

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

III. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar

**Bedeutung des Stromasupports für die
Apoptoseregulation durch Mcl-1 und Proteinkinase C in CLL-Zellen**

Benedikt M. J. Lampl

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. I. Ringshausen
2. Univ.-Prof. Dr. A. Krackhardt

Die Dissertation wurde am 13.09.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 09.02.2011 angenommen.

PATRI

Zusammenfassung

Die chronische lymphatische B-Zell-Leukämie (B-CLL) ist im Wesentlichen durch einen Apoptosedefekt monoklonaler B-Lymphozyten gekennzeichnet. Die antiapoptotischen Proteine Bcl-2, Mcl-1 und XIAP sind in CLL-Zellen gegenüber gesunden B-Zellen überexprimiert, wobei Bcl-2 in letzteren beinahe nicht detektierbar ist. In den leukämischen B-Zellen wird unabhängig von der Bcl-2-Konzentration Apoptose induziert, sie ist vielmehr mit einem Expressionsverlust von Mcl-1 und in geringerem Maße von XIAP assoziiert. Mcl-1 seinerseits wird von den Enzymen PI3K und PKC δ reguliert: Eine Hemmung der PI3K durch den Inhibitor LY 294002 resultiert in verminderten Mcl-1-Leveln. Dabei handelt es sich nicht um eine direkte Regulation, sondern um eine sekundären Degradation nach Caspasenaktivierung. Bcl-2 wird von einer Hemmung der PI3K nicht tangiert, seine Expressionslevel bleiben wie auch bei Behandlung mit unterschiedlichen proapoptotischen Agenzien im Gegensatz zu Mcl-1 (und XIAP) stabil.

In Knock-down-Experimenten mit Mcl-1-spezifischer siRNA lassen sich höhere Apoptoseraten erzielen, die aber in den durchgeführten Apoptose-Assays eine Differenz von 15 % im Vergleich zur Kontrolle nicht überschreiten. Daraus ergibt sich, dass Mcl-1 für den Apoptosedefekt unbestreitbar Relevanz besitzt, aber nicht der alleinige antiapoptotische Faktor sein kann. Zudem ist die Bedeutung anderer Proteine wie beispielsweise Bcl-2 und XIAP bisher ungenügend verstanden.

Neben der PKC δ scheinen auch andere Isoformen für die CLL von Bedeutung zu sein. In Kokultur-Experimenten mit CLL- und Knochenmarkstromazellen reduzieren die PKC-Inhibitoren Bisindolylmaleimide I, Gö 6976 und Gö 6983 die Anzahl vitaler CLL-Zellen. Dies lässt sich sowohl mit der murinen Zelllinie Ltk⁻ wie auch mit primären humanen Stromazellen zeigen. Besonders wirksam ist die Substanz Gö 6976, was auf eine Relevanz des Isoenzym PKC β schließen lässt. PKC β wird in der Kokultur auf Seiten der CLL induziert, eine Hemmung führt zu verminderten Proteinleveln von Mcl-1 und XIAP sowie zu signifikant erhöhter Apoptose. Die Wirkung der Inhibitoren auf das Überleben der Stromazellen allein ist relativ gering, inwieweit die Substanzen in die Interaktionen zwischen CLL- und Stromazellen in der Kokultur eingreifen und ob der vermehrte Zelluntergang auf Seiten der CLL auf additiven Effekten innerhalb beider Zellarten beruht, ist bisher unklar.

Summary

Chronic B-lymphocytic Leucaemia (B-CLL) is essentially characterized by an apoptotic defect of monoclonal lymphocytic B-cells. The antiapoptotic proteins Bcl-2, Mcl-1 and XIAP are overexpressed in CLL cells comparing to normal B cells, Bcl-2 is virtually not detectable in B cells. Leucaemic cells induce apoptosis independently on Bcl-2 levels, whereas decrease of Mcl-1 and – to a lower extent – XIAP is associated with a higher amount of apoptotic cells. Mcl-1 is regulated by PI3K and PKC δ : Inhibition of PI3K by LY 294002 results in reduced levels of Mcl-1. This effect is not based on direct regulation but on secondary degradation after caspase activation. PI3K inhibition does not affect Bcl-2 concentration, it is stably expressed even after treatment with different proapoptotic agents while Mcl-1 (and XIAP) decreases.

Knock-down of Mcl-1 with specific siRNA leads to a higher percentage of apoptotic cells, which is not more than 15 % in comparison to mock-transfected cells according to apoptosis assays. Thus Mcl-1 is of undeniable importance for the defective apoptosis in CLL but not the crucial factor alone. Moreover the understanding of what other proteins like Bcl-2 and XIAP do is not sufficient yet.

It seems clear that PKC δ is not the only relevant isoform in CLL. The PKC inhibiting agents Bisindolylmaleimide I, Gö 6976 and Gö 6983 reduce the amount of viable CLL cells in experiments containing co-culturing of leucaemic B cells and bone marrow stromal cells using the murine cell line Ltk \bar{c} as well as primary human stromal cells. Gö 6976 is particularly effective, thus PKC β appears to be relevant. This isoform is induced in CLL cells when cultured with stromal cells, its inhibition leads to decreased levels of Mcl-1 and XIAP and significantly elevated apoptosis. The PKC inhibitors hardly affect stromal cells alone but it has neither become clear, how these agents function within the interactions between CLL and stromal cells nor, if the higher extinction of leucaemic cells is based on an additive effect on both, CLL and stromal cells.

0 Verzeichnisse

0.1 Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Summary	VII
0 Verzeichnisse	IX
0.1 Inhaltsverzeichnis	IX
0.2 Abbildungsverzeichnis	XI
0.3 Abkürzungsverzeichnis	XII
1 Einführung	1
1.1 Molekularbiologische Charakteristika der chronischen lymphatischen Leukämie	1
1.2 Apoptose und CLL	3
1.2.1 Apoptose: Der programmierte Zelltod	3
1.2.2 Ablauf der Apoptoseaktivierung	4
1.2.3 Apoptoseproteine	5
1.2.4 Apoptosedefekt in der CLL: Rolle von Bcl-2, Mcl-1 und XIAP	7
1.3 Proteinkinase C und ihre Bedeutung für die CLL	8
2 Fragestellung und Vorgehensweise	11
3 Material und Methoden	13
3.1 Allgemeine Materialien	13
3.2 Zellen.....	14
3.3 Separation primärer Zellen	15
3.4 Zellkultur	17
3.5 Bestrahlung und Mitomycin-C-Behandlung der murinen Zelllinie Ltk ⁺	19
3.6 siRNA-Transfektion.....	20
3.7 Trypanblau-Färbung/Zellzählung	21
3.8 Durchflusszytometrie	22
3.8.1 Annexin-V-/Propidium-Jodid-Färbung.....	23
3.8.2 $\Delta\psi$ -Assay.....	24
3.8.3 Bax-Färbung.....	24
3.8.4 Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzahl	25
3.9 Western-Blot.....	27
3.10 In den Experimenten verwendete Agenzien	33

4	Versuche und Ergebnisse	35
4.1	Expression und Regulation von Bcl-2, Mcl-1 und XIAP	35
4.1.1	Basale Expression in CLL-Zellen und gesunden B-Zellen.....	35
4.1.2	Reaktion antiapoptotischer Proteine auf verschiedene proapoptotische Agenzien.....	36
4.1.3	Regulation von Mcl-1 durch PI3-Kinase und PKC δ	39
4.1.3.1	Dosistitration von LY 294002 und Rottlerin	39
4.1.3.2	Koinkubation mit LY 294002 und Z-VAD.FMK	40
4.1.4	Knock-down von Mcl-1.....	42
4.2	Bedeutung der Proteinkinase C in der Kokultur mit Knochenmarkstroma	46
4.2.1	Protektiver Effekt von Ltk $^{-}$ auf CLL-Zellen	46
4.2.2	Proliferationshemmung von Ltk $^{-}$ – Etablierung der Mitomycin-C-Behandlung..	47
4.2.3	Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzahl	51
4.2.4	Wirkung von PKC-Inhibitoren in der Kokultur mit der Zelllinie Ltk $^{-}$	52
4.2.5	Wirkung der PKC-Inhibitoren in der Kokultur mit humanem Primärstroma	54
4.2.6	Effekt der PKC-Inhibitoren auf primäre Stromazellen.....	56
4.2.7	Basale Expression der antiapoptotischen Proteine in der Kokultur mit humanem Primärstroma	58
4.2.8	Wirkung von Gö 6976 auf antiapoptotische Proteine und Apoptose in der Kokultur mit humanem Primärstroma.....	60
5	Diskussion	63
5.1	Bedeutung und Regulation von Mcl-1	63
5.2	Bedeutung der PKC in der Kokultur mit Knochenmarkstroma.....	65
6	Anhang	69
6.1	Literaturverzeichnis.....	69
6.2	Danksagung	75
6.3	Curriculum vitae.....	77

