosis-Wirkungskurve für eine Behandlung von CLL Zellen, die zuvor eine Behandlung aus mindestens vier Zyklen konventioneller Chemotherapie erhielten und einer Vergleichsgruppe aus therapienaiven CLL Zellen. In der Kurve wurde die durchflusszytometrische Messung des Zellüberlebens nach 48 Stunden berechnet und aufgetragen. Der Anteil der als „lebend“ definierten Zellen wurde als AnnexinV-FITC/7-AAD doppelt negativ bestimmt. Die LD_{50} der vorbehandelten CLL-Zellen lag bei 287,5 nM (KI_{95} : 165,7 bis 498,9 μM , $n = 4$), bei den unbehandelten CLL-Zellen lag die LD_{50} bei 268,2 nM (KI_{95} : 204 bis 352,7 nM, $n = 10$).

3.2.4.5 Additiver Effekt von Trichostatin A mit DNS-aktiven Substanzen

Der Wirkmechanismus von Trichostatin A zielt unter anderem auf die DNS durch seinen Effekt an den Histonen (vgl. 3.2.4.2). Um einen potentiellen synergistischen Effekt mit anderen Wirkstoffen zu untersuchen, wurden die beiden häufig genutzten Substanzen Bendamustin (Alkylanz) und Fludarabin (Purinanalogon) ausgewählt, deren Wirkmechanismus ebenfalls im Bereich der DNS liegt.

Für die Untersuchung eines wirkverstärkenden Effektes bei einer Behandlung mit zwei Substanzen wurden die CLL Zellen mit einer konstanten Konzentration im Bereich der LD₅₀-Werte von Bendamustin (20 µM) oder Fludarabin (5 µM) und einer variierenden Wirkstoffkonzentration von Trichostatin A zwischen 200 µM und 0,1 nM 48 Stunden lang inkubiert. Alle Proben stammten von therapienaiven Patienten, da Fludarabin und Bendamustin bei vorbehandelten Zellen kaum bis keine Wirkung zeigen.

Bereits die mit niedriger Wirkstoffkombination behandelten CLL Zellen wiesen in der Kombinationsbehandlung nur noch eine Viabilität zwischen 60-70% auf, während die mit TSA behandelten Zellen noch eine Viabilität zwischen 90-100% zeigten. Dieser Effekt lässt sich durch die Kombinationssubstanz erklären, die über die gesamte Versuchsreihe annähernd dem LD₅₀-Wert entsprach. Die LD₅₀-Werte der drei untersuchten Gruppen wichen nur geringfügig voneinander ab. Die Behandlung durch Trichostatin A alleine wies mit 274,2 nM den höchsten Wert auf, die Kombination mit Bendamustin ergab den niedrigsten Wert mit 206,3 nM (siehe Abb. 31).

Insgesamt lässt sich hier ein additiver Effekt bei einer Kombination von TSA mit anderen Substanzen erkennen. Ein synergistischer Effekt lässt sich nicht erkennen, da die LD₅₀-Werte im ähnlichen Bereich liegen.

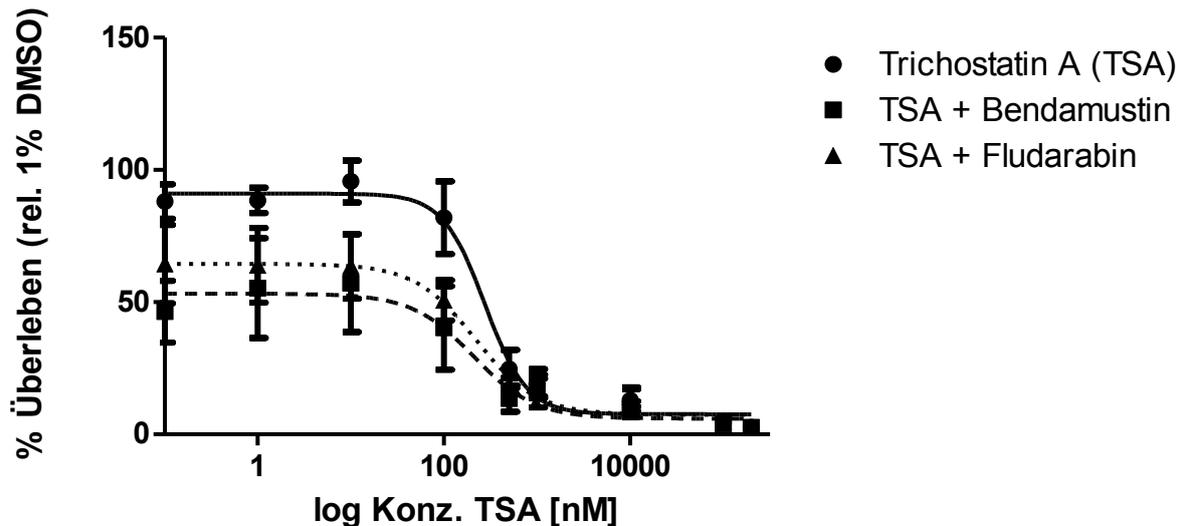


Abbildung 31: Additiver Effekt in Kombination mit DNS-aktiven Substanzen

Die Abbildung zeigt die Dosis-Wirkungskurven für eine Behandlung von CLL-Zellen mit TSA als Einzelwirkstoff und in Kombinationen mit Bendamustin und Fludarabin. In der Kurve wurde eine durchflusszytometrische Messung des Zellüberlebens nach 48 Stunden berechnet und aufgetragen. Der Anteil der als „lebend“ definierten Zellen wurde als AnnexinV-FITC/7-AAD doppelt negativ bestimmt. Die LD_{50} bei der Behandlung mit TSA lag bei 274,2 nM (KI_{95} : 171,2 bis 439,0 μ M, $n = 3$), die LD_{50} der Kombination mit Bendamustin lag bei 206,3 nM (KI_{95} : 46,2 bis 920,2 nM, $n = 3$) und die LD_{50} der Kombination mit Fludarabin lag bei 218,7 nM (KI_{95} : 85,8 bis 557,7 nM, $n = 3$).

3.2.4.6 Der WNT-abhängige Aktivator QS-11 versagt bei der Viabilitätssteigerung in Kombination mit Trichostatin A

Der Inhibitor von ARFGAP1, QS-11, zeigte in der WNT-Bibliothek eine starke Steigerung der Viabilität von CLL-Zellen (vgl. 3.2.1). Der Effekt von QS-11 ist gekoppelt an die Anwesenheit von WNT-Molekülen, die innerhalb des Versuches in Form von FCS dem Nährmedium hinzugefügt wurden. Um den Zusammenhang der Abhängigkeit vom WNT-Signalweg für Trichostatin A genauer zu untersuchen, wurden CLL-Zellen mit beiden Wirkstoffen 48 Stunden lang behandelt. Die Konzentration von QS-11 wurde über die Versuchsreihe konstant bei 1 μ M gehalten, während Trichostatin A in steigenden Konzentrationen um den Wert der LD_{50} hinzugefügt wurde.

Für die Einzelbehandlung mit QS-11 zeigte sich erneut eine Viabilitätssteigerung auf bis zu 125% (siehe Abb. 33).

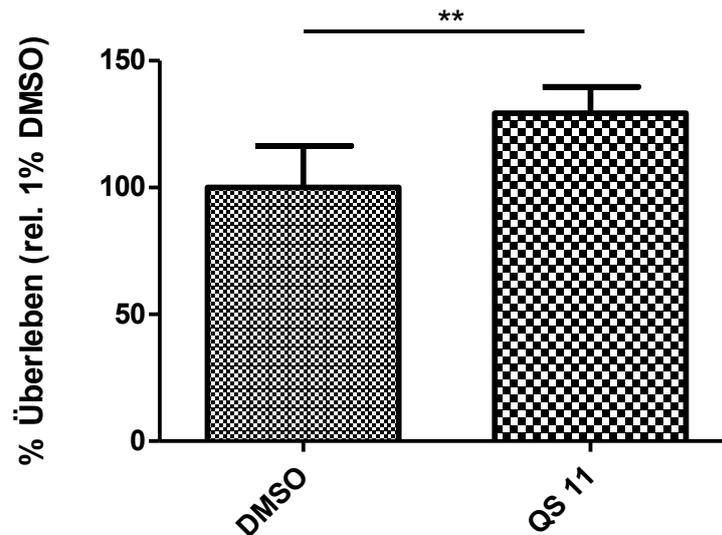


Abbildung 32: Überlebenssteigerung von QS-11 auf CLL Zellen

Die Abbildung zeigt den überlebensfördernden Effekt von QS-11 auf CLL-Zellen gegen eine mit DMSO behandelte Kontrolle. Alle Zellen wurden 48 h mit QS-11 in einer Konzentration von 1 μM behandelt und im Brutschrank inkubiert. Das Zellüberleben wurde mit AnnexinV-FITC/7-AAD Färbung durchflusszytometrisch vermessen, wobei der Anteil der doppelt negativ gefärbten Zellen als „lebend“ definiert war. (n = 6, p<0.01)

Die Überlebenssteigerung durch QS-11 wird durch die Kombinationsbehandlung mit Trichostatin A inhibiert. Die LD_{50} für die Behandlung mit Trichostatin A lag bei 129,7 μM und der Wert für die Kombinationsbehandlung betrug 103,4 μM (siehe Abb. 33). Es ließ sich feststellen, dass Trichostatin A den überlebensfördernden Effekt von QS-11 außer Kraft setzt und in den Zellen Apoptose induziert, wie in der Einzelbehandlung zu sehen war.

Die Abweichung der LD_{50} für Trichostatin A zu den vorherigen Versuchen resultiert wahrscheinlich aus den wenigen für diesen Versuchen gewählten Konzentrationen, die alle um die LD_{50} liegen.

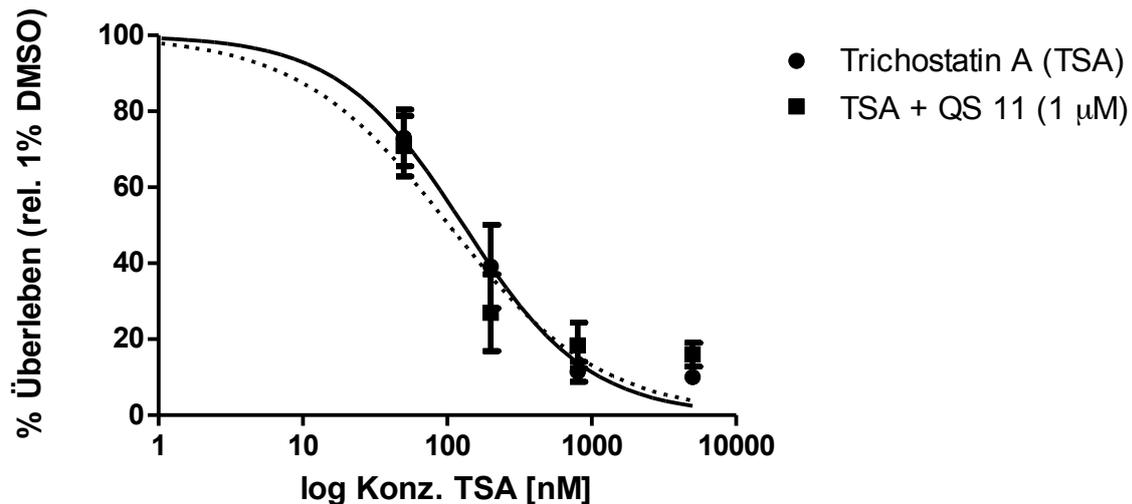


Abbildung 33: QS-11 kann CLL Zellen nicht vor Apoptose durch Trichostatin A schützen

Die Abbildung zeigt die durchflusszytometrische Messung des Zellüberlebens nach 48 Stunden. Der Anteil der als „lebend“ definierten Zellen wurde als AnnexinV-FITC/7-AAD doppelt negativ bestimmt. Die verwendeten Konzentrationen lagen für QS-11 konstant bei 1 µM, während Trichostatin A in steigenden Konzentrationen verwendet wurde. Die ermittelte LD₅₀ für die TSA-Einzelbehandlung lag bei 0,27 µM (KI₉₅: 0,20 bis 0,35 µM, n = 10), bei den gesunden PBMCs lag die LD₅₀ bei 145,22 µM (KI₉₅: 112,03 bis 188,24 µM, n = 3).

3.3 Trichostatin A zeigt ähnliche Eigenschaften wie das bereits zugelassene Medikament Vorinostat

Die Substanzen Trichostatin A und Vorinostat (SAHA) sind strukturell sehr ähnliche Moleküle und gleichen sich auch in ihrer Wirkung an den Histon-Deacetylasen. Da der Wirkstoff SAHA bereits in der Klinik zur Therapie am Menschen zugelassen und darüberhinaus oral verfügbar ist, wurde er ebenfalls an CLL Zellen getestet, da eine mögliche Wirkung durch die Gemeinsamkeiten mit Trichostatin A nahe lag.

Für die Untersuchung wurden nicht vorbehandelte Zellen mit den beiden Wirkstoffen in gleichen Konzentrationen 48 Stunden lang inkubiert. Bei der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich für SAHA ebenfalls eine spezifische Wirkung auf die CLL-Zellen im Vergleich zu gesunden PBMCs, jedoch war diese gekennzeichnet durch eine LD₅₀, die mehr als 30-fach höher war, verglichen mit Trichostatin A (siehe Abb. 34).

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass andere HDACi aus derselben chemischen Gruppe ebenfalls eine Wirkung auf CLL-Zellen entfalten, die Selektivität in Form der LD₅₀ jedoch unterschiedlich ausfallen kann.

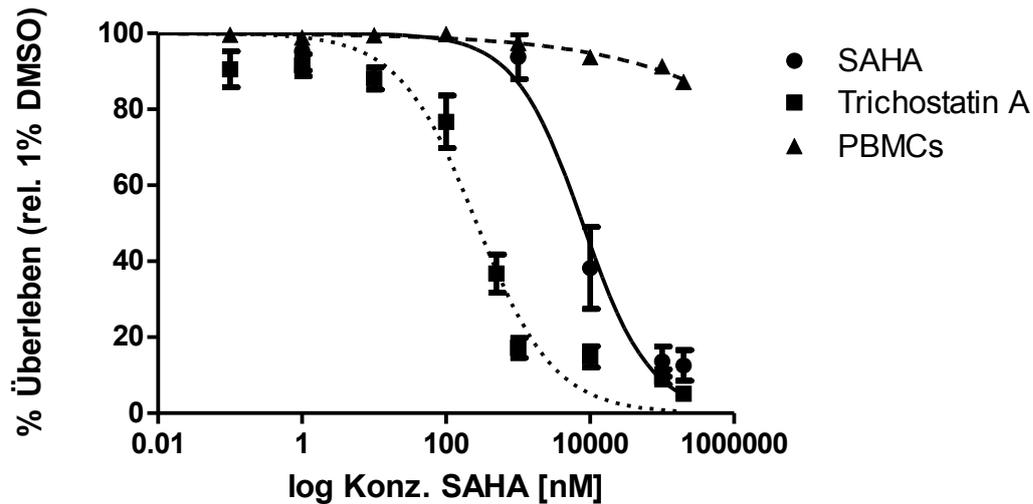


Abbildung 34: Dosis-Wirkungsvergleich zwischen SAHA und Trichostatin A

Die Abbildung zeigt die durchflusszytometrische Messung des Zellüberlebens nach 48 Stunden. Der Anteil der als „lebend“ definierten Zellen wurde als AnnexinV-FITC/7-AAD doppelt negativ bestimmt. Die Substanzen SAHA und Trichostatin A wurden jeweils zum Vergleich in gleichen Konzentrationen verwendet. Die ermittelte LD_{50} für SAHA lag bei 7,88 μM (KI_{95} : 5,31 bis 11,69 μM , $n = 5$), bei der Behandlung mit TSA lag die LD_{50} bei 0,27 μM (KI_{95} : 0,2 bis 0,35 μM , $n = 10$) und bei gesunden PBMCs lag die LD_{50} bei 122,5 mM (KI_{95} : 17,5 bis 857,9 mM, $n = 3$).

