

III Medizinische Klinik

Klinikum rechts der Isar

der Technischen Universität München

(Direktor: Prof. Dr. Florian Bassermann)

Effekte der CDK-Multikinaseinhibition bei Chronisch Lymphatischer Leukämie

Laura Leiser

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Philipp J. Jost
2. Priv.-Doz. Dr. Julia Slotta-Huspenina

Die Dissertation wurde am 13.06.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.12.2019 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom 11.2015 bis 05.2019 unter der Leitung der Direktoren Prof. Dr. med. Christian Peschel und Prof. Dr. med. Florian Bassermann, Herrn Prof. Dr. med. Philipp Jost und Herrn Dr. Christian Bogner in der III. Medizinischen Klinik des Klinikum rechts der Isar durchgeführt.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Christian Bogner bedanken, ohne dessen Hilfe die Arbeit nicht das wäre, was sie jetzt ist: Danke für die Idee, die Denkanstöße, das Feedback und die Korrektur des Manuskriptes.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Madlen Oelsner für die Einarbeitung im Labor und ihre praktische, kognitive und moralische Unterstützung, die mir die Zeit der Dissertation um einiges erleichtert hat.

Bei den Direktoren Prof. Dr. med. Christian Peschel/Prof. Dr. med. Florian Bassermann bedanke ich mich für die Bereitstellung des Laborplatzes, durch die diese Arbeit überhaupt erst möglich geworden ist.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Philipp Jost bedanke ich mich für das Ermöglichen der Durchführung dieses Dissertationsprojektes.

Der Firma Bayer danke ich für das Bereitstellen des Inhibitors Bay 1000394.

Meiner Familie, besonders meinem Partner Adriaan Wildervanck und meinen Eltern Michael Leiser und Beate Blank sowie meiner Schwester Lisa Maria Leiser, danke ich von Herzen, da sie immer an mich glauben und mich unterstützen - nicht nur im Rahmen dieser Dissertation.

Außerdem bedanke ich mich bei meinen Freunden, die immer für mich da sind und mich auch durch die Höhen und Tiefen dieser Dissertation begleitet haben.

Verzeichnisse

I. Inhaltsverzeichnis

Verzeichnisse	i
I. Inhaltsverzeichnis.....	i
II. Abbildungsverzeichnis.....	iii
III. Tabellenverzeichnis	iv
IV. Abkürzungsverzeichnis	v
1. Einleitung	1
1.1. CLL-Pathogenese	1
1.2. Klinik.....	3
1.3. Therapie	7
1.4. Programmierter Zelltod	11
1.5. Apoptose bei CLL	14
1.6. CDKs	16
1.7. Bay 1000394.....	17
1.8. Aufgabenstellung und Vorgehensweise	17
2. Materialien und Methoden	19
2.1. Materialien.....	19
2.1.1. Chemikalien und Additiva	19
2.1.2. Zellproben.....	22
2.1.2.1. CLL-Proben.....	22
2.1.2.2. B-Zell-Proben.....	23
2.1.3. Medien	23
2.1.4. Puffer.....	23
2.1.5. Gele	25
2.1.6. Antikörper	25
2.1.7. Geräte.....	26

2.1.8. Sonstige Materialien	28
2.2. Methoden	29
2.2.1. Separationsverfahren.....	29
2.2.1.1. CLL-Zellen.....	29
2.2.1.2. B-Zellen.....	29
2.2.2. Trypanblau-Färbung	30
2.2.3. Kulturbedingungen	30
2.2.4. Durchflusszytometrie.....	30
2.2.4.1. Annexin-V-Staining	31
2.2.4.2. DiOC6-Staining.....	33
2.2.4.3. TUNEL.....	33
2.2.5. Immunoblot.....	34
2.2.6. Statistische Analysen	36
3. Ergebnisse	37
3.1. Bay 1000394 induziert Apoptose in ruhenden CLL-Zellen	37
3.2. Verlust des mitochondrialen Membranpotentials.....	38
3.3. Aktivierung von Caspase 3, 8, 9 und XIAP	38
3.4. Regulation der mitochondrialen Integrität durch Bcl-2 Proteine	39
3.5. Zugabe des Pan-Caspase Inhibitors Z-VAD-FMK.....	40
3.6. Doppelstrangbrüche im TUNEL-Assay	40
3.7. Stimulierte CLL-Zellen	41
3.8. Stroma-Zellen	41
3.9. Abbildungen	42
4. Diskussion	56
5. Zusammenfassung.....	63
6. Literaturverzeichnis.....	64

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Annexin-V-Assay nach 12h	42
Abb. 2: Dositration mit Bay 1000394 für 12h und 24h.....	43
Abb. 3: Zeitkinetik	44
Abb. 4: Gesunde B-Zellen.....	45
Abb. 5: Mitochondriales Membranpotential nach 12 h Inkubation	46
Abb. 6: DiOC6-Staining des mitochondrialen Membranpotentials	47
Abb. 7: Caspase 3, 8, 9 und XIAP im Immunoblot	48
Abb. 8: Proteine im Immunoblot.....	49
Abb. 9: 12h Annexin-V-Assay nach Vorinkubation mit Z-VAD-FMK	50
Abb. 10: Tunel-Assay nach 12h Inkubation mit Bay 1000394 und Z-VAD-FMK	51
Abb. 11: Tunel-Assay im Vergleich mit und ohne Bay 1000394 und mit und ohne Z-VAD-FMK.....	52
Abb. 12: Wirkung Bay 1000394 auf stimulierte CLL-Zellen.....	53
Abb. 13: Annexin-Assay eines DSP30, IL-2 stimuliertem CLL-Patient	54
Abb. 14: Annexin-V-Assay: Stroma CLL-Zellen.....	55

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach Binet.....	5
Tabelle 2: Stadieneinteilung nach Rai.....	6
Tabelle 3: Erstlinientherapie der CLL.....	8
Tabelle 4: Rezidivtherapie der CLL.....	10

IV. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammonium persulfate
ATM	Ataxia telangiectasia mutated Gen
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-Cell Leukemia 2 Family Protein
Bcl-W	Bcl-2-like protein 2
Bcl-XL	B-Cell Leukemia Family Protein extra large
BCR	B-cell-receptor
BH-	Bcl-2 homology
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bik	Bcl-2 interacting killer
Bim	Bcl-2-like protein 11
BimEL	Bcl-2-like protein 11 extra large
BimL	Bcl-2-like protein 11 large
BimS	Bcl-2-like protein 11 small
Bok	Bcl-2 related ovarian killer
BSA	Bovines Serumalbumin
c-Bid	Cleaved BH3 interacting domain death agonist
CD	Cluster of differentiation

CDK	Cyclin-depended kinases
CD-L	Cluster of differentiation ligand
CIRS	Cumulative Illnes Rating Scala
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CMV	Cytomegalie-Virus
CPG	Desoxycytidin – Phosphorsäure – Desoxyguanosin
$\Delta\Psi_m$	Mitochondrial membran potential
del(17p13)	Deletion 17p13
Diablo	Direkt IAP Bindungs Protein mit Low pI
DiOC6	Mitochondrial marker
DISC	Death-Inducing Signalling Complex
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Deoxyuridine Triphosphat
DNA	Desoxyribonuclein Acid
DSP30	Oligodinucleotid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Fas-L	Fas-ligand
FADD	Fas-associated-death-domain
FCS	Fetal calf serum

FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
Hb	Hämoglobin
HCL	Hydrogenchlorid
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinesulphonic acid
HSV	Herpes-Simplex-Virus
IAP	Inhibitor of apoptosis
IgD	Immunglobulin D
IgM	Immunglobulin M
IgG	Immunglobulin G
IgV _H	Immunoglobulin heavy-chain variable gene
IL-2	Interleukin-2
IWCLL	International Workshop on Chronic Lymphatic Leukemia
JC-1	5,5', 6,6'-Tetrachloro-1,1', 3,3'tetraethylbenzimidazolyl carbocyaniniodid
miRNA	mitochondriale ribonucleic acid
Mcl-1	Myeloid cell leukemia-1 protein
MEM	Minimal essential medium
MHC	Major Histocompatibility Complex
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid

NaOH	Natriumhydroxid
NSCLC	Non Small Cell Lunge Cancer
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat-bufferd-saline
PenStrep	Penicillin Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium Jodid
PMSF	Phenylmethylysulphonyl fluoride
Puma	P53 upregulated modulator of apoptosis
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RAS	Rat sarcoma
RIP1	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
RNA	Ribonucleic Acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Standard deviation Score
SF3B1	Splicing factor 3b subunit 1
SCLC	Small Cell Lunge Cancer
Smac	second mitochondria-derived activator of capsase
Syk	Spleen Tyrosin Kinase
tBid	truncated Bid
TdT	Terminale Desoxyribosyl-Transferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

TLR-9	Toll-Like-Receptor 9
TNF α	Tumor necrosis factor α
TNFR2	TNF Receptor Typ 2
TP53	Tumor Protein 53
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type-1-associated death domain
TRIS	<i>Tris</i> -(hydroxymethyl)-aminomethan
Tunel	Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling
Upm	Winkelgeschwindigkeit
VZV	Varizella-Zoster-Virus
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
ZAP-70	Zeta associated protein 70 kd
Z-VAD-FMK	Irreversible fluoro- or chloromethylketone

1. Einleitung

1.1. CLL-Pathogenese

Die Chronische Lymphatische Leukämie (CLL) zählt zu den niedrig-malignen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen mit regelmäßig leukämischem Verlauf (Schmoll et al., 2006, S. 2845). Sie stellt die häufigste Leukämie der westlichen Welt dar. Die Inzidenz liegt bei etwa 3 Fälle/100.000 Einwohner/Jahr, das mediane Erkrankungsalter bei Erstdiagnose bei etwa 70 Jahren, die Verteilung von männlich zu weiblich beträgt 1,7:1. (Berger & Mertelsmann, 2017, S. 703)

Neoplastische CLL-Zellen sind B-Zellen, die einen funktionsfähigen B-Zell-Rezeptor nur in geringem Ausmaß - und membrangebunden die Antikörper IgM oder IgD nur schwach - exprimieren. Ein Großteil der CLL-Zellen ist somit inkompetent in ihrer Funktion als Antikörper produzierende und präsentierende B-Zelle. (Dighiero & Hamblin, 2008, S. 1018)

CLL-Patienten lassen sich unter anderem nach Besonderheiten der variablen Region der schweren Ketten der Immunglobuline in zwei Subgruppen aufteilen. Während der normalen B-Zell-Reifung kommt es nach Antigenkontakt zur Hypermutation der variablen Region der schweren Ketten der Immunglobulingene, sog. V_H -Gene. In 50-70% sind CLL Patienten Träger solcher somatischer Mutationen. Lassen sich diese Mutationen nicht nachweisen, werden die Tumorzellen immunologisch prä Keimzentrums-B-Zellen zugeordnet. (Dighiero & Hamblin, 2008, S. 1018)

CLL-Patienten mit unmutiertem IgV_H -Genen weisen ein schlechteres Ansprechen auf Chemotherapie und somit ein kürzeres mittleres Überleben auf (Damle et al., 1999, S. 1845). Unabhängig vom Mutationsstatus werden CLL-Zellen den B-Gedächtnis-Zellen zugeordnet, man geht von einer gemeinsamen Ursprungszelle aus (Klein et al., 2001, S. 1632).

Der Pathomechanismus der CLL ist auch im Jahre 2019 nicht abschließend geklärt, ein Defekt im Ablauf des programmierten Zelltodes scheint aber eine entscheidende Rolle zu spielen (Vgl. 1.6).

Ergebnisse aus diversen Arbeiten zeigen, dass das Protein ZAP-70, physiologisch exprimiert in natürlichen Killerzellen und T-Zellen, signifikant häufiger in der unmutierten Form der CLL exprimiert wird (Gobessi et al., 2007, S. 2032; Rosenwald et al., 2001, S. 1643; Wiestner et al., 2003, S. 4945). Die Expression der Tyrosinkinase ZAP-70 ist ein entscheidender Kofaktor für

die mit TLR9 assoziierte Kinase Syk. Die Aktivierung von Syk vermittelt über einen gesteigerten proteasomalen Abbau des proapoptotischen Proteins Bim ein antiapoptotisches Signal, unabhängig von den antiapoptotischen Proteinen Mcl-1, Bcl-2 und Bcl-XL. TLR9 assoziierte antiapoptotische Signale fördern die Sekretion von IgM, die im Sinne eines autokrinen Loops pro-survival Signale über den B-Zell-Rezeptor vermitteln können. Durch diese Mechanismen (Bim Degradierung und IgM autokriner Loop) wird in ZAP-70 positiven CLL-Zellen zusätzlich zur CLL typischen Überexpression von Bcl-2 Apoptose gehemmt (Bim) und die Proliferation der CLL Klone (BCR Stimulation) aktiviert. (Wagner et al., 2016, S. 444-446)

80% der Patienten mit CLL zeigen chromosomale Veränderungen. Anders als bei anderen malignen B-Zell-Erkrankungen sind es hier keine chromosomalen Translokationen. Die häufigsten genetischen Veränderungen sind Deletionen (Deletion 13q (55%), Deletion 11q (18%), Deletion 17p (7%)) oder die Trisomie 12q (16%) (Döhner et al., 2000, S. 1910). Daneben treten Mutationen (TP53 (Dighiero & Hamblin, 2008, S. 1020), NOTCH (Xu et al., 2015, S. 1609), SF3B1 (Zhang et al., 2017, S. 69916) uvm.) mit unterschiedlicher Häufigkeit auf.

Die Deletionen 11q und 17p sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Die Deletion des kurzen Arms von Chromosom 17 betrifft das Tumorsuppressorprotein TP53. TP53 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Doppelstrangbrüche der DNA aktiviert wird und Zellzyklusarrest und Apoptose vermitteln kann. Durch die Deletion des langen Arms von Chromosom 11 wird die Codierung des ATM Gen verändert, was ebenfalls in einem Funktionsverlust des TP53 resultiert. (Dighiero & Hamblin, 2008, S. 1020; Döhner et al., S. 1910; Seiffert et al., 2012, S. 1026)

Diese beiden Deletionen sprechen schlechter auf Immunochemotherapie an, profitieren jedoch von neuen zielgerichteten Substanzen wie Ibrutinib, Idealisib und Venetoclax (Mato et al., 2017, S. 1050).

Deletion 13q verbunden mit einem sonst unauffälligen Karyotyp ist mit einer besseren Prognose assoziiert als ein unauffälliger Karyotyp. Die prognostische Relevanz der Trisomie 12 ist Gegenstand der aktuellen Forschung und wird aktuell nicht einheitlich bewertet. (Seiffert et al., 2012, S. 1026)

CLL-Zellen rezirkulieren aus dem peripheren Blut in Proliferationszentren in Lymphknoten, Milz und Knochenmark. Stimuliert unter anderem durch CD31 auf Endothelzellen und CD154 auf aktivierten T-Zellen werden Moleküle wie CD38 und auch teilweise ZAP-70 hochreguliert,

der Zellzyklus aktiviert und prosurvival Signale und Proteine synthetisiert. CLL-Zellen sezernieren Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α u.a.), welche ebenfalls zur Proliferation der Zellen beitragen. „TNF α wird als mutmaßlich autokriner Wachstumsfaktor vermutet“ (Schmoll et al., 2006, S. 2847). Nach Reaktivierung innerhalb der Proliferationszentren, arretieren die Zellen im peripheren Blut in der G0/G1 Phase und sind mitotisch inaktiv. Nach erneuter Rezirkulation in Proliferationszentren können sie ihre Proliferationsfähigkeit wieder aktivieren. Somit ist die CLL ein Prozess aus Akkumulation und spezifischer Proliferation der malignen Klone. (Dighiero & Hamblin, 2008, S. 1021)

1.2. Klinik

Charakteristisch für die CLL ist ihre extreme klinische Variabilität, woraus sich auch sehr unterschiedliche Therapieansätze ableiten. Bei vielen Patienten stagniert der Krankheitsverlauf für Jahre, andere Verläufe sind von einer raschen Progredienz gekennzeichnet, die unmittelbar therapiert werden muss. 40-60% der Patienten weisen keine körperlichen Beschwerden auf und die Diagnose wird als Zufallsbefund gestellt. Die Erkrankung beginnt schleichend, im Vordergrund stehen indolente Lymphknotenschwellungen vor allem zervikal und supraklavikulär, Leber- und Milzvergrößerungen sowie eine Leukozytose. Symptomatische Patienten klagen über eine generelle Leistungsminderung und B-Symptomatik (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust). (Berger & Mertelsmann, 2017, S. 705)

Um die Diagnose CLL stellen zu können, muss im Blutbild eine dauerhafte monoklonale Lymphozytose, hauptsächlich durch Vermehrung phänotypisch reifer Lymphozyten, von $> 5000/\mu\text{l}$ nachgewiesen werden. Im Blutaussstrich finden sich kleine Lymphozyten mit unreifen bzw. atypischen Zellkernen, außerdem sind Zelltrümmerreste, sog. Gumprecht'sche Kernschatten erkennbar. In der immunphänotypischen Analyse zeigen die peripheren Zellen regelhaft das gleichzeitige Auftreten der Oberflächenmoleküle CD5, CD23, CD19 und CD20, sowie eine κ - oder λ -Leichtkettenrestriktion, womit die Monoklonalität der Zellen nachgewiesen wird. (Berger & Mertelsmann, 2017, S. 703; Wendtner et al., 2019, S. 10)

CLL-Patienten entwickeln im weiteren Krankheitsverlauf häufig eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber bakteriellen und viralen Infekten, da sie durch die zunehmende Verdrängung gesunder B-Zellen durch die malignen funktionslosen Klone keine effektive Antikörperantwort gegenüber eindringenden Pathogenen geben können. Die Anfälligkeit besteht vor allem für

„Pneumonien (Streptokokkus pneumoniae, Hämophilus influenzae, Pneumocystis jiroveci, CMV), Mykosen (Candida, Aspergillus), Herpes Zoster (VZV), Herpes Simplex (HSV)...“ (Berger & Mertelsmann, 2017, S. 705). 75% der Patienten entwickeln eine schwere Hypogammaglobulinämie (Schmoll et al., 2006, S. 2847). Durch das starke Überangebot von CD40 positiven CLL-Zellen im peripheren Blut kommt es auf den T-Zellen zur Herabregulation von CD40L, was das Immundefektsyndrom weiter verschlechtert (Cantwell et al., 1997, S. 984).

Bei massiver Zunahme der Knochenmarksinfiltration durch CLL-Zellen kommt es zur hämatopoetischen Knochenmarkinsuffizienz mit Thrombozytopenie. Haupttodesursachen bei unbehandelten CLL-Patienten sind systemische Infektionen und Blutungen. (Schmoll et al., 2006, S. 2856)

Weitere Komplikationen sind Autoimmunzytopenien, in 11% der Fälle eine autoimmun-hämolytische Anämie (Diehl & Ketchum, 1998, S. 80), häufig bedingt durch Wärmeantikörper vom IgG Typ (Schmoll et al., 2006, S. 2856), sowie Autoimmunthrombopenie in 2% der Fälle (Berger & Mertelsmann, 2017, S. 706). Die CLL kann sich im Rahmen einer Richtertransformation bei 3-10% zu einem hochaggressiven Non-Hodgkin-Lymphom (DLBCL > 95%) entwickeln, aber auch in ein Hodgkin Lymphom, Plasmozytom oder eine akute lymphoblastische Leukämie (Berger & Mertelsmann, 2017, S. 706). Allgemein zeigen CLL Patienten ein erhöhtes Risiko, an einem Zweittumor zu erkranken. Die häufigsten Zweittumorerkrankungen sind Bronchialkarzinome, Hirntumore und maligne Melanome (Schmoll et al., 2006, S. 2856).

Die Stadieneinteilung der CLL erfolgt klinisch nach Rai und Binet, welche eine Abschätzung der Prognose der Patienten erlaubt, sowie die Grundlage der individuellen Therapieplanung darstellt. Die Einteilung basiert auf der körperlichen Untersuchung und der Blutbildanalyse. (Wendtner et al., 2019, S. 11)

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach Binet (Binet et al., 1981, S. 198)

Stadium	Definition	Medianes Überleben
A	Hämoglobin $\geq 10\text{g/dl}$ Thrombozyten $\geq 100.000/\mu\text{l}$ ≤ 3 betroffene Regionen (LK, Leber, Milz)	≥ 10 Jahre
B	Hämoglobin $\geq 10\text{g/dl}$ Thrombozyten $\geq 100.000/\mu\text{l}$ ≥ 3 betroffene Regionen (LK, Leber, Milz)	7 Jahre
C	Hämoglobin $< 10\text{g/dl}$ Thrombozyten $< 100.000/\mu\text{l}$	2 Jahre

Tabelle 2: Stadieneinteilung nach Rai (Rai et al., 1975, S. 219)

	Definition	Medianes Überleben
0	Lymphozytose > 5000/ μ l Knochenmarksinfiltration > 30%	> 12,5 Jahre
I	Lymphozytose und Lymphadenopathie	8,5 Jahre
II	Lymphozytose und Hepatomegalie und/oder Splenomegalie	6 Jahre
III	Lymphozytose mit Anämie (Hb <11g/dl)	1,5 Jahre
IV	Lymphozytose mit Thrombozytopenie	1,5 Jahre

1.3. Therapie

Obwohl die CLL die häufigste Leukämieform der westlichen Welt ist, gibt es bis heute in der Regel keinen heilenden Therapieansatz. Einzig die allogene Stammzelltransplantation kann bei ausgewählten Patienten eine Kurration erreichen. Nach den IWCLL Kriterien stellt das Stadium III-IV nach Rai bzw. Stadium C nach Binet eine absolute Therapieindikation dar. Des Weiteren therapiepflichtig sind, entsprechend der Leitlinie der DGHO, frühere Stadien, sofern folgende Kriterien erfüllt sind:

- Auftreten oder Verschlechterung einer Anämie oder Thrombozytopenie
- progrediente oder symptomatische Splenomegalie
- progrediente oder symptomatische Lymphadenopathie
- Lymphozytenverdopplungszeit von weniger als 6 Monaten oder 50 % Anstieg innerhalb der letzten 2 Monate
- medikamentös refraktäre Autoimmunzytopenie
- ungewollter Gewichtsverlust >10% des Körpergewichts in 6 Monaten
- Fieber unklarer Ursache für mehr als 2 Wochen
- schwerwiegende Fatigue
- Nachtschweiß über einen Monat ohne Nachweis einer Infektion

(Wendtner et al., 2019, S. 13)

Trifft keines dieser Kriterien zu, spricht man von der langsam progredienten, sog. „Smoldering CLL“ und verfährt nach dem Prinzip „watch and wait“ (Montserrat et al., 1991, S. 184).