0.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Apoptoseproteine und ihre Funktion.	5
Abb. 2: Isoformen der PKC.	9
Abb. 3: Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzahl.....	26
Abb. 4: Basale Expression von Bcl-2, Mcl-1 und XIAP in CLL-Zellen und gesunden B-Zellen	35
Abb. 5: Wirkung verschiedener proapoptotischer Agenzien auf CLL-Zellen.	37
Abb. 6: Synopsis der Annexin-V-Messungen nach 24 h an den Zellen fünf verschiedener Patienten.	38
Abb. 7: Dosistitration von LY 294002 und Rottlerin.	40
Abb. 8: Regulation der Apoptoseproteine durch PI3-Kinase: Wirkung des PI3-Kinase- Inhibitors LY 294002 mit und ohne den Caspase-Inhibitor Z-VAD.FMK.....	41
Abb. 9: Mcl-1-Knock-down mit spezifischer siRNA.....	43
Abb. 10: Mcl-1-Knock-down an verschiedenen Patienten.	44
Abb.11: Protektiver Effekt der murinen Fibroblastenzelllinie Ltk ⁻ auf CLL-Zellen.....	46
Abb. 12: Vergleich der Wirkung von Bestrahlung und Mitomycin-C-Behandlung auf die murine Stromazelllinie Ltk ⁻ : Trypanblau-Färbung.....	48
Abb. 13: Veränderung der Morphologie der Ltk ⁻ - Zellen nach Mitomycin-C-Behandlung	49
Abb. 14: Vergleich der protektiven Wirkung unbehandelter und Mitomycin-C-behandelter Ltk ⁻ - Zellen auf CLL-Zellen.....	50
Abb. 15: Messprobleme bei der Bestimmung der Anzahl CD19-positiver Zellen.....	51
Abb. 16: Dosistitration von Bisindolylmaleimide I (BIS I), Gö 6976 und Gö 6983	53
Abb. 17: Wirkung von Bisindolylmaleimide I, Gö 6976 und Gö 6983 in der Kokultur mit humanem Primärstroma (10 d).....	54
Abb. 18: Wirkung des PKC-Inhibitors Gö 6976 auf CLL-Zellen in Kokultur mit humanem Primärstroma.....	55
Abb. 19: Wirkung der PKC-Inhibitoren auf primäre Stromazellen.....	57
Abb. 20: Support und basale Expression der antiapoptotischen Proteine in der Kokultur mit humanem Primärstroma.....	59
Abb. 21: Effekt von Gö 6976 auf CLL-Zellen in der Kokultur mit humanem Primärstroma: Expression von Apoptoseproteinen und Apoptose.....	61

0.3 Abkürzungsverzeichnis

A

A1	= Bcl-2A1
abl	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
AKT	= PKB
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata

B

Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bbc3	Bcl-2 binding component 3 (= PUMA)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-2A1	Bcl-2-related protein A1
Bcl-G	Bcl-Gonad
Bcl-X _L	Bcl-2-related protein X (long)
Bcl-w	Apoptosis regulator Bcl-w
bcr	Breakpoint cluster region
Bfk	Bcl-2 family kin
BH	Bcl-2 homology
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bik	BCL2-interacting killer
Bim	Bcl-2-interacting mediator of cell death
Blk	Bik-like (= Bik)
BlyS	B-lymphocyte Stimulator
Bmf	Bcl2 modifying factor
Bod	Bcl-2-related ovarian death agonist
Bok	Bcl-2-related ovarian killer
BSA	Bovine serum albumin

C

CD	Cluster of differentiation
CD40L	CD40-Ligand

Cdk2 Cyclin dependent kinase 2
cIAP1 Cellular inhibitor of apoptosis protein 1

D

DAG Diacylglycerol
DiOC₆ 3,3'-Dihexyloxacarbocyanino-Iodid
DMSO Dimethylsulfoxid
DP5 Death protein 5 (= Hrk)
DTT Dithiothreitol

E

EDTA Ethylendiamintetraacetat

F

FACS Fluorescence activated cell sorting
Fas Fibroblast associated
FCS Fetal calf serum
FITC Fluoresceinisothiocyanat
FMC7 Flinders Medical Center 7

G

G-Phase Gap-Phase

H

HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
Hrk Harakiri (= DP5)

I

IAP Inhibitor of apoptosis protein
IgV_H Immunoglobulin variable heavy chain

J

JAK Janus-Kinase / "Just another kinase"

M

Mcl-1 Myeloid cell leukemia sequence 1
MEM Minimum Essential Medium

Mtd Matador (= Bok)
MAPK Mitogen activated protein kinase

N

Nbk Natural born killer (= Bik/Blk)
NF κ B Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells

P

PBS Phosphate buffered saline
PI3K Phosphoinositid-3 kinase
PKB Proteinkinase B
PKC Proteinkinase C
PMA Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid
PUMA p53 upregulated modulator of apoptosis

R

RPMI Roswell Park Memorial Institute

S

SDS Sodium dodecyl sulfate
slg Soluble immunoglobulin
siRNA small interfering RNA
STAT Signal transducers and activator of transcription / Signal transduction and transcription protein

T

TEMED Tetramethylethyldiamin
TNF- α Tumor-Nekrose-Faktor α
TRIS Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

X

XIAP X-linked inhibitor of apoptosis protein

Z

ZAP-70 Zeta-chain-associated protein kinase 70

1 Einführung

1.1 Molekularbiologische Charakteristika der chronischen lymphatischen Leukämie

Aus vielerlei Gründen kann die chronische lymphatische B-Zell-Leukämie (B-CLL) als eine Erkrankung *sui generis* bezeichnet werden, die klinisch mit großer Heterogenität imponiert und durch komplexe molekularbiologische Alterationen gekennzeichnet ist. Dabei ist die CLL die häufigste Leukämie des Erwachsenen in der westlichen Welt und betrifft v.a. ältere Menschen ab der fünften Lebensdekade¹.

Die Einzigartigkeit der Entität besteht nicht zuletzt darin, dass bisher keine einzelne Mutation gefunden wurde, in der man – wie bei anderen B-Zell-Lymphomen oder der CML (bcr-abl-Translokation) – die Ursache für die Entartung erkennen kann². Auch wenn sich in jüngster Zeit Hinweise verdichten, dass der Entstehung der CLL als pathogenetisches *primum movens* eine Stimulation durch (Auto-)Antigene in einer frühen Phase der B-Zell-Reifung zugrunde liegt³, ist die Forschung von einem suffizienten Verständnis der formalen und kausalen Pathogenese noch weit entfernt. Der bereits erwähnten klinischen Heterogenität entspricht eine ebenso hohe Variabilität der Zellen einzelner Patienten hinsichtlich ihres Verhaltens *in vitro*, was generelle Aussagen über das Verhalten der CLL an sich erschwert.

Die CLL lässt sich auf Grund der reif erscheinenden monoklonalen B-Zellen, die anerg bzw. autoreaktiv sind und nonfunktionale Immunglobuline synthetisieren, als indolentes (niedrigmalignes) Lymphom klassifizieren⁴, das folgende spezifische Oberflächenmarker exprimiert: CD19, CD5, CD23, CD52 und CD20. Dagegen sind CD22, FMC 7, CD79b (Element des B-Zell-Rezeptor-Signalweges), sIgM und sIgD auf diesen Zellen gar nicht oder nur in geringem Maße vorhanden. Die primär geringe Aggressivität der Erkrankung liegt möglicherweise in einem Zellzyklusarrest in der G₁/G₀-Phase⁵ begründet, ferner weisen die Zellen einen ätiologisch bisher nicht vollständig geklärten Apoptosedefekt auf, dessen Erforschung für Verständnis und Therapie der Erkrankung eine Schlüsselrolle zukommt. Zum längeren Überleben der Zellen trägt eine erhöhte Ausschüttung von TNF- α und BlyS und die dadurch bewirkte Aktivierung von NF κ B bei. Ebenfalls protektiv wirkt das

¹ Zu Epidemiologie und Klinik der CLL: Vgl. Lehrbücher der Inneren Medizin und Hämatologie

² Vgl. Giupaud et al. 2003, S. 506

³ Vgl. Caligaris-Cappio et Ghia 2008, S. 4497 ff.

⁴ Vgl. WHO-Klassifikation maligner Lymphome

⁵ Vgl. Caligaris-Cappio et Hamblin 1999, S. 400; ferner: Caligaris-Cappio et Ghia 2008, S. 4498

antiapoptotische Protein Survivin, das unter dem Einfluss der Interaktion von CD40 und seinem Liganden CD40L induziert wird, der auf leukämischen B-Zellen⁶ und auf CD4-positiven T-Zellen vorhanden ist.⁷ Ferner sind für die CLL die konstitutive Aktivierung bestimmter Signalwege (z.B. PI3-K/AKT, PKC, JAK/STAT, MAPK)⁸ sowie eine (mutmaßlich damit einhergehende) Überexpression bestimmter antiapoptotischer Proteine kennzeichnend⁹. Auf diese letzten beiden Punkte soll weiter unten näher eingegangen werden.

Besondere Aufmerksamkeit verdient das konträre Verhalten leukämischer B-Zellen *in vivo* und *in vitro*: Während die Zellen *in vivo* vor Apoptose geschützt sind, sterben sie *in vitro* bei Kultivierung in Medium ohne zugesetzte Wachstumsfaktoren relativ rasch. Kultiviert man die Zellen hingegen zusammen mit Knochenmarkstroma, überleben sie – anders als normale B-Zellen – bis zu mehreren Wochen. Dafür ist allerdings ein direkter Kontakt mit den Stromazellen nötig, was darauf hinweist, dass die wirksamen Faktoren der Stromazellen in erster Linie auf deren Oberfläche lokalisiert sind bzw. ein Kontakt zwischen Stroma- und CLL-Zellen für die Wirkung löslicher Faktoren essenziell ist. Dieser Kontakt wird v.a. durch β 1- und β 2-Integrine ermöglicht. Frappierend erscheint die Tatsache, dass das Stroma bisher nicht näher charakterisierte Faktoren ausschüttet, die sich – wie Versuche mit konditioniertem Medium zeigen – negativ auf das Überleben von CLL-Zellen auswirken, wenn diese keinen direkten Kontakt zum Stroma haben.¹⁰ Zusätzlich zu der oben genannten Interaktion mit T-Zellen über CD40 und seinen Liganden, besteht also durch ein spezielles sog. Microenvironment, das vornehmlich im Knochenmark angesiedelt ist und von Stromazellen gebildet wird, ein wirksamer Schutz der Zellen vor Apoptose¹¹.