4 Diskussion

Die chronische lymphatische Leukämie ist ein niedrig malignes B-Zell-Lymphom, welches durch eine Anhäufung von funktionell inkompetenten B-Zellen charakterisiert ist. Durch eine fehlerhafte Regulation der Apoptosefunktion sind die B-Zellen darüber hinaus durch ein langes Überleben gekennzeichnet (40, 44).

Selbst mit der Verbesserung und Revolution vieler Analysemethoden in den letzten Jahren ist es bis heute nicht gelungen, den genauen Mechanismus der Pathogenese zu eruieren. Seit der ersten detaillierten Beschreibung der CLL durch Dameshek 1967 befassen sich bis heute viele Studien und Theorien mit der Entstehung der Erkrankung von der Hämatopoese über die Zellentwicklung bis hin zur Apoptoseresistenz.

In allen Entwicklungsstadien gab es mit der Zeit neue Erkenntnisse. Bis heute bleibt allerdings die Vorläuferzelle der CLL und damit die Entstehung der pathologischen B-Zellen unbekannt. Aktuelle Untersuchungen deuten auf einen Zusammenhang mit IgV_H hin, über dessen Mutationsstatus die Abspaltung der Zellen innerhalb bestimmter Punkte der B-Zellentwicklung entschieden wird (191).

Neben der Entstehung der Zellen ist der Mechanismus der Apoptoseresistenz und die damit einhergehende pathologische Überlebensverlängerung nicht vollständig geklärt. Aktuell gibt es einige Ansätze, die Mutationen, Überexpression von Proteinen oder aberrant aktive Signalwege als Ursachen beschreiben.

Ein möglicher Faktor für eine Apoptoseresistenz ist eine Mutation von *TP53* oder dem daraus hervorgehenden Protein p53, welches eine wichtige Rolle im apoptotischen System spielt (174, 181). Ebenfalls wurde eine Überexpression anti-apoptotischer Proteine wie z.B. XIAP oder Bcl-2 beschrieben und diskutiert, die zwar teilweise den Krankheitsverlauf zu beeinflussen scheinen, jedoch nicht eindeutig als Hauptursache für eine Resistenz herausgestellt werden konnten (101, 132, 157).

Neben den genannten Ursachen scheinen fehlerhaft aktive Signalkaskaden eine große Rolle innerhalb des Erkrankungsgeschehens zu spielen. Bisher sind unter anderem die MAP Kinase-Kaskade, der $NF\kappa B$ -, der PI3K/AKT- und der WNT-Signalweg mit einer abnormen Funktion in Verbindung gebracht worden (28).

Insbesondere der WNT-Signalkaskade kommt eine große Bedeutung zu. Physiologisch ist der WNT-Signalweg während der embryonalen Entwicklung aktiv und zudem für die Zellproliferation, die Zellmigration oder die Achsenformung verantwortlich. In gesunden adulten Organismen ist der WNT-Signalweg nicht oder

nur minimal aktiv (22). Die Kaskade spielt eine große Rolle in der Entstehung von neoplastischen Erkrankungen und Leukämien, wobei verschiedene Teile des Signalweges betroffen sein können. Die Hauptursache für die Erkrankungen ist zurückzuführen auf Mutationen innerhalb des Signalweges, wobei die Mutationen entweder zu einem Funktionsverlust (loss-of-function-Mutation) oder zu einer Aktivitätssteigerung (gain-of-function-Mutation) gelangen können (68).

Im Krankheitsbild der CLL ist der WNT-Signalweg mit einer Reihe an hochregulierten Proteinen konstitutiv aktiv und nimmt damit eine zentrale Rolle in der Krankheitsentstehung ein. Dabei sind sowohl viele Vertreter der WNT-Moleküle als auch der Frizzled-Rezeptor überexprimiert (114). Der Transkriptionsfaktor LEF-1 weist sogar eine sehr starke Überexpression auf (55, 95).

4.1 Die Funktionalität der WNT-Signalkaskade

Die einzelnen Bestandteile der WNT-Kaskade spielen in vielen humanen Krebserkrankungen eine Rolle, indem durch Mutationen ihre Funktion verloren geht oder verändert wird. Beta-Catenin als zentraler Bestandteil der Kaskade ist sehr häufig in verschiedenen Erkrankungen zu finden, wie zum Beispiel bei Melanomen, Prostatakarzinomen, hepatozellulären Karzinomen oder Endometrial-Karzinom. Das Gerüstprotein AXIN1 findet sich in Ovarialkarzinomen und APC ist sehr stark mit dem Auftreten von Magenkarzinomen und Kolorektalkarzinomen verknüpft (68, 135).

Als erste Annäherung an die Funktionalität insbesondere des Destruktionskomplexes (APC, AXIN1, GSK3 β), des Proteins β -Catenin und den Transkriptionsfaktor LEF1 wurden wichtige Funktions- und Bindestellen anhand ihrer Gensequenz analysiert (siehe Tab. 16 und Abb. 35).

Die Mutationen von APC sind sehr gut im Krankheitsbild der FAP untersucht, wobei sowohl die Keimbahn- als auch die somatischen Zellen betroffen sein können (58). Aufgrund der Größe des Proteins und der damit verbundenen Gensequenzlänge wurden drei Abschnitte untersucht, die in der FAP signifikant häufiger betroffen sind. Insgesamt wurden 41 Patientenproben analysiert, allerdings ohne Hinweise auf eine Mutation. Bei 5 Proben wurde ein SNP für das Codon der Aminosäure 1493 gefunden, bei dem ein Adenosin statt einem Guanin an der dritten Stelle des Codons lag, wobei beide Anordnungen für die Aminosäure Threonin codierten.

Für den Gerüstbildner AXIN1 wurde der Abschnitt zwischen den Aminosäuren 464-496 analysiert, der für die Bindestelle mit β -Catenin wichtig ist (183). Bei 41

sequenzierten Proben fanden sich keine Mutation und kein Hinweis auf einen Fehler in der Funktion.

Die Sequenzbereiche von β -Catenin, GSK3 β und LEF1 mussten auf cDNA-Basis sequenziert werden, da sich die interessanten Bereiche teilweise über mehrere Exons erstreckten.

Beta-Catenin wird für den Abbau durch das Proteasom an den vier Aminosäuren Ser33, Ser34, The41 und Ser45 phosphoryliert (182). Die Proteinlevel von freiem β -Catenin sind in den leukämischen Zellen erhöht (32). Um eine Mutation und einen eventuellen Funktionsverlust an der Phophorylierungsstellen auszuschließen, wurde β -Catenin im Bereich der Aminosäuren 1 bis 95 an 9 Patientenproben untersucht. Es zeigte sich keine Auffälligkeit innerhalb der Gensequenz.

Die Kinasefunktion für die Phosphorylierungsfähigkeit verteilt sich bei GSK3 β fast über die gesamte Gensequenz (Basen 168-1020, Aminosäuren 56-340) (86). Für eine Mutationsanalyse wurde die vollständige Gensequenz mit vier Primerpaaren abgedeckt und analysiert. Für 6 Patientenproben zeigte sich keine Änderung innerhalb der Gensequenz von GSK3 β .

Aufgrund der hohen Expressionslevel von LEF1 innerhalb der CLL wurde die Gensequenz von LEF1 untersucht, die unter anderem die Bindestelle mit β -Catenin trägt. Diese nimmt einen großen Bereich ein und liegt innerhalb der Aminosäuren 1-213 (Basen 1-639) (8). Für 8 untersuchte Patientenproben zeigte sich keine Veränderung der wichtigen Genbereiche.

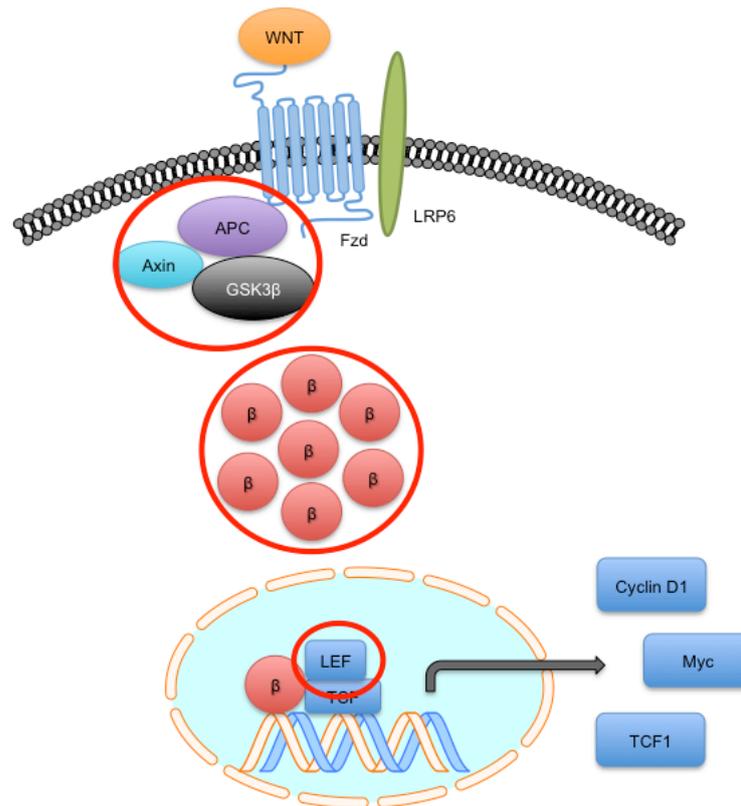


Abbildung 35: Die sequenzierten Proteine des WNT-Signalweges

Innerhalb der WNT-Signalkaskade wurden verschiedene wichtige Proteine vollständig oder teilweise sequenziert. Darunter befanden sich die Bestandteile des Destruktionskomplexes (APC, AXIN1 und GSK3 β), β -Catenin und LEF1. (Eigene Abbildung unter Verwendung von motifolio® Vorlagen)

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass innerhalb der Gruppe der untersuchten Gensequenzen keine Mutationen gefunden wurden. Der WNT-Signalweg ist bereits in großen Mutationsstudien neben anderen Kaskaden wie zum Beispiel dem NOTCH-, dem B-Zell-Rezeptor- oder inflammatorischen Signalwegen aufgefallen, jedoch scheinen in der vorliegenden Analyse die wichtigsten Strukturen intakt zu sein (109).

4.2 Die Aktivatoren der WNT Bibliothek

Durch die Sequenzierung der einzelnen Teile des WNT-Signalweges ergab sich keine sichtbare Einschränkung in der Funktion der Kaskade. Aufgrund der abnormalen Aktivität in den CLL-Zellen stellte sich im weiteren Verlauf die Frage, ob es möglich ist, durch Beeinflussung einzelner Proteine des Signalweges eine

Funktionsänderung und damit eine erkennbare Wirkung auf die CLL Zellen zu erzielen.

Die Bibliothek war eine Zusammenstellung aus Testsubstanzen und bereits für diverse Erkrankungen lizenzierten Arzneistoffen. Alle Substanzen hatten entweder direkt durch ihren Wirkmechanismus oder indirekt über Hinweise in der Literatur durch verschiedene Untersuchungen einen Einfluss auf den WNT-Signalweg. Anhand ihrer Wirkungsweise waren sie grob in aktivierende oder inhibierende Substanzen eingeteilt. Insgesamt wurden 75 Substanzen getestet. Um einen ersten Eindruck von der Wirkung auf CLL-Zellen zu bekommen, wurde mit DMSO eine Konzentrationsreihe der 75 Substanzen mit vier Konzentrationen erstellt, um konzentrationsabhängige Aussagen über die Wirkung zu erhalten. Die Bibliothek wurde anschließend mittels ATP-Assay getestet (siehe Abb. 15 und 16).

Auf der Seite der Aktivatoren gab es nur wenige Substanzen mit einem beachtenswerten Ergebnis. Die Farbgebung der Heatmap ist relativ zu den per ATP-Assay gemessenen Emissionswerten errechnet worden. Dabei wurden keine Grenzwerte festgelegt, sondern die Ergebnisse aller Substanzen in Relation zueinander betrachtet. Die Substanz QS-11 wirkte stark viabilitätsfördernd, dadurch erscheinen hier leuchtend grüne Bereiche, wogegen die anderen Substanzen mit geringerer Viabilität bewertet wurden.

Viele wichtige Ziele wie zum Beispiel die Kinase GSK3 β , welche das Ziel von insgesamt acht spezifisch darauf wirkenden Substanzen war oder DKK1 mit vier Substanzen blieben ohne nennenswertes Ergebnis. Es zeigte sich keine gute Wirksamkeit auf CLL Zellen und oft eine hohe Toxizität auf die gesunden Populationen.

Die Substanz QS-11 wirkt durch die Inhibierung des Proteins ARFGAP1 an einer weniger naheliegenden Stellen innerhalb der WNT-Kaskade. Zhang et al. stellten für QS-11 eine WNT-abhängige Wirkung fest, was bei der Kultur der CLL Zellen durch Hinzugabe von FCS gewährleistet ist. In Abwesenheit von FCS entsteht keine Wirkung von QS-11 auf die Zellen. Der bisher erforschte Wirkmechanismus beruht auf einer Verbesserung des Vesikelverkehrs und damit einer verbesserten Verteilung von β -Catenin (193). Die Behandlung der CLL Zellen mit QS-11 zeigt bei einer Konzentration von 1 μ M eine Steigerung der Viabilität auf über 125% nach 48 Stunden (siehe Abb. 17 und 32). Unter dem Blickpunkt des schlechten Überlebens der CLL Zellen *in vitro* ist alleine das Überleben des Großteils der Zellen der

behandelten Proben interessant, da die Zellen bei eigenen Versuchen nach teilweise 24 Stunden *in vitro* sehr schlechte Überlebensraten zeigten. Die generell schlechte Überlebensrate von CLL Zellen *in vitro* wurde auch in weiteren Studien belegt, in denen die spontane Apoptose bei Inkubation über 30 Stunden mehr als 20% der Zellen betraf (34).

Durch den verbesserten Vesikelverkehr und die Verteilung von β -Catenin scheint QS-11 in Anwesenheit von FCS *in vitro* die ohnehin hohe Apoptoseresistenz bzw. die Zellviabilität der CLL Zellen durch den Einfluss eines Wirkstoffs nochmals zu steigern.

4.2 Die Inhibitoren der WNT Bibliothek

Auf der Seite der Inhibitoren gab es mehrere interessante Substanzen, die einen stark minimierenden Effekt auf die Viabilität der CLL Zellen ausübten. Die Zielstrukturen entlang der WNT-Kaskade waren dabei sehr heterogen.