Das individuelle Therapievorgehen richtet sich nach dem Allgemeinzustand und Alter des Patienten, relevanten Komorbiditäten, ermittelt durch den CIRS Score, am zyto-/molekulargenetischen Status, wobei hier im Besonderen neben dem Nachweis eines komplexen Karyotyps die Deletion 17p- und/oder die TP53 Mutation sowie die IGHV-Mutation die Veränderungen darstellen, die die Therapieentscheidung beeinflussen. (Wendtner et al., 2019, S. 13-17)

Die nachfolgende Tabelle gibt, ohne Anspruch auf Vollständigkeit, einen Überblick über die möglichen Erstlinientherapien der CLL, die möglichst in klinischen Studien durchgeführt werden sollte.

Tabelle 3: Erstlinientherapie der CLL (Wendtner et al., 2019, S. 13-17)

Klinik	Allgemeinzustand	Mutation	Alter	Therapie
Asymptomatisch	alle	alle	alle	Watch and Wait
Symptomatisch	Fit (go go)	Ohne del 17p13, TP53, IGHV- Mutation	< 65 Jahre	- Ibrutinib - Fludarabin- Cyclophosphamid- Rituximab
		Ohne del 17p13, TP53 Mutation, mit IGHV- Mutation		- Ibrutinib - Fludarabin- Cyclophosphamid- Rituximab
		Ohne del 17p13, TP53, IGHV- Mutation	> 65 Jahre	- Ibrutinib - Rituximab- Bendamustin
		Ohne del 17p13, TP53 Mutation, mit IGHV- Mutation		- Ibrutinib - Rituximab- Bendamustin
		Mit del 17p13, TP53 Mutation	alle	- Ibrutinib
Unfit (slow go)	Ohne del 17p13, TP53, IGHV- Mutation	alle	- Ibrutinib - Chlorambucil/ Obinutuzumab - Bendamustin/ Rituximab	

	Ohne del 17p13, TP53 Mutation, mit IGHV- Mutation		- Ibrutinib - Chlorambucil/ Obinutuzumab - Bendamustin/ Rituximab
	Mit del 17p13, TP53 Mutation		- Ibrutinib
Gebrechlich (slow go)	alle	alle	- Best supportiv care

Tabelle 4: Rezidivtherapie der CLL (Wendtner et al., 2019, S. 17-20)

Allgemein- zustand	Mutation	Vortherapie	Rezidiv- form	Therapie
fit (go go), unfit (low go)	ohne del 17p13, TP53 Mutation	nach Ibrutinib	alle	- Venetoclax-Rituximab - Nach Remission: - Allogene Stammzelltherapie - Erhaltungstherapie
		ohne Ibrutinib	Progressive Erkrankung, Frührezidiv	- Ibrutinib - Venetoclax-Rituximab - Nach Remission: - Allogene Stammzelltherapie - Erhaltungstherapie - Stabile/Progressive Erkrankung - Drittlinientherapie
			Spätrezidiv	- Wiederholung Primärtherapie - Ibrutinib - Venetoclax-Rituximab - Stabile/Progressive Erkrankung - Drittlinientherapie
	Mit del 17p13, TP53 Mutation			- Ibrutinib - Venetoclax-Rituximab - Nach Remission: - Allogene Stammzelltherapie

	- Erhaltungstherapie - Stabile/Progressive Erkrankung - Drittlinientherapie
Gebrechlich (no go)	- Best supportive care

Die einzige kurative Therapiemöglichkeit stellt die allogene Stammzelltransplantation dar. Sinnvoll ist diese bei Patienten in gutem körperlichen Zustand mit Nachweis einer Richter-Transformation oder therapierefraktären CLL (Wendtner et al., 2019, S. 20). Die Indikation zur allogenen Transplantation wird aufgrund der neuen zielgerichteten Therapeutika zunehmend zurückhaltend gestellt. Auch hat im Rezidivfall aufgrund der aktuellen Studiendaten eine zielgerichtete Kombinationstherapie die konventionelle Immunchemotherapie abgelöst, wie die neusten Daten der Murano-Studie anhand der Kombinationstherapie aus Venetoclax und Rituximab belegen (Kater et al., 2018, S. 8).

Als supportive Therapie versteht man die systemische Behandlung mit Antibiotika bzw. Antimykotika bei Infekten bzw. Gabe von Immunglobulinen bei Hypogammaglobulinämie. Eine mögliche chirurgische Maßnahme stellt die Splenektomie dar, ausschließlich indiziert bei nicht zu kontrollierender Autoimmunhämolytischer Anämie, massiver Hypersplenie und wiederkehrenden Milzinfarkten. Eine Strahlentherapie findet in der Regel im Rahmen einer lokalen Bestrahlung von klinisch auffälligen, großen Lymphomen bzw. Infiltraten Anwendung. (Schmoll et al., 2006, S. 2857; Wendtner et al., 2019, S. 21)

1.4. Programmierter Zelltod

Programmierter Zelltod spielt eine zentrale Rolle in der physiologischen Differenzierung des Organismus, Homöostase, Entwicklung von Immuntoleranz sowie der Kontrolle hyperproliferativer Erkrankungen. Fehlregulationen können zu verschiedenen Erkrankungen führen wie Neurodegeneration und malignen Neoplasien. (Fuchs & Steller, 2011, S. 742-744; Rassow, 2012, S. 506)

Lange Zeit wurde programmierter Zelltod mit Apoptose gleichgesetzt. Neuere Erkenntnisse belegen jedoch das Vorhandensein alternativer Mechanismen des programmierten Zelltodes (u.a. Ferroptose, Pyroptose oder Nekroptose). Bei der Ferroptose wird durch das RAS-selektive Onkogen Erastin und Glutamat die Zystinaufnahme durch den Zystin/Glutamat-Antiporter inhibiert und somit, abhängig von intrazellulärem Eisen, oxidativer Zelltod ausgelöst, wohingegen ein potentieller Inhibitor der Ferroptose in Tumorzellen Ferrostatin-1 ist (Dixon et al., 2012, S. 1060; Jiang et al., 2015, S. 61). Die Pyroptose wird getriggert durch verschiedene pathogene Stimuli, wie Tumore, Herzinfarkt oder mikrobielle Infektionen beispielsweise Salmonellen oder Legionellen; letztlich wird Caspase-1 abhängig der Zelltod ausgelöst (Bergsbaken et al., 2009, S. 99).

Nekroptose ist eine regulierte Form der Nekrose. Die Nekrose wurde lange Zeit dem programmierten Zelltod gegenübergestellt. Durch irreversiblen Schaden von außen, wie Hitze oder Ischämie, wird eine Entzündungsreaktion in Gang gesetzt, die durch erhöhte Plasmamembranpermeabilität und daraus resultierender Zellschwellung zum Untergang der Zelle führt. Daher wurde Nekrose lange Zeit als passiver, nicht-regulierter Vorgang angesehen. Studien zeigten allerdings, dass Nekroptose, eine Form des regulierten Zelltodes darstellt. Liganden können über Aktivierung der RIP1-Kinase Nekroptose einleiten. Über das Protein Nekrostatin wird die RIP-Kinase inhibiert und somit das Überleben der Zelle eingeleitet (Zhou & Yuan, 2014, S. 15). (Rassow, 2012, S. 506)

Das Wort Apoptose stammt aus dem Griechischen und beschreibt die vom Baum fallenden Blätter im Herbst. Zellen lösen auf Grund irreparabler Schäden oder externer Stimuli eine streng geordnete Abfolge biochemischer Vorgänge aus, die letztlich zum Tod der Zelle führen. An sich ist die Apoptose, der bis zum heutigen Tag am Umfassendsten aufgeklärte Mechanismus des programmierten Zelltodes, ein physiologischer Vorgang, bei dem alte bzw. funktionsgestörte Zellen eliminiert werden. Ferner spielt die Apoptose eine Rolle in der Ontogenese. (Rassow, 2012, S. 506-507; Wong, 2011, S. 30)

Zytomorphologisch schrumpft die apoptotische Zelle, ändert ihre Form und verliert dadurch Kontakt zu den Nachbarzellen. Das Chromatin kondensiert, Endonukleasen schneiden die DNA und es kommt zur Fragmentierung der Zelle in Membrankörper, den sog. Apoptosekörpern, die anschließend durch das phagozytierende System eliminiert werden. Weiterhin kommt es zu Veränderungen der Plasmamembran, wie der Umlagerung von Phosphatidylserin, was die Grundlage des Annexin-V-Assays darstellt (Vgl. 2.2.4.1). (Rassow, 2012, S. 506; Wong, 2011, S. 31)

Im Zentrum des Apoptosevorganges stehen Caspasen, die zugleich als Initiatoren, Caspase 2, -8, -9, -10, und Effektoren, Caspase 3, -6, -7, agieren. Sie liegen zunächst als Proenzyme vor, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Der Begriff Caspase bedeutet Cysteinyll-Aspartate Specific Protease; es handelt sich also um cysteinhaltige Proteasen, die aspartatspezifisch spalten und somit zelluläre Proteine degradieren. (Rassow, 2012, S. 507)

Apoptose kann über mehrere Mechanismen ausgelöst werden. Am besten erforscht sind der extrinsische, z.B. über den FAS FADD Pathway, und der intrinsische, mitochondriale Weg. (Rassow, 2012, S. 508-509; Wong, 2011, S. 32)

Die extrinsische Aktivierung beginnt mit der Bindung eines Liganden an den entsprechenden Rezeptor. Die bekanntesten Vertreter der Rezeptoren sind der TNF Rezeptor Typ 2, sog. TNFR2, und der Fas-Rezeptor, mit ihren jeweiligen Liganden TNF und FasL. Diese Rezeptoren haben eine intrazelluläre Domäne, die Adapterproteine rekrutiert, beim TNF Rezeptor die assoziierte Domäne TRADD und die Fas-assoziierte Domäne FADD sowie die Cysteinprotease Caspase 8. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor bewirkt somit die Formation des Ligand-Rezeptor-Komplexes inklusive Bindung eines Adapterproteins. Der Ligand-Rezeptor-Adapter-Protein Komplex wird als Death-Inducing Signalling Complex (DISC) bezeichnet und aktiviert Procaspase 8 zu Caspase 8. Caspase 8 aktiviert zum einen Procaspase 3, welche die gemeinsame Endstrecke von ex- und intrinsischem Weg einleitet. Zum anderen veranlasst es die Spaltung von Bid zu cBid und konsekutiv den Einbau von tBid in die Mitochondrienmembran, was nach Aktivierung und Oligomerisierung von Bax, Bak oder ggf. auch Bok zur Ausschüttung von Cytochrom C führt. (Wong, 2011, S. 32)

Die intrinsische Aktivierung erfolgt durch interne Stimuli wie irreparable genetische Schäden, Hypoxie, oxidativer Stress etc. Unabhängig von den Triggern endet die Kaskade in einer Erhöhung der mitochondrialen Permeabilität und Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium ins Zytoplasma. Gehemmt werden kann die intrinsische Aktivierung durch Überlebenssignale von außen. Die Permeabilität der Mitochondrien wird normalerweise von einer Proteingruppe, der sogenannten Bcl-2 Familie, kontrolliert. Die Bcl-2-Familien-Mitglieder sind für die Permeabilität der Membran verantwortlich, entweder in Form von Ionenkanälen oder durch Poren. Basierend auf ihrer Funktion und der Bcl-2-Homologie (BH) Domäne kann man die Mitglieder in verschiedene Gruppen einteilen: Die antiapoptotischen Proteine, wie Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, besitzen alle 4 BH Domänen. Die einzige Ausnahme dieser Gruppe ist das Protein Mcl-1, welches nur drei BH-Domänen aufweist (Strasser, 2005, S. 192). Die Aufgabe der antiapoptotischen Proteine besteht primär in der Hemmung der

proapoptotischen Proteine durch die Insertion der BH-3-Domäne in einer präformierte Tasche. Zusätzlich sind sie dazu in der Lage, Caspasen direkt zu regulieren (Packham & Stevenson, 2005, S. 443). Weiter lassen sich die proapoptotischen Proteine unterteilen: in Bax-ähnliche Proteine wie Bax und Bak und die sog. BH-3 only Proteine, die nur die BH-3 Domäne besitzen, wie Bid, Bad, Bim, Puma, Noxa und Bik, deren Funktion primär in der Bindung von antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen (Bad, Noxa, Puma) und der Aktivierung von Bax bzw. Bak (Bid und Bim). (Labi et al., 2006, S. 1325-1326; Strasser, 2005, S. 192-193)

Zudem zählt Xiap zu den antiapoptotischen Proteinen. Xiap hemmt Caspasen direkt enzymatisch (Holcik et al., 2001, S. 253). Es vermittelt die Ubiquitylierung von Smac, Diablo und Caspase 9, was letztlich zu deren Abbau durch das Proteasom führt (Morizane et al., 2005, S. 131).

Die Gruppe der anti- und proapoptotischen Bcl-2 Familienproteine befinden sich normalerweise im Gleichgewicht (Equilibrium) und formen überwiegend Heterodimere und Homodimere, was es ihnen jeweils ermöglicht, den gegensätzlichen Typ zu sequestrieren und somit die entsprechenden Komponenten equilibrial auszugleichen. So bindet zum Beispiel Bcl-2 Bax in der mitochondrialen Membran. Kommt es zu einer Verschiebung des Equilibriums, z.B. durch vermehrte Expression von Bax und Bak durch verminderte Anwesenheit von Bcl-2 oder durch einen Anstieg der Konzentration von Bad, Bid oder Bim, stören diese Verschiebungen die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch Signalproteine ins Zytoplasma freigesetzt werden wie Cytochrom C, Diablo, Smac uvm. Vor allem die Akkumulation von Cytochrom C im Zytoplasma führt zur Bildung des Apoptosoms, welches aus Cytochrom C, (d)ATP, Apaf-1 und Caspase 9 gebildet wird und selbst wiederum Caspase 3 aktiviert. Smac und Diablo hingegen wirken durch Bindung von IAP. (Wong, 2011, S. 32)

Beide Mechanismen führen schließlich zur vermehrten Aktivierung von Caspasen: extrinsisch wird die Konzentration von Caspase 8 erhöht, intrinsisch von Caspase 9. Beide aktivieren Caspase 3, welche dann eine Kaskade der Effektorcaspasen einleitet, die letztendlich in der DNA Fragmentierung endet. (Rassow, 2012, S. 508-509)

1.5. Apoptose bei CLL

Apoptose ist ein zentrales Element physiologischer Körpervorgänge. Allerdings kann eine gestörte Apoptose zur pathologisch verlängerten Lebenszeit von Zellen führen und somit eine

wichtige Rolle in der Entwicklung neoplastischer Erkrankungen spielen. Dies beschrieben Hanahan und Weinberg et al. in ihren Grundprinzipien der Tumorgenese, den sog. „Hallmarks of Cancer“ (Hanahan & Weinberg, 2011, S. 57). De facto sind Tumorzellen Zellen, die eigentlich sterben sollten, aber entweder kein entsprechendes Signal erhalten oder durch aberrante Expression von prosurvival Proteinen – zwar für programmierten Zelltod geprimed sind (z.B. aktiviertes Bax/tBid in der mitochondrialen Membran), das Programm jedoch nicht durchlaufen können (z.B. Bindung und Inhibition von Bax und tBid durch Bcl-2).

Wie in 1.2 aufgeführt, sind CLL-Zellen im peripheren Blut in der G0/G1-Phase des Zellzyklus arretiert. Die Erkrankung wurde deshalb lange Zeit als statische Erkrankung beschrieben. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass CLL-Zellen in Proliferationszentren rezirkulieren, und dort ihre proliferative Aktivität wieder aufnehmen durch die Interaktionen mit dem Mikromileu. Dem Zusammenspiel aus gestörter Funktion des programmierten Zelltodes und der proliferativen Aktivität wird eine zentrale Schlüsselrolle als „Hallmark“ der CLL zugeschrieben. (Dighiero & Hamblin, 2008, S. 1021)

Das Gleichgewicht der pro- und antiapoptischen Proteine ist dabei zugunsten der antiapoptischen Partner verschoben. Die relative Verteilung der pro- und antiapoptischen Proteine (Equilibrium) spielt hierbei eine größere Rolle als deren absolute Konzentrationen. Die überwiegende Mehrheit der CLL-Patienten zeigt eine Überexpression von Bcl-2. Darüber hinaus kann regelmäßig eine Hypomethylierung des Bcl-2-Gens nachgewiesen werden. Die Deletion des langen Armes von Chromosom 13 (13q14.3), eine der häufigsten zytogenetischen Aberrationen bei CLL, führt zu einem Verlust der microRNA miR-15a und miR-16-1, deren Aufgabe in der Kontrolle der Funktion von Bcl-2 durch posttranskriptionelle Modulation besteht (Dighiero & Hamblin, 2008, S. 1020). Analysen zeigen, dass neben Veränderungen der antiapoptischen Bcl-2 Proteine auch Veränderungen für proapoptische Proteine wie z.B. Bax nachgewiesen werden können (Vucicevic et al., 2016, S. 152-153). Hierbei kann es sowohl zu einer verstärkten als auch zu einer verringerten Expression kommen. Hier sei erneut auf die Heterogenität der CLL hingewiesen. Allerdings kommt es bei nahezu allen CLL-Patienten zur Erhöhung der Bcl-2/Bax-Ratio im Vergleich zu gesunden Probanden (Vucicevic et al., 2016, S. 153-154). Damit wird die bereits erwähnte These unterstützt, dass die Verschiebung des Equilibriums zwischen pro- und antiapoptischen Proteinen ein entscheidender Punkt in der Fehlregulation der Apoptose ist.

Die erhöhte Konzentration von Bcl-2 korreliert direkt mit einer schlechteren Überlebensrate (Vucicevic et al., 2016, S. 151). Der Einsatz neuer zielgerichteter Therapeutika wie Venetoclax,

das als BH3 Mimetikum gezielt Bcl-2 inhibiert und in der Klinik bereits sehr gute Ergebnisse zeigt ist unter diesen Aspekten sehr interessant (Stilgenbauer et al., 2016, S. 768).

Seit langer Zeit steht ein weiteres antiapoptisches Protein der Bcl-2-Familie, Mcl-1, im Zentrum der Forschung. Die erhöhte Mcl-1 Expression scheint mit dem Stadium der Erkrankung, Lymphozytenverdopplungszeit, CD38 und ZAP-70 Expression, sowie dem fehlendem Ansprechen auf Fludarabin assoziiert zu sein. (Pepper et al., 2008, S. 3815)

Somit werden verschiedene Fehlregulationen im programmierten Zelltod bei CLL beschrieben. Letztendlich resultieren alle in einer gestörten Funktion des programmierten Zelltodes.

1.6. CDKs

Nicht nur die Fehlregulationen im Ablauf des programmierten Zelltodes sondern auch der Verlust der Zellzykluskontrolle ist eine charakteristische Eigenschaft für Tumorzellen (Hanahan & Weinberg). Der Zellzyklus wird normalerweise durch ein Kontrollsystem an sog. Checkpoints streng überwacht, wozu die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) gehören. Dies sind Serin/Threonin-Proteinkinasen, deren Aktivität bestimmt wird durch die Bindung phasenspezifisch exprimierter Proteine, den Zyklinen, Phosphorylierung (Aktivierung) bzw. Dephosphorylierung (Inhibition) sowie der Bindung von sog. CDK-Inhibitorproteinen. (Rassow, 2012, S. 507)

CDK1, CDK2, CDK4 und CDK6 spielen eine wichtige Rolle für die Zellteilung und die Kontrolle an den entsprechenden Checkpoints im Zellzyklus, während hingegen CDK7, CDK8 und CDK9 für Genamplifikationen, u.a. der RNA-Polymerase II, verantwortlich sind. Die Überaktivierung von CDKs resultiert im Versagen der Zellzykluskontrolle, was direkt mit der molekularen Pathologie von Tumoren in Verbindung steht. Im Gegenzug zeigt die Inaktivierung von CDKs eine Erneuerung der Checkpointkontrolle und dem Einleiten vom programmierten Zelltod. Somit stellt die Inhibition der CDK-Aktivität durch z.B. „small molecules“ eine vielversprechende Option in der Tumorthherapie dar. (Ayaz et al., 2016, S. 1710)

Seit ihrer Entdeckung sind CDKs eine Zielgruppe für eine neue Generation von Tumormedikamenten. In klinischen Studien werden bereits verschiedenen CDK-Inhibitoren getestet, jedoch ist der therapeutische Effekt bisher eher moderat. Beispielsweise ist der CDK

Inhibitor ZK 304509 eine viel-versprechende Option in Tumor Xenograft Modellen, versagte allerdings in klinischen Studien bereits in Phase 1 (Siemeister et al., 2006, S. 2272).

2015 ist der erste CDK4/CDK6-Inhibitor in den USA auf den Markt gebracht worden. Palbociclib ist der CDK-Inhibitor, der als Erstlinientherapie in Kombination mit dem Aromataseinhibitor Letrozol zur Behandlung von postmenopausalen Frauen mit Östrogen-Rezeptor-positiven, Her2-negativen, metastasierten Brustkrebs zugelassen ist. (Bowles & Clarke, 2015, S. 577). Bezüglich nicht-solider Tumore gibt es bis dato jedoch noch keinen Durchbruch in der klinischen CDK-Inhibitor Anwendung.

1.7. Bay 1000394

Bay 1000394, (R)-S-Cyclopropyl-S-(4-{[4-{{(1R,2R)-2-hydroxy-1-methylpropyl}oxy}-5-(trifluoro methyl)pyrimidin-2-yl]amino}phenyl)sulfoximide, auch als Roniciclib bezeichnet, ist ein oral bioverfügbarer Pan-CDK-Inhibitor und inaktiviert die Zellzykluskinasen CDK1/Cyclin B, CDK2/Cyclin E, CDK4/Cyclin D und der Transkriptionskinasen CDK7/Cyclin H/MAT1 und CDK9/Cyclin T1 bereits bei IC₅₀ Konzentrationen in nanomolaren Bereichen (Siemeister et al., 2006, S. 2266). Studien zeigen die Inhibition von CDKs, und somit Verringerung des Tumorwachstums, durch Bay 1000394 in vivo Mausmodellen für, gegenüber gängigen Chemotherapeutika resistenten, Mamma- und Ovarial-Ca sowie in Zelllinienmodellen und Xenograft-Tumortransplanten für SCLC und NSCLC (Siemeister et al., 2012, S. 2269-2271). Roniciclib wurde in klinischen Phase Ib/II Studie für NSCLC getestet (Cho et al., 2018, S. 14). Da bisher alle getesteten Zelllinien hochsensibel auf den pan-Caspase Inhibitor Bay 1000394 angesprochen haben, stellt Roniciclib ein potentielles Medikament für nicht-solide Tumoren dar, wie z.B. auch für die bisher nicht kurativ therapierbare CLL darstellen.