In letzter Zeit fand man neben diversen chromosomalen Aberrationen verschiedene Marker, anhand deren die Patienten in Gruppen mit niedrigem oder hohem Risiko und entsprechend günstigerer oder schlechterer Prognose eingeteilt werden können (zusätzlich zu den klinischen Klassifikationen von Binet und Rai)¹². So korreliert die Mutation eines Gens, das für die variable Region der schweren Kette des Immunglobulins (IgV_H) kodiert, mit einer besseren Prognose. Als Surrogatmarker für den Mutationsstatus des Immunglobulins konnte die Tyrosinkinase ZAP-70 identifiziert werden. ZAP-70 findet sich normalerweise in T-Zellen und ist für dort für Aktivierung durch Antigene und die Differenzierung der Zellen von

⁶ Vgl. Munk-Pedersen et Reed 2004, S. 2367

⁷ Vgl. Giupaud et al. 2003, S. 508

⁸ Vgl. Ringshausen et al 2002, S. 3741 ff.; ferner: Ringshausen et al. 2006, S. 514 ff.; Barragán et al. 2003, S. 1865 ff.

⁹ Vgl. z.B. Packham et Stevenson 2005, S. 442 ff. ; ansonsten in einschlägigen Publikationen passim

¹⁰ Vgl. Lagneaux et. al. 1998, S. 2392 ff.

¹¹ Vgl. Munk-Pedersen et Reed 2004, S. 2365 ff.

¹² Vgl. Montillo et al. 2005, S. 393 f.; ferner: Byrd et al. 2004, S. 164 f.

Bedeutung. In gesunden B-Zellen und CLL-Zellen mit IgV_H-Mutation kann es im Unterschied zu CLL-Zellen mit unmutiertem IgV_H nur in geringem Maße nachgewiesen werden. Funktionell scheint ZAP-70 in den B-Zell-Rezeptor-Signalweg eingebunden zu sein, worauf die vermehrte Signaltransduktion über diesen Weg in ZAP-70-positiven Zellen hinweist.¹³ Prognostische Bedeutung hat neben ZAP-70 auch die Expression von CD38. Beide Marker korrelieren allerdings nicht in allen Fällen mit dem IgV_H-Status.¹⁴

1.2 Apoptose und CLL

Da der Defekt im Apoptosegeschehen der CLL-Zellen nach bisherigem Erkenntnisstand eine besonders wichtige Rolle im Rahmen der Pathogenese spielt und die Eigenschaften der Zellen bestimmt, sollen in diesem Abschnitt die Apoptose im Allgemeinen sowie im speziellen Fall der CLL die Bedeutung von überexprimierten antiapoptotischen Proteinen behandelt werden.

1.2.1 Apoptose: Der programmierte Zelltod

Das Phänomen der Apoptose wurde erstmals von Kerr und Kollegen im Jahre 1972 beschrieben.¹⁵ Es handelt sich dabei um eine geordnet und nach einem programmierten Schema ablaufende Selbsterstörung der Zelle auf Grund von irreparablen Schäden oder rezeptorvermittelten externen Signalen. Zytomorphologisch äußert sich dieser Vorgang in einer Zellschrumpfung, die im Falle von adhärennten Zellen zu einem Verlust der Adhäsion und konsekutiver Kugelung der Zellen führt, in der Ausbildung einer vesikulären Oberfläche („Blebbing“), einer Chromatinkondensation und einer nukleären Fragmentierung (Zeiose). Ferner kommt es neben zahlreichen Veränderungen an der Plasmamembran zu einer Externalisierung des Phospholipids Phosphatidylserin (Grundlage des Annexin-V-Assays, vgl. Kap. 3.8.1). Im Zellinnern ist der Vorgang der Apoptose maßgeblich durch die Aktivierung sog. Caspasen (Cysteinproteasen, die Aspartat-spezifisch sind) charakterisiert, die zelluläre Proteine degradieren. Zuletzt zerfällt die Zelle in einzelne Vesikel, die phagozytotisch beseitigt werden. Die Apoptose ist ein physiologischer Vorgang, der in verschiedenen Gewebetypen unterschiedlich oft, aber regelmäßig abläuft und die Aufgabe hat, gealterte oder in ihrer Funktion gestörte Zellen zu eliminieren. Zusätzlich ist der programmierte Zelltod wesentlich in die Ontogenese involviert.¹⁶

¹³ Vgl. Boelens et al. 2009, S. 609

¹⁴ Vgl. ebd.; ferner: Giupaud et al. 2003, S. 507

¹⁵ Vgl. Kerr et al. 1972, S. 239 ff.

¹⁶ Vgl. zu diesem Abschnitt: Zimmermann et al. 2001, S. 57 f.

Andererseits kann eine gestörte Apoptose – wie im Falle der CLL – zu pathologisch verlängerter Lebenszeit einzelner Zellen führen. Somit stellt der Apoptosedefekt neben der dysregulierten Proliferation durch die Aktivierung von Protoonkogenen oder durch den Verlust von Tumorsuppressorgenen eine wesentliche molekulare Grundlage der Kanzerogenese dar.

1.2.2 Ablauf der Apoptoseaktivierung

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Aktivierungskaskaden der Apoptose: eine intrinsische, die durch Zellschaden unterschiedlicher Genese eingeleitet wird, und eine extrinsische, die nach Bindung spezifischer Liganden an extrazytoplasmatisch lokalisierte Rezeptoren abläuft. Beide Wege münden in eine gemeinsame Endstrecke, die die Aktivierung von Caspasen und den konsekutiven Abbau von Zellproteinen beinhaltet¹⁷. Die Caspasen lassen sich in Initiator- und Effektorcaspasen unterteilen: Zu ersteren gehören die Caspasen-2, -8, -9 und -10, zu letzteren die Caspasen-3, -6 und -7. Alle Caspasen liegen zunächst als Proenzyme vor, die dann proteolytisch gespalten und so aktiviert werden.¹⁸

Die Aktivierung der Caspasen kann wie erwähnt über zwei verschiedene Wege erfolgen. Der intrinsische Weg wird durch zellulären Stress initiiert und durch Überlebenssignale von außen inhibiert. Durch Translokation von proapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie (Bax und Bak) zum Mitochondrium und nachfolgender Oligomerisation kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C, welches wiederum selbst Apaf-1 aktiviert. In der Folge wird unter Einwirkung des sog. Apoptosoms, das aus Cytochrom C, Apaf-1 und Procaspase-9 gebildet wird, Procaspase-3 rekrutiert, welche als aktive Form die wichtigste Effektorcaspase ist. Alternativ zu Cytochrom C kann auch das Protein Smac/Diablo über eine Interaktion mit dem Apoptosom und eine Bindung an IA-Proteine (z.B. XIAP, s.u.) und deren Hemmung die Caspasen-3 und -9 aktivieren.¹⁹

Am Anfang des extrinsischen Weges steht die Bindung eines Liganden (z.B. Fas-Ligand) an einen sog. Todesrezeptor (z.B. Fas-Rezeptor), der an der Außenseite der Zellmembran sitzt. Eine solche Bindung wird als Signal für die Initiierung der Apoptose transduziert. Es kommt einerseits zu einer sukzessiven Aktivierung von Caspase-8, -3, -6 und -7, andererseits zu

¹⁷ Seit einiger Zeit wird in der Literatur auch von einer Caspase-unabhängigen Apoptose berichtet z.B. in Hefezellen (vgl. Liang et al. 2008, S. 1311 ff.) oder postischämisch in menschlichen Neuronen (vgl. Cho et Toledo-Pereyra 2008, S. 141 ff.). Einzelheiten dieses Mechanismus sind bisher aber noch unklar und auf eine etwaige Bedeutung für die chronische lymphatische Leukämie konnten in der Literaturrecherche zur vorliegenden Arbeit keine Hinweise gefunden werden.

¹⁸ Vgl. Zimmermann et al. 2001, S. 59

¹⁹ Vgl. ebd. S. 61 f.; ferner: Jiang et Wang 2004, S.89 ff.

einem durch die Caspase-8 vermittelten Einbau von Bid in die Mitochondrienmembran. Unmittelbare Folge dieses Ereignisses ist wiederum die Ausschüttung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium und deren oben geschilderte Konsequenzen.²⁰

1.2.3 Apoptoseproteine

Das Apoptosegeschehen wird entscheidend durch das Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen beeinflusst (Abb.1). An erster Stelle sind hier die bereits erwähnten Proteine der Bcl-2-Familie zu nennen. Einige Mitglieder dieser Familie fördern den programmierten Zelltod, andere unterdrücken ihn. Zu den antiapoptotischen Proteinen zählen Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, A1 und Mcl-1. Sie alle haben vier Bcl-2-Homologie-Domänen (BH-Domains, BH1 – BH4) und sitzen an der äußeren Mitochondrienmembran. Ihre Aufgabe besteht im Wesentlichen darin, die Integrität des Mitochondriums als zentralem Organ für das Zellüberleben zu gewährleisten.