Tabelle 18: Interessante inhibitorische Wirkstoff aus der WNT Bibliothek

Wirkstoff	Zielstruktur
XAV939	AXIN/Tankyrase
NO-ASA	TCF4/beta-Catenin Interaktion
JSK	Beta-Catenin
Pyrvinium pamoat	CK1 α
Trichostatin A	DKK1

NO-ASA

Ein potenter Inhibitor ist die Substanz NO-ASA, ein Acetylsalicylsäure-Molekül, welches über einen Spacer mit einer stickstoffspendenden Abgangsgruppe verbunden ist. Ursprünglich wurde die Substanz als magenprotektives Pendant zu ASS (Acetylsalicylsäure) entwickelt, da bei längerer Anwendung von ASS häufig eine Schädigung der Magenschleimhaut auftritt. Stickstoffmonoxid gilt als ein wichtiger Regulator der Magenschleimhautsekretion über eine Stimulation der Guanylylcyclase in den Epithelzellen (180). Die antineoplastische Aktivität von ASS wurde bereits in vielen Studien beschrieben. An Kolonkarzinom-Zellen ist die Potenz von nitriertem ASS sogar bis zu 1.000 fach höher im Vergleich zu herkömmlichem ASS (65).

Die Effekte von NO-ASA auf CLL Zellen wurden bereits von Razavi et al. untersucht (67, 141). Dabei zeigte sich eine sehr gute Wirkung auf die Viabilität von CLL Zellen und ein starker Apoptose-induzierender Effekt (141). Weitere strukturelle

Untersuchungen zeigten die Abhängigkeit der Wirkung von der isomerischen Struktur des Moleküls. Das meta-Isomer erwies sich in Konzentrationen bis zu 100 μM als ineffektiv gegenüber den CLL Zellen und zeigte keine Caspase-Aktivität, während das para-Isomer bereits in geringen Konzentrationen eine starke Apoptose-Induktion aufwies (67).

Innerhalb der WNT-Bibliothek zeigte NO-ASA in Konzentrationsbereichen von 1-100 μM ebenfalls den bereits beschriebenen Effekt auf CLL-Zellen (siehe Abb. 16).

JSK

Die WNT-Bibliothek enthielt mit JSK eine weitere Substanz mit Stickstoff-freisetzender Wirkung. Aufgrund der schlechten Bioverfügbarkeit von gasförmigem Stickstoffmonoxid wurde nach weiteren Applikationsmöglichkeiten gesucht (96). Ursprünglich beschäftigte sich die Arbeitsgruppe um Saavedra et al. mit der effektiven Freisetzung von Stickstoff *in vivo*. Dabei wurde ein leberselektives Prodrug erstellt, welches TNF α -abhängige Apoptose und Lebertoxizität hemmt (152). Weitere Versuche der Arbeitsgruppe führten zur Gruppe der Diazeniumdiolat-Familie. Die Moleküle setzten Stickstoff durch eine Esterspaltung frei, abhängig von der Konzentration an Esterasen. Diese Reaktion fand bei Untersuchungen an den leukämischen Zelllinien HL-60 und U-937 innerhalb der Zellen statt. Damit war eine selektive Wirkung innerhalb der Zellen gegeben, ohne ungewollte Nebenwirkungen, zum Beispiel am kardiovaskulären System, zu erhalten (153). Das Diazeniumdiolat JSK zeigte bereits 2003 gute anti-leukämische Wirkung *in vitro* und *in vivo* an einem Xenograft-Modell (159). JSK induzierte in Jurkat T-Zellen Apoptose und bewirkt eine G₂/M Zellzyklus-Arretierung. Darüber hinaus verursachte JSK eine Inhibierung des WNT-Signalweges durch eine Anhäufung von β -Catenin im Zytoplasma und eine Verringerung der Cyclin-D1 Expression. Beides deutet auf eine verminderte transkriptionelle Aktivität von β -Catenin/TCF hin, unterstützt durch Hinweise auf eine S-Nitrosylierung von β -Catenin und damit eine sterische Hinderung der Bindung zum Transkriptionsfaktor (126). Ein ähnlicher Wirkmechanismus über eine β -Catenin/TCF Interaktionshemmung wie für JSK beschrieben konnte auch für NO-ASA in SW480 Kolonkarzinomzellen gezeigt werden (127).

In der vorliegenden Arbeit zeigte JSK in der WNT-Bibliothek bereits eine sehr gute Wirksamkeit und einen stark inhibierenden Einfluss auf die Viabilität der CLL Zellen, wobei die Nebeneffekte auf die gesunden Zellpopulationen gering ausfielen (siehe

Abb. 16). Für eine nähere Analyse wurde das Zellüberleben von CLL Zellen und gesunden PBMCs nach der Einwirkung von JSK durchflusszytometrisch vermessen. Hier zeigte sich ein therapeutisches Fenster zwischen gesunden und kranken Zellen mit einer LD₅₀ von 5,15 µM für die CLL Zellen und 18,03 µM für gesunde PBMCs nach 24 stündiger Inkubation (siehe Abb. 21). Um eine Veränderung des Effektes zu beobachten, wurde die Messung zusätzlich nach einer 48-stündigen Inkubation ausgewertet. Dabei zeigte sich eine negative Veränderung des therapeutischen Fensters durch eine Annäherung der beiden Überlebenskurven und LD₅₀-Werten von 5,8 µM für CLL Zellen und 8,11 µM für gesunde PBMCs (siehe Abb. 22). Die LD₅₀ von JSK gegenüber CLL Zellen blieb somit relativ konstant, während der Wert für PBMCs um eine Zehnerpotenz fiel und damit nur noch gering über dem Wert für die erkrankten Zellen lag.

Aufgrund dieser Veränderung wurden zugunsten effektiverer Substanzen keine näheren Untersuchungen zu JSK vorgenommen.

Pyrvinium pamoat

Eine weitere interessante Substanz war Pyrvinium pamoat. Aktuell ist die Substanz Pyrvinium in fester Form als Salz der Embonsäure als Antihelminthikum gegen Infektionen mit *Enterobius vermicularis* (Oxyuriasis) im Handel. In der WNT-Bibliothek zeigte sie eine ausgeprägte Senkung der Viabilität der CLL Zellen, die sich ebenfalls durchflusszytometrisch in Form einer LD₅₀ von 0,64 µM bestätigte (siehe Abb. 16 und 18). Der Zusammenhang mit dem WNT-Signalweg wurde 2000 von Thorne et al. über eine Aktivierung der Prä-Kinase CK1α beschrieben. Dabei wurde unter anderem bei einer Behandlung der Kolonkarzinomzelllinie SW480 mit Pyrvinium eine Inhibition des WNT-Signalweges und der Proliferation gezeigt, unabhängig davon, ob die Zellen zusätzlich eine Mutation von APC oder β-Catenin trugen (168).

In der Behandlung von Wurmbefall wird das Medikament als Flüssigkeit oral eingenommen und wirkt lokal im Darm, ohne eine systemische Verstoffwechslung zu durchlaufen. Bei dieser Wirkweise wird der Arzneistoff nach Wirkung im Darm wieder ausgeschieden. Daher fehlen Daten, wie sich der Arzneistoff bei einer i.v.-Applikation verhält. Die Auswertung der WNT-Bibliothek zeigte innerhalb der gesunden Populationen an PBMCs und B-Zellen einen relativ starken toxischen Effekt bei einer Inkubation mit Pyrvinium in Konzentrationsbereichen von 10-100 µM.

Zusätzlich zu den toxischen Nebeneffekten stellen neuere Untersuchungen bereits beschriebene Verbindungen mit dem WNT-Signalweg infrage. So zeigten 2013 Venerando et al. eine CK1 α -unabhängige Wirkung zugunsten einer Akt/PKB Herabregulation und einer Aktivierung von GSK3 (178). Unabhängig davon wurde 2012 ein weiterer Wirkmechanismus bei der Inhibition von Myeloma-Zelllinien in Form einer Unterdrückung des mitochondrialen Atmungskettenkomplex I und STAT3 gefunden (87).

Abgesehen von der Toxizität gegenüber gesunden Zellpopulationen ist der Wirkmechanismus von Pyrvinium bis heute nicht vollständig geklärt. Eventuell läuft ein multizentrisches Geschehen innerhalb mehrerer Zellkompartimente und Signalkaskaden ab. Aufgrund dieser Unsicherheiten wurden keine weiteren Experimente zu Pyrvinium ausgeführt, trotz der guten Wirksamkeit auf CLL-Zellen.

XAV939

Die Substanz XAV939 zeigte zwar kaum Veränderungen in der ATP-Analyse der WNT-Bibliothek, jedoch gab sich in Western Blot-Analysen eine konzentrationsabhängige Wirkung auf bestimmte Proteine der WNT-Signalkaskade.

Als Wirkmechanismus wurden die Proteine TKNS I und II (Tankyrase) und die entfernt verwandten Proteine der PARP-Familie durch Proteinkristallographie identifiziert. Innerhalb der Protein-Familie kann XAV939 unabhängig von Isoformen an die Proteine der TKNS- und PARP-Familien binden (100). Die Tankyrasen binden physiologisch an das Protein TRF1 (telomeric repeat binding factor-1), welches einen negativen Regulator für die Telomerlänge darstellt (164). Die Schnittstelle mit der WNT-Signalkaskade resultiert aus einer daraus hervorgehenden AXIN-Stabilisierung und in der Folge einer möglichen Antagonisierung des Signalweges durch die Stabilisierung des Destruktionskomplexes und den vermehrten Abbau von β -Catenin. Diese wurde in SW480 Kolonkarzinomzellen durch eine Bindung von TKNS I und II an AXIN I und II nachgewiesen. Die β -Catenin-abhängige Kolorektalkarzinom Zelllinie DLD-1 kann durch die Behandlung mit XAV939 in ihrem Wachstum gehemmt werden (88). Darüber hinaus wurde eine Induktion von Apoptose in Neuroblastom Zelllinien über eine Inhibierung des WNT-Signalweges durch XAV939 beobachtet (171).

Aufgrund dieser interessanten Fakten wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung von XAV939 auf CLL Zellen untersucht. Im ATP-Assay der WNT-

Bibliothek zeigte sich keine Auswirkung auf die Zellen, weder auf die gesunde, noch auf die kranke Zellpopulation (siehe Abb. 16). Weitere Untersuchungen auf Proteinebene nach einer 24-stündigen Inkubation mit XAV939 in Konzentrationen von 0,1 nM bis 50 μ M ergaben eine konzentrationsabhängige Stabilisierung von AXIN 1 ab einer Konzentration von ca. 100 nM aufwärts. Aufgrund dieser Stabilisierung wurden zusätzlich die Proteinlevel von APC als Interaktionspartner für die Formung des Destruktionskomplexes bestimmt. Auch APC war konzentrationsabhängig ab ca. 100 nM durch eine Zunahme der Proteinmenge gekennzeichnet. Aufgrund dieser Tatsache beruhte die weitere Fragestellung auf einem möglichen Effekt durch die Stabilisierung des Destruktionskomplexes. Dafür wurden die Proteinkonzentrationen an Phospho- β -Catenin gemessen, welches zuvor durch den Komplex phosphoryliert wurde, um danach im Proteasom abgebaut zu werden. Hier zeigte sich keine Änderung der Proteinmengen (siehe Abb. 19). Die gleichbleibenden β -Catenin-Mengen waren wohl auch der Grund für die Ineffektivität des Stoffes gegenüber CLL Zellen, sowohl im ATP-Assay als auch bei der durchflusszytometrischen Evaluierung der Apoptose. Auch hier zeigte sich nach 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen keine Änderung der Viabilität der CLL Zellen (siehe Abb. 20).

Eine mögliche Erklärung für diese Tatsache bietet die 2013 publizierte Arbeit von Cho-Park et al.. Es wurde darin festgestellt, dass die Tankyrasen wichtig für die Proteasom-Aktivität sind. Durch Hemmung der Tankyrase-Aktivität, zum Beispiel mit der Substanz XAV939, wird auch die Proteasom-Aktivität verhindert (30). Diese Proteasom-Hemmung könnte ein Grund für die ausbleibende Änderung der β -Catenin-Proteinlevel sein und im Weiteren auch für das Ausbleiben einer Induktion der Apoptose.

4.3 Trichostatin A – ein herausragender Wirkstoff

Trichostatin A kristallisierte sich in der WNT-Bibliothek als besonders wirksame Substanz heraus. Weitere molekularbiologische Untersuchungen bestätigten die guten Ergebnisse des ATP-Assay.

Die Substanz Trichostatin A ist 1975 zum ersten Mal beschrieben worden. Ursprünglich ist es ein natürlich vorkommender Stoff, der von der Arbeitsgruppe um Tsuji et al. aus der Bakterienspezies *Streptomyces hygroscopicus* neben einem Derivat mit einer Glucopyranosyl-Gruppe, genannt Trichostatin C, extrahiert werden

konnte. Funktionell ist Trichostatin A ein antifungales Antibiotikum, welches gegen Trichophyten, einer Gattung von Fadenpilzen, gerichtet ist (173). Strukturell gehört es zur Klasse der Hydroxamsäuren, die vielfach in der Natur vorkommen, unter anderem auch als natürliche Antibiotika. Neben der Substanz Actinonin war es die erste bekannte primäre Hydroxamsäure (3). Actinonin wird von der Bakterienspezies *Streptomyces sp.* produziert und wurde als Deformylase Inhibitor identifiziert, der wie auch Trichostatin A eine anti-leukämische Aktivität aufweist (26, 72). Es wurde ebenfalls eine mögliche Interaktion mit der WNT-Signalkaskade in diesem Zusammenhang festgestellt (111).

Eine erste Beschreibung des Wirkmechanismus von Trichostatin A erfolgte durch die Arbeitsgruppe um Yoshida et al. 1990. Sie stellte eine spezifische Inhibition der mammalischen Histon Deacetylase fest, wobei diese eine Enantioselektivität besitzt, die fast ausschließlich das (R)-Enantiomer begünstigt (185). Die Arbeitsgruppe entdeckte in einer weiteren Arbeit, dass sowohl Trichostatin A und auch das zyklische Trichostatin C einen starken induktiven Effekt auf die Friend Zelllinie hat. Friend et al. etablierten diese murine erythroleukämische Zelllinie, deren erythroide Differenzierungsfähigkeit durch das Friend'sche Leukämie Virus blockiert wird. Sie konnten zeigen, dass beide Trichostatin-Formen die Differenzierungsfunktion bereits in sehr geringen Konzentrationen wiederherstellen konnten (60, 186).

Im ATP-Assay der WNT-Bibliothek spiegelte sich ebenfalls die Wirkung im geringen Konzentrationsbereich wider. Im gesamten erfassten Konzentrationsbereich von 0,1 μM bis 100 μM entfaltete Trichostatin A einen stark inhibitorischen Effekt auf die Viabilität der CLL-Zellen, während die gesunden Populationen kaum eine Veränderung aufwiesen (siehe Abb. 16).

Die Aussage des ATP-Assay über die Bestimmung der ATP-Reduktion innerhalb einer Zelle gibt jedoch nur begrenzte Information über die Zytotoxizität einer Substanz. Der Assay setzt die Veränderung des ATP-Gehaltes in Zusammenhang mit der Zellviabilität. Der ATP-Gehalt ist jedoch auch durch andere zellphysiologische Vorgänge veränderbar und somit kein zuverlässiges Einzelmerkmal.