1.8. Aufgabenstellung und Vorgehensweise

Im Zentrum der Untersuchungen steht die Frage nach der Wirkung des pan-CDK-Inhibitors Bay 1000394 auf Chronisch Lymphatische Leukämiezellen. Besonderes Interesse liegt auf den Effekten auf Apoptoseinduktion. Aber auch die Auswirkungen auf proliferativ aktive CLL-Zellen (stimuliert im Modell mit CPG-Oligonukleotiden) werden untersucht.

Mit Hilfe eines Zellmodells werden Proteinexpression und klassische Apoptose untersucht. Dazu werden diverse durchflusszytometrische Methoden verwendet wie Annexin-V-Assay zur Apoptosedetektion, DiOC6-Staining zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ und Tunel-Assay zur Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen. Die Proteinverteilung wird mittels Western Blot bestimmt.

Im ersten Teil der Versuche werden ruhende CLL-Zellen untersucht. Zum Vergleich wird die Wirkung an B-Zellen gesunder Probanden untersucht. Im zweiten Teil werden Versuche an proliferativ aktiven Zellen getestet: Dafür werden die Zellen mit dem Oligonukleotid DSP30 und Interleukin 2 stimuliert. Um in vivo Verhältnisse zu simulieren, wird später das bestehende Zellmodell um Stromazellen erweitert.

Ausgewertet werden die Versuche bzgl. der Fragestellungen: Mechanismus der Apoptoseauslösung und unterschiedliches Ansprechen der Patienten hinsichtlich des ZAP-70 Status in Anlehnung an neue Erkenntnisse, die Mitglieder der Arbeitsgruppe zeigten (Wagner et al., 2016, S. 436).

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien und Additiva

Acryl/Bis 1.69 Rotiphorese Gel30	Roth (Karlsruhe, D)
Albumin Fraction V	Roth (Karlsruhe, D)
Aqua	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
Annexin-FITC	Caltag Laboratories/Invitrogen (Carlsbad, USA)
Annexin-V-Buffer 10x	BD Pharmingen (San Diego, USA)
Antibiotic-Antimycotic (10.000 Units/ ml Penicillin-G-Na+, 10 ug/ml - Streptomycin-Sulfat, 25 microg/ml -	
Amphotericin B	GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)
Apo-Direct-Kit	
Reaction Buffer	
TdT Enzyme	
FITC-dUTP	
Wash Buffer	
Rinse Buffer	
PI/RNase-Lösung	BD Pharmingen (San Diego, USA)
APS	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Bay 1000394	Bayer Health Care (Leverkusen, D)
Benzamidine 5mM x 100x	Fluka Chemika (Buchs, CH)

BD™ FACS Clean	Becton, Dickinson and Company, BD Bioscience (San Jose, USA)
BSA	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Bio RAD DC™ Protein Assay Reagent A	Bio-Rad Laboratories Inc. (München, D)
Bio RAD DC™ Protein Assay Reagent B	Bio-Rad Laboratories Inc. (München, D)
Bio RAD DC™ Protein Assay Reagent S	Bio-Rad Laboratories Inc. (München, D)
Clenz Cleaning Agent	Beckman Coulter GmbH (Wiesbaden, D)
Demineralisiertes Wasser	Liquid Production GmbH (Flitnsbach, D)
DETACHaBeats CD19	
DiOC ₆ Stocklösung: 5,7 mg in 10 ml	
Ethanol (100%)	Dynal Biotech (Oslo, Norwegen)
Working Solution: Stocklösung	
1:100 mit PBS verdünnt	Molecular Probes (Eugene, USA)
DMSO	Serva (Heidelberg, D)
DTT	Fluka Chemika (Buchs, CH)
Dynabeads M450 CD2/14 CD19	Dynal Biotech (Oslo, Norwegen)
Essigsäure ROTIPURAN® 100 % p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
EDTA	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FCS	PAA (Pasching, A)
Ficoll: Biocoll Separation Solution(Dichte 1.077 g/ml)	Biochrom AG (Berlin, D)
FITC Annexin V	BioLegend® (San Diego, USA)
Glycerol 100%	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Glycin	Roth (Karlsruhe, D)

Heparin-Natrium 25000	ratiopharm® (Ulm, D)
HEPES 1 M	GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)
L-Glutamin 200mM	GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)
Methanol	J.T. Baker (Deventer, Netherlands)
MEM Alpha Medium + GlutaMAX 1x	IBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)
MEM Nichtessentielle Aminosäure 0,7x	GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)
Mercaptoenol 100%	GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)
NaPyruvat 100mM	GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)
NaCl	Roth (Karlsruhe, D)
NaF 0,5M 10x	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
NaH ₂ PO ₄ pH 4,4	Merck (Darmstadt, D)
NaH ₂ PO ₄ x 7 H ₂ O pH 8,8	Merck (Darmstadt, D)
NaOH	Merck (Darmstadt, D)
NaN ₃	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
NaPyrophosphat 50mM pH 7,0 – 7,5 5x	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Orthovanadate 100 mM 100x	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
PBS	Biochrom (Berlin, D)
Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (1000 microg/ml)	GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)
PMSF 1 mM 100x	Roche (Mannheim, D)
Precision Plus ProteinDual Colors Standard	Bio-Rad-Laboratories (München, D)
Propidium-Jodid 25 mg	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
PFA	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

Protease-Inhibitor Tablette 1x	Roche (Mannheim, D)
Protein Assay Standard II (3mg/ml)	Bio-Rad Laboratories (München, D)
RPMI 1640 Medium	GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)
SDS	Fluka Chemika (Buchs, CH)
TEMED	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
TRIS 1 M	Roth (Karlsruhe, D)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe, D)
Tween	Fluka Chemika (Buchs, CH)
Tryptan Blue Stain 0,4%	GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)
Z-VAD-FMK	BD Pharmingen™ (San Diego, USA)

2.1.2. Zellproben

Ein entsprechendes Ethikvotum zur Entnahme der Proben und Durchführung der Untersuchungen liegt vor. Ethiknummer: 1894/07.

2.1.2.1. CLL-Proben

Die Patienten sind zum Zeitpunkt der Blutentnahme bzgl. der CLL alle unbehandelt unter „watch and wait“ im Stadium Binet A oder B, jedoch mit unterschiedlichem ZAP 70 Status. Sie sind zwischen 50 und 90 Jahren alt, männlich und weiblich. Die Probenauswahl erfolgt blind, ohne Berücksichtigung von Alter, Geschlecht oder Vorerkrankungen. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme haben die Patienten keine Anzeichen eines klinischen Infektes. Die Patienten werden über die Verwendung ihres Blutes zu Forschungszwecken ausführlich aufgeklärt und ihr Einverständnis wird vor der Probenentnahme schriftlich eingeholt. Ca. 50 ml venöses Blut wird peripher abgenommen.

2.1.2.2. B-Zell-Proben

Die Probanden befinden sich im Alter zwischen 20 und 30 Jahren. Die Patienten sind zum Zeitpunkt der Probeentnahme ohne Vorerkrankungen und ohne Infektzeichen. Nach Aufklärung und Einwilligung über die Verwendung ihres Blutes zu Forschungszwecken wird zwischen 200-300ml Blut peripher abgenommen.

2.1.3. Medien

CLL-Medium: 500 ml RPMI 1640 Medium
50 ml fetales Kälberserum (FCS)
30 ml Additiva: Aliquot aus 100 ml PenStrep,
100 ml Glutamin 200 nM,
100 ml HEPES 1M,
60 ml MEM nicht essentielle Aminosäure 0,7x,
70 µl Mercaptoethanol 50 mM,
100ml RPMI 1640 Medium

Stroma-Medium: 150 ml FCS
50 ml Pferdeserum
800 ml α -MEM mit Glutamax,
1ml PenStrep,
10µM β -Mercaptoethanol

2.1.4. Puffer

Blocking-Puffer: Milch (10%): 2g Milchpulver, 20ml PBS-Tween
BSA (5%): 1g BSA, 20ml PBS-Tween

Erythrolysepuffer-
EasyLyse (1x) der Firma DakoCytomation (Glostrup, Dänemark)

FACS-Puffer: PBS verdünnt mit Aqua dest. (1:10)+ 1% BSA

10 x Lauf Puffer:	288 g Glycin, 60g Tris, 20g Tris, 20g SDS, aufgefüllt mit Aqua dest. auf 2l
5 x Lyse Puffer:	10ml TRIS 1M pH 7,5 mit HCl hergestellt, 52 ml NaCl 2,5M, 10 ml 0,5M EDTA pH 8, 10 g (ca 12ml) Triton X-100 (5%), mit Aqua dest. aufgefüllt auf 200 ml
1 x Lyse Puffer:	2,0 ml 5X Lyse Puffer, 0,4 ml 25x Phosphat- Puffer pH 7,0 (bestehend aus NaH_2PO_4 pH 4,4; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ pH 8,8), 2,0 ml 5x Na-pyrophosphat 50 mM pH 7,0-7,5, 1,0 ml 10x NaF 0,5M, 0,1 ml 100x Benzamidine 5mM, 0,1 ml 100x PMSF 1mM, 0,1 ml 100x Orthovanadate 100 mM, 1x Protease Inhibitor (1 Tablette), mit 10 ml Aqua dest. aufgefüllt
200x Na-Azid:	2 g NaN_3 , 50 ml Aqua dest. (4% NaN_3)
Paraformaldehyd Lsg 1%	5g PFA, 400 ml Aqua dest., 50 ml PBS (10x), 1 Tropfen NaOH, pH 7,4 eingestellt mit Hcl
Protein-Loading 10%, Puffer	10ml 1M DTT, 5ml 1M TRIS pH 6,8 mit HCl eingestellt, 20 ml SDS 2,5 ml Bromphenolblau 1%, 10 ml Glycerol 100%
Sammelgelpuffer	6,05 g TRIS, 0,4 g SDS, auf 100 ml Aqua dest., pH-Einstellung HCl (4x) pH 6,8
Stripping-Puffer	100 ml Methanol (100%), 100 ml Essigsäure (100%), 800 ml Aqua dest. (Amido Black Destain)
Transfer-Puffer	3,5l Aqua dest., 1l Methanol, 0,5 l 10% Lauf-Puffer
Trenngelpuffer	91 g TRIS, 2g SDS, auf 500 ml Aqua dest., pH-Einstellung mit HCl (4x) pH 8,8
Wasch-Puffer	999 ml PBS (49,75 g PBS auf 5 l Aqua dest.), 1 ml Tween

2.1.5. Gele

Trenngel 9 %	6,8 ml Acryl/Bis 1.69 Rotiphorese Gel 30, 5,6 ml 4x Trenngelpuffer pH 8,8, 10,1 ml Aqua dest., 75 µl APS 10%, 15 µl TEMED
Trenngel 10 %	7,5 ml Acryl/Bis 1.69 Rotiphorese Gel 30, 5,6 ml 4x Trenngelpuffer pH 8,8, 9,4 ml Aqua dest., 75 µl APS 10%, 15 µl TEMED
Trenngel 12 %	9,0 ml Acryl/Bis 1.69 Rotiphorese Gel 30, 5,6 ml 4x Trenngelpuffer pH 8,8, 7,9 ml Aqua dest., 75 µl APS 10%, 15 µl TEMED
Trenngel 15 %	11,3 ml Acryl/Bis 1.69 Rotiphorese Gel 30, 5,6 ml 4x Trenngelpuffer pH 8,8, 5,6 ml Aqua dest., 75 µl APS 10%, 15 µl TEMED
Sammelgel	0,91 ml Acryl/Bis 1.69 Rotiphorese Gel 30, 1,75 ml Sammelgelpuffer pH 6,8, 4,3 ml Aqua dest., 0,035 µl APS 10%, 0,007 µl TEMED

2.1.6. Antikörper

Anti-Mouse-Antibody	GE Healthcare Limited (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)
Anti-Rabbit-Antibody	GE Healthcare Limited (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)
Bad Antibody	© 2008 Cell signaling Technology, Inc. (Massachusetts, USA)
Bak Polyclonal Rabbit Anti	BD Biosciences Pharmingen™ (San Diego, USA)
Bax Serum Rabbit Anti-Human	BD Biosciences Pharmingen™ (San Diego, USA)
Bcl-2 Antibody	BD Biosciences Pharmingen™ (San Diego, USA)
Bid Antibody (Human Specific)	© 2010 Cell signaling Technology, Inc. (Massachusetts, USA)
Bim Antibody	© 2010 Cell signaling Technology, Inc. (Massachusetts, USA)
Bim- Rabbit Antibody	BD Biosciences Pharmingen™ (San Diego, USA)

Caspase-3 (3G2) Mouse mAb	© 2010 Cell signaling Technology, Inc. (Massachusetts, USA)
Caspase-8 (1C12) Mouse mAb	© 2010 Cell signaling Technology, Inc. (Massachusetts, USA)
Caspase-9 Antibody	© 2011 Cell signaling Technology, Inc. (Massachusetts, USA)
Mcl-1 (S-19): sc-819	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, USA)
Phospho-Bad (Ser136) Antibody	© 2009 Cell signaling Technology, Inc. (Massachusetts, USA)

2.1.7. Geräte

Absaugpumpe	Schütt Labortechnik GmbH (Göttingen, D)
Durchflusszytometer Beckman Coulter EPICS XL	Beckman Coulter GmbH (Krefled, D)
Elektrophoresekammer	Biometra (Göttingen, D)
Gefrierfach -86°C VIP™SERIES	SANYO (München, D)
Glasplatten (14,7 x 14,3 mm)	Biometra (Göttingen, D)
Hypercasette™	Amersham Life Science (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)
Hyperfilm™ECL™	Amersham Bioscience (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)
Hyperprocessor	Amersham Life Science (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)
Inkubator NUNC	Nalge Nunc International (Rochster, USA)
Isoliergummis	Biometra (Göttingen, D)
Kämme	Biometra (Göttingen, D)
Kühleppendorffzentrifuge Mikro 22R	Hettich (Tuttlingen, D)
Kühlschrank 4 °C	Liebherr (Ochsenhausen, D)

Kühlschrank -20°C	Liebherr (Ochsenhausen, D)
Magnetic Particle Concetrator Dynal MPC®-6	Dynal, Biotech (Oslo, Norwegen)
Mikroskop-Axiovert 25	Zeiss (Jena, D)
Minishaker MS1	IKA-Werke GmbH & Co KG (Staufen, D)
Neubauer-Zählkammer	LO-Laboroptik GmbH (Friedrichsdorf, D)
Pipetboy	INTEGRA BIOSCIENCE (Fernwald, D)
Pipette 10 microl	Eppendorf (Hamburg, D)
Pipette 20 microl	Eppendorf (Hamburg, D)
Pipette 100 microl	Eppendorf (Hamburg, D)
Pipette 200 microl	Eppendorf (Hamburg, D)
Pipette 1000 microl	Eppendorf (Hamburg, D)
Schüttler WT 12	Biometra (Göttingen, D)
Software: Excel	
Power Point	
Word	
System II for EPICS Version 3.0	Beckman Coulter GmbH (Wiesbaden, G)
Sterilbank HERASafe	Heareus (Hanau, D)
Stickstofftank: K-Series	Taylor-Wharton Germany GmbH (Husum, D)
Stromquelle Power Pack P25 T	Biometra (Göttingen, D)
Super Signal® West Dura Stable Peroxide Buffer	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Super Signal® West Dura Luminol/Enhancer Solution	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Super Signal ® West Femto Stable Peroxide Buffer	Thermo Scientific (Rockford, USA)

Super Signal ® West Femto Luminol/Enhancer Solution	Thermo Scientific (Rockford, USA)
SuperSignal® West Pico Stable Peroxide Solution	Pierce Biotechnology (Bonn, D)
SuperSignal® West Pico Luminol/Enhancer Solution	Pierce Biotechnology (Bonn, D)
Thermomixer	Eppendorf (Hamburg, D)
Transferkammer	Biometra (Göttingen, D)
Universal Microplate Reader Software: kc junior	BioTek (Bad Friedrichshall, D)
Waagen	
Analysewaage (Modell Kern 700)	Kern & Sohn GmbH (Balingen Frommern, D)
Präzisionswaage (Model Kern PLJ)	Kern & Sohn GmbH (Balingen Frommern, D)
Wasserbad	GFL (Burgwedel, D)
Zentrifuge Megafuge	HERAEUS (Hanau, D)
Zähluhr	

2.1.8. Sonstige Materialien

BioMax MR Film	Kodax (Codex, F)
Eppendorf-Gefäß 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorft (Hamburg, D)
FACS-Röhrchen	Nunc GmbH & Co. KG (Wiesbaden, G)
Handschuhe	Softskin® BRAUN (Melsungen, D)
Gel Blotting Paper BG 005	Whatman GmbH (Dassel, D)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe, D)
Pipette 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Tissue Culture Flasks	Greiner (Frickenhausen, D)
Transfer Membran	Millipore Corporation (Bedford, USA)

Tubes 50 ml	Nunc GmbH & Co. KG (Wiesbaden, D)
Zellkulturflaschen 75 cm ² , 150 cm ²	TPP (Trasadingen, CH)
Zellkulturplatten 6 Well, 12 Well, 24 Well	TPP (Trasadingen, CH)

2.2. Methoden

2.2.1. Separationsverfahren

2.2.1.1. CLL-Zellen

Die heparinisierten Blutproben werden mit PBS 1:2 verdünnt. Daraus werden die lymphomononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) durch Dichtegradientenzentrifugation über einen Ficoll-Hypaque-Gradient in einer Dichte von 1.077g/ml selektiert. Die restlichen Erythrozyten werden durch einen EryLysepuffer entfernt. Die Separation der CLL-Zellen erfolgt über eine negative Isolation mittels Dynabeads®, magnetische Beads gekoppelt mit einem Antikörper: CD2 für T-Zellen und CD14 für Monozyten, nach Anweisungen des Herstellers (DynaL Biotech). Überprüft wird die Separation mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen sind zu > 98% reine CLL-Zellen.

2.2.1.2. B-Zellen

Die PBMC werden aus unverdünnten, heparinisierten Blutproben durch Dichtegradientenzentrifugation über einen Ficoll-Hypaque-Gradient in einer Dichte von 1.077g/ml gewonnen. Nach Entfernen der Erythrozyten mittels EryLysepuffer erfolgt die Separation der B-Zellen durch positive Isolation mittels Dynabeads CD19. Anschließend werden die Dynabeads durch Detachabeads CD19 entfernt. Überprüft wird die Separation mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen sind zu > 98% reine B-Zellen.

2.2.2. Trypanblau-Färbung

Um die Zellzahl für die Versuchsansätze zu bestimmen, werden die Zellen mit Trypanblau behandelt. Alle Zellen nehmen den Farbstoff zunächst auf, vitale Zellen können ihn aber, im Gegensatz zu avitalen Zellen, wieder ausschleußen. Unter dem Mikroskop erscheinen daher die lebenden Zellen weiß vor einem blauen Hintergrund an toten Zellen. Dafür werden die separierten Zellen zunächst in 15 ml CLL-Medium resuspendiert und auf 20 ml Ficoll gegeben. Anschließend werden sie 15 Minuten bei 2100 upm zentrifugiert, die Interphase mit den Zellen wird abgenommen und anschließend bei 1500 upm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und in 15 ml CLL-Medium resuspendiert. Daraus werden 10 µl entnommen und in 90 µl Trypanblau in einer 96 Well Platte gemischt. Daraus werden wieder 10 µl entnommen und in weiteren 90 µl Trypanblau gemischt. Somit ergibt sich eine 1:1000 Verdünnung wovon 10 µl dieser Zellsuspension in die Neubauer-Zählkammer gegeben und die weißen, vitalen Zellen gezählt werden. Die Gesamtzellzahl lässt sich dann wie folgt bestimmen:

$$N = n/2 \times D \times V \times \text{ml}^{-1}$$

N: Gesamtzellzahl, n: gezählt Zellen mindestens 2 Quadranten, D: Verdünnungsfaktor 1000, V= Volumen: 15000 ml. Aus der berechneten Gesamtzellzahl kann man die Zellen auf 1×10^6 Zellen/ml verteilen.

2.2.3. Kulturbedingungen

Die separierten Zellen werden in einem RPMI 1640 Medium, versehen mit fetalem Kälberserum (FCS), Penicillin (10.000 U/ml)/ Streptomycin (100µg/ml), HEPES 1M, L-Glutamin 200mM, MEM nicht essentielle Aminosäure 0,7x, Mercaptoethanol 50 mM NaPyruvat 100 mM bei 37°C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 100% kultiviert. Angesetzt werden die Zellen in einer Konzentration $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml Medium.

2.2.4. Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie (FACS) kann man einzelne Zellen multiparametrisch zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen analysieren. Dazu werden die Zellen einzeln hintereinander angesaugt und fließen durch das

Gerät. Dabei werden sie von einem Laser einer definierten Wellenlänge angestrahlt. Das daraus resultierende Streulicht wird vom FACS detektiert als A) Vorwärtsstreulicht abhängig von der Größe der Zelle, in Richtung des ursprünglichen Laserstrahls B) Seitwärtsstreulicht abhängig von der Granularität der Zelle, im 90° Winkel zum ursprünglichen Strahl. Zur Auswertung werden die Zellen in einer Graphik, dem sog. Dot-Plot aufgetragen: auf der X-Achse das Vorwärts- und auf der Y-Achse das Seitwärtsstreulicht.

Zusätzlich kann das FACS Fluoreszenzlicht messen. Man kann ein Merkmal einer Zelle mit einem passenden Antikörper, der gegen das Merkmal gerichtet ist, markieren. Dieser Antikörper ist selbst mit einem fluoreszierenden Molekül beladen und kann dadurch vom FACS detektiert werden. So lässt sich eine Vielzahl von Merkmalen der Zelle untersuchen. Die Fluoreszenzmessung wird ebenfalls in einer Dot-Plot Graphik aufgetragen.

2.2.4.1. Annexin-V-Staining

Durch Markierung der Zellen mittels Annexin V in Kombination mit Propidiumjodid kann der Vorgang der Apoptose detektiert werden. An der Innenseite einer lebenden Zelle findet sich Phosphatidylserin. Während der Apoptose wird Phosphatidylserin von der Innenseite auf die Außenseite transloziert. Annexin V bindet an das Phosphatidylserin an der Außenseite und anhand der Fluoreszenzmessung kann man dieses im FACS bestimmen. Beim Vorgang der Nekrose kann Annexin allerdings die Zellmembran passieren und an das Phosphatidylserin der Innenseite binden. Somit lässt sich mit alleiniger Annexin-V-Färbung nicht zwischen Apoptose und Nekrose unterscheiden. Daher werden die Zellen zusätzlich mit Propidiumiodid angefärbt. Das Propidiumiodid bindet nur an Zellen mit durchlässiger Membran, also an nekrotische Zellen. Die Fluoreszenzmessung trägt die Zellen entsprechend ihrer Annexin-V-Positivität (X-Achse) und PI-Positivität (Y-Achse) in der Dot-Plot-Graphik auf.