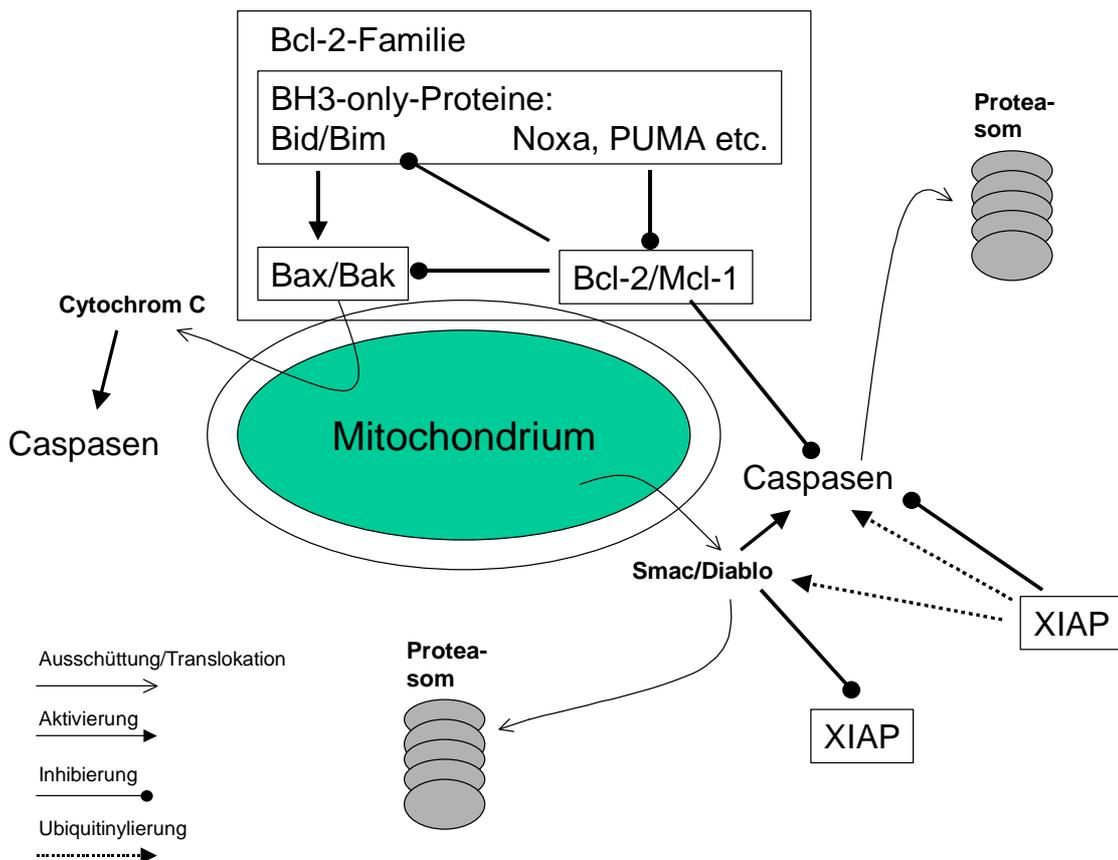


Abb. 1: Apoptoseproteine und ihre Funktion.

²⁰ Vgl. Zimmermann et al. 2001, S. 65 f.

Die proapoptotischen Proteine können in zwei Gruppen unterteilt werden: in die Gruppe der Bax-ähnlichen Proteine, zu der Bax, Bak, Bok/Mtd, Bcl-G und Bfk gehören, und in die Gruppe der sog. BH3-only-Proteine, zu der Bad, Bik/Blk/Nbk, Hrk/DP5, Bid, Bim/Bod, Noxa, Bmf und PUMA/Bbc3 rechnen. Wie ihr Name suggeriert, enthalten Letztere nur die BH3-Domäne, wohingegen die Erstgenannten zwei oder drei BH-Domänen besitzen und eine große Ähnlichkeit mit den antiapoptotischen Proteinen aufweisen.²¹ Die Rolle der Bax-ähnlichen Proteine im Apoptosegeschehen besteht hauptsächlich in der Freisetzung von Cytochrom C, die BH3-only-Proteine inhibieren die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine durch Bindung an sie (Noxa, PUMA u.a.), können aber beispielsweise auch Bax bzw. Bak aktivieren (Bid und Bim)²². Bcl-2 und seine homologen Proteine kontrollieren die Apoptose, indem sie – vermittelt durch die Insertion der BH3-Domäne in eine präformierte Tasche – die proapoptotischen Verwandten hemmen. Ferner sind sie möglicherweise in der Lage, Caspasen direkt zu regulieren.²³

Zu den antiapoptotisch wirkenden Proteinen gehören neben denen der Bcl-2-Familie auch die Inhibitor-of-Apoptosis-Proteine (IAP). Der bekannteste und bedeutendste Vertreter dieser Gruppe ist XIAP²⁴. Dieses Protein vermittelt nach bisherigen Erkenntnissen seine antiapoptotische Wirkung über unterschiedliche Mechanismen, die letztlich in einer verminderten Caspaseaktivität resultieren: Zum einen hemmt es sowohl Initiator- als auch Effektorcaspasen (Caspase-9, -3 und -7) direkt enzymatisch²⁵, zum anderen führt es die Ubiquitynylierung von Caspase-9 und Smac/Diablo und deren Abbau im Proteasom herbei²⁶. Außerdem scheint es in die Signaltransduktionswege bestimmter Rezeptoren eingebunden zu sein²⁷. Die übrigen IA-Proteine wie beispielsweise cIAP1 können gemäß neueren Untersuchungen Caspasen vermutlich nicht direkt hemmen, ihre Wirkungsweise ist bisher nicht genau verstanden.²⁸

²¹ Vgl. Labi et al. 2006, S. 1325 sowie Packham et Stevenson 2005, S.442 ff.

²² Vgl. Labi et al. 2006, S. 1326, Abb. 2

²³ Vgl. Packham et Stevenson 2005, S.443

²⁴ Auch das eingangs erwähnte Survivin gehört zu dieser Gruppe. Vgl. Kap. 1.1

²⁵ Vgl. Holcik et al. 2001, S.254

²⁶ Vgl. Morizane et al. 2005, S. 125

²⁷ Vgl. Holcik et al 2001, S. 257 ff. und S. 258, Abb.3

²⁸ Vgl. Eckelman et al. 2006, S. 991 ff.

1.2.4 Apoptosedefekt in der CLL: Rolle von Bcl-2, Mcl-1 und XIAP

Das Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Faktoren ist im Falle der chronischen lymphatischen Leukämie zur Seite der Antiapoptose verschoben. Wie und in welchem Stadium der Krankheitsentwicklung es zu dieser Veränderung kommt, ist noch immer unklar. Von besonderem Interesse in diesem Zusammenhang sind drei der oben vorgestellten Proteine: Bcl-2, Mcl-1 und XIAP.

Seit langem ist bekannt, dass Bcl-2 in allen leukämischen B-Zellen überexprimiert wird. Als Ursachen für die Überexpression konnte zum einen eine Hypomethylierung des Bcl-2-Gens festgestellt werden²⁹, zum anderen eine Deletion auf dem langen Arm von Chromosom 13 (13q14.3), wo sich die microRNA-Gene miR-15a und miR-16-1 befinden. Diese microRNAs scheinen in gesunden Zellen Bcl-2 posttranskriptionell zu regulieren und seine Konzentration so zu verringern.³⁰ Ferner ist bekannt, dass das Verhältnis von Bcl-2 zu Bax mit der *in-vitro*-Apoptose und dem klinischen Outcome korreliert werden kann.³¹ Allerdings liefert die hohe Konzentration von Bcl-2 keine Erklärung für die unterschiedliche Chemoresponsivität verschiedener Patienten. So zeigen u.a. eigene Versuche (s.u.), dass die Zellen trotz stabiler Expressionslevel von Bcl-2 Apoptose induzieren.

Daher wird von vielen Autoren Mcl-1 als ausschlaggebend für die unterschiedliche Sensitivität gegenüber der Chemotherapie favorisiert. Diese Ansicht wird gestützt von dem Befund, dass die Expression dieses Proteins in apoptotischen Zellen vermindert ist. Experimente mit transgenen Mäusen zeigten, dass Mcl-1 eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Lymphomen spielt und daneben Bedeutung für die Entwicklung und Differenzierung von B- und T-Zellen hat. Mcl-1 besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit Bcl-2, ist aber einem hohen Umsatz unterworfen und hat demzufolge eine relativ kurze Halbwertszeit von wenigen Stunden. Seine Regulation, die sowohl auf transkriptioneller und translationaler als auch auf Proteinebene angreift, ist vielfältig, besonders wichtig erscheint die Einbindung von Mcl-1 in bestimmte Signaltransduktionswege (z.B. MAPK oder PI3K). Daneben gibt es Hinweise auf eine Regulation durch Zytokine, die möglicherweise von Stromazellen u.a. produziert werden und das Zellüberleben verlängern.³² Interessant ist im Übrigen, dass Mcl-1 nach Spaltung durch Caspasen eine proapoptotische Wirkung entfaltet, es wird damit, wie Packham und Stevenson schreiben, „from a molecular bodyguard to assassin“³³.

²⁹ Vgl. Hanada et al. 1993, S.1820 ff.