Dieses Ergebnis wurde im weiteren Verlauf der Arbeit durchflusszytometrisch bestätigt. Hierzu wurde das Überleben einer CLL Zell-Population und einer gesunden Kontrollgruppe aus PBMCs zu zwei Zeitpunkten bestimmt. Während die Wirkung im ATP-Assay bereits nach 24 Stunden sichtbar war, zeigte sich im gleichen Inkubationszeitraum durchflusszytometrisch kein großer Einfluss auf das

Zellüberleben. Die LD₅₀ der CLL-Zellen lag bei 166,7 µM und die PBMCs wiesen einen Wert von 3,7 mM auf (siehe Abb. 23).

Die Hauptwirkung stellte sich nach 48 Stunden ein. Trichostatin A induzierte Apoptose in den CLL Zellen mit einer sehr niedrigen LD₅₀ von 0,27 µM. Die gesunde Kontrollgruppe aus PBMCs blieb weitgehend unberührt von der Wirkung mit einer LD₅₀ von 145,22 µM. Damit ergab sich ein therapeutisches Fenster mit einer über 500-fach höheren Konzentration zwischen der gesunden und der kranken Population (siehe Abb. 24). Diese gezielte Wirkung von Trichostatin A auf maligne CLL-Zellen ist ein Ansatz für eine spezifische Therapiemöglichkeit. Insbesondere aktuelle Chemotherapeutika sind durch eine unselektive Wirkungsweise charakterisiert, die in der Folge häufig durch schwere Nebenwirkungen gekennzeichnet sind. Diese Nebenwirkungen können den Erfolg der Therapie durch verschiedene Problematiken erschweren, falls zum Beispiel die Wirkstoffe für geschwächten Patienten eine Kontraindikation darstellen oder falls mit der zunehmenden Entwicklung vieler oral verfügbarer Wirkstoffe die konstante Einnahme bzw. die Compliance des Patienten gefährdet ist. Diese Problematiken können mit der Entwicklung spezifischer Wirkstoffe mit geringem Nebenwirkungsprofil umgangen werden.

Die Induktion von Apoptose in CLL-Zellen durch Trichostatin A

Ein Problem ist, wie bereits erwähnt, eine Resistenz innerhalb der CLL-Zellen gegenüber der Apoptose (vgl. 1.1.7). Aufgrund dieser Problematik ist eine Wirkstoffsuche eng mit der Lösung dieses Problems verknüpft. Generell wird zwischen dem programmierten Zelltod infolge der Apoptose und dem ungeordneten Zelltod in Form der Nekrose unterschieden. Die Nekrose ist ein ungewünschtes Geschehen, da sie häufig zu Entzündungsreaktionen führt. Die Entzündungen sind Folge eines unkontrollierten Austritts von Zellteilen aus der untergehenden Zelle in das umgebende Gewebe.

Einen ersten Hinweis auf die Induktion der Apoptose durch Trichostatin A ergaben die durchflusszytometrischen Untersuchungen der CLL Zellen nach einer Inkubation mit dem Wirkstoff. Dabei kann mit der speziellen Färbung durch Annexin V-FITC/7-AAD der Viabilitätszustand der Zelle zwischen den drei Stadien „lebend“, „apoptotisch“ und „tot“ definiert und unterschieden werden. Die Unterscheidung gegenüber nekrotischen Zellen erfolgt aufgrund der Tatsache, dass in Folge des Aufbrechens der Zellen innerhalb eines nekrotischen Geschehens das an der

Membranunterseite lokalisierte Phosphatidylserin an Annexin V-FITC und gleichzeitig 7-AAD an die ebenfalls zugängliche DNA binden kann. Dadurch sind spät-apoptotische Zellen einfach positiv und nekrotische Zellen nur als doppelt-positiv detektierbar (103) (siehe Abb. 23 und 24).

Um die Apoptoseinduktion genauer zu untersuchen, wurde die Aktivität der Effektorcaspase 3/7 und die Spaltung von PARP analysiert (vgl. 3.2.4.1). Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 wurde luminometrisch mit einem Caspase-Assay vermessen. Die Konzentrationen an Trichostatin A für die Inkubation der CLL Zellen wurden um die LD₅₀ festgelegt. Bis zum Wirkungseintritt von Trichostatin A in Form einer messbaren Apoptoseinduktion vergehen bis zu 48 Stunden. Um die bis dahin ablaufenden Prozesse der Caspasen zu erfassen, wurde für den Assay ein Zeitpunkt von 24 Stunden gewählt. Die Auswertung zeigte eine Aktivitätssteigerung der beiden Effektorcaspasen auf bis zu 300% bei einer Konzentration von 500 nM (siehe Abb. 25 und 26).

In Abbildung 36 ist schematisch die Anordnung der apoptotischen Kaskade zu sehen. Am Ende der Aktivierung der Effektorcaspasen wird das Protein PARP gespalten. Als Kontrolle für die Caspasen-Aktivität wurde die Spaltung von PARP durch eine Western Blot Analyse detektiert. In Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration zeigte sich eine Verschiebung der Proteinmenge von intaktem PARP hin zu seinen kleineren Spaltprodukten, während die Kontrollen unverändert blieben. Die Aktivierung der Effektorcaspasen sowie die Spaltung von PARP deuten auf eine Induzierung der Apoptose über den intrinsischen Signalweg hin (siehe Abb. 36). Die Aktivierung der Apoptose über diesen Weg ist bereits für zytostatische Wirkstoffe bekannt. Äußere Einflüsse führen zu einer Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium. Cytochrom C aktiviert Caspase 9, welche im weiteren Verlauf zur Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 führt. Jedoch lässt sich eine Beteiligung des extrinsischen Weges nicht völlig ausschließen, da eine Verbindung zwischen intrinsischem und extrinsischem Weg über eine Spaltung des Proteines Bid besteht. Diese Spaltung wird über die Caspase 8 induziert und führt in der Folge ebenfalls zu einer Freisetzung von Cytochrom C (132).

Obwohl für eine genaue Festlegung des betroffenen Apoptosewegs noch weitere Untersuchungen notwendig sind, lässt sich aus den bereits erhobenen Daten eine Induzierung der Apoptose über die Effektorcaspasen und PARP durch Trichostatin A bestätigen. Die Induktion läuft konzentrationsabhängig ab und fällt in die Bereiche, in

denen bereits durchflusszytometrisch die Zellviabilität beeinflusst werden konnte. Aufgrund dieser Überlegungen lässt sich festhalten, dass die Wirkung von Trichostatin A auf die Viabilität der CLL-Zellen über eine Induktion von Apoptose verläuft.

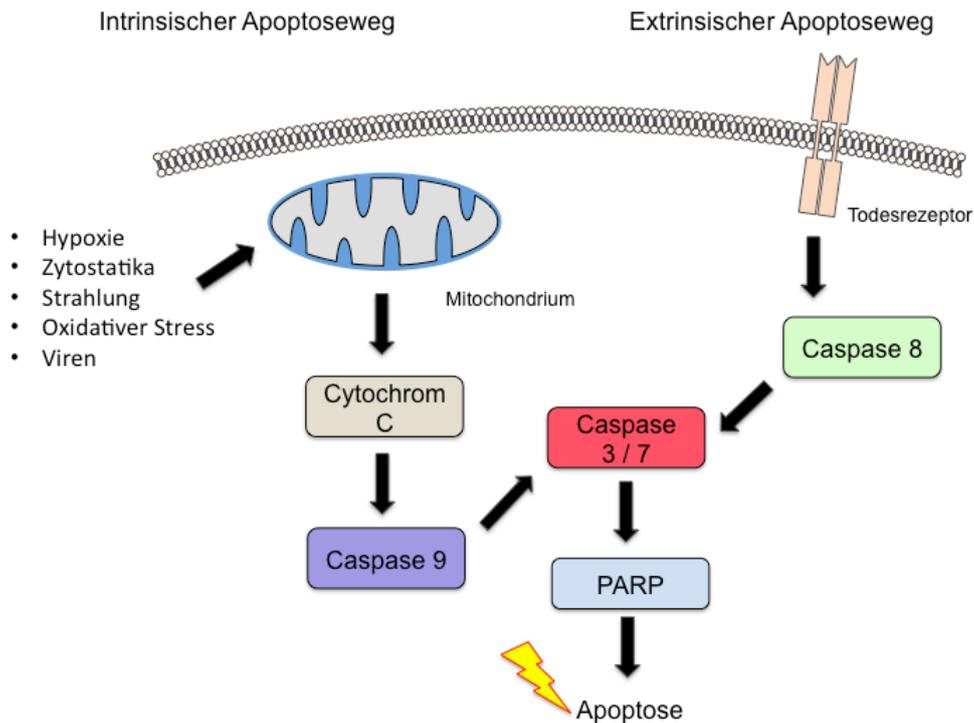


Abbildung 36: Intrinsischer und extrinsischer Apoptoseweg

Die Darstellung zeigt eine vereinfachte Übersicht über den extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweg. Durch äußere Reize kann über das Mitochondrium der intrinsische Apoptoseweg ausgelöst werden. Das Mitochondrium setzt Cytochrom C frei, welches über eine Aktivierung der Caspase 9 die Effektorcaspasen 3 und 7 aktiviert. Der extrinsische Weg ist abhängig von einer Ligandenbindung an den Todesrezeptor, gefolgt von einer Aktivierung der Caspase 8, welche wiederum die Effektorcaspasen 3 und 7 aktiviert. Grafik erstellt mit motifolio® Vorlagen, modifiziert nach Indran et al. (90).

Der Wirkungsmechanismus von Trichostatin A

Die erste Beschreibung eines Wirkmechanismus für Trichostatin A gelangte von Yoshida et al. 1990, indem sie spezifische Inhibition der Histon Deacetylase (HDAC) durch Trichostatin A beschrieben (185). Die post-translationale Acetylierung der Kern-Histone wurde um 1960 erstmals beschrieben. Histone sind Bestandteile des Chromatins und bilden die kleinste Verpackungseinheit für die DNA. Acetylierung findet an den Histonen H2A, H2B, H3 und H4 speziesübergreifend in tierischen und pflanzlichen Zellen statt. Dabei wird ein bestimmter Lysin-Rest innerhalb der aminoterminalen Region acetyliert. Physiologisch stellt sich ein Gleichgewicht zwischen

Acetylierung und Deacetylierung ein, das durch Enzyme katalysiert wird. Wird der Großteil der Histone innerhalb des Chromatins acetyliert, verändert sich die Ladung der Histone ins Negative und die Bindefähigkeit für die ebenfalls negativ geladene DNA wird herabgesetzt. Dadurch wird die DNA entpackt und für die Transkription vorbereitet (37, 175).

Die mechanistischen Eigenschaften von HDAC Inhibitoren wurden im Jahr 2000 charakterisiert. Dabei wurde festgestellt, dass diese ihre Wirkung auf zwei verschiedene Arten entfalten können. Zum einen postulierten Billin et al. eine Notwendigkeit der Histon Deacetylasen für die Interaktion von β -Catenin/LEF1 und ihre korrekte Funktion innerhalb der DNA-Transkription (13). Zum anderen gelang es Lin et al. 2006, einen zweiten Wirkungsweg an nicht-Histon bezogenen Zielen zu zeigen (112).

In der vorliegenden Arbeit konnten ebenfalls zwei unterschiedliche Wirkmechanismen charakterisiert werden (vgl. 3.2.3.2). Durch die schon bekannte Klassifizierung als Histon Deacetylase Inhibitor lag eine Untersuchung in diese Richtung auf der Hand. Dazu wurde die Proteinexpression des acetylierten Histon H4 nach einer 24-stündigen Inkubation mit Trichostatin A bestimmt. In zwei Konzentrationen (10 und 1 μ M) zeigte sich, dass nur die Kontrolle deacetyliert wurde, die behandelten CLL Zellen jedoch weiterhin ihre Acetylgruppe trugen (siehe Abb. 27).

Ein weiterer Mechanismus wurde in Anlehnung einer Entdeckung der Gruppe um Sikandar et al. analysiert. Die Arbeitsgruppe stellte einen Zusammenhang zwischen einer Wirkung von HDACi und dem WNT-Signalweg über eine Hochregulation des Proteins DKK1 her (161). Diese Entdeckung korreliert mit den Ergebnissen von Filipovich et al., dass das Signal von DKK1 in CLL gestört ist (59). Physiologisch stellt DKK1 einen negativen Regulator für den Korezeptor LRP6 dar, der für den Ablauf des WNT-Signalweges notwendig ist. Wird LRP6 nicht gehemmt, kann er an den Frz-Rezeptor binden und den Destruktionskomplex aus dem Zytoplasma binden und damit inaktivieren. β -Catenin kann akkumulieren und im Nukleus die Transkription initiieren (116).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die relative mRNA-Expression von DKK1 nach der Behandlung erhöht ist. Die Werte steigen bei einer Konzentration von 10 μ M bis auf das Doppelte im Vergleich mit der Kontrolle an (siehe Abb. 28).

Diese Ergebnisse deuten auf einen dualen Wirkungsmechanismus hin (siehe Abb. 37). Zum einen verändert Trichostatin A die Expression von DKK1 auf extrazellulärer Ebene, in dessen Folge es zu einer Hemmung der Co-Rezeptors LRP6 kommt, und auf der anderen Seite verändert es direkt im Nucleus den Acetylierungsstatus der DNS.

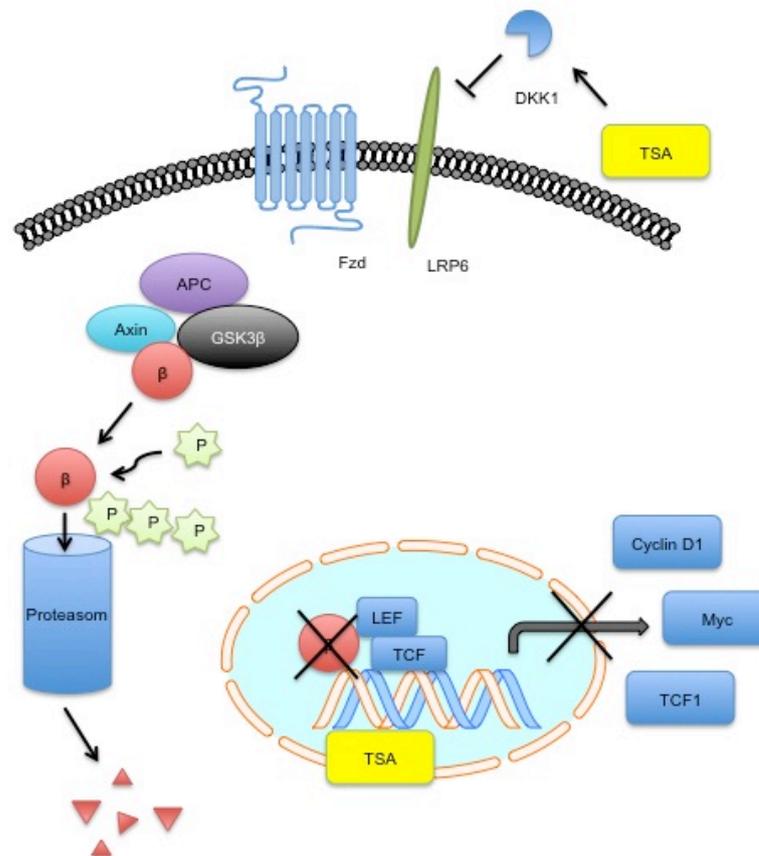


Abbildung 37: Der duale Wirkmechanismus von Trichostatin A

Die Abbildung zeigt die mechanistischen Ziele von Trichostatin A (TSA) entlang der WNT-Kaskade. (Abbildung erstellt mit motifolio®-Vorlagen)

Die Theorie des dualen Mechanismus wird durch die Versuche aus Kapitel 3.2.4.6 gestützt. Dabei wurden die CLL Zellen mit einer Kombination aus Trichostatin A und dem WNT-abhängigen Aktivator QS-11 inkubiert. Als Einzelsubstanz konnte QS-11 die Viabilität der CLL Zellen auf bis zu 125% erhöhen (siehe Abb. 32). Eine Kombinationsbehandlung aus beiden Substanzen zeigte allerdings, dass die Dosis-Wirkungskurve vergleichbar mit der Kurve der Einzelbehandlung aus Trichostatin A verlief (siehe Abb. 33). Daraus ergibt sich, dass die WNT-Aktivierung von QS-11 nicht gegen Trichostatin A besteht, bzw. die nicht direkt WNT-abhängige Wirkung an den Histonen ein eventuelles Fehlen der WNT-abhängigen Wirkung durch den Einfluss von QS-11 umgehen kann.