Der Ablauf der Annexin Messung ist für alle Versuchsansätze gleich. Nach Inkubation der Zellen in 24 Well Platten mit je 1×10^6 Zellen/ml CLL-Medium pro Well, Inkubationszeit und Koinkubation variieren je nach Versuch s. u., werden die Zellen in Facsscanner-Röhrchen überführt, 5 Minuten bei 1500 upm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend mit je 500 µl Annexin-Puffer, 3 µl Annexin FITC und 5 µl PI für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Zellen im Durchflusszytometer bestimmt, wobei jeweils 20.000 Counts gemessen werden.

Die Versuchsreihe beginnt mit einer Dosistitration. Pro Patient werden die Zellen mit dem Inhibitor Bay 1000394 in den Konzentration 0 nM, 0,5 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM und 1µM jeweils für 12 und 24 Stunden koinkubiert.

In einer Zeitkinetik werden die Zellen für jeweils 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden mit dem Inhibitor Bay 1000394 in den Konzentrationen 0 nM, 10 nM, 20 nM, 25 nM und 50 nM inkubiert.

Zusammen mit Bay 1000394 werden die Zellen mit dem Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK inkubiert. Entsprechend der Anleitung des Herstellers wird 1 mg Z-VAD-FMK in 214 µl DMSO gelöst und dadurch eine 10 nM Stock Lösung hergestellt. 30 Minuten vor Zugabe des Bay 1000394 werden die Proben mit 10 µl der Stocklösung Z-VAD-FMK angesetzt. Nach 30 Minuten werden jeweils zusätzlich zu einem reinen Z-VAD-FMK Ansatz Bay 1000394 in der Konzentration von 0 nM und 20 nM hinzugefügt. Zum Vergleich werden die Versuche auch ohne Zugabe von Z-VAD-FMK durchgeführt. Gemessen wird nach 12 und 24 Stunden. Somit gibt es pro Patient vier Ansätze: reines Medium, Medium mit Z-VAD-FMK, Bay 1000394 20 nM, Bay 1000394 20 nM mit Z-VAD-FMK.

Zur Untersuchung der Wirkung von Bay auf stimulierte Zellen werden die Ansätze vor Zugabe von Bay 1000394 für 72 Stunden mit DSP 30 auch IL-2 der Konzentration 100 U/ml zusammen koninkubiert. Dann wird Bay 1000394 in den Konzentrationen 0 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM und 1 µM hinzugefügt. Die Messung erfolgte nach 24 Stunden.

Um in vivo Verhältnisse zu modellieren wird die embryonale Leberzelllinie EL08 in eine Kultur mit 15 ml Stromamedium gegeben. Nach Proliferation werden die Zellen ausplattiert, Stroma abgesaugt und die Zellen mit 5 ml 1x Trypsin gelöst und danach wieder mit Stroma 1:20 verdünnt. In 24 Well Platten werden sie erneut kultiviert bis die Wells zu über 95% mit dendritischen Zellen bewachsen sind, dann wird das Stroma erneut abgesaugt und die CLL-Zellen im CLL-Medium hinzugegeben mit dem Inhibitor Bay 1000394 in den Konzentrationen 0 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM. Parallel zu den Stromaansätzen werden Kontrollen mit reinen Mediumansätzen durchgeführt. Die Messung erfolgt nach 24 und nach 48 Stunden.

Zur Kontrolle der Wirkung auf normale B-Zellen werden gesunde separierte B-Zellen in 24 Wells-Platten mit Bay 1000394 und der Konzentration von 0 nM und 20 nM für 12 Stunden inkubiert und anschließend im Facs gemessen.

2.2.4.2. DiOC6-Staining

Eines der frühen Ereignisse der Apoptose ist der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ durch Porenbildung. Den elektrochemischen Gradienten kann man mit dem lipophilen kationischen Farbstoff 5,5', 6,6'-Tetrachloro-1,1', 3,3'tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid (JC-1) nachweisen. Dieser Farbstoff passiert sowohl Plasma- als auch Mitochondrienmembran. In gesunden Zellen reichern sich JC-1 im stark negativ geladenen Inneren der Mitochondrien an und bilden dort J-Aggregate. Sie emittieren rotes Licht, das durchflusszytometrisch detektiert werden kann. Bricht das mitochondriale Membranpotential zusammen, zerfallen die instabilen J-Aggregate und JC-1 liegt als Monomer vor. Die Emission der Monomere wird als grünes Licht detektiert. Somit misst das FACS die Verschiebung im Emissions-Spektrum, das Verhältnis der Emission von rotem Fluoreszenzsignal (J-Aggregate) und grünem Fluoreszenzsignal (J-Monomere) wird als mitochondriales Membranpotential $\Delta\Psi_m$ bezeichnet.

Für die Versuche werden die CLL-Zellen in 24 Well Platten zu 1×10^6 /ml CLL-Medium mit Bay 1000394 der Konzentrationen 0 nM und 20 nM für 12 Stunden inkubiert. Anschließend werden 4 μ l DiOC6 Workingsolution/ml Zellsuspension hinzugegeben und für 30 min inkubiert. Für 5 Minuten werden die Proben bei 1500 upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Pro Ansatz werden 500 μ l FACS-Puffer zugegeben und 5 μ l PI-Workingsolution. Anschließend wird das $\Delta\Psi_m$ mit der Durchflusszytometrie bestimmt.

2.2.4.3. TUNEL

TUNEL steht für Terminale-Desoxyribosyl-Transferase (TdT) mediated dUTP Nick End Labeling. Die Methode dient zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen. Während der Apoptose wird der DNA Strang durch Endonukleasen fragmentiert, die Strangenden haben eine freie 3'-OH-Gruppe. Daran bindet das Enzym TdT die markierten dUTP Nukleotide. Diese kann man mit dem Fluoreszenzlicht des FACS messen. Apoptotische Zellen weisen eine stärkere TUNEL Fluoreszenz auf als gesunde Zellen. Für die Versuche werden die CLL Zellen in 24 Well Platten zu 1×10^6 /1ml CLL Medium zum einen mit Bay 1000394 alleine mit den Konzentrationen 0 nM und 20 nM angesetzt, zum anderen wurde 30 Minuten vor Zugabe von Bay 1000394 10 μ l der 10 nM Stocklösung des Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK hinzugegeben. Nach 12 Stunden Inkubationszeit werden die Zellen fixiert: 500 μ l Zellsuspension werden in Facsscanröhrchen

überführt und für 5 Minuten bei 1500 upm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 300 µl resuspendiert. Nach Zugabe von 3 ml Paraformaldehyd-Lsg (1%) wird die Suspension für 15 Minuten auf Eis gegeben, erneut für 5 Minuten bei 1500 upm zentrifugiert und je 2x mit je 3 ml PBS gewaschen. Folgend wird je 1 ml eisgekühlten Ethanol (70%) zugegeben und für 30 Minuten auf Eis gekühlt.

Für die Färbung werden die fixierten Zellen und zusätzlich 500 µl der positiven bzw. negativen Kontrollzellen 5 Minuten bei 1500 upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets werden je mit 1 ml Wash-Buffer 2x gewaschen. Anschließend werden sie in 50 µl Staining Solution resuspendiert und über 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Rinse-Buffer, wird die Zellsuspension gevortext und für 5 Minuten bei 1400 upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wird einmal wiederholt, die Pellets in 500 µl PI/RNase-Lösung resuspendiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird gemessen.

2.2.5. Immunoblot

Durch das sogenannte Immunblotting, auch als Western-Blot bezeichnet, können die Konzentrationen einzelner Proteine quantitativ bestimmt werden. Zunächst werden Zellen lysiert und anschließend jeweils pro Ansatz die Proteinmenge bestimmt und daraus entsprechend die Proteinlysate auf ein zuvor gegossenes SDS-Gel aufgetragen. Durch die Elektrophorese werden die Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und dann vom Gel auf eine Membran übertragen, was als „Blotting“ bezeichnet wird. Die jetzt noch freien Proteinbindungsstellen der Membran werden mittels nicht-detektierbaren Polymeren blockiert, das sogenannte „Blocken“. Dann werden die Proteine mit spezifischen Primärantikörpern gekoppelt, woran wiederum enzymgekoppelte Sekundärantikörper binden. Nach Auftragen der Entwicklerlösung katalysiert das Enzym dieses Antikörpers eine Chemolumineszenzreaktion, die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form. Diese Reaktion kann durch den Entwickler auf einem Film sichtbar gemacht werden, woraus sich die Menge des exprimierten Proteins erschließt.

In 150 cm² Zellkulturflaschen werden je 60 x 10⁶ Zellen/25ml CLL-Medium mit Bay 1000394 der Konzentration 0 nM und 20 nM für 6 und 12 Stunden inkubiert. Anschließend werden die Zellen in ein 50 ml Tube überführt und bei 1500 upm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand

wird verworfen und die Zellen in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt, 5 Minuten bei 4300 upm zentrifugiert, der Überstand mittels Pipette abgenommen und die Pellets anschließend im Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend aufgetaut.

Für die Lyse der Proteine wird zuerst ein frischer Lyse Puffer angesetzt, aus 100 µl 10x Protease-Inhibitor und 900 µl 1x Lyse Puffer. Der Lyse Puffer wird entsprechend der Größe des Pallets, zwischen 30 und 60 µl, hinzugegeben, daraufhin 20 Minuten stehen gelassen und dabei alle 5 Minuten gevortext. Anschließend werden die Lysate bei 4°C für 20 Minuten bei 1400 upm zentrifugiert. Pro Ansatz werden zum einen 5 µl Aliquot zur Proteinbestimmung und zum anderen ein definiertes Volumen, abhängig von der vorherigen Pufferverdünnung, zwischen 30 und 60 µl in ein neue Eppendorf Gefäße überführt. Die Lysate werden mit 2x Loading Buffer 1:1 verdünnt und vor jedem Western Blot für 10 Minuten bei 95°C aufgeköcht um die Raumstruktur der Proteine zu zerstören. Gelagert werden die Lysate bei 20°C.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde zunächst eine Verdünnungsreihe ausgehend von einem BSA Protein Standard 3mg/ml erstellt: Je 20 µl H₂O werden in 6 Eppendorfgefäße vorgegeben, und ausgehend vom Standard über Eppendorfgefäß 1-6 werden immer 20 µl in das nächste Gefäß pipettiert. Für die Messreihe werden in eine 96 Well Platte 2 x 5 µl H₂O als Blindwert vorgelegt, je 2x 5 µl der Verdünnungsreihe 1-6 und letztlich je 2x 5 µl der Lysate. 1 ml Reagenz A wurde mit 20 µl Reagenz S gemischt und davon werden je 25 µl in jedes Well pipettiert, zusätzlich Reagenz B mit 200 µl. Die Färbung wird 15 Minuten ruhen gelassen und anschließen mittels ELISA Reader bei 750 nm die Proteinkonzentration bestimmt.

Zur Herstellung des Laufgels für die Gelelektrophorese wird zunächst 10,5 ml Trenngel luftblasenfrei zwischen zwei vorbereiteten Glasplatten pipettiert, mit Methanol überschichtet und für 30 Minuten stehen gelassen. Nachdem das Gel fest ist, wird das Methanol abgekippt und die Glasplatten komplett mit Sammelgel aufgefüllt und ein Kamm eingesetzt zur Bildung der Geltaschen für die Aufnahme des lysierten Proteins. Nach 20 Minuten Ruhezeit ist das Sammelgel ausgehärtet.

Für die Gelelektrophorese wird das Gel in den Glasplatten in eine Laufkammer eingesetzt, die mit 1x Lauf-Puffer gefüllt ist. Um die Größe der Proteine abzuschätzen, wird in die erste Tasche 15 µl eines farbmarkierten Proteinstandard gegeben. In jede Tasche wird dann ein entsprechend der Proteinbestimmung ermitteltes Volumen gefüllt, die leeren Taschen werden mit 15 µl 2x Lade-Puffer beladen. Für 30 Minuten wird die Elektrolyse bei 60 V laufen gelassen, dann auf 140 V hochgeschaltet, bis der Proteinstandard aufgetrennt ist.

Zum Transfer wird zunächst eine Transferkammer zu 2/3 mit Transferpuffer gefüllt und das Kühlwasser aufgedreht. Die 0,45 µm dicke PVDF-Membran wird zurechtgeschnitten und in Methanol equilibriert. Auf das Whatman Paper folgt die Membran, darauf das vorsichtig von den Glasplatten gelöste Gel mit den aufgetrennten Proteinen und darauf wiederum ein Whatman Paper. Die Transferkassette wird in die Transferkammer gesteckt und diese mit Transferpuffer bis obenhin aufgefüllt. Dies wird an eine Stromquelle bei 800 mA angeschlossen. Die Transferzeit in Minuten entspricht der gewünschten Proteingröße in kDa. Nach der Transferzeit werden die Proteine auf der Membran fixiert.

Nach dem Transfer wird je nach Antikörper mit 20 ml 5% Milch bzw. 20 ml 5% BSA für 1 Stunde zur Minimierung unspezifischer Antikörperbindung geblockt.

Die primären Antikörper werden je nach Antikörper entweder in 20 ml 5% Milch oder 20 ml 5% BSA im Verhältnis 1:2000 angesetzt. Für die Haltbarkeit wird 100 µl NaAzid hinzugeben. Nach dem Blocken wird die Membran für 2 Stunden mit dem primären Antikörper auf dem Schütteltisch inkubiert und anschließend 3x mit ca 20 ml PBS/TWEEN gewaschen für je 2-5 Minuten. Der sekundäre Antikörper wird entsprechend in 20 ml 5% Milch oder 5% BSA im Verhältnis 1:10000 angesetzt. Die Spezifität, ob Maus oder Hase, richtet sich dabei nach dem Isotyp des primären Antikörpers. Nach dem Waschen wird dieser auf die Membran gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schütteltisch inkubiert. Anschließend wird die Membran 2x mit PBS/TWEEN gewaschen für je 2-5 Minuten und folgend nochmal mit PBS ohne TWEEN für ca. 10 Minuten gewaschen.

Zur Herstellung der Entwicklerlösung wird die Super Signal Luminol/Peroxide im Verhältnis 1:1 in ein Eppendorf Gefäß pipettiert und gut gemischt. Je nach Signalstärke des Proteins wählt man zwischen Pico, Dura und Femto. Die Lösung wird nach dem letzten Waschschrift auf die Membran gegeben, in Klarsichtfolie gepackt, in eine Entwicklerkassette gelegt und in der Dunkelkammer entwickelt. Die Dauer der Auflage des Films variiert je nach Protein und nach Stärke der Entwicklerlösung. Schließlich wird der Film im Hyperprocessor entwickelt.

2.2.6. Statistische Analysen

Statistische Signifikanzen werden durch die Verwendung gepaarter T-Tests ermittelt. P-Werte <0,05 werden als statistisch signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Bay 1000394 induziert Apoptose in ruhenden CLL-Zellen

Die Inkubation von CLL-Zellen mit Bay 1000394 beeinflusst das Apoptoseverhalten der Zellen.

Abb. 1 zeigt ein repräsentatives Ergebnis einer Facsscananalyse nach 12h Inkubationszeit von ruhenden Zellen mit und ohne Bay 1000394. Der obere Teil der Abbildung zeigt den Anteil annexinpositiver Zellen im Dichtebplot, der untere im Histogramm. Die Zugabe des Inhibitors bewirkt jeweils eine Verschiebung der Zellpopulation in den annexinpositiven Bereich. Die Abbildung verdeutlicht repräsentativ eine Verschiebung von 25,02 % zu 92,13 % annexinpositiver Zellen 12h nach Zugabe von 20 nM Bay 1000394. Abb. 2 stellt das durchschnittliche Ergebnis einer Dosistitration anhand von 9 CLL Patienten dar. Dabei zeigt die Abbildung den Anteil annexinpositiver Zellen in Prozent in Abhängigkeit der Konzentration des Inhibitors (0 nM, 0,1 nM, 0,5 nM, 1nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1 µM) bei einer Inkubationszeit von 12h und 24h. Bereits geringe Konzentrationen bewirken eine Verschiebung in den annexinpositiven Bereich. Zwischen 10 nM und 50 nM liegt die maximale Steigerungsrate.

Da bereits nach 12h ein Großteil der Zellen (> 81,2%) annexinpositiv sind, werden im weiteren Verlauf der Experimente kürzere Zeitpunkte für die Konzentrationen zwischen 0 und 50 nM untersucht. Abb. 3 zeigt die Anzahl annexinpositiver Zellen in Abhängigkeit der Inkubationsdauer für verschiedene Konzentrationen. Abb. 3 stellt das durchschnittliche Ergebnis von 5 Patienten dar. Die Verschiebung von Phosphatidylserin zur äußeren Membran zeigt sich nach circa 6h Koinkubation mit Bay 1000394 für Konzentrationen von 10 nM oder mehr und erreicht ihr Maximum nach 24h. Konzentrationen von 20 nM, 25 nM und 50 nM resultieren nicht signifikant unterschiedlich in >90% annexinpositiven Zellen nach 24h. Dabei zeigt sich die deutlichste Wirkungsverstärkung mit 27% bei einer Konzentrationserhöhung des Inhibitors von 15 nM auf 20 nM im Vergleich zu 4% bzw. 3% Konzentrationserhöhungen von 20 nM auf 25 nM bzw. 25 nM auf 50 nM. Die Wirkungssteigerung ist am prominentesten zwischen 6h und 12h nachweisbar, bei einer Konzentration des Inhibitors von 20 nM steigt die Anzahl annexinpositiver Zellen um 45%, während die Zunahme annexinpositiver Zellen (+6%) von 12h auf 24h deutlich geringer ausfällt. Somit erhöhen eine längere Exposition bis zu 24 Stunden oder höhere Konzentration bis zu 1000 nM nicht die Effektivität der Annexin-Verschiebung.

Bezüglich der Wirkung des Inhibitors Bay 1000394 auf den ZAP-70 Status werden keine Unterschiede der untersuchten CLL Zellen festgestellt.

Abb. 4 zeigt die Wirkung des Inhibitors auf CLL-Zellen im Vergleich zu gesunden B-Zellen. In CLL Zellen resultiert eine Konzentration von 20 nM Bay 1000394 in einer Verschiebung der Einlagerung von Phosphatidylserin in die äußere Zellmembran von 64%, im Vergleich zur Mediumkontrolle, während sich bei B-Zellen gesunder Probanden kein Unterschied zwischen Mediumkontrolle und Inkubation mit dem Inhibitor zeigt. Die Abbildung zeigt das durchschnittliche Ergebniss für 3 gesunden B-Zell-Probanden.

3.2. Verlust des mitochondrialen Membranpotentials

Die Inkubation von ruhenden CLL-Zellen mit Bay 1000394 führt zum teilweisen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials.

Abb. 5 zeigt die durchschnittliche Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials. Durch Zugabe des Inhibitors nach 12h zeigt sich durchschnittlich eine 34%ige Reduktion des intakten mitochondrialen Membranpotentials (bei bestehender Heterogenität zwischen den einzelnen CLL-Proben). Neben Patientenproben mit vollständigem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 6 Patient B) zeigen sich für andere Patientenproben nur geringfügige Veränderungen (Patient A und C). Eine eventuelle Zuordnung der Unterschiede im Verhalten des mitochondrialen Membranpotentials zum ZAP-70 Status der Patienten konnte nicht nachgewiesen werden, da sowohl bei ZAP-70 positiven, als auch negativen Patientenproben die Auswirkungen auf $\Delta\Psi_m$ (siehe Abb. 6) sehr unterschiedlich sind. Im Durchschnitt kommt es zur Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials um ca 34%. Dabei variieren die Ergebnisse von 81 % Verringerung zu 10 %, was auf die vorhandene Heterogenität der CLL zurückzuführen ist. Die Abbildung zeigt die durchschnittlichen Ergebnisse von 9 Probanden.

3.3. Aktivierung von Caspase 3, 8, 9 und XIAP

Die Inkubation von CLL-Zellen mit Bay 1000394 führt zur Cleavage von Procaspase 3, Procaspase 8 und Procaspase 9.

Im Immunoblotting zeigt sich bereits 6h (++) 12h nach Zugabe von 20 nM Bay 1000394, eine Abnahme von Procaspase 3 mit respektiver Zunahme an „cleaved“ Caspase 3. Procaspase 3 wird sowohl von Caspase 8 via extrinsischen Weg, als auch über Caspase 9 via intrinsischem Weg aktiviert. Abb. 7 zeigt die Abnahme der Konzentration von Procaspase 3 als auch von Procaspase 8 und Procaspase 9. Dementsprechend werden entweder beide Signalwege durch Bay 1000394 initiiert, oder es kommt zu einer sekundären Aktivierung einer der beiden Signalwege im Verlauf.

XIAP zeigt ebenfalls eine verringerte Expression nach Inhibitor Inkubation. XIAP bindet Effektorcaspasen wie Caspase 9. Durch die verminderte Expression von XIAP könnte diese Funktion beeinträchtigt sein.

3.4. Regulation der mitochondrialen Integrität durch Bcl-2 Proteine

Die Zugabe von Bay 1000394 beeinflusst die Expression von Proteinen der Bcl-2 Familie.

Das mitochondriale Membranpotential wird durch das Gleichgewicht aus pro- und antiapoptischen Proteinen der Bcl-2-Familie aufrechterhalten (s. 1.6). Auf Grund der Ergebnisse aus den Messungen des mitochondrialen Membranpotentials werden diese weiter im Western Blot untersucht. Das antiapoptische Protein Bcl-2 zeigt nach Inkubation mit Bay 1000394 keine Veränderung der Expression (siehe Abb. 8). Das antiapoptische Protein Mcl-1 hingegen zeigt nach Zugabe von Bay 1000394 nach 6h und nach 12h eine ausgeprägte Verringerung der Expression. Es zeigte sich eine verstärkte Expression von Noxa, einem propapoptischen Protein der Bcl-Familie und Inhibitor von Mcl-1.

Für das proapoptische Protein Bax lässt sich nach Inkubation mit Bay 1000394 ein 18 kDa große Bax Variante im Verlauf nachweisen. Die Expression des proapoptischen Proteins Bak bleibt unverändert. Die Aktivierung von Procaspase 8 führt zum Einbau von tBid nach Cleavage in die mitochondriale Membran, was durch Interaktionen (Aktivierung) mit Bax und Bak in einer Oligomerisierung der entsprechenden Proteine und konsekutiver Porenbildung in der mitochondrialen Membran führt. Eine Folge davon ist u.a. die Freisetzung von Cytochrom C.