³⁰ Calligaris-Cappio et Ghia 2008, S. 4498

³¹ Packham et Stevenson 2005, S. 444

³² Vgl. Packham et Stevenson 2005, S. 445 f. ; ferner: Michels et al. 2005, S. 267 ff.; Zhou et al. 1997, S. 630

³³ Vgl. Packham et Stevenson 2005, S. 445

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass – ähnlich wie im Falle von Bcl-2 – eine erhöhte Mcl-1/Bax-Ratio mit verminderter Chemosensitivität einhergeht. Darüber hinaus wurde die Mcl-1-Expression positiv mit dem Vorhandensein prognostischer Faktoren wie dem unmutierten V_H-Gen, CD38 und ZAP-70 korreliert.³⁴

Zuletzt ist in der Reihe der Proteine, die in der CLL mutmaßlich an der Vermittlung des Apoptosedefekts beteiligt sind, XIAP zu nennen. Bekannt ist lediglich die relativ hohe Konzentration dieses Proteins in den leukämischen Zellen. Seine Regulation sowie seine Relevanz für die Apoptosekontrolle sind weitgehend unklar.

1.3 Proteinkinase C und ihre Bedeutung für die CLL

Neben den direkt in den Ablauf des programmierten Zelltodes involvierten Proteinen sind nach bisherigen Erkenntnissen konstitutiv aktive Signalwege (wie z.B. auch die MAP-Kinase oder JAK/STAT) in den Zellen der CLL von Bedeutung. Wie eine Serie aktueller Veröffentlichungen zeigt³⁵, rückt im Zuge der Aufklärung dieser Wege die Proteinkinase C (PKC) immer mehr ins Zentrum des Interesses.

Die PKC, eine Serin-/Threonin-Kinase, gehört zu den ersten Proteinkinasen, die überhaupt identifiziert wurden. Ihre Funktionen besteht u.a. in der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Die Isoenzyme der PKC werden in drei Gruppen eingeteilt (Abb. 2): Die Isoformen α , β (I, II) und γ werden als konventionelle („conventional/classical“), die Isoformen δ , ϵ , η und θ als neue („novel“) und die Isoformen ι und ζ als atypische („atypical“) PKC bezeichnet. Allen Gruppen gemeinsam ist, dass sie durch Phospholipide aktiviert werden können. Die konventionellen Formen sind Ca⁺⁺-abhängig und werden zusätzlich wie die Ca⁺⁺-unabhängigen neuen Isoformen durch DAG aktiviert. Der tumorogene Phorboläther PMA wirkt stimulierend auf die konventionellen und neuen PKC-Formen, indem er für eine Aktivierung schon bei niedrigeren Ca⁺⁺-Konzentrationen sorgt.³⁶

In CLL-Zellen werden nur bestimmte Isoformen exprimiert. Alkan und Kollegen wiesen in ihrer Arbeit in den Zellen aller untersuchten Patienten die Isoenzyme β , γ , δ und ζ nach. Die detektierten Konzentrationen von PKC α , ϵ und ι waren dagegen variabel, die Isoformen η und θ waren nicht vorhanden. Durch den Einsatz des PKC-Inhibitors Safingol konnte eine reduzierte Transkription bestimmter Gene festgestellt werden, was auf die Bedeutung von

³⁴ Pepper et al. 2008, S. 10 ff.; zu Mcl-1 im Allgemeinen: Vgl. Michels et al. 2005, S. 267 ff.

³⁵ Vgl. beispielsweise Michie et Nakagawa 2006 oder Alkan et al. 2005

³⁶ Vgl. zum gesamten Abschnitt: Mellor et Parker 1998, S. 281 f.

PKC als Transkriptionsregulator hinweist.³⁷ Andere Autoren zeigen, dass Inhibitoren wie z.B. Bisindolylmaleimide I oder IX zu gesteigerter Apoptose³⁸ und einer Abnahme von Mcl-1 und XIAP führen³⁹.

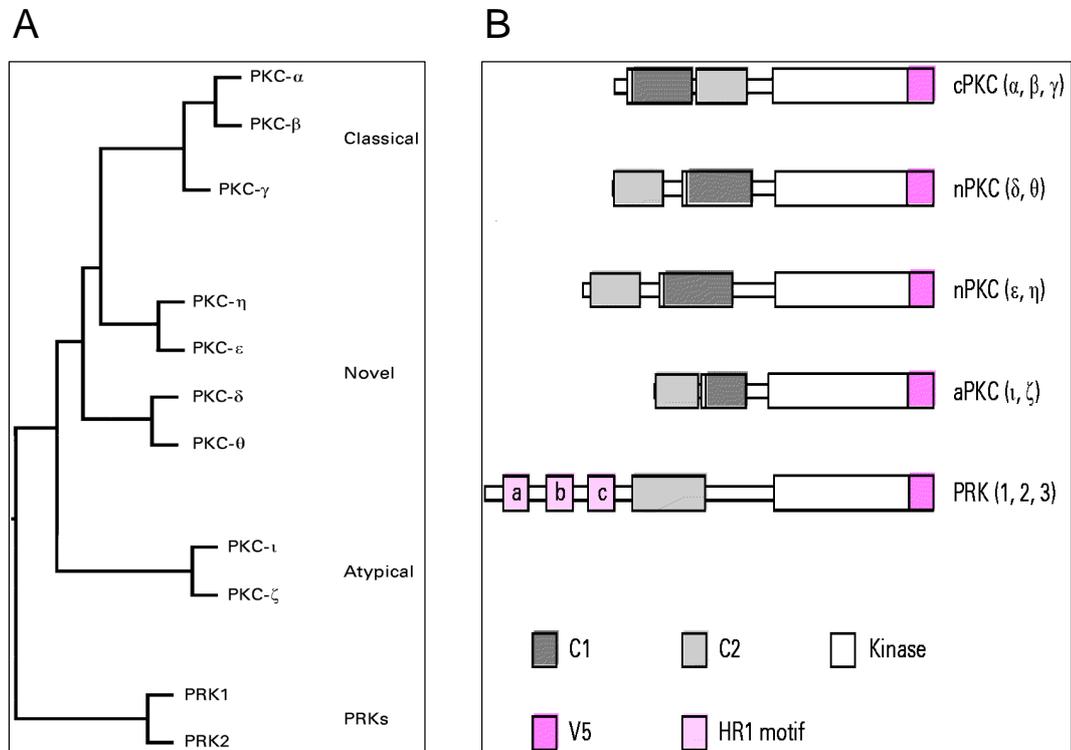


Abb. 2: Isoformen der PKC.

A Verwandtschaft der einzelnen Isoformen gemäß Sequenzvergleich. **B** Domänenstruktur. Aus: Mellor et Parker 1998, S. 282

Ringshausen et al. konnten im Jahr 2002 zeigen, dass die Phosphatidylinositol-3-Kinase und damit assoziiert das Isoenzym δ der Proteinkinase C in der CLL konstitutiv aktiviert werden. PKC δ wird nach PI3K-Aktivierung phosphoryliert und somit in die aktive Form überführt. Mit dem PI3-Kinase-Hemmer LY294002 und dem PKC δ -spezifische Inhibitor Rottlerin ließ sich eine höhere Apoptoserate erzielen. Diese konnte mit einer Expressionsverminderung von Mcl-1 und XIAP korreliert werden.⁴⁰ Andere Publikationen belegen zusätzlich, dass auch die konstitutiv exprimierte PKC β einen wesentlichen Beitrag zum Apoptosedefekt der CLL leistet.

³⁷ Vgl. Alkan et al. 2005, S. 100 ff.

³⁸ Vgl. Barragán et al. 2002, S. 2971

³⁹ Vgl. Snowden et al. 2003, S. 1985 f. ; ferner: Michie et Nakagawa 2006, S. 136

⁴⁰ Vgl. Ringshausen et al. 2002, S. 3741 ff. sowie: Ringshausen et al. 2006, S.514 ff.

Sie ist an der Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors⁴¹ sowie an der Regulation des Proteins AKT⁴² beteiligt.

Die geschilderten Befunde erhärten den Verdacht, dass die Proteinkinase C eine eminente Bedeutung für die Apoptosekontrolle in CLL-Zellen besitzt und folglich Potential für neue Therapieansätze birgt. Dies belegt auch der Einsatz des Inhibitors N-Benzoyl-Staurosporin (PKC 412) in klinischen Phase-II-Studien, wo er insbesondere bei Patienten, die bereits nicht mehr auf die herkömmlichen Therapeutika Chlorambucil und Fludarabin ansprechen, Wirkung zeigte.⁴³

⁴¹ Vgl. Abrams et al. 2007, S. 1193 ff.

⁴² Vgl. Barragán et al. 2006, S. 1473

⁴³ Michie et Nakagawa 2006, S. 136

2 Fragestellung und Vorgehensweise

Im Zentrum der Arbeit stehen die antiapoptotischen Proteine Bcl-2, Mcl-1 und XIAP sowie deren Regulation durch die Proteinkinase C, insbesondere im Kontext mit einem Support der CLL-Zellen durch primäre humane Stromazellen. Von partikulärem Interesse war die Rolle von Mcl-1 innerhalb des Apoptosedefekts, der die chronische lymphatische Leukämie kennzeichnet.