Die Wirkung von Trichostatin A in speziellen Fällen

Wie bereits in Kapitel 1.1.7 beschrieben, stellen bestimmte Ausprägungen des Krankheitsbildes Herausforderungen für neue Therapieansätze dar. Aufgrund der Problematik von Mutationen und Resistenzen gegenüber Chemotherapie wurde Trichostatin A stellvertretend für die diversen Mutationen an Proben mit einer 17p-Deletion getestet. Die 17p-Deletion ist durch eine sehr geringe Überlebenswahrscheinlichkeit in Kombination mit teilweise schlechtem oder keinem Ansprechen auf die konventionelle Chemotherapie gekennzeichnet (46, 71). In diesem Fall zeigten CLL Zellen mit und ohne Mutation ein equivalent effektives Ansprechen auf die Therapie mit Trichostatin A (siehe Abb. 29). Die LD₅₀ Werte sind mit 47,25 nM für mutierte und 94,57 nM für unmutierte CLL Zellen etwas geringer als in den vorherigen Versuchen aus Kapitel 3.2.3.5. Dieses Phänomen lässt sich durch die Probenaufbereitung erklären. Die 17p-mutierten Zellen sind im Zuge des Patientenzuganges eine seltene Probenspezies gewesen. Die für diesen Versuch verwandten Proben wurden aus der Kryokonservierung wiederhergestellt und gegen ebenfalls kryokonservierte unmutierte CLL-Zellen als Vergleich vermessen.

Eine zweite Besonderheit stellen Resistenzen dar, die durch eine Vorbehandlung entstehen, entweder nach einem oder mehreren Zyklen konventioneller Chemotherapie. Diese Problematik betrifft mehrere Wirkstoffklassen und ist somit eine weitere große Herausforderung für die Entwicklung neuer und zuverlässiger Wirkstoffe als zukünftige Therapieoption (123, 190). Für diesen Fall wurden Proben ausgesucht, die mindestens vier Zyklen aus einer konventionellen Therapie bestehend aus Rituximab, Bendamustin, Fludarabin, Cyclophosphamid, Prednison oder deren Kombinationen erhalten hatten. Während vorbehandelte Proben in unserem Labor wenig bis kein Ansprechen auf Bendamustin oder Fludarabin in Vorversuchen zeigten, konnte sich Trichostatin A mit einem Wirkungsprofil vergleichbar mit unbehandelten Zellen behaupten. Die LD₅₀ Werte und die entsprechenden Überlebenskurven lagen mit 287,5 nM für vorbehandelte und 268,2 nM für unbehandelte Zellen fast übereinander (siehe Abb. 30).

Zusammenfassend zeichnete sich Trichostatin A besonders in Fällen der schwierig zu therapierenden CLL-Fälle mit einem zuverlässigen Wirkungsprofil aus, welches weder durch eine schwerwiegende Mutation, noch durch eine Vorbehandlung minimiert wurde.

Die Kombinationstherapie von Trichostatin A mit DNA-aktiven Wirkstoffen

Die Kombination verschiedener Wirkstoffe und Wirkstoffklassen ist bereits heute Teil der Behandlungsrichtlinien für CLL (52). Für die Wirkstoffklasse der HDACi konnte ebenfalls eine Steigerung der Apoptoseinduktion in verschiedenen Karzinomarten festgestellt werden, wenn diese mit anderen Chemotherapeutika, wie zum Beispiel Doxorubicin, Vincristin, Etoposid, Gemcitabin oder Docetaxel, kombiniert wurden (16, 61, 99). Für eine nähere Untersuchung von eventuellen synergistischen Effekten wurden die CLL Zellen mit einer Kombination aus Trichostatin A und je einer DNA-aktiven Substanz aus den aktuellen Behandlungsleitlinien der CLL (Bendamustin oder Fludarabin) behandelt. Dabei wurde in der Versuchsanordnung die Konzentration der DNA-aktiven Substanz konstant auf die LD₅₀ eingestellt, während Trichostatin A in den Konzentrationen der vorausgegangenen Versuche eingesetzt wurde. Aus dem Vergleich wurde in beiden Kombinationen ein additiver Effekt beobachtet (194). Die LD₅₀ Werte der Einzelbehandlung lag bei 274,2 nM, während die Kombination mit Bendamustin bei 206,3 nM und die Kombination mit Fludarabin bei 218,7 nM lag. Der additive Effekt ergibt sich aus dem Kurvenverlauf (vgl. 3.2.4.5) (siehe Abb. 31). Die Dosis-Wirkungskurven der Kombinationstherapie verlaufen bei niedrigen Konzentrationen an Trichostatin A niedriger als bei der Einzelbehandlung. Für einen synergistischen Effekt wäre eine Kombination wünschenswert, bei der sich die LD₅₀ Werte signifikant unterscheiden.

4.4 Die strukturellen Eigenschaften der HDAC-Inhibitoren

Die Klasse der HDAC Inhibitoren setzt sich aus einer heterogenen Molekülstruktur zusammen, die weitestgehend unterschiedliche Aktivität an den HDAC Klassen aufweisen (151). Bisher sind fünf chemisch unterschiedliche Klassen an HDAC-Inhibitoren bekannt. Dazu zählen die kurzkettigen Fettsäuren, die Hydroxymaten, die Benzamide, die zyklischen Peptide und die elektrophilen Ketone (12, 62, 133). Trichostatin A selbst gehört zur Gruppe der Hydroxamaten (vgl. 1.4, Abb. 11). Die Moleküle dieser Gruppe weisen alle eine ähnliche chemische Struktur auf, die sich chemisch gesehen aus drei Teilen zusammensetzt: eine Deckelstruktur (capping group), ein Kohlenstoff-Verbindungsstück (carbon linker) und einen metallbindenden Teil (metal-binding moiety) (vgl. 3.3) (136). Innerhalb dieser Teile ist die Molekülstruktur variabel, wie bereits an Trichostatin A und seinem Derivat

Trichostatin C zu erkennen ist (Abb. 38). Sobald Veränderungen in einem der Teile stattfinden, ändern sich auch die chemischen Eigenschaften und das Wirkungsprofil der Substanz. Wie bereits in Kapitel 4.3 beschrieben, stellte die Arbeitsgruppe um Yoshida et al. fest, dass die Wirkung von Trichostatin C auf die Differenzierung von murine erythroleukämischen Zellen um eine Potenz geringer war im Vergleich zu Trichostatin A (185). Die gleichzeitige Bedeutung der sterischen Anordnung der Moleküle zeigte sich durch den Vergleich der Wirkung von (R)-Trichostatin A mit (S)-Trichostatin A, wobei die Wirkung sich fast ausschließlich auf das (R)-Enantiomer konzentrierte (62).

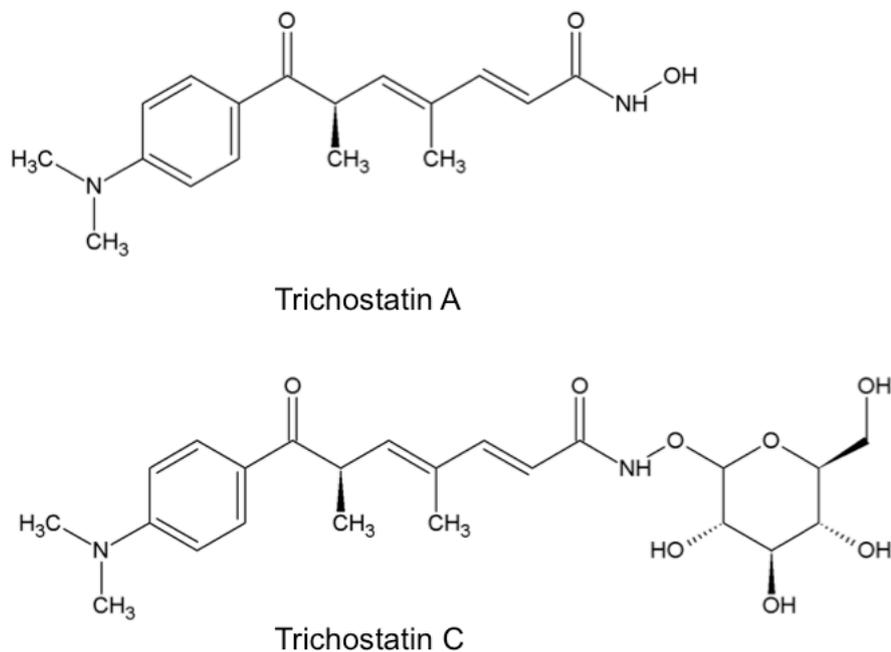


Abbildung 38: Struktureller Vergleich von Trichostatin A und C

Die Abbildung zeigt die beiden Derivate Trichostatin A und C. Die Grundstruktur beider Moleküle ist gleich. Trichostatin C trägt am Sauerstoffrest des metallbindenden Endes zusätzlich eine Glucopyranosyl-Gruppe.

Wirkungsvergleich mit SAHA (Vorinostat)

Die Substanz SAHA (Vorinostat) gehört ebenfalls der Hydroxamat-Gruppe an und wurde von der FDA zur Behandlung des kutanen T-Zell Lymphoms zugelassen (91). In Kapitel 3.3 wurde bereits die strukturelle Ähnlichkeit zu Trichostatin A beschrieben. SAHA ist als Kapsel erhältlich und kann oral appliziert werden. Zu den Hauptnebenwirkungen zählen Thrombozytopenie, Durchfall, Übelkeit, Geschmacksstörungen und Erschöpfungszustände (51).

Da die beiden Substanzen gleiche Angriffspunkte in der Inhibition der HDAC-Klassen zeigen, war SAHA ebenfalls eine interessante Option für die Behandlung von CLL Zellen. Dazu wurden die CLL Zellen mit den gleichen Konzentrationen behandelt, die für alle Versuche mit Trichostatin A ebenfalls eingesetzt worden waren. Die Inkubationszeit betrug 48 Stunden.

SAHA wies ebenfalls eine Apoptose-induzierende Wirkung auf, lag jedoch mit einer LD_{50} von 7880 nM verglichen mit 253 nM für Trichostatin A über 30-fach höher (siehe Abb. 34).

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass HDAC-Inhibitoren der Hydroxamat-Struktur eine gute Wirkung auf CLL-Zellen zeigen, die durch strukturelle Veränderungen an Verträglichkeit und Sensitivität angepasst werden können (117).

4.5 Ausblick

Der WNT-Signalweg bietet ein interessantes Ziel für die Wirkstoffentwicklung bei der CLL. Die Funktion der Kaskade scheint in wichtigen Bereichen nicht durch Mutationen beeinflusst zu sein, die in vielen anderen Krankheitsbildern zum Krankheitsgeschehen beitragen. Für eine abschließende Aussage über die Funktionalität sollten in Zukunft die ausstehenden Teile der WNT-Signalkaskade auf potentielle Mutationen untersucht werden und in der Folge die Proteinexpressionen und Protein-Protein-Interaktionen zum Beispiel innerhalb des Destruktionskomplexes untersucht werden.

Die Wirkstoffbibliothek gab einen ersten Hinweis auf neue potentielle Ziele entlang der WNT-Kaskade sowie auf interessante Wirkstoffstrukturen.

Der herausragende Wirkstoff Trichostatin A induziert selektiv und in niedrigen Konzentrationen Apoptose in CLL Zellen ohne eine Wirkung auf gesunde Zellen zu entwickeln. Strukturell gesehen sind bereits einige Fakten bekannt, die die Wirkung beeinflussen können: In älteren Publikationen wurde schon die Bedeutung der Enantioselektivität beschrieben, bei der ein Enantiomer fast zu 100% für die Wirkung verantwortlich ist. Die Veränderung der Molekülstruktur und die damit einhergehende Änderung der Wirksamkeit wird beim Vergleich der beiden Derivate Trichostatin A und C klar, die mit einer funktionellen Gruppe als Unterschied bereits in Studien eine Zehnerpotenz ihrer Wirkung einbüßte. Vergleicht man SAHA und Trichostatin A als Vertreter der Wirkstoffklasse der Hydroxamate, erkennt man das gleiche Grundgerüst mit geringen Abweichungen, die allerdings die Selektivität bezüglich CLL Zellen signifikant senken.

Der Vergleich der einzelnen Strukturen und die damit verbundenen Änderungen in ihrer Wirkung zeigen, dass die HDAC-Inhibitoren ein großes Potential für neue effektive Arzneimittel bei der Behandlung der CLL bieten. Eine Möglichkeit dazu bieten chemisch gesehen auf der theoretischen Seite das molecular modeling, um die Substanzen am Computer durch strukturelle Änderungen besser ihren Zielstrukturen anzupassen zu können, und auf praktischer Seite die Herstellung einer Wirkstoffbibliothek aus Derivaten der HDACi mit Hydroxamatstruktur, um die Funktionen und Möglichkeiten der funktionellen Gruppen im Hinblick auf die Behandlung der CLL analysieren zu können.

Die Möglichkeit einer oralen Applikation, ein geringes Nebenwirkungspotential durch erhöhte Selektivität und die guten Behandlungsergebnisse bei Hochrisikofällen *in*

vitro sind weitere wichtige Punkte für eine erfolgreiche neue Substanzklasse in der Therapie der CLL.

5 Zusammenfassung

Die Pathogenese der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) ist bislang nicht vollständig geklärt. Das Krankheitsbild manifestiert sich in Form einer Akkumulation von morphologisch reifen, jedoch funktionell inkompetenten B-Lymphozyten. Diese B-Lymphozyten sind gekennzeichnet durch eine ausgeprägte Apoptoseresistenz.

Die konventionellen Behandlungsmöglichkeiten ermöglichen bislang eine längere Kontrolle des Krankheitsbildes, allerdings ohne kurativen Endpunkt. Spezielle Ausprägungen des Krankheitsbildes, wie zum Beispiel Mutationen, erschweren die Therapie aufgrund von Resistenzbildung gegenüber einer Chemotherapie.