Die Abnahme der Expression von „full length“ Bid zeigt der Immunoblot von Bid. Der Blot für das propapoptischen Protein Bim zeigt nach Zugabe von Bay 1000394 eine Zunahme der Expression der 12 kDa und 15 kDa großen alternativen Splicing Varianten BimL und BimS.

BimS und BimL sind beide als starke Aktivatoren von Bax beschrieben (Chi et al., 2019, S. 4). Alle Isoformen des Proteins haben proapoptotische Wirkung, wobei die potenteste Wirkung der kleinsten Isoform zugeschrieben wird (O'Connor et al., 1998, S. 388). Die eben dargelegten Veränderungen in den Immunoblots sind bereits nach 6h dedektierbar – dies korreliert gut mit den Ergebnissen der Annexinassays aus den Zeitkinetivversuchen (siehe Abb. 3).

Eine äquivalente Proteinladung wird durch β -Aktin Antikörperkontrollen in allen Western Blots sichergestellt.

3.5. Zugabe des Pan-Caspase Inhibitors Z-VAD-FMK

Die Zugabe von Z-VAD-FMK verringert die Anzahl annexinpositiver Zellen nur um knapp 20%.

Z-VAD-FMK ist ein Pancaspase Inhibitor. Wie in 1.4 beschrieben, spielen Caspasen eine wichtige Rolle im Ablauf der Apoptose und werden durch Zugabe von Bay 1000394 aktiviert. Die zusätzliche Inkubation der CLL-Zellen mit Z-VAD-FMK wird auf die Auswirkungen auf die CDK-Inhibitor vermittelte Apoptose untersucht. Abb. 9 zeigt den Durchschnittswert von 11 Probanden mit einer Abnahme annexinpositiver Zellen bei Koninkubation mit Z-VAD-FMK. Allerdings verringert sich der Wert im Vergleich zu Zellen ohne Zugabe von Z-VAD-FMK nur um knapp 20%. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Bay 1000394 caspaseabhängig Apoptose und caspaseunabhängig Apoptose oder auch weitere Formen des programmierten Zelltod auslösen könnte (Nekroptose, Pyroptose etc.). Interessant sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse aus 3.10 wo eine deutliche Reduktion der DNA Doppelstrangbruchrate im TUNEL Assay unter Einsatz von Bay 1000394 und Z-VAD-FMK nachgewiesen werden kann.

3.6. Doppelstrangbrüche im TUNEL-Assay

Die Zugabe von Bay 1000394 führt zu DNA-Strangbrüchen in CLL-Zellen.

Abb. 10 zeigt ein durchschnittliches Ergebnis (n=4) der TUNEL Untersuchungen bei Zugabe von 20 nM Bay 1000394 nach 12h. Es zeigt sich ein Anstieg UTP-positiver Zellen (und somit der Doppelstrangbrüche) um 57 %. Wird 30 Minuten vor Zugabe des Inhibitors mit Z-VAD-FMK vorinkubiert, wird die Anzahl der UTP-positiven Zellen verringert: es kommt lediglich

zu einem Anstieg um 19%. Abb. 11 zeigt das Verhalten im Tunel Assay mit und ohne Bay 1000394 sowie der Zugabe von Z-VAD-FMK. Während die UTP-positiven Zellen durch Zugabe von Z-VAD-FMK ausgeprägt vermindert werden, ist der Einfluss auf die Annexinpositivität der CLL-Zellen deutlich geringer nachweisbar (Vgl. Kapitel 3.4).

3.7. Stimulierte CLL-Zellen

Bay 1000394 induziert programmierten Zelltod auch in stimulierten CLL-Zellen.

Die Titrationskurve in Abb. 12 (Annexinassay) zeigt, dass der Inhibitor auch in stimulierten Zellen eine Umlagerung von Phosphatidylserin an die äußere Zellmembran bewirkt. Sie zeigt das durchschnittliche Ergebnis von 9 Probanden. Nachdem die Zellen für 72h mit DSP30 und mit IL-2 koinkubiert werden, sind bei einer Konzentration von 20 nM Bay 1000394 deutlich weniger CLL-Zellen in den Annexin positiven Bereich verschoben, verglichen mit unstimulierten CLL-Zellen. Repräsentativ ist dies dargestellt im Annexinassay in Abb. 13 nach einer 72h Inkubation mit DSP30 und IL-2 bei einer Konzentration von 20 nM. Die Anzahl der annexinpositiven Zellen steigt nur um 5%, während sie bei ruhenden CLL-Zellen um ca. 30 % steigt. Dieses Ergebnis zeigt sich für alle CLL Proben bei 72 h Vorstimulation mit DSP30 und IL-2 (Vgl. Abb. 12).

3.8. Stroma-Zellen

CLL-Zellen auf supportivem Stroma (in vivo Modell) sprechen weniger sensibel auf Bay 1000394 an.

Abb. 14 zeigt, dass eine höhere Konzentration an Bay 1000394 benötigt wird (100nM), um die maximale Wirkung im Annexinassay zu erreichen. Die Abbildung zeigt das durchschnittliche Ergebnis von 3 Probanden. Bei Stromazellkontakt sind nach 24 h Inkubationszeit mit 20 nM des Inhibitors nur 36 % der CLL Zellen annexinpositiv. Erhöht man die Dosis auf 100 nM sind 93 % der CLL Zellen annexinpositiv.

3.9. Abbildungen

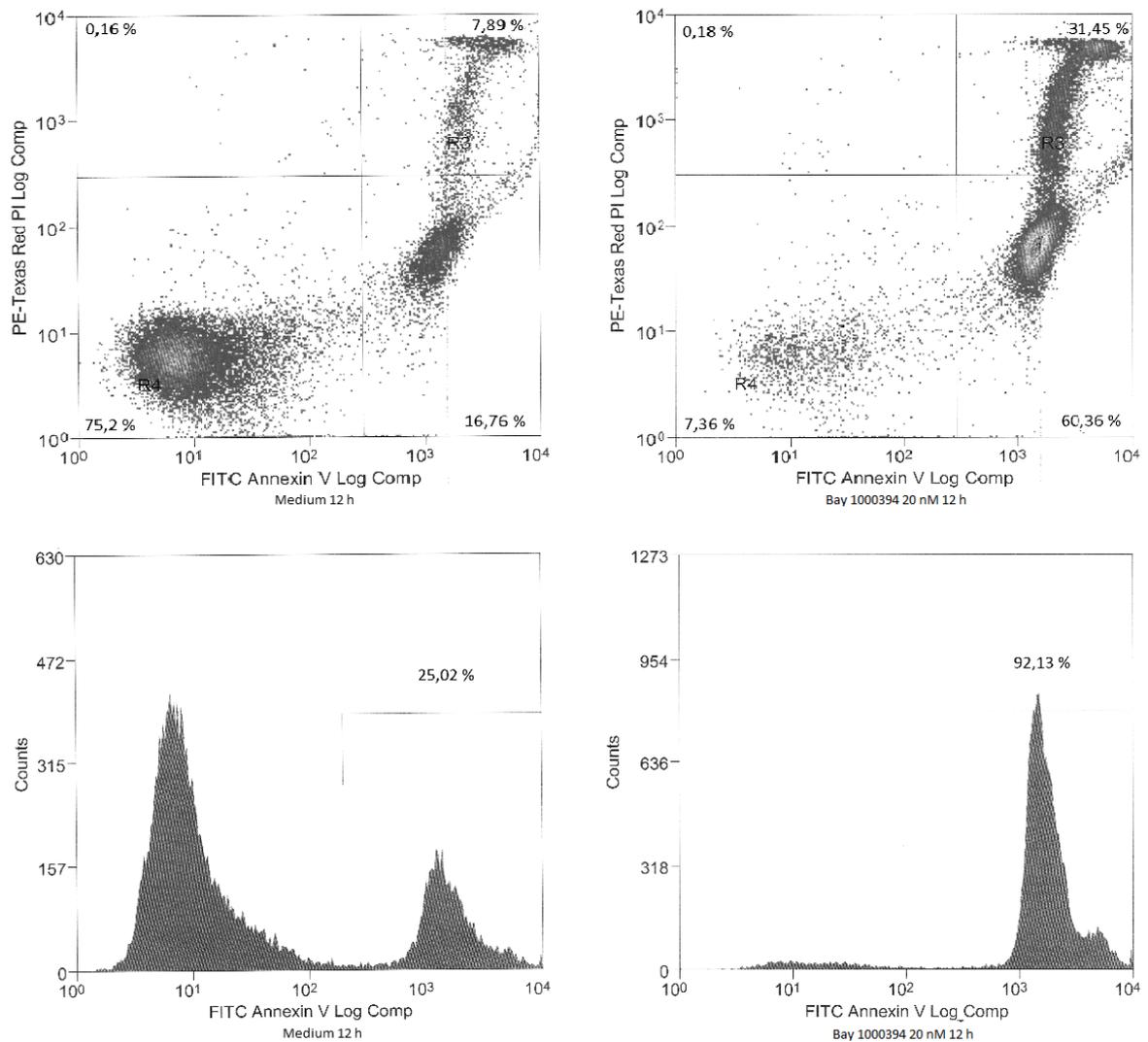


Abb. 1: Annexin-V-Assay nach 12h

Bay 1000394 führt zu einer Umlagerung von Annexin in die äußere Zellmembran, repräsentativ dargestellt anhand der Verschiebung der Zellen in den annexinpositiven Bereich bei einer Konzentration von 20 nM und einer Inkubationszeit von 12h. Die Histogramme zeigen eine Zunahme von 25,02 % auf 92,13 % annexinpositiver Zellen nach Zugabe von Bay 1000394. Bei der Darstellung der Dichtebplots werden die annexinpositiven Zellen nochmals aufgetrennt in PI-positive und –negative Zellen.

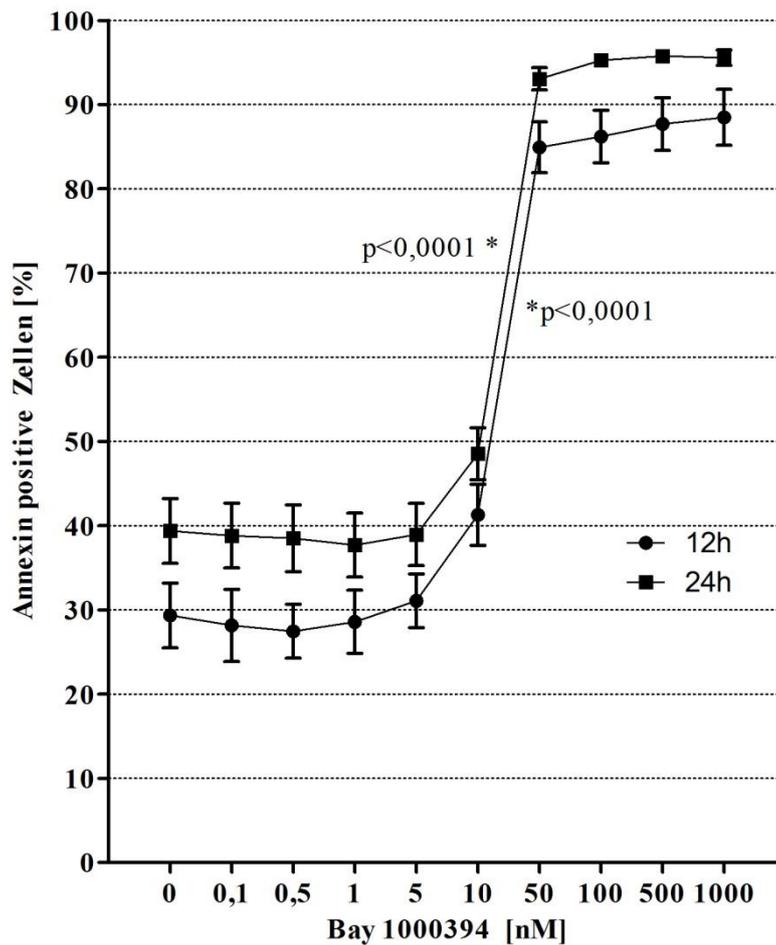


Abb. 2: Dosistitration mit Bay 1000394 für 12h und 24h

Die Anzahl annexinpositiver Zellen ist abhängig von der Konzentration an Bay 1000394. Zwischen 10 und 50 nM liegt die quantitativ größte Zunahme der Annexinpositivität (Δ 42,8% 12h vs. 44 % 24h). Ein Plateau zeigt sich für Konzentrationen \geq 50 nM (ca. 90% Annexinpositivität), eine weitere Steigerung der Konzentration an Bay 1000394 auf bis zu 1000 nM führt nicht mehr zu signifikanten Änderungen. Die Abbildung zeigt die durchschnittlichen Ergebnisse von 9 CLL-Patientenproben.

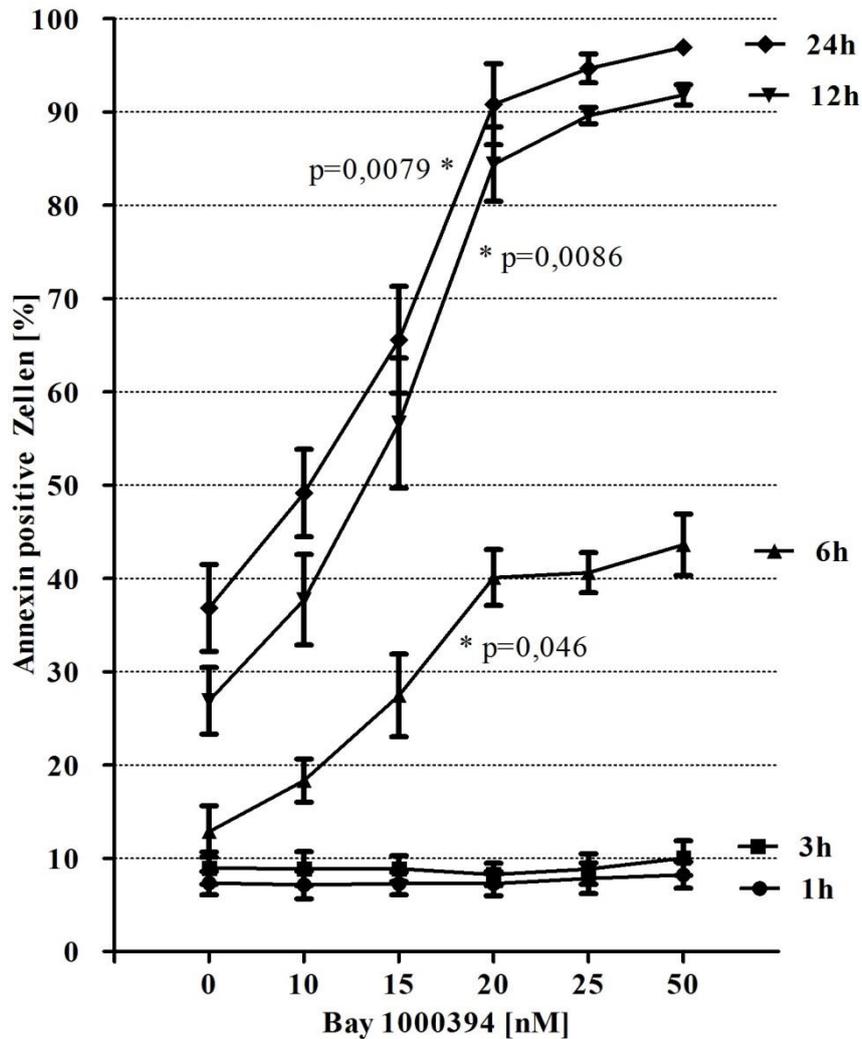


Abb. 3: Zeitkinetik

Die Abbildung zeigt das Ansprechen von CLL Zellen auf verschiedene Konzentrationen des Inhibitors Bay 1000394 in Abhängigkeit der Inkubationsdauer. Dargestellt auf der X-Achse sind verschiedene Konzentrationen des Inhibitors Bay 1000394 (0-50 nM). Bereits nach 6h bzw. deutlich prominenter nach 12h zeigt sich ein Anstieg auf 40% bzw. 84% annexinpositive Zellen für Konzentrationen von Bay 1000394 von 20 nM, 25 nM oder 50 nM. Die Abbildung zeigt die durchschnittlichen Ergebnisse für 5 Probanden. Zu berücksichtigen ist eine erwartete erhöhte Spontanrate annexinpositiver Zellen für die Zeitpunkte 12h und 24h im Vergleich zu 1h-6h Inkubation.

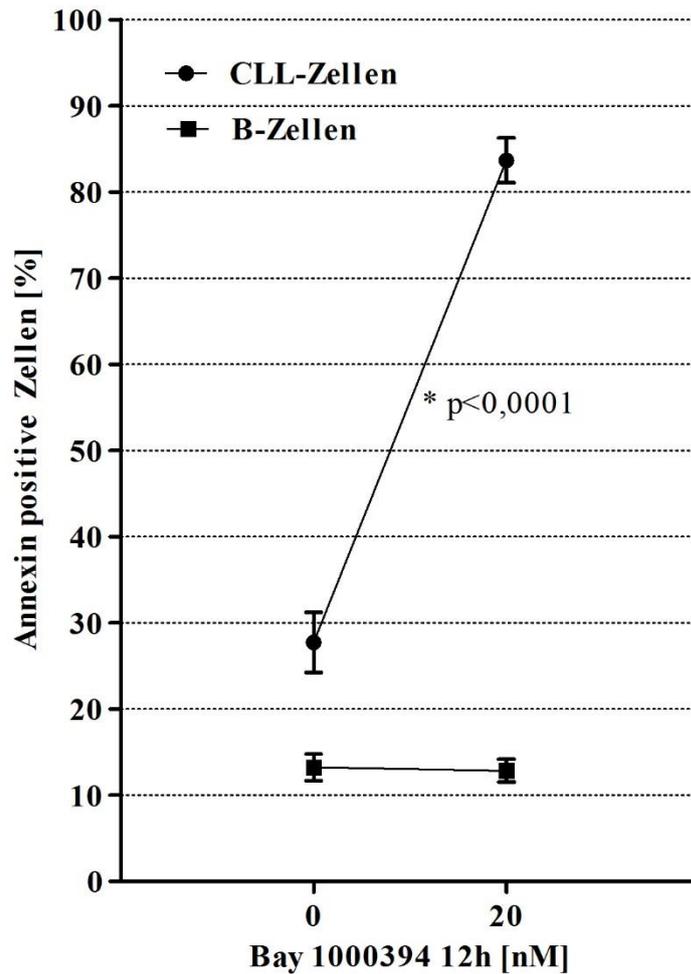


Abb. 4: Gesunde B-Zellen

Die Abbildung zeigt den Anteil annexinpositiver Zellen für Konzentrationen von 20 nM Bay 1000394 im Vergleich zur Mediumkontrolle für CLL-Zellen und normalen B-Zellen. Während sich bei CLL-Zellen ein Anstieg um 64 % zeigt, ist bei normalen B-Zellen kein Unterschied feststellbar. Die Abbildung zeigt das durchschnittliche Ergebnis für 3 gesunde B-Zell-Probanden.

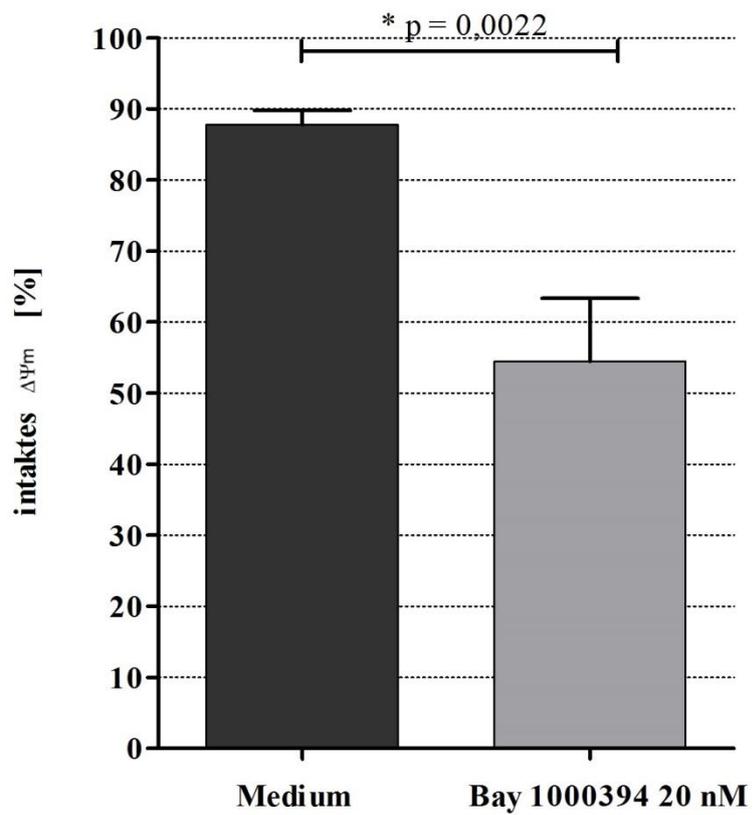


Abb. 5: Mitochondriales Membranpotential nach 12 h Inkubation

Abbildung 5 zeigt den Anteil intaktes mitochondriales Membranpotential $\Delta\Psi_m$ dargestellt auf der y-Achse für die entsprechende Mediumkontrolle und für Bay 1000394 in einer Konzentration 20 nM von n=9 Patientenproben nach 12 h Inkubationszeit. Das intakte $\Delta\Psi_m$ nimmt dabei durchschnittlich um 32 % ab.