Mit Hilfe des Zellmodells wurden Proteinexpression und Apoptose untersucht. Zum Einsatz kamen dabei v.a. durchflusszytometrische Methoden wie Annexin-V-Assay, $\Delta\psi$ -Assay und Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe von FITC-markierten Anti-CD19-Antikörpern und Fluorospheres. Proteinkonzentrationen wurden mittels Western-Blot-Verfahren ermittelt.

Zunächst wurde die basale Konzentration der besagten Proteine in leukämischen und gesunden B-Zellen bestimmt, um die Besonderheiten des Expressionsprofils der CLL zu vergegenwärtigen. Im weiteren Verlauf sollte der Zusammenhang zwischen einer Konzentrationsveränderung der antiapoptotischen Proteine und einer gesteigerten Apoptose infolge einer Exposition gegenüber verschiedenen Noxen aufgezeigt werden. In diesem Kontext sollten die von Ringshausen et al. beschriebene Regulation von Mcl-1 durch PI3K und PKC δ und die Apoptoseinduktion durch die Substanzen LY 294002 und Rottlerin bestätigt und ferner geklärt werden, ob Mcl-1 direkt von PI3K reguliert wird. Um die generelle Bedeutung von Mcl-1 für die Apoptose der CLL-Zellen zu eruieren, wurde das Protein in Knock-down-Versuchen mittels spezifischer siRNA ausgeschaltet.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde durch die Verwendung von Kokulturen bestehend aus CLL- und Knochenmarkstromazellen das bisherige Zellmodell erweitert, um physiologischere Bedingungen zu schaffen und damit den Verhältnissen *in vivo* näher zu kommen. Dabei sollte der oben beschriebenen Interaktion zwischen Stroma- und leukämischen B-Zellen und dem daraus resultierenden Schutz der CLL-Zellen vor Apoptose Rechnung getragen werden. Durch den Einsatz von PKC-Inhibitoren mit unterschiedlichem Wirkungsspektrum wurde untersucht, welche Bedeutung die Proteinkinase C für das Überleben von Leukämiezellen in der Kokultur besitzt. Ferner sollte geklärt werden, ob und inwieweit sich eine Hemmung der PKC auf die Expression von Bcl-2, Mcl-1 und XIAP auswirkt, und ob sich Hinweise darauf ergeben, welche Isoform(en) neben PKC δ relevant ist (sind). Die Experimente wurden anfangs mit der murinen Fibroblastenzelllinie Ltk \bar{c} durchgeführt, im weiteren Verlauf der Arbeit dann mit primären humanen Knochenmarkstromazellen.

3 Material und Methoden

3.1 Allgemeine Materialien

Die für bestimmte Methoden spezifischen Materialien sind unter dem jeweiligen Methodenpunkt aufgelistet.

Aqua dest.	<i>Delta Pharma GmbH</i> (Pfullingen, D)
BSA	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, D)
Digitalkamera Power Shot A620	<i>Canon Deutschland GmbH</i> (Krefeld, D)
EDTA	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, D)
Eppendorf-Gefäß 1,5 ml (mit Deckel)	<i>Eppendorf</i> (Hamburg, D)
Eppendorf-Pipetten	<i>Eppendorf</i> (Hamburg, D)
Ethanol	<i>Merck</i> (Darmstadt, D)
Heparin 5000 I.E./ml	<i>Roche Pharma AG</i> (Grenzach-Wyhlen, D)
Methanol	<i>Merck</i> (Darmstadt, D)
NaCl	<i>Roth</i> (Karlsruhe, D)
PBS 1x	<i>Biochrom AG</i> (Berlin, D)
PBS (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, D)
Gefrierfach - 20 °C	<i>Liebherr</i> (Ochsenhausen, D)
- 86 °C VIP™SERIES	<i>Sanyo</i> (München, D)
Handschuhe: SemperCare	<i>Semperit Technische Produkte GmbH</i> (Wien, A)
Kryoröhrchen 2 ml	<i>Corning</i> (New York, USA)
Kühlschrank	<i>Liebherr</i> (Ochsenhausen, D)
Micro Tube 2 ml	<i>Sarstedt</i> (Nümbrecht, D)
Mikroskop- Axiovert 25	<i>Zeiss</i> (Jena, D)
Minishaker MS1	<i>IKA-Werke GmbH & Co KG</i> (Staufen, D)
Pipetboy	<i>Integra Bioscience</i> (Fernwald, D)

Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)	<i>BD Falcon</i> (Heidelberg, D)
Pipettenspitzen	<i>Sarstedt</i> (Nümbrecht-Rommelsdorf, D)
Software	
▪ Excel 2003	
▪ PowerPoint 2003	
▪ Word 2000	<i>Microsoft Deutschland GmbH</i> (Unterschleißheim, D)
▪ WinMDI 2.8	Joe Trotter, The Scripps Research Institute (La Jolla, USA)
Stickstofftank: K-Series	<i>Taylor-Wharton Germany GmbH</i> (Husum, D)
Tubes (20/50 ml)	<i>Nunc GmbH & Co. KG</i> (Wiesbaden, D)
Waagen	<i>Kern & Sohn GmbH</i> (Balingen Frommern, D)
▪ Analysewaage (Modell Kern 770)	
▪ Präzisionswaage (Modell Kern PLJ 2100- LM)	
Wasserbad	<i>GFL</i> (Burgwedel, D)
Zentrifuge Megafuge	<i>Heraeus</i> (Hanau, D)

3.2 Zellen

CLL-Zellen / B-Zellen gesunder Donatoren. Nach Aufklärung und Einwilligung wurde Patienten, bei denen eine chronische lymphatische Leukämie diagnostiziert worden war, und die entsprechende klinische und immunphänotypische Kriterien erfüllten, peripheres Blut entnommen. Prämisse war dabei, dass die Patienten bisher keiner Chemotherapie unterzogen worden waren, bzw. dass eine solche Therapie mindestens drei Monate lang zurücklag. Die B-Lymphozyten wurden nach Aufklärung und Einwilligung aus dem peripheren Blut gesunder Probanden isoliert.

Primäre humane Stromazellen. Für die Versuche mit primärem humanem Stroma wurden Zellen entweder durch Knochenmarkpunktion oder intraoperativ nach Aufklärung und Einwilligung des Patienten gewonnen. Keiner der Patienten litt zum Zeitpunkt der Zellentnahme an einer hämatologischen Erkrankung.

Stromazelllinie. In einer Reihe von Experimenten, die Kokulturen von Stroma und CLL-Zellen beinhalteten, fand die Ltk⁻-Zelllinie (eine murine Fibroblastenzelllinie) Verwendung⁴⁴.

⁴⁴ von: CAMR Centre for Applied Microbiology & Research (ECACC, Salisbury, Wiltshire)

3.3 Separation primärer Zellen

Material

DETACHaBeads CD19	<i>Dynal Biotech</i> (Oslo, Norwegen)
DMSO	<i>Serva</i> (Heidelberg, D)
Dynabeads M450 CD2/CD14 CD19	<i>Dynal Biotech</i> (Oslo, Norwegen)
Erythrozytenlysepuffer: EasyLyse (1x)	<i>DakoCytomation</i> (Glostrup, Dänemark)
FCS	<i>PAA</i> (Pasching, A)
Ficoll: Biocoll Separating Solution (Dichte 1.077g/ml)	<i>Biochrom AG</i> (Berlin, D)
Magnetic Particle Concentrator Dynal MPC [®] -6	<i>Dynal Biotech</i> (Oslo, Norwegen)

Procedere

CLL-Zellen. Mononukleäre Zellen aus heparinisiertem Vollblut wurden durch Dichtezentrifugation über einer Ficoll-Schicht isoliert. Zur Separation der CLL-Zellen kamen magnetische Beads (Dynabeads) mit Anti-CD2- bzw. Anti-CD14-Spezifität zum Einsatz.

Zur Separation der CLL-Zellen wurde das mit PBS und 0,5% BSA im Verhältnis 1:2 verdünnte Patientenblut (35 ml) in einem 50-ml-Tube über 15 ml Ficoll geschichtet. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 2000 rpm (ohne Bremse) nahm man die Interphase ab, in der sich Mono- und Lymphozyten befinden, und überführte sie in ein neues 50-ml-Tube. Anschließend erfolgte bei 4 °C eine Zentrifugation für 10 min bei 1500 rpm. Das entstandene Pellet wurde hierauf mit 10 ml Erythrozytenlysepuffer bei 4 °C 10 min inkubiert und danach zweimal mit B-Zell-Kulturmedium (RPMI-1640 versetzt mit FCS und Additiva, vgl. Kap. 3.4) gewaschen (5 min bei 1500 rpm).

Für die Konzentration der Dynabeads galt: 100 µl Beads = 4×10^7 Beads. Bei einem Zielverhältnis von vier Beads pro Zelle wurden 100 µl der Suspension auf 10^7 Zellen gegeben. Die entsprechende Menge Beads (mit jeweiliger Spezifität für CD2 bzw. CD14) wurde mit PBS (+0,1% BSA) im Verhältnis 1:1 gemischt und in ein 15-ml-Tube überführt. Nach einminütigem Verbleiben in einem Magnetständer (Dynal MPC[®]-6) wurde der Überstand abgenommen und der Vorgang ein weiteres Mal wiederholt. Danach gab man die im ursprünglichen Volumen PBS/BSA aufgenommenen Beads zu dem in 7 ml Medium

resuspendierten Zellpellet und inkubierte die Mischung für 30 min bei 4 °C auf dem Rolltisch, um anschließend mit Hilfe eines Magnetständers (DynaL MPC[®]-6) die an die Beads gebundenen Zellen vom Rest zu trennen. Nach vorsichtiger Abnahme des Überstandes wurde der Vorgang zweimal wiederholt.