Die Pathogenese ist geprägt durch ein Zusammenspiel von mehreren Faktoren und unterschiedlichen Signalwegen. Die WNT-Signalkaskade scheint eine wichtige Rolle als Ursache für die Entstehung der CLL und den apoptotischen Block zu spielen. Während sie physiologisch in der Entwicklung von Zellen aktiv ist, ist der Signalweg in ausdifferenzierten Zellen nicht mehr aktiv. CLL-Zellen weisen jedoch eine abberant aktive WNT-Aktivität auf.

Aufgrund dieser Tatsache war die korrekte Funktionalität der Kaskade sowie deren potentielle Eignung für neue Wirkstoffentwicklungen Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

Durch Sequenzierung verschiedener Hauptbestandteile wurde der WNT-Signalweg auf seine korrekte Funktion untersucht. Im Fokus der Sequenzierung stand der Destruktionskomplex mit APC, AXIN und GSK3 β als wichtigsten Proteine. Des Weiteren wurden β -Catenin als Mittelpunkt der Kaskade und der Transkriptionsfaktor LEF1 untersucht, die in der CLL durch eine hohe Expression gekennzeichnet sind. In der Überprüfung der Gen-Sequenzen fand sich kein Hinweis auf eine Mutation und damit auf eine Einschränkung der Funktionalität.

Daraus ergab sich die Fragestellung, ob durch die Inhibierung verschiedener Moleküle mittels chemischer Substanzen die Kaskade und in der Folge die Viabilität und die Apoptoseresistenz der B-Zellen beeinflussbar sind.

Das Screening einer Wirkstoffbibliothek aus 75 Substanzen, unterteilt in Aktivatoren und Inhibitoren, mittels eines ATP-Assays ergab erste wichtige Hinweise auf potentielle Ziele und Wirkstoffstrukturen. Die interessanten Wirkstoffe wurden mit weiteren molekularbiologischen Methoden analysiert.

Auf der Seite der Aktivatoren wies QS-11, ein ARFGAP-Inhibitor, eine unerwartete Wirkung in Form einer starken Steigerung der Viabilität auf bis zu 125% über 48 Stunden hinaus auf.

Die Inhibitoren umfassten einige interessante Substanzen, aus denen sich der Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A als wirksamste und selektivste Substanz bewies. Trichostatin A induziert Apoptose in CLL-Zellen nach einer Inkubation von 48 Stunden, ohne Nebenwirkungen auf gesunde Zellen zu zeigen. Die Apoptoseinduktion war sowohl durchflusszytometrisch als auch über eine Aktivierung der Effektorcaspase 3 und 7 und eine Spaltung von PARP sichtbar.

In dieser Arbeit erwies sich die stark zytotoxische Wirkung von Trichostatin A bereits in geringen Wirkstoffmengen sowohl bei unbehandelten CLL-Zellen als auch in Proben von Hochrisiko-Patienten, entweder in Form einer 17p-Deletion oder einer bereits sehr intensiven chemotherapeutischen Vorbehandlung, als gleichwertig wirksam. Bei der Behandlung der CLL-Zellen entwickelt Trichostatin A einen dualen Wirkmechanismus, sowohl direkt an den Histonen über eine Hemmung der Deacetylase, als auch über eine Steigerung der Expression von DKK1.

Der strukturell nah verwandte HDAC-Inhibitor SAHA (Vorinostat) wird bereits für das kutane T-Zell Lymphom eingesetzt. Für die Behandlung von CLL Zellen erwies er sich ebenfalls wirksam, wenn auch weit weniger selektiv als Trichostatin A.

In der vorliegenden Arbeit wurden wesentliche Ziele und die Funktionalität des WNT-Signalweges untersucht. Dabei wurden HDACi als potente und selektive Wirkstoffklasse zur Behandlung der CLL herausgestellt. Diese Substanzklasse sollte in Zukunft weiter erforscht werden, um über strukturelle Änderungen potentielle Verbesserungen der Verträglichkeit und der Selektivität zu erreichen, mit dem Ziel einer hochwirksamen neuen Wirkstoffklasse für die Therapie der CLL.

6 Literaturverzeichnis

1. **Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R.** beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16: 3797–3804, 1997.
2. **Arce L, Pate KT, Waterman ML.** Groucho binds two conserved regions of LEF-1 for HDAC-dependent repression. *BMC Cancer* 9: 159, 2009.
3. **Attwood MM.** An investigation into the mode of action of actinonin. *J. Gen. Microbiol.* 55: 209–216, 1969.
4. **Baliakas P, Iskas M, Gardiner A, Davis Z, Plevova K, Nguyen-Khac F, Malcikova J, Anagnostopoulos A, Glide S, Mould S, Stepanovska K, Brejcha M, Belessi C, Davi F, Pospisilova S, Athanasiadou A, Stamatopoulos K, Oscier D.** Chromosomal translocations and karyotype complexity in cll: A systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am. J. Hematol.* (October 26, 2013).
5. **Bauduer F, Capdupuy C, Renoux M.** Characteristics of deaths in a department of oncohaematology within a general hospital. A study of 81 cases. *Support. Care Cancer Off. J. Multinatl. Assoc. Support. Care Cancer* 8: 302–306, 2000.
6. **Baumann Kreuziger LM, Tarchand G, Morrison VA.** The impact of Agent Orange exposure on presentation and prognosis of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* (May 15, 2013). doi: 10.3109/10428194.2013.794267.
7. **Begleiter A, Mowat M, Israels LG, Johnston JB.** Chlorambucil in chronic lymphocytic leukemia: mechanism of action. *Leuk. Lymphoma* 23: 187–201, 1996.
8. **Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W.** Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382: 638–642, 1996.
9. **Bentley DP, Pepper CJ.** The apoptotic pathway: a target for therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Oncol.* 18: 87–98, 2000.
10. **Bentz M, Huck K, du Manoir S, Joos S, Werner CA, Fischer K, Döhner H, Lichter P.** Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood* 85: 3610–3618, 1995.
11. **Berrebi A, Bassous L, Haran M, Shtalrid M, Shvidel L.** The significance of elevated beta 2-microglobulin (b2-m) in chronic lymphocytic leukemia (CLL): Evidence of in vitro secretion following activation of CLL cells. *Leuk. Res.* 34: e248–e249, 2010.
12. **Bhalla KN.** Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of

hematologic malignancies. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23: 3971–3993, 2005.

13. **Billin AN, Thirlwell H, Ayer DE.** Beta-catenin-histone deacetylase interactions regulate the transition of LEF1 from a transcriptional repressor to an activator. *Mol. Cell. Biol.* 20: 6882–6890, 2000.

14. **Binet J-L, Caligaris-Cappio F, Catovsky D, Cheson B, Davis T, Dighiero G, Döhner H, Hallek M, Hillmen P, Keating M, Montserrat E, Kipps TJ, Rai K, International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL).** Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 107: 859–861, 2006.

15. **Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F.** A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48: 198–206, 1981.

16. **Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW.** Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5: 769–784, 2006.

17. **Boonstra JG, van Lom K, Langerak AW, Graveland WJ, Valk PJM, Kraan J, van 't Veer MB, Gratama JW.** CD38 as a prognostic factor in B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL): comparison of three approaches to analyze its expression. *Cytometry B Clin. Cytom.* 70: 136–141, 2006.

18. **Bosch F, Muntañola A, Giné E, Carrió A, Villamor N, Moreno C, Crespo M, Montserrat E.** Clinical implications of ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin. Cytom.* 70: 214–217, 2006.

19. **Brok-Simoni F, Rechavi G, Katzir N, Ben-Bassat I.** Chronic lymphocytic leukaemia in twin sisters: monozygous but not identical. *Lancet* 1: 329–330, 1987.

20. **Byrd JC, Kitada S, Flinn IW, Aron JL, Pearson M, Lucas D, Reed JC.** The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood* 99: 1038–1043, 2002.

21. **Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW.** Chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* (2004). doi: 10.1182/asheducation-2004.1.163.

22. **Cadigan KM, Nusse R.** Wnt signaling: a common theme in animal

development. *Genes Dev.* 11: 3286–3305, 1997.

23. **Cadigan KM.** Wnt-beta-catenin signaling. *Curr. Biol. CB* 18: R943–947, 2008.
24. **Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES.** The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 117: 5019–5032, 2011.
25. **Capalbo S, Trerotoli P, Ciancio A, Battista C, Serio G, Liso V.** Increased risk of lymphoproliferative disorders in relatives of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: relevance of the degree of familial linkage. *Eur. J. Haematol.* 65: 114–117, 2000.
26. **Chen DZ, Patel DV, Hackbarth CJ, Wang W, Dreyer G, Young DC, Margolis PS, Wu C, Ni ZJ, Trias J, White RJ, Yuan Z.** Actinonin, a naturally occurring antibacterial agent, is a potent deformylase inhibitor. *Biochemistry (Mosc.)* 39: 1256–1262, 2000.
27. **Chen G, Courey AJ.** Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression. *Gene* 249: 1–16, 2000.
28. **Chen J, McMillan NAJ.** Molecular basis of pathogenesis, prognosis and therapy in chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer Biol. Ther.* 7: 174–179, 2008.
29. **Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, Rai KR.** National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 87: 4990–4997, 1996.
30. **Cho-Park PF, Steller H.** Proteasome regulation by ADP-ribosylation. *Cell* 153: 614–627, 2013.
31. **Chu DH, Morita CT, Weiss A.** The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol. Rev.* 165: 167–180, 1998.
32. **Chung EJ, Hwang S-G, Nguyen P, Lee S, Kim J-S, Kim JW, Henkart PA, Bottaro DP, Soon L, Bonvini P, Lee S-J, Karp JE, Oh HJ, Rubin JS, Trepel JB.** Regulation of leukemic cell adhesion, proliferation, and survival by beta-catenin. *Blood* 100: 982–990, 2002.
33. **Clevers H, Nusse R.** Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease. *Cell* 149: 1192–1205, 2012.
34. **Collins RJ, Verschuer LA, Harmon BV, Prentice RL, Pope JH, Kerr JF.** Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br. J. Haematol.* 71: 343–350, 1989.

35. **Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marcé S, López-Guillermo A, Campo E, Montserrat E.** ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 348: 1764–1775, 2003.
36. **Criel A, Michaux L, De Wolf-Peeters C.** The concept of typical and atypical chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk. Lymphoma* 33: 33–45, 1999.
37. **Csordas A.** On the biological role of histone acetylation. *Biochem. J.* 265: 23–38, 1990.
38. **Cuttner J.** Increased incidence of hematologic malignancies in first-degree relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Invest.* 10: 103–109, 1992.
39. **Dameshek W.** Special Article: Chronic Lymphocytic Leukemia—an Accumulative Disease of Immunologically Incompetent Lymphocytes. *Blood* 29: 566–584, 1967.
40. **Dameshek W.** Special Article: Chronic Lymphocytic Leukemia—an Accumulative Disease of Immunologically Incompetent Lymphocytes. *Blood* 29: 566–584, 1967.
41. **Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N.** Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94: 1840–1847, 1999.
42. **Danilov AV.** Targeted Therapy in Chronic Lymphocytic Leukemia: Past, Present, and Future. *Clin. Ther.* 35: 1258–1270, 2013.
43. **Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC.** X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388: 300–304, 1997.
44. **Dighiero G, Hamblin TJ.** Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 371: 1017–1029, 2008.
45. **DiGiuseppe JA, Borowitz MJ.** Clinical utility of flow cytometry in the chronic lymphoid leukemias. *Semin. Oncol.* 25: 6–10, 1998.
46. **Döhner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S.** p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 85: 1580–1589, 1995.

47. **Döhner H, Pilz T, Fischer K, Cabot G, Diehl D, Fink T, Stilgenbauer S, Bentz M, Lichter P.** Molecular cytogenetic analysis of RB-1 deletions in chronic B-cell leukemias. *Leuk. Lymphoma* 16: 97–103, 1994.
48. **Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P.** Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 343: 1910–1916, 2000.
49. **Dores GM, Anderson WF, Curtis RE, Landgren O, Ostroumova E, Bluhm EC, Rabkin CS, Devesa SS, Linet MS.** Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *Br. J. Haematol.* 139: 809–819, 2007.
50. **Dürig J, Nüchel H, Cremer M, Führer A, Halfmeyer K, Fandrey J, Möröy T, Klein-Hitpass L, Dührsen U.** ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 17: 2426–2434, 2003.
51. **Duvic M, Talpur R, Ni X, Zhang C, Hazarika P, Kelly C, Chiao JH, Reilly JF, Ricker JL, Richon VM, Frankel SR.** Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood* 109: 31–39, 2007.
52. **Eichhorst B, Dreyling M, Robak T, Montserrat E, Hallek M.** Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 22: vi50–vi54, 2011.
53. **Eichhorst B, Hallek M.** Revision of the guidelines for diagnosis and therapy of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 20: 469–477, 2007.
54. **Elter T, Hallek M, Engert A.** Fludarabine in chronic lymphocytic leukaemia. *Expert Opin. Pharmacother.* 7: 1641–1651, 2006.
55. **Erdfelder F, Hertweck M, Filipovich A, Uhrmacher S, Kreuzer K-A.** High lymphoid enhancer-binding factor-1 expression is associated with disease progression and poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Rep.* 2: e3, 2010.
56. **European Medicines Agency.** MabCampath - Withdrawal of the marketing authorisation in the European Union [Online]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Public_statement/2012/08/WC500130945.pdf.
57. **Fan L, Wang L, Zhang R, Fang C, Zhu D-X, Wang Y-H, Zou Z-J, Li J-Y, Xu**

- W. Richter transformation in 16 of 149 Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 53: 1749–1756, 2012.
58. **Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF.** The ABC of APC. *Hum. Mol. Genet.* 10: 721–733, 2001.
59. **Filipovich A, Gandhirajan RK, Gehrke I, Poll-Wolbeck SJ, Kreuzer K-A.** Evidence for non-functional Dickkopf-1 (DKK-1) signaling in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Eur. J. Haematol.* 85: 309–313, 2010.
60. **Friend C, Patuleia MC, De Harven E.** Erythrocytic maturation in vitro of murine (Friend) virus-induced leukemic cells. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 22: 505–522, 1966.
61. **Fuino L, Bali P, Wittmann S, Donapaty S, Guo F, Yamaguchi H, Wang H-G, Atadja P, Bhalla K.** Histone deacetylase inhibitor LAQ824 down-regulates Her-2 and sensitizes human breast cancer cells to trastuzumab, taxotere, gemcitabine, and epothilone B. *Mol. Cancer Ther.* 2: 971–984, 2003.
62. **Furumai R, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Yoshida M, Horinouchi S.** Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 87–92, 2001.
63. **Gahrton G, Robèrt K-H.** Chromosomal aberrations in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 6: 171–181, 1982.
64. **Gandhi DV, Plunkett W.** Cellular and Clinical Pharmacology of Fludarabine. *Clin. Pharmacokinet.* 41: 93–103, 2002.
65. **Gao J, Liu X, Rigas B.** Nitric oxide-donating aspirin induces apoptosis in human colon cancer cells through induction of oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 17207–17212, 2005.
66. **García-Muñoz R, Galiacho VR, Llorente L.** Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development. *Ann. Hematol.* 91: 981–996, 2012.
67. **Gehrke I, Razavi R, Poll-Wolbeck SJ, Berkessel A, Hallek M, Kreuzer K-A.** The Antineoplastic Effect of Nitric Oxide-Donating Acetylsalicylic Acid (NO-ASA) in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Cells is Highly Dependent on its Positional Isomerism. *Ther. Adv. Hematol.* 2: 279–289, 2011.
68. **Giles RH, van Es JH, Clevers H.** Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1653: 1–24, 2003.
69. **Di Giovanni S, Valentini G, Carducci P, Giallonardo P.** Beta-2-microglobulin is a reliable tumor marker in chronic lymphocytic leukemia. *Acta*

Haematol. 81: 181–185, 1989.