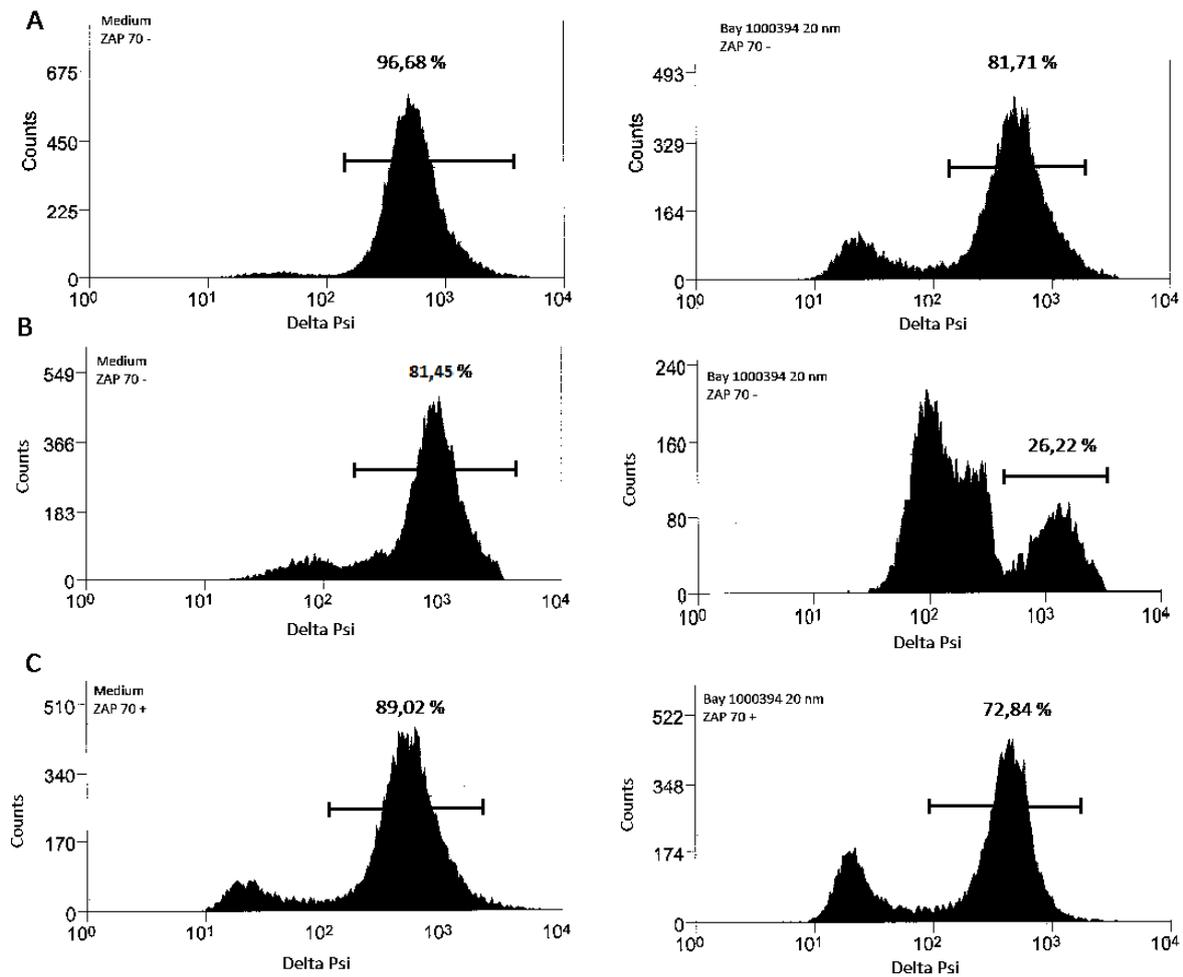


Abb. 6: DiOC6-Staining des mitochondrialen Membranpotentials

Abbildung 6 zeigt den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials nach 12h Inkubationszeit mit 20 nM Bay 1000394. Dafür werden CLL Zellen 30 Minuten vor Entnahme mit DiOC6 inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer untersucht. Die Histogramme stehen repräsentativ für 3 Patientenproben mit unterschiedlichen ZAP-70 Status. Probe A und B repräsentieren CLL-Proben mit negativen ZAP-70 Status, Probe C ZAP-70 positiv. Deutlich wird hier der Trend zur Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials, bei allen Probanden, unterschiedlich stark und unabhängig vom ZAP-70 Status.

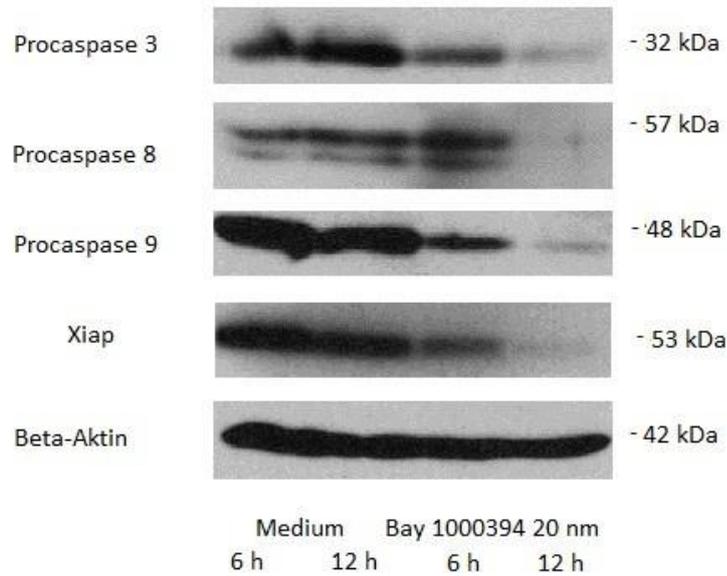


Abb. 7: Caspase 3, 8, 9 und XIAP im Immunoblot

Die Inkubation von CLL-Zellen mit Bay 1000394 führt zur verminderten Expression von Procaspase 3, 8 und 9 bei unstimulierten CLL-Zellen. Außerdem zeigt sich eine Reduktion des Proteins XIAP. Aufgereinigte CLL-Zellen werden für 6h und 12h mit oder ohne Bay 1000394 in einer Konzentration von 20 nM inkubiert. Repräsentativ dargestellt ist die Expression von Procaspase 3, 8, 9 und XIAP bei einer Proteinmenge von 50 µg pro Probe. Gleiche Proteinbeladung wird durch Analyse des Proteins β-Aktin gewährleistet.

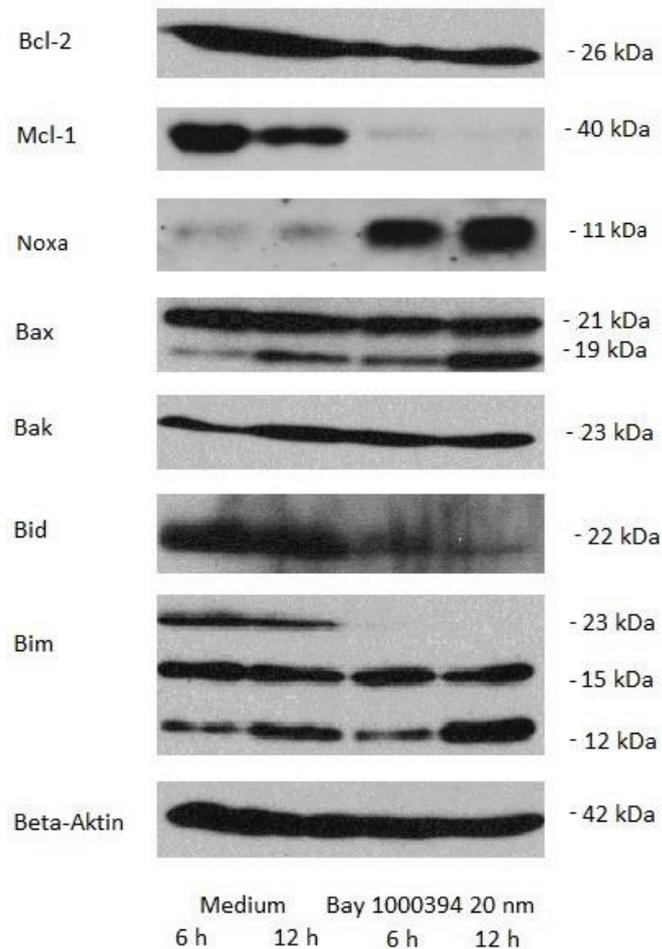


Abb. 8: Proteine im Immunoblot

Die Inkubation von CLL-Zellen mit Bay 1000394 führt zur Veränderung der Expression wichtiger Apoptose-regulierender Proteine. Nach Zugabe von 20 nM Bay 1000394 ist bereits nach 6h für die proapoptotischen Proteine Bax und Bim entsprechende Änderungen nachweisbar. Ebenso zeigt sich für Bid eine Abnahme des full length Proteins (vermutlich bei Spaltung in die mitochondrial integrale Form c/tBid). Dahingegen sinkt die Konzentration der antiapoptotischen Proteine Mcl-1. Die Expression von Bcl-2 und Bak verändert sich nicht. Das proapoptotische Protein NOXA wird stark hochreguliert. Repräsentativ dargestellt ist die Expression von Bcl-2, Mcl-1, Bax, Bak, NOXA, Bid und Bim nach 6h und 12h Inkubationszeit mit Bay 1000394. Die Proteinmenge beträgt 50 µg pro Probe, gleiche Proteinbeladung wird durch das Protein β-Aktin gewährleistet.

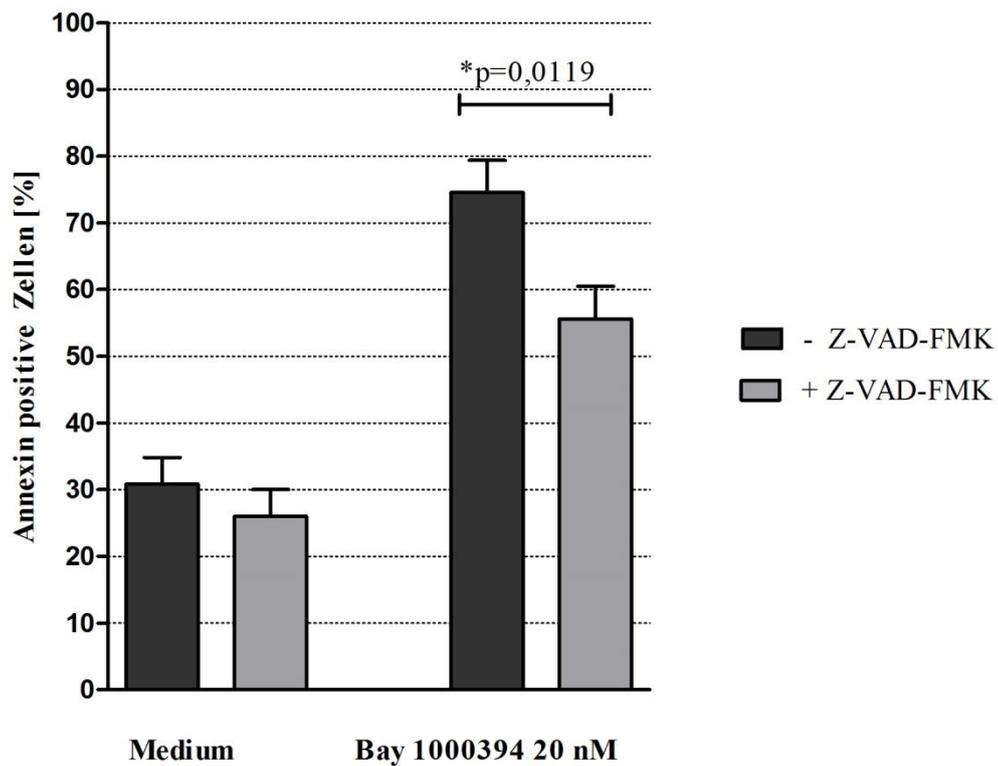


Abb. 9: 12h Annexin-V-Assay nach Vorinkubation mit Z-VAD-FMK

Der Pancaspase Inhibitor Z-VAD-FMK verringert die Wirkung von Bay 1000394 um ca. 20%. Abbildung 9 zeigt den Vergleich von CLL-Zellen die mit oder ohne 20 nM Bay 1000394 und mit und ohne Z-VAD-FMK für 12h inkubiert wurden. Die Abbildung repräsentiert die durchschnittlichen Ergebnisse von 11 Probanden.

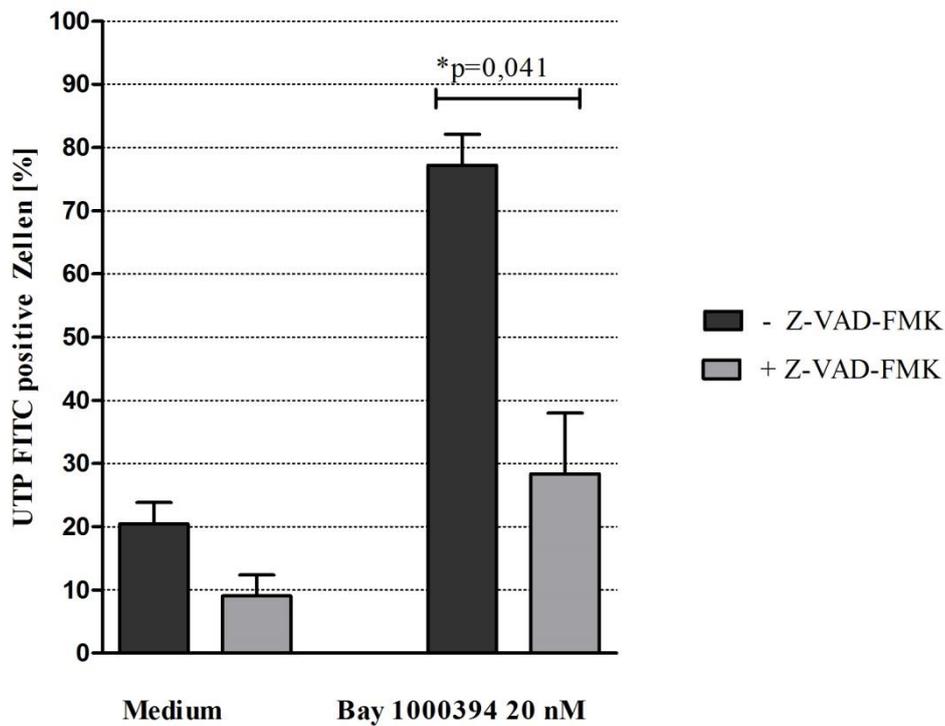


Abb. 10: Tunel-Assay nach 12h Inkubation mit Bay 1000394 und Z-VAD-FMK

Die Inkubation mit Bay 1000394 führt zu DNA-Doppelstrangbrüchen. Die Zugabe des Pancaspase Inhibitor Z-VAD-FMK reduziert die Anzahl der Doppelstrangbrüche: aufgereinigte CLL-Zellen werden für 12h ohne und mit Zugabe von Bay 1000394 in einer Konzentration von 20 nM inkubiert. Zusätzlich wird die DNA Doppelstrangbruchrate mit Hilfe des Tunelassays als Facsscananalyse anhand UTP-positiver Zellen ermittelt. Die Doppelstrangbruchrate steigt bei Zugabe von 20 nM Bay 1000394 um 57 %. Durch Zugabe von Z-VAD-FMK nur um 19 %. Dargestellt sind die durchschnittlichen Ergebnisse von 4 Probanden.

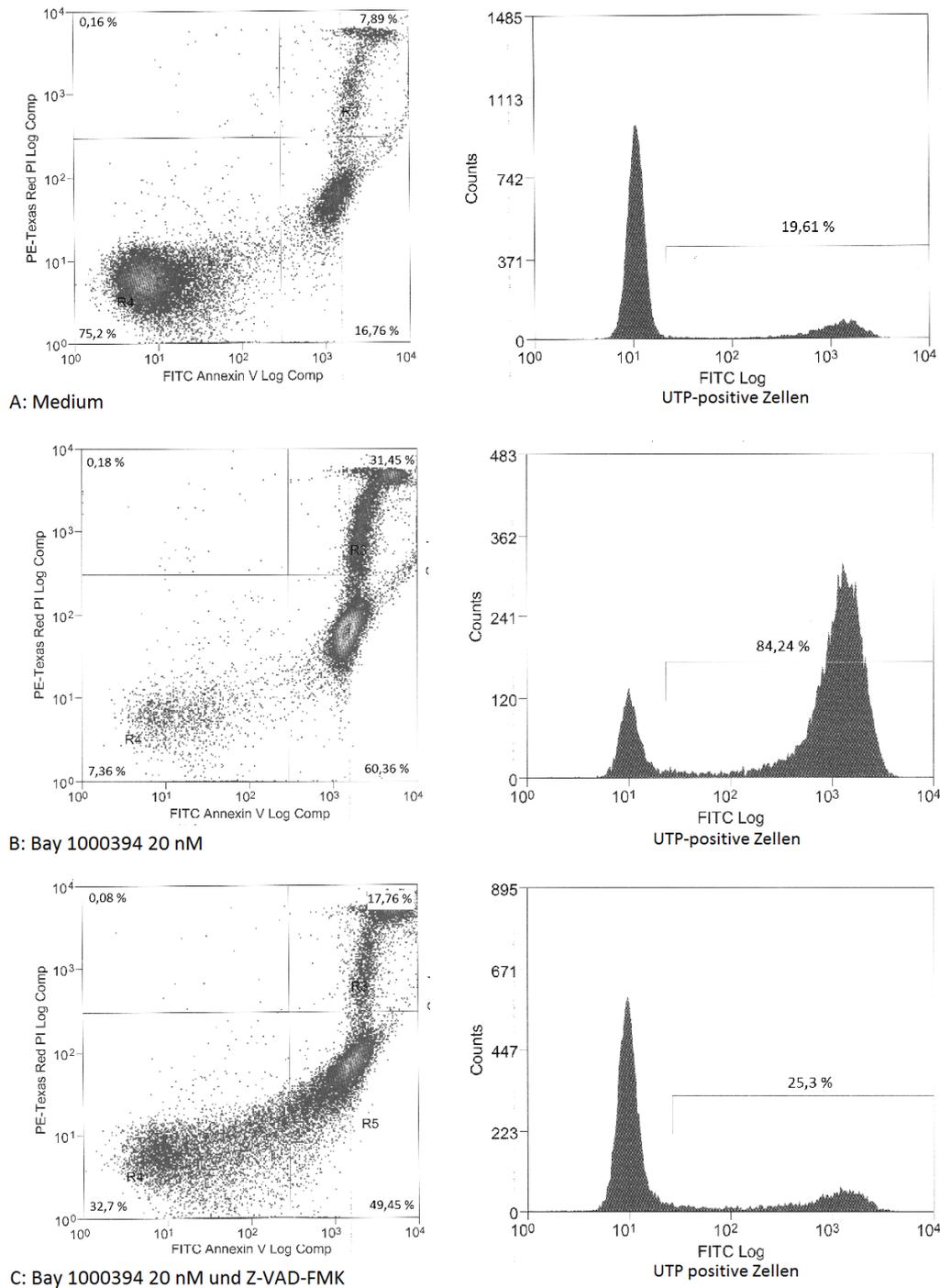


Abb. 11: TUNEL-Assay im Vergleich mit und ohne Bay 1000394 und mit und ohne Z-VAD-FMK

Die Zugabe von 20 nM Bay 1000394 führt nach einer Inkubationszeit von 12h zur Zunahme von UTP-positiven Zellen um 65%. Bei zusätzlicher Gabe von Z-VAD-FMK wird dieser Effekt aufgehoben.

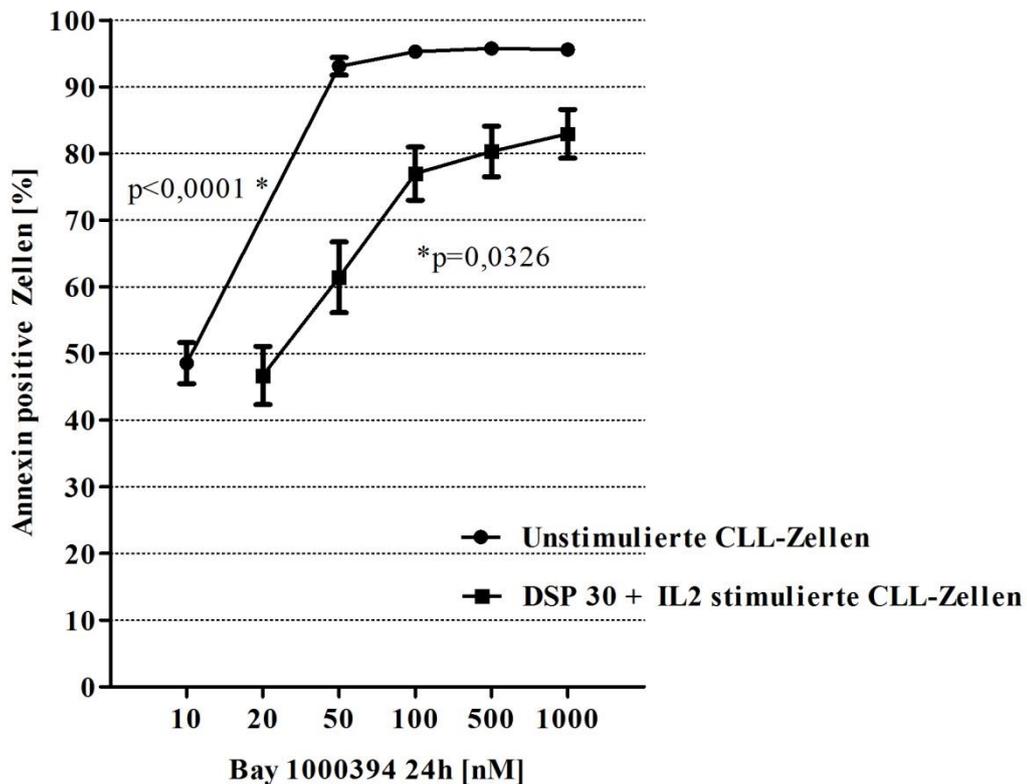


Abb. 12: Wirkung Bay 1000394 auf stimulierte CLL-Zellen

Bay 1000394 führt auch bei stimulierten CLL-Zellen zur Verschiebung in den annexinpositiven Bereich. Nach Aufreinigung der Zellen, werden diese für 72 h mit DSP30 und IL-2 inkubiert. Nach 72 h Stimulation erfolgt die Zugabe des Inhibitors Bay 1000394 in verschiedenen Konzentrationen. 50 nM bis 100 nM bewirken eine signifikante Zunahme der Annexinpositivität der CLL-Zellen. Die Abbildung 3.12 zeigt das durchschnittliche Ergebnis von 9 Probanden.