Zuletzt wurden die Zellen auf eine Konzentration von $100 \times 10^6/\text{ml}$ gebracht und in 2 ml Einfriermedium (bestehend aus FCS und 10% DMSO) eingefroren. Die zu diesem Zweck benutzten Kryoröhrchen wurden in mit Isopropanol gekühlten Einfrierboxen verstaut, welche zunächst für 24h bei – 80 °C gelagert wurden. Die definitive Lagerung bis zu Verwendung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei – 196 °C.

Zum Gebrauch der Zellen im Experiment wurden sie bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in RPMI-Medium verdünnt über Ficoll geschichtet. Nach Zentrifugation (20 min, 2000 rpm, ohne Bremse) erfolgte die Abnahme der in der Interphase über dem Ficoll verbliebenen lebenden Zellen.

B-Lymphozyten gesunder Donatoren. Nach Dichezentrifugation (s.o.) ließen sich mittels magnetischer Beads, die an das Oberflächenantigen CD19 binden, B-Zellen von den restlichen mononukleären Zellen trennen (Positivselektion). Die Ablösung der Beads von den Zellen erfolgte durch den Einsatz von CD19-Detaching-Beads.

Stromazellen. Nach intraoperativer Entnahme des Knochenmarks wurden die Zellen zum Transport in heparinisiertes und gekühltes Nährmedium (Stromamedium, vgl. Kap. 3.4) verbracht. Die Separation der Stromazellen erfolgte über Ficoll in 50-ml-Tubes (Zentrifugation 20 min bei 2000 rpm und Raumtemperatur, s.o.). Nach der Zentrifugation nahm man die Interphase sowie den oberflächlichen Lipidlayer ab und überführte beide in Zellkulturflaschen mit Stromamedium. In den ersten sieben Tagen nach Separation wurde jeweils einmal täglich die Hälfte des Mediums entfernt und durch frisches substituiert.

Die primären Stromazellen sowie die Zellen der Stromazelllinie wurde auf eine Konzentration von $0,5 \times 10^6$ gebracht und in 2 ml Einfriermedium kryokonserviert (s.o.). Nach dem Auftauen wurde in den ersten Tagen das Medium mit den darin befindlichen nicht angewachsenen Zellen zur Hälfte entfernt und substituiert.

3.4 Zellkultur

Material

Absaugpumpe	<i>Schütt Labortechnik GmbH (Göttingen, D)</i>
Antibiotic-Antimycotic (10.000 Units/ml Penicilline-G-Na ⁺ , 10.000 µg/ml Streptomycin-Sulfat, 25 µg/ml Amphotericin B)	<i>GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)</i>
FCS	<i>PAA (Pasching, A)</i>
HEPES 1M	<i>GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)</i>
Inkubator NUNC	<i>NalgeNuncInternational (Rochester, USA)</i>
L-Glutamin 200mM	<i>GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)</i>
MEM Alpha Medium + GlutaMAX 1x	<i>GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)</i>
MEM nichtessentielle Aminosäuren 0,7x	<i>GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)</i>
Mercaptoethanol 100%	<i>GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)</i>
NaPyruvat 100mM	<i>GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)</i>
Penicillin (10000U/ml)/ Streptomycin (1000µg/ml)	<i>GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)</i>
RPMI-1640-Medium	<i>GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)</i>
Sterilbank HERASafe	<i>Heraeus (Hanau, D)</i>
Trypsin 10x	<i>GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)</i>
Zellkulturflaschen (75/150 cm ²)	
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-Well)	
Zellkulturschalen 100 x 20 mm	<i>TPP (Trasadingen, CH)</i>

Procedere

Es fanden die üblichen Methoden der Zellkultivierung Anwendung. Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ in humider Atmosphäre kultiviert.

B-Zellen. Die leukämischen B-Zellen und die B-Lymphozyten der gesunden Spender wurden in RPMI-1640-Medium kultiviert. 500 ml dieses Mediums wurden 10% fetales Kälberserum

(FCS, hitzeinaktiviert für 30 min bei 56 °C) sowie 30 ml der folgende Additiva-Mischung zugesetzt:

- 100 ml Penicillin (10000U/ml)/ Streptomycin (1000µg/ml)
- 100 ml HEPES 1M
- 100 ml L-Glutamin 200mM
- 60 ml MEM nicht essentielle Aminosäuren 0,7x
- 70 µl Mercaptoethanol 100%
- 100 ml NaPyruvat 100mM
- 20 ml Antibiotic-Antimycotic (10.000 Units/ml Penicilline-G-Na⁺, 10.000 µg/ml Streptomycin-Sulfat, 25 µg/ml Amphotericin B)
- 100 ml Medium ohne Zusätze

Zur Kultivierung wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1 – 2 x 10⁶/ml eingestellt.

Stromazellen. Die Stromazelllinie wurde ebenfalls in mit FCS und Additiva versetztem RPMI-1640-Medium (s.o.) gehalten. Das Zell-Splitting erfolgte je nach Wachstum der Zellen alle drei bis vier Tage. Dazu wurden die Zellen bei 37 °C für ca. 5 min trypsiniert (Trypsin 10x 1:10 mit PBS verdünnt). Nach anschließender Verdünnung mit RPMI-Medium und Zentrifugation (5 min, 1500 rpm) wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in Medium aufgenommen und ein entsprechender Anteil der Zellen in eine neue Schale ausgesät.

Das primäre Humanstroma wurde in Stromamedium (500 ml MEM alpha Medium + GlutaMAX, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml Antibiotic/Antimycotic, 50 ml FCS) ausgesät. Zum Splitten der Zellen (s.o.) wurden sie mit 1x-Trypsin abgelöst. Das übrige Vorgehen war mit der Versorgung der Zelllinie identisch. Die primären Zellen wurden jedoch in Zellkulturflaschen gehalten.

CLL-Stromazell-Kokultur. Für die Versuchsansätze mit Kokulturen von CLL-Zellen und Stromazellen wurden letztere jeweils 24 h vor Zugabe der Leukämiezellen ausgesät, um eine Adhäsion der Zellen zu ermöglichen. Wenn Inhibitoren zum Einsatz kamen, wurden diese i.d.R. 24 h nach Start der Kokultivierung zugegeben, so dass ein Kontakt zwischen den beiden Zellarten zustande kommen konnte. Nach Beendigung der Kokultur wurde bei Verwendung der Zelllinie jeweils der gesamte Ansatz trypsiniert. Wenn Primärstroma eingesetzt worden war, konnten die Leukämie-Zellen durch vorsichtiges Spülen von der adhären Stromazellschicht abgelöst werden.

Für die Kokultur wurde ausschließlich RPMI-1640-Medium mit FCS und Additiva verwendet.

3.5 Bestrahlung und Mitomycin-C-Behandlung der murinen Zelllinie Ltk^c

Material

Bestrahlungsautomat
Buchler Typ OB29/902-1

Buchler GmbH (Braunschweig, D)

Mitomycin C

Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

Prinzip

Bei der Kokultivierung von CLL-Zellen und der murinen Fibroblastenzelllinie Ltk^c ergab sich das Problem der stetigen Proliferation der Linie, die bereits nach einigen Tagen die Leukämiezellen überwucherte. Durch den exponentiellen Anstieg der Zellzahl und den damit verbundenen kritisch erhöhten Nährstoffverbrauch sowie die vermehrt anfallenden Abfallprodukte des Zellstoffwechsels wären Zehn-Tage-Versuche in ihrer Aussagekraft kompromittiert gewesen. Daher wurden die Zellen zur Proliferationsinhibierung entweder bestrahlt oder mit dem DNA-Synthese-Inhibitor Mitomycin C (von *Streptomyces caespitosus*) vorbehandelt, um eine – bezogen auf den Ausgangswert – konstante Zellzahl zu gewährleisten.

Procedere

Bestrahlung. Die Zellen wurden zunächst trypsiniert und in ein 50-ml-Tube überführt. Anschließend erfolgte die Bestrahlung mit einer Zieldosis von 30 Gy. Dann wurden die Zellen für den entsprechenden Ansatz ausgesät. Nach 24 h und Adhäsion der Stromazellen begann durch Zugabe der CLL-Zellen die Kokultivierung.

Mitomycin-C-Behandlung. Konfluente Zellen in einer Zellkulturschale (100 x 20 mm) wurden nach einmaligem Waschen (Überschichten mit PBS und Absaugen) mit Mitomycin C (Endkonzentration 10 µg/ml) in 4 ml RPMI-1640-Medium für ca. 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (s.o.) und Trypsinieren der Zellen plattierte man eine entsprechende Zellzahl für die Ansätze aus. Die CLL-Zellen wurden für die Kokultur wiederum erst nach dem Anwachsen der Linie (nach 24 h) zugegeben.