70. **Gladstone D, Fuchs E.** Hematopoietic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. [Miscellaneous Article]. *Curr. Opin. Oncol.* March 2012 24: 176–181, 2012.
71. **Gonzalez D, Martinez P, Wade R, Hockley S, Oscier D, Matutes E, Dearden CE, Richards SM, Catovsky D, Morgan GJ.** Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29: 2223–2229, 2011.
72. **Grujic M, Zavasnik-Bergant T, Pejler G, Renko M.** Actinonin induces apoptosis in U937 leukemia cells. *Cancer Lett.* 223: 211–218, 2005.
73. **Gutierrez A Jr, Tschumper RC, Wu X, Shanafelt TD, Eckel-Passow J, Huddlestone PM 3rd, Slager SL, Kay NE, Jelinek DF.** LEF-1 is a prosurvival factor in chronic lymphocytic leukemia and is expressed in the preleukemic state of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Blood* 116: 2975–2983, 2010.
74. **Haferlach C, Dicker F, Weiss T, Schnittger S, Beck C, Grote-Metke A, Oruzio D, Kern W, Haferlach T.** Toward a comprehensive prognostic scoring system in chronic lymphocytic leukemia based on a combination of genetic parameters. *Genes. Chromosomes Cancer* 49: 851–859, 2010.
75. **Hallek M, Bergmann M, Emmerich B.** Chronic lymphocytic leukaemia: updated recommendations on diagnosis and treatment. *Onkologie* 27: 97–104, 2004.
76. **Hallek M, Bergmann, Manuela, Emmerich, Bertold.** *Chronische lymphatische Leukämie.* Bremen [u.a.: UNI-MED-Verl., 2009.
77. **Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ, International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia.** Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 111: 5446–5456, 2008.
78. **Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dietzfelbinger H, Adorf D, Ostwald M, Busch R, Kuhn-Hallek I, Thiel E, Emmerich B.** Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 93: 1732–1737, 1999.
79. **Hallek M, Pflug N.** State of the art treatment of chronic lymphocytic

leukaemia. *Blood Rev.* 25: 1–9, 2011.

80. **Hallek M, Wanders L, Ostwald M, Busch R, Senekowitsch R, Stern S, Schick HD, Kuhn-Hallek I, Emmerich B.** Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk. Lymphoma* 22: 439–447, 1996.
81. **Hallek M.** Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am. J. Hematol.* (May 30, 2013). doi: 10.1002/ajh.23491.
82. **Hallek M.** Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies. *Blood* (September 24, 2013). doi: 10.1182/blood-2013-05-498287.
83. **Hamblin AD, Hamblin TJ.** The immunodeficiency of chronic lymphocytic leukaemia. *Br. Med. Bull.* 87: 49–62, 2008.
84. **Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK.** Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94: 1848–1854, 1999.
85. **Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG.** CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 99: 1023–1029, 2002.
86. **Hanks SK, Quinn AM.** Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol.* 200: 38–62, 1991.
87. **Harada Y, Ishii I, Hatake K, Kasahara T.** Pyrinium pamoate inhibits proliferation of myeloma/erythroleukemia cells by suppressing mitochondrial respiratory complex I and STAT3. *Cancer Lett.* 319: 83–88, 2012.
88. **Huang S-MA, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, Charlat O, Wiellette E, Zhang Y, Wiessner S, Hild M, Shi X, Wilson CJ, Mickanin C, Myer V, Fazal A, Tomlinson R, Serluca F, Shao W, Cheng H, Shultz M, Rau C, Schirle M, Schlegl J, Ghidelli S, Fawell S, Lu C, Curtis D, Kirschner MW, Lengauer C, Finan PM, Tallarico JA, Bouwmeester T, Porter JA, Bauer A, Cong F.** Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* 461: 614–620, 2009.
89. **Ibrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, Lerner S, Kantarjian HM, Albitar M.** CD38 expression as an important prognostic factor in B-

cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 98: 181–186, 2001.

90. **Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, Brenner C.** Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1807: 735–745, 2011.
91. **Iwamoto M, Friedman EJ, Sandhu P, Agrawal NGB, Rubin EH, Wagner JA.** Clinical pharmacology profile of vorinostat, a histone deacetylase inhibitor. *Cancer Chemother. Pharmacol.* doi: 10.1007/s00280-013-2220-z.
92. **Jaffe ES.** The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* (2009). doi: 10.1182/asheducation-2009.1.523.
93. **James DF, Kipps TJ.** Rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Adv. Ther.* 28: 534–554, 2011.
94. **Johnston JB.** Mechanism of Action of Pentostatin and Cladribine in Hairy Cell Leukemia. *Leuk. Lymphoma* 52: 43–45, 2011.
95. **K. Gandhirajan R, J. Poll-Wolbeck S, Gehrke I, Kreuzer K-A.** Wnt/beta-Catenin/LEF-1 Signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): A Target for Current and Potential Therapeutic Options. *Curr. Cancer Drug Targets* 10: 716–727, 2010.
96. **Keefer LK.** Nitric oxide (NO)- and nitroxyl (HNO)-generating diazeniumdiolates (NONOates): emerging commercial opportunities. *Curr. Top. Med. Chem.* 5: 625–636, 2005.
97. **Khan NI, Bendall LJ.** Role of WNT signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Histol. Histopathol.* 21: 761–774, 2006.
98. **Kilo MN, Dorfman DM.** The utility of flow cytometric immunophenotypic analysis in the distinction of small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia from mantle cell lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 105: 451–457, 1996.
99. **Kim MS, Blake M, Baek JH, Kohlhagen G, Pommier Y, Carrier F.** Inhibition of Histone Deacetylase Increases Cytotoxicity to Anticancer Drugs Targeting DNA. *Cancer Res.* 63: 7291–7300, 2003.
100. **Kirby CA, Cheung A, Fazal A, Shultz MD, Stams T.** Structure of human tankyrase 1 in complex with small-molecule inhibitors PJ34 and XAV939. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 68: 115–118, 2012.
101. **Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, Wang HG, Zhang X, Bullrich F, Croce CM, Rai K, Hines J, Reed JC.** Expression

of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* 91: 3379–3389, 1998.

102. **Konoplev SN, Fritsche HA, O'Brien S, Wierda WG, Keating MJ, Gornet TG, St Romain S, Wang X, Inamdar K, Johnson MR, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE.** High serum thymidine kinase 1 level predicts poorer survival in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* 134: 472–477, 2010.

103. **Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH.** Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415–1420, 1994.

104. **Kröber A, Bloehdorn J, Hafner S, Bühler A, Seiler T, Kienle D, Winkler D, Bangerter M, Schlenk RF, Benner A, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S.** Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24: 969–975, 2006.

105. **Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S.** V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100: 1410–1416, 2002.

106. **Kühl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT.** The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet. TIG* 16: 279–283, 2000.

107. **Kühnl A, Gökbuget N, Kaiser M, Schlee C, Stroux A, Burmeister T, Mochmann LH, Hoelzer D, Hofmann W-K, Thiel E, Baldus CD.** Overexpression of LEF1 predicts unfavorable outcome in adult patients with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 118: 6362–6367, 2011.

108. **Kyasa MJ, Hazlett L, Parrish RS, Schichman SA, Zent CS.** Veterans with chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL) have a markedly increased rate of second malignancy, which is the most common cause of death. *Leuk. Lymphoma* 45: 507–513, 2004.

109. **Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, Sougnez C, Stewart C, Sivachenko A, Wang L, Wan Y, Zhang W, Shukla SA, Vartanov A, Fernandes SM, Saksena G, Cibulskis K, Tesar B, Gabriel S, Hacohen N, Meyerson M, Lander ES, Neuberg D, Brown JR, Getz G, Wu CJ.** Evolution and Impact of Subclonal Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cell*

152: 714–726, 2013.

110. **Lemery SJ, Zhang J, Rothmann MD, Yang J, Earp J, Zhao H, McDougal A, Pilaro A, Chiang R, Gootenberg JE, Keegan P, Pazdur R.** U.S. Food and Drug Administration Approval: Ofatumumab for the Treatment of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia Refractory to Fludarabine and Alemtuzumab. *Clin. Cancer Res.* 16: 4331–4338, 2010.

111. **Lendeckel U, Arndt M, Frank K, Spiess A, Reinhold D, Ansorge S.** Modulation of WNT-5A expression by actinonin: linkage of APN to the WNT-pathway? *Adv. Exp. Med. Biol.* 477: 35–41, 2000.

112. **Lin H-Y, Chen C-S, Lin S-P, Weng J-R, Chen C-S.** Targeting histone deacetylase in cancer therapy. *Med. Res. Rev.* 26: 397–413, 2006.

113. **Lu D, Liu JX, Endo T, Zhou H, Yao S, Willert K, Schmidt-Wolf IGH, Kipps TJ, Carson DA.** Ethacrynic acid exhibits selective toxicity to chronic lymphocytic leukemia cells by inhibition of the Wnt/beta-catenin pathway. *PLoS One* 4: e8294, 2009.

114. **Lu D, Zhao Y, Tawatao R, Cottam HB, Sen M, Leoni LM, Kipps TJ, Corr M, Carson DA.** Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 3118–3123, 2004.

115. **Magnac C, Porcher R, Davi F, Nataf J, Payelle-Brogard B, Tang RP, Oppedo P, Lévy V, Dighiero G, Ajchenbaum-Cymbalista F.** Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL. *Leukemia* 17: 133–137, 2003.

116. **Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stanek P, Glinka A, Niehrs C.** LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411: 321–325, 2001.

117. **Marks PA, Breslow R.** Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat. Biotechnol.* 25: 84–90, 2007.

118. **Marti G, Orfao A, Goolsby C.** ZAP-70 in CLL: towards standardization of a biomarker for patient management: history of clinical cytometry special issue. *Cytometry B Clin. Cytom.* 70: 197–200, 2006.

119. **Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, Catovsky D.** The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 8: 1640–1645, 1994.

120. **Melo JV, Catovsky D, Galton DA.** The relationship between chronic

lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. I. Clinical and laboratory features of 300 patients and characterization of an intermediate group. *Br. J. Haematol.* 63: 377–387, 1986.

121. **Montillo M, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E.** Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica* 90: 391–399, 2005.

122. **Montserrat E, Bosch F, Rozman C.** B-cell chronic lymphocytic leukemia: recent progress in biology, diagnosis, and therapy. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 8 Suppl 1: 93–101, 1997.

123. **Montserrat E, Moreno C, Esteve J, Urbano-Ispizua A, Giné E, Bosch F.** How I treat refractory CLL. *Blood* 107: 1276–1283, 2006.

124. **Montserrat E, Rozman C.** Chronic lymphocytic leukemia: present status. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 6: 219–235, 1995.

125. **Mozaheb Z, Hasanzadeh NazarAbadi MH, Aghaee MA.** Chronic lymphocytic leukemia and prognostic factors. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 13: 3009–3013, 2012.

126. **Nath N, Chattopadhyay M, Pospishil L, Cieciora LZ, Goswami S, Kodela R, Saavedra JE, Keefer LK, Kashfi K.** JS-K, a nitric oxide-releasing prodrug, modulates β -catenin/TCF signaling in leukemic Jurkat cells: evidence of an S-nitrosylated mechanism. *Biochem. Pharmacol.* 80: 1641–1649, 2010.

127. **Nath N, Kashfi K, Chen J, Rigas B.** Nitric oxide-donating aspirin inhibits beta-catenin/T cell factor (TCF) signaling in SW480 colon cancer cells by disrupting the nuclear beta-catenin-TCF association. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 12584–12589, 2003.

128. **Nusse R, Varmus H.** Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. *EMBO J.* 31: 2670–2684, 2012.

129. **Obermann EC, Went P, Tzankov A, Pileri SA, Hofstaedter F, Marienhagen J, Stoehr R, Dirnhofer S.** Cell cycle phase distribution analysis in chronic lymphocytic leukaemia: a significant number of cells reside in early G1-phase. *J. Clin. Pathol.* 60: 794–797, 2007.

130. **Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, Hamblin TJ, Staudt LM, Oscier DG.** ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 363: 105–111, 2004.

131. **Ott G, Balague-Ponz O, de Leval L, de Jong D, Hasserjian RP, Elenitoba-**

Johnson KSJ. Commentary on the WHO classification of tumors of lymphoid tissues (2008): indolent B cell lymphomas. *J. Hematop.* 2: 77–81, 2009.

132. **Packham G, Stevenson FK.** Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology* 114: 441–449, 2005.

133. **Park J-H, Jung Y, Kim TY, Kim SG, Jong H-S, Lee JW, Kim D-K, Lee J-S, Kim NK, Kim T-Y, Bang Y-J.** Class I Histone Deacetylase-Selective Novel Synthetic Inhibitors Potently Inhibit Human Tumor Proliferation. *Clin. Cancer Res.* 10: 5271–5281, 2004.

134. **Pekarsky Y, Palamarchuk A, Maximov V, Efanov A, Nazaryan N, Santanam U, Rassenti L, Kipps T, Croce CM.** Tcl1 functions as a transcriptional regulator and is directly involved in the pathogenesis of CLL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 19643–19648, 2008.

135. **Polakis P.** Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, 2012.

136. **Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D.** Histone deacetylase inhibitors (HDACIs). Structure--activity relationships: history and new QSAR perspectives. *Med. Res. Rev.* 32: 1–165, 2012.

137. **Rai KR, Han T.** Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 4: 447–456, 1990.

138. **Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS.** Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46: 219–234, 1975.

139. **Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, Neuberg DS, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ.** ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 351: 893–901, 2004.

140. **Rawstron AC, Bennett F, Hillmen P.** The biological and clinical relationship between CD5+23+ monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 139: 724–729, 2007.

141. **Razavi R, Gehrke I, Gandhirajan RK, Poll-Wolbeck SJ, Hallek M, Kreuzer K-A.** Nitric oxide-donating acetylsalicylic acid induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells and shows strong antitumor efficacy in vivo. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17: 286–293, 2011.

142. **Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, Botteman MF, Pashos CL.** The

clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur. J. Cancer Care (Engl.)* 13: 279–287, 2004.

143. **Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL.** A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423: 409–414, 2003.

144. **Reya T, O’Riordan M, Okamura R, Devaney E, Willert K, Nusse R, Grosschedl R.** Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity* 13: 15–24, 2000.

145. **Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R.** The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 50: 649–657, 1987.

146. **Robak T.** The place of cladribine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: a 10-year experience in Poland. *Ann. Hematol.* 84: 63–70, 2005.

147. **Robertson TI.** Complications and causes of death in B cell chronic lymphocytic leukaemia: a long term study of 105 patients. *Aust. N. Z. J. Med.* 20: 44–50, 1990.

148. **Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, Yang L, Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BD, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, Brown PO, Staudt LM.** Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* 194: 1639–1647, 2001.

149. **Rossi D, Gaidano G.** Richter syndrome: molecular insights and clinical perspectives. *Hematol. Oncol.* 27: 1–10, 2009.

150. **Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P.** Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275: 1790–1792, 1997.

151. **De Ruijter AJM, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg ABP.** Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* 370: 737–749, 2003.