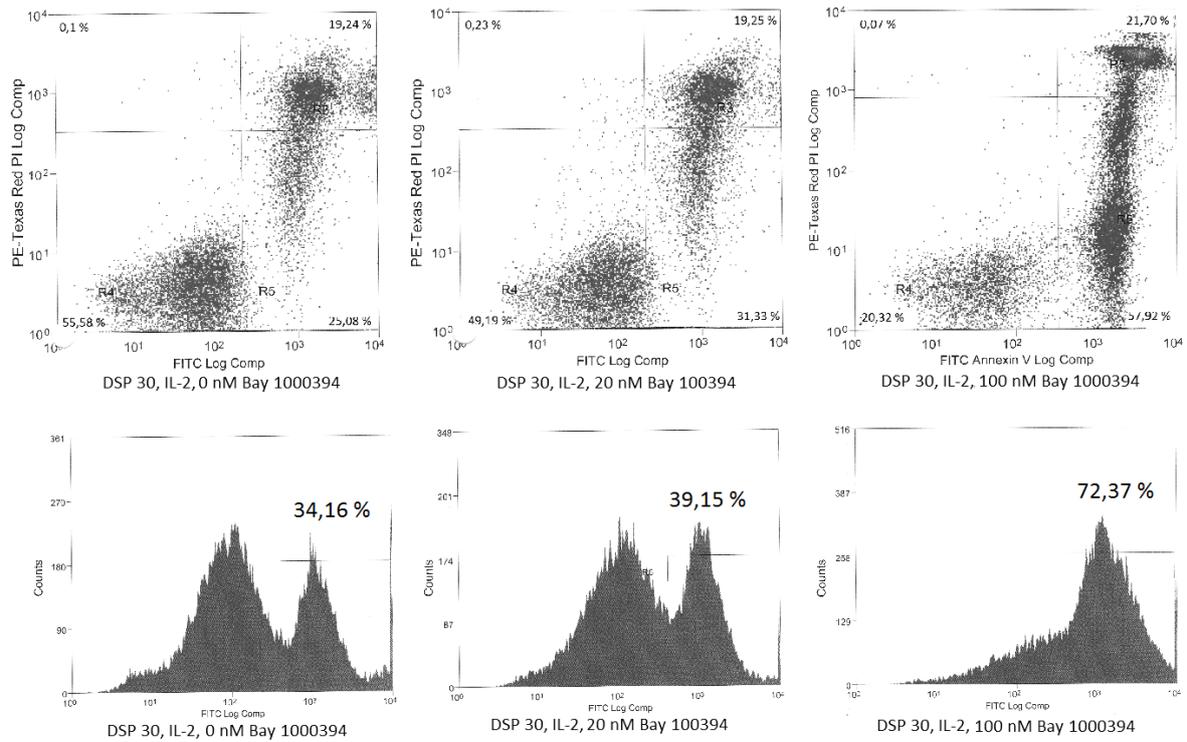


Abb. 13: Annexin-Assay eines DSP30, IL-2 stimuliertem CLL-Patient

Um im Annexinassay einen quantitativ ähnlichen Effekt zu erzielen, benötigt man bei zuvor mit DSP30 und IL-2 vorstimulierten CLL-Patienten höhere Dosen an Bay 1000394 im Vergleich zu unstimulierten CLL-Zellen. Abbildung 13 zeigt repräsentativ die Inkubation von unstimulierten und stimulierten Zellen mit 0 nM, 20 nM und 100 nM Bay 1000394 für 24h.

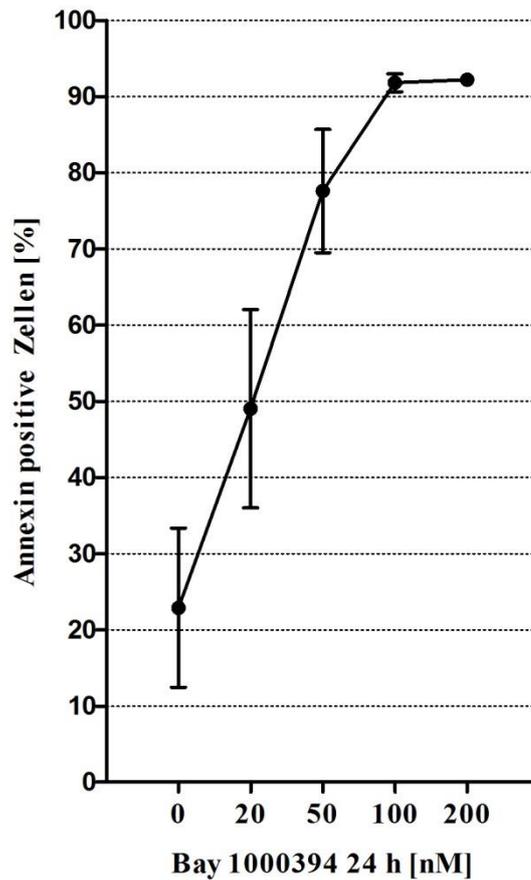


Abb. 14: Annexin-V-Assay: Stroma CLL-Zellen

Bay 1000394 induziert bei, in supportivem Stroma kokultivierten, CLL-Zellen (in vivo Modell) eine signifikante Verschiebung der Zellpopulationen in den annexinpositiven Bereich. Allerdings werden höhere Konzentrationen (100 nM) des Inhibitors benötigt, um über 90% Annexinpositivität zu erreichen, verglichen mit der Mediumkontrolle (20nM). Abbildung 3.14 zeigt das durchschnittliche Ergebnis von 3 Patientenproben.

4. Diskussion

Bis heute beginnt die Einleitung nahezu jeder Veröffentlichung neuer Forschungsergebnisse zur Chronisch Lymphatischen Leukämie mit dem Satz: Die Erkrankung ist bisher nur in Ausnahmefällen durch eine allogene Stammzelltherapie heilbar. Die aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie basieren mehr und mehr auf der zielgerichteten Therapie durch die Hemmung der Signalübertragung des B-Zellrezeptors (Ibrutinib), sowie in der Regulierung des programmierten Zelltodes (Venetoclax), wie auch in den monoklonalen CD20-Antikörpern (Rituximab, Ofatumumab und Obinutuzumab) (Wendtner et al., 2019, S. 11-17). Speziell für den Einsatz von BH3 Mimetika als auch bezüglich der BCR assoziierten Therapieansätze sind bisher nur begrenzte (für Ibrutinib aber immerhin schon 5 Jahre) Langzeiterfahrungen verfügbar und somit bleibt die Frage nach einem kurativen Therapieansatz der CLL weiterhin (noch) offen. Aus diesem Grund werden in der vorliegenden Arbeit Versuche an primären CLL-Zellen durchgeführt um alternative Therapiemöglichkeiten zu erforschen.

Die Pathogenese der CLL ist entscheidend durch den Arrest der Zellen in der G0/G1 Phase im peripheren Blut, der proliferativen Aktivität innerhalb der Proliferationszentren und der Resistenz gegenüber Apoptose geprägt. Um therapeutisch erfolgreich zu sein, versucht man neue Erkenntnisse bzgl. der entsprechenden Pathomechanismen in die therapeutische Anwendung zu übertragen. Für die Vermittlung von Apoptose („point of no return“) spielen Mitglieder der Bcl-2 Familie eine entscheidende Rolle. Durch Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie wird die mitochondriale Integrität, respektiv das Überleben der Zelle, maßgeblich mit beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis der Expression von antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 u.a.) und proapoptotischen Mitgliedern (Bax, Bak, Bok u.a.) bei Tumoren für die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika eine wichtige Rolle spielt (Bannerji et al., 2003, S. 1466; Kitada et al., 1998, S. 3379). Aus diesen Erkenntnissen abgeleitet (die auch eine wichtige Rolle im Verständnis des Modells der Tumoraddiktion spielen (Weinstein & Joe, 2008, S. 3077)) wird aktuell klinisch der Einsatz von BH3 Mimetika wie Venetoclax (in der Vergangenheit auch Navitoclax) bei der Behandlung von CLL, Mantelzelllymphom, AML und weiteren Entitäten in klinischen Studien getestet bzw. bereits als zugelassene Substanz bei der CLL mit Nachweis einer 17p- und/oder TP53 Mutation nach Versagen einer BCR assoziierten Therapie, eingesetzt (Wendtner et al., 2019, S. 24). Dabei nutzt man die Signalweg-Addiktion der Tumorzelle bezüglich antiapoptotischer Bcl-2

Proteine. Für Tumorzellen, die für das Durchlaufen des programmierten Zelltodes (Apoptose) voraktiviert sind, lassen sich regelhaft membrangebundene Komplexe aus aktivierten Effektor Bcl-2 Proteinen wie Bax und Bak nachweisen, die durch antiapoptotische Proteine wie Bcl-2, Bcl-XL oder Mcl-1 „in Schach“ gehalten werden. Durch den Einsatz von BH3 Mimetika wie Venetoclax (Bcl-2), Navitoclax (Bcl-XL) oder auch neuen Mcl-1 Inhibitoren (AZD9551) kann durch eine Entthemung der prä - aktivierten Effektorproteine (durch kompetitive Verdrängung aus der Bindung mit einem antiapoptotischen Bcl-2 Protein) eine Oligomerisierung und konsekutiv Poren Formierung, Cytochrom C Freisetzung und Formierung des Apoptosoms nachgewiesen werden. Nicht voraktivierte Zellen werden durch die BH3 Mimetika in Stress versetzt. In der Regel weisen sie jedoch keine membrangebundenen und aktivierten Effektorproteine (Bax zytosolisch) auf. So ist die Sensitivität der nicht malignen Zellpopulation auf BH3 Mimetika deutlich niedriger. Dies ist ein zentrales Merkmal der zielgerichteten Wirkungsweise dieser Therapieformen. (Billard, 2012, S. 2032; Stilgenbauer et al., 2016, S. 768)

Eine weitere Möglichkeit das Gleichgewicht dieser Proteine zu beeinflussen, besteht in der Inhibition von Cyclin abhängigen Kinasen (CDK). Die unregulierte CDK-Aktivität führt unmittelbar zu einem Verlust der Zellzyklus-Kontrolle und zu einer erhöhten Expression antiapoptotischer Proteine (Lapenna & Giordano, 2009, S. 550). Studien zur CDK-Inhibition mittels diverser Inhibitoren an CLL-Zellen sind bereits veröffentlicht. Flavopiridol ist der erste bekannte Apoptoseinduktor der an CLL-Zellen untersucht wurde. Durch CDK9-Inhibition vermindert er die Transkription von Mcl-1 und Xiap (Chen & Plunkett, 2010, S. 159). Nach erfolgsversprechenden in vitro Versuchen scheiterten allerdings klinische Studien bzgl. Flavopiridol-Infusion an mangelnder therapeutischer Effektivität (Flinn et al., 2005, S. 1253). Auch der CDK-Inhibitor Roscovitin (Inhibition von CDK2 und CDK5) zeigte durch Herabregulation von Mcl-1, proapoptotische Wirkung (Meijer et al., 1997, S. 527). Er befindet sich derzeit in klinischen Studien.

Aufgrund der bisher mangelnden klinischen Effektivität der Inhibitoren wird in der vorliegenden Arbeit ein Inhibitor untersucht, der ein breites Spektrum an CDK inhibiert. Bay 1000394 (Roniciclib) inaktiviert die Zellzykluskinasen CDK1/Cyclin B, CDK2/Cyclin E, CDK4/Cyclin D und die Transkriptionskinasen CDK7/Cyclin H/MAT1 und CDK9/Cyclin T1 bereits für Konzentrationen im nanomolaren Bereich. Der Inhibitor wird aktuell in verschiedenen Studien getestet, bisher an soliden Tumoren wie Mamma-Ca, Ovarial-Ca, Lungen-Ca (Siemeister et al., 2012, S. 2265) oder beim anaplastischen Schilddrüsen-Carcinom

(Lin et al., 2017, S. 67990). Letztere Studien zeigen, dass Roniciclib im anaplastischen Schilddrüsenkarzinom programmierten Zelltod, speziell Apoptose auslöst, mit Beteiligung des intrinsischen und extrinsischen Signalweges, aber auch Zellen in der G2 Phase des Zellzyklus arretieren kann (Lin et al., 2017, S. 67995). Somit scheint der Inhibitor in Pathomechanismen einzugreifen, die essentiell für die Tumorgenese der CLL sind. Die Effekte in primären CLL-Zellen durch Bay 1000394 beinhalten eine Verschiebung des Equilibriums für Proteine der Bcl-2 Familie zugunsten der proapoptotischen Vertreter. Sowohl in G0/G1-arretierten Zellen als auch in proliferierenden CLL-Zellen (in vitro Modell) wird programmierter Zelltod, u.a. Apoptose induziert (Abb. 2). Wie schon für veröffentlichte Arbeiten zu Mamma-Ca, Ovarial-Ca, Lungen-Ca und anaplastisches Schilddrüsen-Ca beschrieben, sind Konzentrationen im nanomolaren Bereich wirksam.

Diverse Studien zeigen, dass erhöhte Konzentrationen der Apoptoseproteine Bcl-2, Mcl-1, XIAP bzw. ein verändertes Verhältnis von Bcl-2 zu Bax mit einem schlechten Ansprechen auf Chemotherapie bzw. mit einer kürzeren Remissionsphase bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen assoziiert ist (Aguilar-Santelises et al., 1996, S. 114; Kitada et al., 1998, S. 3379; Robertson et al., 1996, S. 456).

Das antiapoptotische Protein Mcl-1 ist sehr stark reguliert. Bei CLL-Zellen ist die Expression regelhaft erhöht nachweisbar. Es ist in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert und verhindert u.a. durch Bindung an proapoptotische Proteine wie Bax und Bak die Destabilisierung des Membranpotentials (durch Oligomerisierung von Bax/Bak u.a.) und damit die Initiierung der Apoptosekaskade. Eine erhöhte Konzentration wird als Risikofaktor für Chemotherapie Resistenz beschrieben (Awan et al., 2009, S. 535; Pepper et al., 2008, S. 3807). Bay 1000394 führt zu einer verminderten Expression von Mcl-1 (Abb 8).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zusätzlich eine starke Expression des proapoptotischen Protein Noxa. Das Gleichgewicht zwischen Noxa und Mcl-1 beeinflusst das Überleben oder Untergehen von zirkulierenden und proliferierenden CLL-Zellen. Änderungen in diesem Gleichgewicht aus pro- und antiapoptotischen Proteinen korrelieren mit einer unterschiedlichen Überlebenskapazität von malignen Zellen. Diese Veränderungen werden bereits bei Roscovitin-induzierter Apoptose in CLL-Zellen (Hallaert et al., 2007, S. 1958), bei Camptothecin in HeLa und H1299 Zellen (Mei et al., 2007, S. 871), sowie in der Glucose Limitation in proliferierenden T-Zellen beschrieben (Alves et al., 2006, S. 703).

Zusätzlich zeigen Studien, dass eine niedrige Mcl-1 Konzentration mit einer höheren Ansprechrate für Rituximab korreliert (Hussain et al., 2007, S. 2144). Somit könnte der Einsatz von Bay 1000394 sequenziell oder in Kombination mit anti CD 20 Antikörpern sinnvoll sein. Auch scheint die Konzentration des antiapoptotischen Proteins Xiap, gemessen vor Behandlung mit Rituximab, bei CLL Patienten assoziiert zu sein mit unterschiedlichem Therapieansprechen (Bannerji et al., 2003, S. 1466). Xiap hemmt direkt Caspase 3 und Caspase 7 (Deveraux et al., 1997, S. 300). Bay 1000394 führt zur verminderten Expression von Xiap und somit gegebenenfalls indirekt zur Aktivierung von Caspase 3.

Für das proapoptotische Protein Bax (full length 21kDa) zeigt sich im Verlauf der Inkubation eine neu auftretende 18 kDa Bande. Diese 18 kDa große Variante wird als Protein mit erhöhter proapoptotischer Aktivität im Vergleich zum 21 kDa Pendant beschrieben (Wood & Newcomb, 2000, S. 376). In der Veröffentlichung von Wood et al. wird vermutet, dass das p18 Bax gegebenenfalls die intrinsische Aktivität dieses Proteins und dadurch gleichzeitig die proapoptotische Wirkung von Bax erhöht (Wood & Newcomb, 2000, S. 376). Alternativ kann im Rahmen der Oligomerisierung auch eine Konformationsänderung oder möglicherweise Abspaltung eines Teils des p21 Proteins vermutet werden (Pritz et al., 2017, S. 962). Bay 1000394 hat keinen direkten Effekt auf die Expression von Bcl-2 (Vgl. Abb. 8). Dennoch verändert der CDK-Inhibitor durch Regulation/Aktivierung von Bax die Bcl-2/Bax Ratio.

Die beschriebenen Proteinveränderungen resultieren in der Aktivierung von Caspase 3, dem Effektorprotein der Apoptosemaschinerie. Die Aktivierung erfolgt entweder direkt via Caspase 8 über den extrinsischem Weg oder indirekt durch Herabregulation von XIAP. Bay 1000394 führt zudem zur Cleavage von Procaspase 9 (Vgl. Abb 9), was einer Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs entspricht. Die aktivierten Caspasen vermitteln die typischen morphologischen Veränderungen der Apoptose: Sie spalten Proteine des Zytoskeletts und Nukleus.

Da die verschiedenen Caspasen durch Bay 1000394 aktiviert werden, sollte die Vorinkubation der CLL-Zellen mit dem pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK eine Reduktion der Apoptoseaktivität zur Folge haben. Unsere Versuche zeigen allerdings, dass die Vorinkubation mit Z-VAD-FMK die Zahl annexinpositiver Zellen nur teilweise reduziert (Vgl. Abb. 9). Dies lässt den Schluss zu, dass Bay 1000394 andere, caspaseunabhängige Wege des Zelltodes der CLL-Zellen auslösen kann. Bereits 1999 beschreiben Borner et al. die Möglichkeit, dass charakteristische morphologische Merkmale der Apoptose, wie Zellschrumpfung und Kernkondensation, ohne Caspaseaktivierung auftreten können (Borner & Monney, 1999, S.

497). Auch für Abläufe der Apoptose bei Chronisch Lymphatischer Leukämie werden caspaseunabhängige Mechanismen beschrieben (Pettitt & Cawley, 2000, S. 800). Mechanismen dieser caspaseunabhängigen Apoptose sind Gegenstand der aktuellen Forschung und bisher nicht abschließend geklärt. In den meisten beschriebenen Arbeiten kann, analog zu unseren Ergebnissen, der Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK die mitochondrialen Veränderungen wie den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, ROS (Radical Oxygen Species) Generierung und Freisetzung von Faktoren wie Cytochrom C und AIF nicht komplett inhibieren. Die Weitervermittlung von Apoptose wird vermutlich durch andere Faktoren mit bedingt: AIF und Bax bzw. Bax-ähnliche Proteine. Wie diese Faktoren in Abwesenheit von Caspasen die Signaltransduktion steuern, ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt. Möglicherweise werden Proteasen wie das calciumabhängige Calpain oder das lysosomale Cathepsin aktiviert, welche ggf. Caspasen ersetzen können. Das lysosomale Cathepsin spaltet Bid, das den extrinsischen Weg der Apoptose mit steuert. Calpain spaltet Bax, das durch Porenformierung nach Oligomerisierung zum einen die Ausschüttung von Cytochrom C vermittelt, zum anderen auch Auswirkungen auf das endoplasmatische Retikulum und Chaperone zu haben scheint, und dadurch Zelltod vermitteln kann. (Herr & Debatin, 2001, S. 2605-2606)

Diese Ergebnisse könnten auch Ausdruck unserer Resultate sein (Bax (p18 Fragment) und Bid Cleavage (Vgl. Abb. 8).

Wagner et al. zeigen, dass die Expression von ZAP-70 bei CLL-Patienten unabhängig von der beschriebenen hohen Expression von Mcl-1 oder Bcl-2, durch Herabregulation von Bim, über die TLR-9 assoziierte Kinase Syk, Apoptose im Sinne einer pro survival Regulation beeinflusst (Wagner et al., 2016, S. 444-446). Im Rahmen unserer Versuche sehen wir bezüglich der Konzentration von Bim, Mcl-1 oder Bcl-2 keine Unterschiede in der Regulation in Abhängigkeit des ZAP-70 Status.

ZAP-70 exprimierenden CLL-Zellen wird durch vorgeschaltete Inkubation mit DSP30 ein pro survival Signal vermittelt, wohingegen ZAP-70 negative Zellen proapoptotisch auf die Vorinkubation mit DSP30 reagieren (Wagner et al., 2016, S. 437). In Bezug auf diese Arbeit zeigen unsere Versuche keine Unterschiede zwischen den Patientengruppen mit unterschiedlichen ZAP-70 Status hinsichtlich des Ansprechens auf Bay1000394. Somit scheint der ZAP-70 Status keine Auswirkung auf die Wirkung des CDK Inhibitors zu haben, im Gegensatz zu anderen experimentellen Therapien bei ZAP-70-positiven Patienten (Wiestner et al., 2003, S. 4944).

Die klonale CLL-Proliferation ist ein direkter Indikator für eine progressive Erkrankung, die mit einem schlechterem Verlauf verbunden ist (Messmer et al., 2005, S. 755). Lymphknoten, Knochenmark und Milz stellen wichtige Proliferationszentren dar, die zur Akkumulation der CLL beitragen (Dighiero & Hamblin, 2008, S. 1021). Decker et al. konnten zeigen, dass CLL-Zellen, koinkubiert mit CpG-Oligonukleotid DSP30 und IL-2, proliferativ aktiv werden (Decker et al., 2000). Wir untersuchen die Wirkung von Bay 1000394 in vitro sowohl auf unbehandelte CLL-Zellen als auch auf mit DSP30 und IL-2 stimulierte (proliferativ aktive) CLL-Zellen. Erhöht man die Dosis von Bay 1000394 auf 100 nM, reagieren stimulierte CLL-Zellen quantitativ vergleichbar (Annexin positiv), bezogen auf 20 nM Bay 1000394 für unstimulierten Zellen (Vgl. Abb. 12, 13). Dementsprechend lassen die in vitro Daten der vorliegenden Arbeit den Schluss zu, dass Bay 1000394 auch bei stimulierten, proliferierenden CLL-Zellen wirksam ist, wenn auch in höherer Dosis.

Unsere Versuche werden an primären CLL-Zellen in vitro durchgeführt. Unberücksichtigt dabei sind mögliche Interaktionen mit Zellen des Mikromileus v.A. in sogenannten Proliferationszentren. Seit langem ist bekannt, dass CLL-Zellen innerhalb dieses Microenvironments, das u.a. aus Knochenmarkstroma und T-Zellen gebildet wird, Zell-Zell-Kontakte unterhalten, die sich protektiv auf das Apoptoseverhalten der leukämischen Klone auswirken (Ghia et al., 2008, S. 550). Um diesen Effekt zu simulieren, koinkubieren wir die CLL-Zellen zusammen mit Stroma und Bay 1000394. Dies ist klinisch relevant, da CLL-Zellen im Knochenmark möglicherweise vor der Wirkung diverser konventioneller Chemotherapeutika oder zielgerichteter Medikamente geschützt sein könnten. In einer Konzentration von 100 nM zeigt der Inhibitor Bay1000394 eine quantitativ vergleichbare Wirksamkeit (Annexin Positivität, u.a.) für die CLL Population unter Stromakontakt, verglichen mit 20 nM bei unstimulierten CLL-Zellen ohne Stromakontakt. Somit scheint der „Schutz“ vor Apoptose durch „supportives Stroma“ durch höhere Konzentrationen (100 nM) des Inhibitors überwunden werden zu können.

Um die Spezifität der Therapie zu untersuchen, und auch um mögliche Nebenwirkungen abzuwägen, analysieren wir die Wirkung auf nicht maligne B-Zellen. Hierbei zeigt sich für die untersuchten Konzentrationen keine Aktivität von Bay 1000394 bei nicht malignen B-Zellen des peripheren Blutes. Demgegenüber ließ sich bei > 80% der CLL-Zellen durchflusszytometrisch eine Aktivität (Annexinpositivität) bei äquimolarer Konzentration des Inhibitors (Abb. 4) nachweisen.