152. **Saavedra JE, Billiar TR, Williams DL, Kim YM, Watkins SC, Keefer LK.** Targeting nitric oxide (NO) delivery in vivo. Design of a liver-selective NO donor prodrug that blocks tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and toxicity in the liver. *J. Med. Chem.* 40: 1947–1954, 1997.

153. **Saavedra JE, Shami PJ, Wang LY, Davies KM, Booth MN, Citro ML,**

Keefer LK. Esterase-sensitive nitric oxide donors of the diazeniumdiolate family: in vitro antileukemic activity. *J. Med. Chem.* 43: 261–269, 2000.

154. **Sagatys EM, Zhang L.** Clinical and laboratory prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Control J. Moffitt Cancer Cent.* 19: 18–25, 2012.

155. **Sanchez M, Almeida J, Vidriales B, Orfao A.** Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. *Publ. Online 30 July 2002 Doi101038sjleu2402584* 16, 2002.

156. **Schena M, Gottardi D, Ghia P, Larsson LG, Carlsson M, Nilsson K, Caligaris-Cappio F.** The role of Bcl-2 in the pathogenesis of B chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 11: 173–179, 1993.

157. **Schliep S, Decker T, Schneller F, Wagner H, Häcker G.** Functional evaluation of the role of inhibitor of apoptosis proteins in chronic lymphocytic leukemia. *Exp. Hematol.* 32: 556–562, 2004.

158. **Schroers R, Griesinger F, Trümper L, Haase D, Kulle B, Klein-Hitpass L, Sellmann L, Dührsen U, Dürig J.** Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 19: 750–758, 2005.

159. **Shami PJ, Saavedra JE, Wang LY, Bonifant CL, Diwan BA, Singh SV, Gu Y, Fox SD, Buzard GS, Citro ML, Waterhouse DJ, Davies KM, Ji X, Keefer LK.** JS-K, a glutathione/glutathione S-transferase-activated nitric oxide donor of the diazeniumdiolate class with potent antineoplastic activity. *Mol. Cancer Ther.* 2: 409–417, 2003.

160. **Siegel R, Naishadham D, Jemal A.** Cancer statistics, 2013. *CA. Cancer J. Clin.* 63: 11–30, 2013.

161. **Sikandar S, Dizon D, Shen X, Li Z, Besterman J, Lipkin SM.** The class I HDAC inhibitor MGCD0103 induces cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer initiating cells by upregulating Dickkopf-1 and non-canonical Wnt signaling. *Oncotarget* 1: 596–605, 2010.

162. **Skowronska A, Parker A, Ahmed G, Oldreive C, Davis Z, Richards S, Dyer M, Matutes E, Gonzalez D, Taylor AMR, Moss P, Thomas P, Oscier D, Stankovic T.** Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom Leukemia Research Fund Chronic Lymphocytic Leukemia 4 trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30: 4524–4532, 2012.

163. **Smith JL, Cowling DC, Barker CR.** RESPONSE OF LYMPHOCYTES IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKÆMIA TO PLANT MITOGENS. *The Lancet* 299: 229–233, 1972.
164. **Smith S, Giriat I, Schmitt A, de Lange T.** Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 282: 1484–1487, 1998.
165. **Stankovic T, Skowronska A.** The role of ATM mutations and 11q deletions in disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* (September 12, 2013). doi: 10.3109/10428194.2013.829919.
166. **Stilgenbauer S, Bullinger L, Benner A, Wildenberger K, Bentz M, Döhner K, Ho AD, Lichter P, Döhner H.** Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 13: 1331–1334, 1999.
167. **Tedder TF, Engel P.** CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol. Today* 15: 450–454, 1994.
168. **Thorne CA, Hanson AJ, Schneider J, Tahinci E, Orton D, Cselenyi CS, Jernigan KK, Meyers KC, Hang BI, Waterson AG, Kim K, Melancon B, Ghidu VP, Sulikowski GA, LaFleur B, Salic A, Lee LA, Miller DM 3rd, Lee E.** Small-molecule inhibition of Wnt signaling through activation of casein kinase 1 α . *Nat. Chem. Biol.* 6: 829–836, 2010.
169. **Thorsélius M, Kröber A, Murray F, Thunberg U, Tobin G, Bühler A, Kienle D, Albesiano E, Maffei R, Dao-Ung L-P, Wiley J, Vilpo J, Laurell A, Merup M, Roos G, Karlsson K, Chiorazzi N, Marasca R, Döhner H, Stilgenbauer S, Rosenquist R.** Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood* 107: 2889–2894, 2006.
170. **Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, Shaughnessy JD.** The Role of the Wnt-Signaling Antagonist DKK1 in the Development of Osteolytic Lesions in Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 349: 2483–2494, 2003.
171. **Tian X-H, Hou W-J, Fang Y, Fan J, Tong H, Bai S-L, Chen Q, Xu H, Li Y.** XAV939, a tankyrase 1 inhibitor, promotes cell apoptosis in neuroblastoma cell lines by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 32: 100, 2013.
172. **Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Thörn I, Söderberg O, Hultdin M, Botling J, Enblad G, Sällström J, Sundström C, Roos G, Rosenquist R.** Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic

lymphocytic leukemia. *Blood* 99: 2262–2264, 2002.

173. **Tsuji N, Kobayashi M, Nagashima K, Wakisaka Y, Koizumi K.** A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J. Antibiot. (Tokyo)* 29: 1–6, 1976.

174. **Turgut B, Vural O, Pala FS, Pamuk GE, Tabakcioğlu K, Demir M, Ongören S, Soysal T, Algüneş C.** 17p Deletion is associated with resistance of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells to in vitro fludarabine-induced apoptosis. *Leuk. Lymphoma* 48: 311–320, 2007.

175. **Turner BM.** Histone acetylation and control of gene expression. *J. Cell Sci.* 99 (Pt 1): 13–20, 1991.

176. **Turner M, Schweighoffer E, Colucci F, Di Santo JP, Tybulewicz VL.** Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol. Today* 21: 148–154, 2000.

177. **Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT.** A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev. Cell* 5: 367–377, 2003.

178. **Venerando A, Girardi C, Ruzzene M, Pinna LA.** Pyrvinium pamoate does not activate protein kinase CK1, but promotes Akt/PKB down-regulation and GSK3 activation. *Biochem. J.* 452: 131–137, 2013.

179. **Vigushin DM, Ali S, Pace PE, Mirsaidi N, Ito K, Adcock I, Coombes RC.** Trichostatin A Is a Histone Deacetylase Inhibitor with Potent Antitumor Activity against Breast Cancer in Vivo. *Clin. Cancer Res.* 7: 971–976, 2001.

180. **Wallace JL, Miller MJ.** Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology* 119: 512–520, 2000.

181. **Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, Vanrumbeke M, Quesnel B, Dervite I, Morel P, Fenaux P.** p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood* 84: 3148–3157, 1994.

182. **Wu G, He X.** Threonine 41 in beta-catenin serves as a key phosphorylation relay residue in beta-catenin degradation. *Biochemistry (Mosc.)* 45: 5319–5323, 2006.

183. **Xing Y, Clements WK, Kimelman D, Xu W.** Crystal structure of a β -catenin/Axin complex suggests a mechanism for the β -catenin destruction complex. *Genes Dev.* 17: 2753–2764, 2003.

184. **Yee KWL, O'Brien SM.** Chronic lymphocytic leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin. Proc. Mayo Clin.* 81: 1105–1129, 2006.

185. **Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T.** Potent and specific inhibition of

- mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* 265: 17174–17179, 1990.
186. **Yoshida M, Nomura S, Beppu T.** Effects of trichostatins on differentiation of murine erythroleukemia cells. *Cancer Res.* 47: 3688–3691, 1987.
187. **Ysebaert L, Chicanne G, Demur C, De Toni F, Prade-Houdellier N, Ruidavets J-B, Mansat-De Mas V, Rigal-Huguet F, Laurent G, Payrastre B, Manenti S, Racaud-Sultan C.** Expression of beta-catenin by acute myeloid leukemia cells predicts enhanced clonogenic capacities and poor prognosis. *Leukemia* 20: 1211–1216, 2006.
188. **Zeng X, Huang H, Tamai K, Zhang X, Harada Y, Yokota C, Almeida K, Wang J, Doble B, Woodgett J, Wynshaw-Boris A, Hsieh J-C, He X.** Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Dev. Camb. Engl.* 135: 367–375, 2008.
189. **Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, He X.** A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438: 873–877, 2005.
190. **Zenz T, Gribben JG, Hallek M, Döhner H, Keating MJ, Stilgenbauer S.** Risk categories and refractory CLL in the era of chemoimmunotherapy. *Blood* 119: 4101–4107, 2012.
191. **Zenz T, Mertens D, Döhner H, Stilgenbauer S.** Importance of genetics in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev.* 25: 131–137, 2011.
192. **Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S.** From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* 10: 37–50, 2010.
193. **Zhang Q, Major MB, Takanashi S, Camp ND, Nishiya N, Peters EC, Ginsberg MH, Jian X, Randazzo PA, Schultz PG, Moon RT, Ding S.** Small-molecule synergist of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 7444–7448, 2007.
194. **Zhao L, Au JL-S, Wientjes MG.** Comparison of methods for evaluating drug-drug interaction. *Front. Biosci. Elite Ed.* 2: 241–249, 2010.
195. Chronic Lymphocytic Leukemia: Recommendations for Diagnosis, Staging, and Response Criteria. *Ann. Intern. Med.* 110: 236–238, 1989.

7 Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Vortrag auf wissenschaftlichem Kongress

Peiffer L., Flamme H., Poll-Wolbeck S.J., Hallek M., Kreuzer K.A.: Der HDAC Inhibitor Trichostatin A wirkt effektiv und selektiv auf CLL Zellen in vitro / The HDAC inhibitor Trichostatin A induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells (CLL) in a highly effective and selective manner. Freier Vortrag auf der Jahrestagung der DGHO, Wien, 2013 (Session CLL I)

Publikation

Peiffer L., Poll-Wolbeck S.J., Flamme H., Gehrke, I., Hallek M., Kreuzer K.A.: Trichostatin A Effectively Induces Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells via Inhibition of WNT Signaling and Histone Deacetylation, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, erschienen im Mai 2014 online, im August 2014 als Printartikel

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Blutausstrich eines CLL-Patienten	4
Abbildung 2: FISH-Analyse einer Patienten mit 17p-Deletion.....	11
Abbildung 3: Der WNT/PCP Signalweg und der WNT/ Ca ²⁺ Signalweg	19
Abbildung 4: Die WNT/ β -Catenin Signalkaskade.....	21
Abbildung 5: Die Struktur von QS11	24
Abbildung 6: Die Struktur von Pyrvinium pamoat.....	25
Abbildung 7: Die Struktur von XAV939	25
Abbildung 8: Die Struktur von JSK.....	26
Abbildung 9: Die Struktur von Trichostatin A	27
Abbildung 10: Die Struktur von SAHA.....	27
Abbildung 11: Strukturelle Übersicht von Substanzen der Hydroxamat-Familie.....	28
Abbildung 12: Induktion von Apoptose in CLL-Zellen durch Trichostatin A	46
Abbildung 13: Reaktionsgleichung der Luciferase-Reaktion.....	47
Abbildung 14: Reaktionsgleichung der Luciferase-Reaktion zur Bestimmung der Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7	48
Abbildung 15: Die WNT-Bibliothek – Aktivatoren	56
Abbildung 16: Die WNT-Bibliothek – Inhibitoren	57
Abbildung 17: QS-11 steigert das Überleben von CLL-Zellen	59
Abbildung 18: Pyrvinium pamoat induziert Apoptose in CLL Zellen	60
Abbildung 19: Der Effekt von XAV939 auf die Proteine des WNT-Signalweges	61
Abbildung 20: XAV939 zeigt keinen Einfluss auf die Viabilität der CLL Zellen	62
Abbildung 21: JSK induziert Apoptose in CLL-Zellen nach 24 Stunden	63
Abbildung 22: Die LD ₅₀ -Werte der beiden Populationen nähern sich nach 48 Stunden einander an	64
Abbildung 23: Trichostatin A zeigt einen geringen Effekt auf gesunde und kranke Zellpopulationen nach 24 Stunden.....	65
Abbildung 24: TSA induziert Apoptose nach 48 Stunden mit einem geringen Einfluss auf gesunde Zellen.....	66
Abbildung 25: Aktivität der Caspasen 3 und 7 in CLL-Zellen nach Behandlung mit TSA	67
Abbildung 26: Die Spaltung von PARP als Kontrolle für Caspase-Aktivität	68
Abbildung 27: Die Inhibition der Histon-Deacetylase durch Trichostatin A	69
Abbildung 28: Die mRNA-Expression von DKK1 ist nach TSA-Behandlung erhöht	70
Abbildung 29: TP53-mutierte CLL Zellen sprechen gut auf die Behandlung mit TSA an	71
Abbildung 30: Stark vorbehandelte Patienten zeigen gleiche Ansprechraten auf Behandlung mit TSA wie therapienaive Patienten	72

Abbildung 31: Additiver Effekt in Kombination mit DNS-aktiven Substanzen	74
Abbildung 32: Überlebenssteigerung von QS-11 auf CLL Zellen	75
Abbildung 33: QS-11 kann CLL Zellen nicht vor Apoptose durch Trichostatin A schützen ...	76
Abbildung 34: Dosis-Wirkungsvergleich zwischen SAHA und Trichostatin A	77
Abbildung 35: Die sequenzierten Proteine des WNT-Signalweges	81
Abbildung 36: Intrinsischer und extrinsischer Apoptoseweg	91
Abbildung 37: Der duale Wirkmechanismus von Trichostatin A	93
Abbildung 38: Struktureller Vergleich von Trichostatin A und C	96

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Stadieneinteilung der CLL nach Rai	6
Tabelle 2: Klinische Stadieneinteilung der CLL nach Binet.....	7
Tabelle 3: Temperaturprogramm für cDNS Gewinnung mit Hilfe der reversen Transkriptasereaktion.....	38
Tabelle 4: Zusammensetzung der PCR-Ansätze	40
Tabelle 5: Temperaturprogramm für APC	40
Tabelle 6: Temperaturprogramm für Axin	40
Tabelle 7: Temperaturprogramm für GSK3 β	41
Tabelle 8: Temperaturprogramm für LEF1	41
Tabelle 9: Temperaturprogramm für β -Catenin.....	41
Tabelle 10: Übersicht der Sequenzierungsprimer und der dazugehörigen Schmelztemperaturen	42
Tabelle 11: Temperaturprogramm für die enzymatische Aufreinigung der PCR	43
Tabelle 12: PCR-Ansatz für die Sequenzierungs-PCR gemäß CCG-Vorgaben	43
Tabelle 13: Temperaturprogramm der Sequenzierungs-PCR	43
Tabelle 14: Ansatz für die Quantitative PCR.....	44
Tabelle 15: Temperaturprogramm für die qualitative PCR von DKK1 und ABL.....	44
Tabelle 16: Übersicht der Sequenzierungsprimer und der dazugehörigen Schmelztemperaturen für die qualitative PCR	45
Tabelle 17: Übersicht über die untersuchten Gen-Bereiche für wichtige Bestandteile des WNT-Signalweges.....	54
Tabelle 18: Interessante inhibitorische Wirkstoff aus der WNT Bibliothek.....	83

9 Lebenslauf

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