Bei den gewählten Konzentrationen scheint Bay 1000394 elementare Signalwege von CLL Zellen signifikant zu beeinflussen, bei gleichzeitig begrenztem Einfluss auf normale B-Zellen. Wir sehen die Grundlage zu weiteren Untersuchungen dieses Inhibitors bei CLL gegeben.

In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass die Behandlung primärer CLL-Zellen mit dem Multikinaseinhibitor Bay 1000394 signifikant (Caspase-abhängig und -unabhängig) Apoptose (und vermutlich andere Formen des programmierten Zelltodes) auslöst, durch Beeinflussung entscheidender Signalwege der CLL. Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen wird der Weg Caspase-unabhängiger Apoptose bzw. die Frage nach weiteren alternativen programmierten „Cell Death“ Signalwegen, wie Ferroptose, Pyroptose oder Nekroptose weiter untersucht.

Unsere Ergebnisse legen die Erweiterung der Analysen von Bay 1000394 auf ein CLL-Xenograft-Maus-Modell (TCL1-Mausmodell) nahe, um mehr Erkenntnisse in vivo gewinnen zu können. Dies könnte letztlich die Grundlage sein, Roniciclib in klinische Studien der Phase 1 der CLL-Therapie aufzunehmen, um das Portfolio an zielgerichteten Substanzen in der Therapie der CLL sinnvoll zu ergänzen und zu erweitern.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse der in vitro Untersuchungen des Pan-CDK Inhibitors Bay 1000394 an primären Zellen von Patienten mit Chronisch Lymphatischer Leukämie (CLL) präsentiert.

Primäre CLL-Zellen werden mit Hilfe verschiedener durchflusszytometrischer Methoden (Annexin-V-Assay, DiOC6-Staining $\Delta\Psi_m$, Tunel-Assay) untersucht. Die Expression wichtiger Proteine in der Vermittlung des programmierten Zelltod (mit Fokus auf Apoptose) werden mittels Western Blot analysiert. Durch Koinkubation mit DSP30 und IL-2 wird zudem ein in vitro Stimulationsmodell für proliferierende CLL-Zellen untersucht. Außerdem werden CLL-Zellen auf „supportivem Stroma“ als Modell für die Interaktion mit dem Mikromileu in vivo analysiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass Bay 1000394 bereits im nanomolaren Bereich in primären CLL-Zellen programmierten Zelltod auslösen kann. Obwohl der Pan-Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK in der Lage ist die DNA-Doppelstrangbruchrate zu reduzieren, wird die Verschiebung der Zellen in den annexinpositiven Bereich als gemeinsame Endstrecke im Ablauf der Apoptose und auch anderer Formen des programmierten Zelltodes, nur teilweise beeinflusst. Daher scheint Bay 1000394 neben klassischer Apoptose auch weitere, caspaseunabhängigen Wege der Apoptose, oder nicht apoptotische Formen des programmierten Zelltodes auszulösen.

Die Tatsache, dass Bay 1000394 in der Lage ist Apoptose an ruhenden, proliferierenden und CLL-Zellen in Kontakt mit unterstützendem Stroma auszulösen, auf nicht maligne B-Zellen jedoch keine relevante Wirkung zeigt, legt weitere Versuche mit dem CDK-Inhibitor in Xenograft-Maus-Modellen bzw. im weiteren Verlauf in klinischen Studien nahe, um die Therapiemöglichkeiten dieser weiterhin noch in den meisten Fällen unheilbaren Krankheit weiter zu verbessern.

6. Literaturverzeichnis

- Aguilar-Santelises, M., Rottenberg, M. E., Lewin, N., Mellstedt, H., & Jondal, M. (1996). Bcl-2, Bax and p53 expression in B-CLL in relation to in vitro survival and clinical progression. *International journal of cancer*, *69*(2), 114–119. doi:10.1002/(sici)1097-0215(19960422)69:2<114::Aid-ijc8>3.0.Co;2-3
- Alves, N. L., Derks, I. A. M., Berk, E., Spijker, R., van Lier, R. A. W., & Eldering, E. (2006). The Noxa/Mcl-1 axis regulates susceptibility to apoptosis under glucose limitation in dividing T cells. *Immunity*, *24*(6), 703–716. doi:10.1016/j.immuni.2006.03.018
- Awan, F. T., Kay, N. E., Davis, M. E., Wu, W., Geyer, S. M., Leung, N., Jelinek, D. F., Tschumper, R. C., Secreto, C. R., Lin, T. S., Grever, M. R., Shanafelt, T. D., Zent, C. S., Call, T. G., Heerema, N. A., Lozanski, G., Byrd, J. C., & Lucas, D. M. (2009). Mcl-1 expression predicts progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia patients treated with pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab. *Blood*, *113*(3), 535–537. doi:10.1182/blood-2008-08-173450
- Ayaz, P., Andres, D., Kwiatkowski, D. A., Kolbe, C.-C., Lienau, P., Siemeister, G., Lücking, U., & Stegmann, C. M. (2016). Conformational Adaption May Explain the Slow Dissociation Kinetics of Roniciclib (BAY 1000394), a Type I CDK Inhibitor with Kinetic Selectivity for CDK2 and CDK9. *ACS chemical biology*, *11*(6), 1710–1719. doi:10.1021/acscchembio.6b00074
- Bannerji, R., Kitada, S., Flinn, I. W., Pearson, M., Young, D., Reed, J. C., & Byrd, J. C. (2003). Apoptotic-regulatory and complement-protecting protein expression in chronic lymphocytic leukemia: Relationship to in vivo rituximab resistance. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *21*(8), 1466–1471. doi:10.1200/jco.2003.06.012
- Berger, D. P., & Mertelsmann, R. (2017). *Das Rote Buch: Hämatologie und Internistische Onkologie* (6th ed. ed.). Heidelberg: Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm.
- Bergsbaken, T., Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: Host cell death and inflammation. *Nature reviews. Microbiology*, *7*(2), 99–109. doi:10.1038/nrmicro2070.
- Billard, C. (2012). Design of novel BH3 mimetics for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, *26*(9), 2032–2038. doi:10.1038/leu.2012.88
- Binet, J. L., 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, M. T., Monconduit, M., Belabbes, S., & Gremy, F. (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate

- survival analysis. *Cancer*, 48(1), 198–206. doi:10.1002/1097-0142(19810701)48:1<198::aid-cnrc2820480131>3.0.co;2-v
- Borner, C., & Monney, L. (1999). Apoptosis without caspases: An inefficient molecular guillotine? *Cell death and differentiation*, 6(6), 497–507. doi:10.1038/sj.cdd.4400525
- Bowles, P. H. J., & Clarke, N.-C. K. L. (2015). Palbociclib: A New Option for Front-Line Treatment of Metastatic, Hormone Receptor–Positive, HER2-Negative Breast Cancer. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology*, 6(6), 577–581. doi:10.6004/jadpro.6.6.6
- Cantwell, M., Hua, T., Pappas, J., & Kipps, T. J. (1997). Acquired CD40-ligand deficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Nature medicine*, 3(9), 984–989. doi:10.1038/nm0997-984
- Chen, R., & Plunkett, W. (2010). Strategy to induce apoptosis and circumvent resistance in chronic lymphocytic leukaemia. *Best practice & research. Clinical haematology*, 23(1), 155–166. doi:10.1016/j.beha.2010.01.003
- Chi, X., Pemberton, J., Nguyen, D., Osterlund, E. J., Liu, Q., Brahmabhatt, H., Zhang, Z., Lin, J., Leber, B., & Andrews, D. (2019). The carboxyl-terminal sequence of Bim enables Bax activation and killing of unprimed cells. *bioRxiv*, 1-51. doi:10.1101/554907
- Cho, B. C., Dy, G. K., Govindan, R., Kim, D.-W., Pennell, N. A., Zalcman, G., Besse, B., Kim, J.-H., Koca, G., Rajagopalan, P., Langer, S., Ocker, M., Nogai, H., & Barlesi, F. (2018). Phase Ib/II study of the pan-cyclin-dependent kinase inhibitor roniciclib in combination with chemotherapy in patients with extensive-disease small-cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 123, 14–21. doi:10.1016/j.lungcan.2018.04.022
- Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S. L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S. M., Schulman, P., Vinciguerra, V. P., Rai, K. R., Ferrarini, M., & Chiorazzi, N. (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94(6), 1840–1847.
- Decker, T., Schneller, F., Kronschnabl, M., Dechow, T., Lipford, G. B., Wagner, H., & Peschel, C. (2000). Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells. *Experimental Hematology*, 28(5), 558–568. doi:10.1016/s0301-472x(00)00144-2
- Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., & Reed, J. C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, 388(6639), 300–304. doi:10.1038/40901

- Diehl, L. F., & Ketchum, L. H. (1998). Autoimmune disease and chronic lymphocytic leukemia: Autoimmune hemolytic anemia, pure red cell aplasia, and autoimmune thrombocytopenia. *Seminars in oncology*, *25*(1), 80–97.
- Dighiero, G., & Hamblin, T. J. (2008). Chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet*, *371*(9617), 1017–1029. doi:10.1016/s0140-6736(08)60456-0
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, *149*(5), 1060–1072. doi:10.1016/j.cell.2012.03.042.
- Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Kröber, A., Bullinger, L., Döhner, K., Bentz, M., & Lichter, P. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, *343*(26), 1910–1916. doi:10.1056/nejm200012283432602
- Flinn, I. W., Byrd, J. C., Bartlett, N., Kipps, T., Gribben, J., Thomas, D., Larson, R. A., Rai, K., Petric, R., Ramon-Suarez, J., Gabilove, J., & Grever, M. R. (2005). Flavopiridol administered as a 24-hour continuous infusion in chronic lymphocytic leukemia lacks clinical activity. *Leukemia research*, *29*(11), 1253–1257. doi:10.1016/j.leukres.2005.03.010
- Fuchs, Y., & Steller, H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, *147*(4), 742–758. doi:10.1016/j.cell.2011.10.033.
- Ghia, P., Chiorazzi, N., & Stamatopoulos, K. (2008). Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: The role of antigen stimulation. *Journal of internal medicine*, *264*(6), 549–562. doi:10.1111/j.1365-2796.2008.02030.x
- Gobessi, S., Laurenti, L., Longo, P. G., Sica, S., Leone, G., & Efremov, D. G. (2007). ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood*, *109*(5), 2032–2039. doi:10.1182/blood-2006-03-011759
- Hallaert, D. Y. H., Spijker, R., Jak, M., Derks, I. A. M., Alves, N. L., Wensveen, F. M., Boer, J. P. d., Jong, D. d., Green, S. R., van Oers, M. H. J., & Eldering, E. (2007). Crosstalk among Bcl-2 family members in B-CLL: Seliciclib acts via the Mcl-1/Noxa axis and gradual exhaustion of Bcl-2 protection. *Cell death and differentiation*, *14*(11), 1958–1967. doi:10.1038/sj.cdd.4402211
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57–70. doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Herr, I., & Debatin, K.-M. (2001). Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*, 98(9), 2603–2614. doi:10.1182/blood.V98.9.2603
- Holcik, M., Gibson, H., & Korneluk, R. G. (2001). XIAP: Apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 6(4), 253–261. doi:10.1023/a:1011379307472
- Hussain, S.-R. A., Cheney, C. M., Johnson, A. J., Lin, T. S., Grever, M. R., Caligiuri, M. A., Lucas, D. M., & Byrd, J. C. (2007). Mcl-1 is a relevant therapeutic target in acute and chronic lymphoid malignancies: Down-regulation enhances rituximab-mediated apoptosis and complement-dependent cytotoxicity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(7), 2144–2150. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-06-2294
- Jiang, L., Kon, N., Li, T., Wang, S.-J., Su, T., Hibshoosh, H., Baer, R., & Gu, W. (2015). Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature*, 520(7545), 57–62. doi:10.1038/nature14344.
- Kater, A. P., Seymour, J. F., Hillmen, P., Eichhorst, B., Langerak, A. W., Owen, C., Verdugo, M., Wu, J., Punnoose, E. A., Jiang, Y., Wang, J., Boyer, M., Humphrey, K., Mobasher, M., & Kipps, T. J. (2018). Fixed Duration of Venetoclax-Rituximab in Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia Eradicates Minimal Residual Disease and Prolongs Survival: Post-Treatment Follow-Up of the MURANO Phase III Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 1-18. doi:10.1200/jco.18.01580
- Kitada, S., Andersen, J., Akar, S., Zapata, J. M., Takayama, S., Krajewski, S., Wang, H. G., Zhang, X., Bullrich, F., Croce, C. M., Rai, K., Hines, J., & Reed, J. C. (1998). Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: Correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood*, 91(9), 3379–3389.
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G. A., Mattioli, M., Cattoretti, G., Husson, H., Freedman, A., Inghirami, G., Cro, L., Baldini, L., Neri, A., Califano, A., & Dalla-Favera, R. (2001). Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *The Journal of experimental medicine*, 194(11), 1625–1638. doi:10.1084/jem.194.11.1625

- Labi, V., Erlacher, M., Kiessling, S., & Villunger, A. (2006). BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy. *Cell death and differentiation*, *13*(8), 1325–1338. doi:10.1038/sj.cdd.4401940
- Lapenna, S., & Giordano, A. (2009). Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature reviews. Drug discovery*, *8*(7), 547–566. doi:10.1038/nrd2907
- Lin, S.-F., Lin, J.-D., Hsueh, C., Chou, T.-C., & Wong, R. J. (2017). Effects of roniciclib in preclinical models of anaplastic thyroid cancer. *Oncotarget*, *8*(40), 67990–68000. doi:10.18632/oncotarget.19092
- Mato, A. R., Hill, B. T., Lamanna, N., Barr, P. M., Ujjani, C. S., Brander, D. M., Howlett, C., Skarbnik, A. P., Cheson, B. D., Zent, C. S., Pu, J. J., Kiselev, P., Foon, K., Lenhart, J., Henick Bachow, S., Winter, A. M., Cruz, A.-L., Claxton, D. F., Goy, A., Daniel, C., Isaac, K., Kennard, K. H., Timlin, C., Fanning, M., Gashonia, L., Yacur, M., Svoboda, J., Schuster, S. J., & Nabhan, C. (2017). Optimal sequencing of ibrutinib, idelalisib, and venetoclax in chronic lymphocytic leukemia: Results from a multicenter study of 683 patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, *28*(5), 1050–1056. doi:10.1093/annonc/mdx031
- Mei, Y., Xie, C., Xie, W., Tian, X., Li, M., & Wu, M. (2007). Noxa/Mcl-1 balance regulates susceptibility of cells to camptothecin-induced apoptosis. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *9*(10), 871–881. doi: 10.1593/neo.07589
- Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Chong, J. P. J., Blow, J. J., Inagaki, N., Inagaki, M., Delcros, J.-G., & Moulinoux, J.-P. (1997). Biochemical and Cellular Effects of Roscovitine, a Potent and Selective Inhibitor of the Cyclin-Dependent Kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *European Journal of Biochemistry*, *243*(1-2), 527–536. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.t01-2-00527.x
- Messmer, B. T., Messmer, D., Allen, S. L., Kolitz, J. E., Kudalkar, P., Cesar, D., Murphy, E. J., Koduru, P., Ferrarini, M., Zupo, S., Cutrona, G., Damle, R. N., Wasil, T., Rai, K. R., Hellerstein, M. K., & Chiorazzi, N. (2005). In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of clinical investigation*, *115*(3), 755–764. doi:10.1172/jci23409
- Montserrat, E., Viñolas, N., Reverter, J. C., Rovira, M., & Rozman, C. (1991). "Smouldering" Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia & lymphoma*, *5 Suppl 1*, 183–187. doi:10.3109/10428199109103403

- Morizane, Y., Honda, R., Fukami, K., & Yasuda, H. (2005). X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO. *Journal of biochemistry*, *137*(2), 125–132. doi:10.1093/jb/mvi029
- O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Hausmann, G., Adams, J. M., Cory, S., & Huang, D. C. (1998). Bim: A novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *The EMBO journal*, *17*(2), 384–395. doi:10.1093/emboj/17.2.384
- Packham, G., & Stevenson, F. K. (2005). Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*, *114*(4), 441–449. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02117.x
- Pepper, C., Lin, T. T., Pratt, G., Hewamana, S., Brennan, P., Hiller, L., Hills, R., Ward, R., Starczynski, J., Austen, B., Hooper, L., Stankovic, T., & Fegan, C. (2008). Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood*, *112*(9), 3807–3817. doi:10.1182/blood-2008-05-157131
- Pettitt, A. R., & Cawley, J. C. (2000). Caspases influence the mode but not the extent of cell death induced by purine analogues in chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*, *109*(4), 800–804. doi:10.1046/j.1365-2141.2000.02068.x
- Pritz, J. R., Wachter, F., Lee, S., Luccarelli, J., Wales, T. E., Cohen, D. T., Coote, P., Heffron, G. J., Engen, J. R., Masefski, W., & Walensky, L. D. (2017). Allosteric sensitization of proapoptotic BAX. *Nature chemical biology*, *13*(9), 961–967. doi:10.1038/nchembio.2433
- Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A. D., Levy, R. N., & Pasternack, B. S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *46*(2), 219–234. doi:10.1182/blood-2016-08-737650
- Rassow, J. (2012). *Biochemie: Mit 67 Tabellen ; [mit Stoffwechselweg-Animationen]* (3., vollst. überarb. u. erw. Aufl. ed.). Stuttgart: Thieme.
- Robertson, L. E., Plunkett, W., McConnell, K., Keating, M. J., & McDonnell, T. J. (1996). Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia*, *10*(3), 456–459.
- Rosenwald, A., Alizadeh, A. A., Widhopf, G., Simon, R., Davis, R. E., Yu, X., Yang, L., Pickeral, O. K., Rassenti, L. Z., Powell, J., Botstein, D., Byrd, J. C., Grever, M. R., Cheson, B. D., Chiorazzi, N., Wilson, W. H., Kipps, T. J., Brown, P. O., & Staudt, L. M. (2001). Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation

- genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine*, 194(11), 1639–1647. doi:10.1084/jem.194.11.1639
- Schmoll, H.-J., Höffken, K., & Possinger, K. (2006). *Kompendium internistische Onkologie: Standards in Diagnostik und Therapie* (Vierte, völlig überarbeitete und erweiterte Auflage ed.). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Seiffert, M., Dietrich, S., Jethwa, A., Glimm, H., Lichter, P., & Zenz, T. (2012). Exploiting biological diversity and genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 53(6), 1022–1031. doi:10.3109/10428194.2011.631638
- Siemeister, G., Lücking, U., Wengner, A. M., Lienau, P., Steinke, W., Schatz, C., Mumberg, D., & Ziegelbauer, K. (2012). BAY 1000394, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, with potent antitumor activity in mono- and in combination treatment upon oral application. *Molecular cancer therapeutics*, 11(10), 2265–2273. doi:10.1158/1535-7163.Mct-12-0286
- Siemeister, G., Luecking, U., Wagner, C., Detjen, K., Mc Coy, C., & Bosslet, K. (2006). Molecular and pharmacodynamic characteristics of the novel multi-target tumor growth inhibitor ZK 304709. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 60(6), 269–272. doi:10.1016/j.biopha.2006.06.003
- Stilgenbauer, S., Eichhorst, B., Schetelig, J., Coutre, S., Seymour, J. F., Munir, T., Puvvada, S. D., Wendtner, C.-M., Roberts, A. W., Jurczak, W., Mulligan, S. P., Böttcher, S., Mobasher, M., Zhu, M., Desai, M., Chyla, B., Verdugo, M., Enschede, S. H., Cerri, E., Humerickhouse, R., Gordon, G., Hallek, M., & Wierda, W. G. (2016). Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: A multicentre, open-label, phase 2 study. *The Lancet Oncology*, 17(6), 768–778. doi:10.1016/s1470-2045(16)30019-5
- Strasser, A. (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 5(3), 189–200. doi:10.1038/nri1568
- Vucicevic, K., Jakovljevic, V., Colovic, N., Tosic, N., Kostic, T., Glumac, I., Pavlovic, S., Karan-Djurasevic, T., & Colovic, M. (2016). Association of Bax Expression and Bcl2/Bax Ratio with Clinical and Molecular Prognostic Markers in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of medical biochemistry*, 35(2), 150–157. doi:10.1515/jomb-2015-0017
- Wagner, M., Oelsner, M., Moore, A., Götte, F., Kuhn, P.-H., Haferlach, T., Fiegl, M., Bogner, C., Baxter, E. J., Peschel, C., Follows, G. A., & Ringshausen, I. (2016). Integration of

- innate into adaptive immune responses in ZAP-70-positive chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 127(4), 436–448. doi:10.1182/blood-2015-05-646935
- Weinstein, I. B., & Joe, A. (2008). Oncogene addiction. *Cancer research*, 68(9), 3077-3080; discussion 3080. doi:10.1158/0008-5472.Can-07-3293
- Wendtner, C.-M., Dreger, P., Eichhorst, B., Gregor, M., Greil, R., Hallek, M., Knauf, W. U., Pritzkuleit, R., Schetelig, J., Stilgenbauer, S., Wörmann, B., & Zenz, T. (2019). Chronische Lymphatische Leukämie (CLL). 1-30.
- Wiestner, A., Rosenwald, A., Barry, T. S., Wright, G., Davis, R. E., Henrickson, S. E., Zhao, H., Ibbotson, R. E., Orchard, J. A., Davis, Z., Stetler-Stevenson, M., Raffeld, M., Arthur, D. C., Marti, G. E., Wilson, W. H., Hamblin, T. J., Oscier, D. G., & Staudt, L. M. (2003). ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*, 101(12), 4944–4951. doi:10.1182/blood-2002-10-3306
- Wong, R. S. Y. (2011). Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 30:87, 1-14. doi:10.1186/1756-9966-30-87
- Wood, D. E., & Newcomb, E. W. (2000). Cleavage of Bax enhances its cell death function. *Experimental cell research*, 256(2), 375–382. doi:10.1006/excr.2000.4859
- Xu, Z.-S., Zhang, J.-S., Zhang, J.-Y., Wu, S.-Q., Xiong, D.-L., Chen, H.-J., Chen, Z.-Z., & Zhan, R. (2015). Constitutive activation of NF-κB signaling by NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology reports*, 33(4), 1609–1614. doi:10.3892/or.2015.3762
- Zhang, Z., Chen, S., Chen, S., Chen, G., Zhang, R., Li, J., & Qu, J. (2017). SF3B1 mutation is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia: A meta-analysis. *Oncotarget*, 8(41), 69916–69923. doi:10.18632/oncotarget.19455.
- Zhou, W., & Yuan, J. (2014). Necroptosis in health and diseases. *Seminars in cell & developmental biology*, 35, 14–23. doi:10.1016/j.semcdb.2014.07.013.