3.6 siRNA-Transfektion

Material

AlexaFluor-488-siRNA	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, D)
Elektroporationsmedium Opti-MEM	<i>GIBCO/Invitrogen</i> (Karlsruhe, D)
Gene Pulser Cuvette 0,4 cm Electrode	<i>Bio-Rad Laboratories</i> (München, D)
Elektroporator Gene Pulser II	<i>Bio-Rad Laboratories</i> (München, D)
Kontroll-siRNA	<i>Qiagen GmbH</i> (Hilden, D)
Mcl-1-siRNA Sequenz: 5' AAG UAU CAC AGA CGU UCU CTT 3'	<i>MWG Biotech AG</i> (Ebersberg, D)

Prinzip

Bei siRNA handelt es sich um doppelsträngige RNA (dsRNA) von 21 oder 22 Nukleotiden Länge, die in Tier- und Pflanzenzellen vorkommt und in der Lage ist, bestimmte Gene posttranskriptionell stillzulegen. Durch Transfektion mit synthetischer spezifischer siRNA kann gezielt die Expression einzelner interessanter Proteine unterdrückt werden (Knock-down). Die siRNA bindet dabei an die mRNA des entsprechenden Proteins und führt deren Abbau durch Nukleasen herbei. In der Folge kann die Translation der mRNA nicht erfolgen, und das Protein wird nicht synthetisiert.⁴⁵

Zur Einbringung der siRNA in die Zellen existieren verschiedene Verfahren. In diesem Fall fand die Elektroporation Anwendung. Dabei wird durch einen Stromstoß definierter Stärke die Zellmembran für die siRNA permeabel.

Procedere

Nach zweimaligem Waschen mit PBS und Zentrifugation wurden die Zellen auf eine Konzentration von 10×10^6 /ml eingestellt. In die Elektroporationsküvetten wurden dann 3 µg spezifische siRNA bzw. Kontroll-siRNA, 200 µl der Zellsuspension und 200 µl Elektroporationsmedium gegeben. Anschließend verblieb die Küvette für 10 min auf Eis. Die Elektroporation erfolgte bei 360V und 950 µF. Zuletzt wurden die Zellen in vorbereitete 6-Well-Platten überführt. Um den Erfolg der Elektroporation zu zeigen, wurde als Kontrolle eine mit AlexaFluor 488 markierte siRNA in einen Ansatz eingebracht und der Titer durchflusszytometrisch bestimmt.

⁴⁵ Vgl. Elbashir et al. 2001, S. 494 ff. ; ferner : Tuschl et Borkhardt 2002, S. 158 ff.

3.7 Trypanblau-Färbung/Zellzählung

Material

Neubauer-Zählkammer	<i>LO – Laboroptik GmbH</i> (Friedrichsdorf, D)
Trypan Blue Stain 0,4%	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, D)
Zellzähler	<i>Roth</i> (Karlsruhe, D)

Prinzip

Die Zellen werden zur Bestimmung der Zellzahl mit Trypanblau behandelt und anschließend in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Alle Zellen nehmen den Farbstoff zunächst auf, avitale Zellen jedoch können ihn im Gegensatz zu lebenden nicht wieder ausschleusen und erscheinen daher unter dem Mikroskop blau. Das Verfahren wurde nicht nur eingesetzt, um die Zellzahl für die Versuchsansätze zu bestimmen, sondern insbesondere auch, um bei Versuchen mit primärem Stroma, das sich auf Grund seiner Zytomorphologie generell schlecht für die Durchflusszytometrie eignet, die Zellzahl zu bestimmen.

Procedere

Die Zellen wurden zur Zählung in einem definierten Volumen Medium aufgenommen. Anschließend entnahm man 10 µl dieser Suspension und mischte sie je nach ästimierter Zellmenge (zwischen 1:2 und 1:100) mit Trypanblau in einer 96-Well-Platte. Dann wurden die Zellen in die Neubauer-Zählkammer gegeben und gezählt. Die Gesamtzellzahl wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$N = n/4 \times 10 \times D \times V$$

N: Gesamtzellzahl

n: gezählte Zellen in allen vier Quadranten

4: Anzahl der Quadranten

10: Kammerfaktor

D: Verdünnung (z.B. bei 1:10: D = 10)

V: Volumen, in dem die Zellen suspendiert waren

Problematik der Methode

Mit Hilfe dieser Methode kann nur rein optisch zwischen Trypanblau-positiven und -negativen Zellen differenziert werden. Oftmals aber lassen sich Zellen nicht eindeutig einer der beiden Populationen zuordnen. Insbesondere gilt dies für leukämische B-Zellen, die mit Knochenmarkstromazellen kultiviert wurden. Die Erfassung der Zellzahl in der Kokultur wird zusätzlich dadurch erschwert, dass unter dem Mikroskop kleine Stromazellen oder Zellfragmente u.U. wie CLL-Zellen imponieren können. Damit ist das Ergebnis der Zählung sehr von der zählenden Person abhängig und schwankt von Zählung zu Zählung bisweilen erheblich. Daher sind im Ergebnisteil stets Mittelwert und Standardabweichung dreier separater Zählungen angegeben.

3.8 Durchflusszytometrie⁴⁶

Allgemeines Material

Durchflusszytometer Beckman Coulter EPICS XL	<i>Beckman Coulter GmbH (Krefeld, D)</i>
FACS-Puffer: PBS verdünnt mit Aqua dest. (1:10) + 1% BSA	
FACS-Röhrchen	<i>Nunc GmbH & Co. KG (Wiesbaden, D)</i>
Software SYSTEM II for EPICS Version 3.0	<i>Beckman Coulter GmbH (Krefeld, D)</i>

Prinzip

Im Durchflusszytometer passieren die Zellen in einer Kapillare einen Laserstrahl. Das Prinzip der Messung beruht auf der Detektion von Größe und Granularität einzelner Zellen durch den Laserstrahl, der an verschiedenen Zellen unterschiedlich stark gestreut wird. Diese unterschiedliche Streuung allein erlaubt schon eine Differenzierung zwischen mehreren Zellpopulationen. Setzt man zusätzlich an Fluoreszenzfarbstoffe gebundene Antikörper ein, kann unter Einsatz farbiger Laser die Expression von Oberflächenmarkern (z.B. Annexin-V-Assay) oder intrazellulären Proteinen (intrazytoplasmatische Färbung, z.B. Bax-Färbung) anhand der emittierten Fluoreszenz ermittelt werden.

⁴⁶ im Folgenden auch als FACS bezeichnet

3.8.1 Annexin-V-/Propidium-Jodid-Färbung

Material

Annexin-FITC	<i>Caltag Laboratories/Invitrogen</i> (Carlsbad, USA)
Annexin-V-Puffer (10x) 1:10 mit mit PBS (1x) verdünnt	<i>BD Pharmingen</i> (Franklin Lakes, USA)
Propidium-Jodid 25 mg Stocklösung: 5mg/ml (gelöst in DMSO) Working-Solution: 50 µg/ml (Stocklösung 1:100 mit PBS verdünnt)	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, D)

Prinzip

Apoptotische Zellen exponieren an der Außenseite ihrer Zellmembran im Unterschied zu vitalen Zellen das Phospholipid Phosphatidylserin (bei gesunden Zellen ist es beinahe ausschließlich an der Innenseite der Membran zu finden). Annexin-V bindet bei geeigneter Ca^+ -Konzentration an Phosphatidylserin und markiert auf diese Weise apoptotische Zellen. Da nekrotische Zellen für Annexin-V permeabel und somit ebenfalls Annexin-positiv sind, müssen die Zellen zur Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose mit Propidium-Jodid (PI) gegengefärbt werden.

Procedere

Zur Annexin-V-/PI-Färbung wurden die Zellen (ca. $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Ansatz), nachdem sie in PBS gewaschen worden waren, in 0,5 ml Annexin-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von je 5 µl Annexin-V-Fluoreszein-Isothiocyanat (Annexin-V-FITC) und Propidium-Jodid-Lösung (PI-Lösung; 50 µg/ml) bei 4 °C für 15 min inkubiert. Anschließend folgte die durchflusszytometrische Messung.

3.8.2 $\Delta\psi$ -Assay

Material

DiOC₆ *Molecular Probes* (Eugene, USA)
Stocklösung: 5,7 mg in 10 ml Ethanol (100%)
Working-Solution: Stocklösung 1:100
mit PBS verdünnt

FACS-Puffer (vgl. Kap. 3.8)

PI-Working-Solution (vgl. Kap. 3.8.1)

Prinzip

Die Verschiebung des Potentials an der Mitochondrienmembran zeigt die Degradation der Mitochondrien an und liefert so Hinweise auf die Apoptoseaktivierung. Der Einbau von DiOC₆ in das Mitochondrium ist dabei dem transmembranären Potential $\Delta\psi$ proportional.

Procedere

Nach Entnahme der Zellen (ca. $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Ansatz) wurden sie mit 4 μ l DiOC₆-Working-Solution pro 1 ml Zellsuspension 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und zum Pellet 500 μ l FACS-Puffer sowie 5 ml PI-Working-Solution hinzupipettiert. Nach guter Durchmischung folgte eine zehnmünütige Inkubation bei 4 °C. Schließlich wurde die zytometrische Messung durchgeführt.

3.8.3 Bax-Färbung

Material

Anti-Bax YTH-6A7
(Maus, monoklonal) *Trevigen* (Gaithersburg, USA)

Anti-Mouse-IgG₁-FITC *Beckman Coulter GmbH* (Krefeld, D)

FIX & PERM Medium A
FIX & PERM Medium B *Caltag Laboratories/Invitrogen* (Carlsbad, USA)

IgG₁ isotype control 0,5 mg/ml
(Maus) *BD Pharmingen* (Franklin Lakes, USA)

Prinzip

Bei der Bax-Färbung handelt es sich um eine intrazytoplasmatische Färbung des proapoptotischen Proteins Bax. In Zellen, die in Apoptose gehen, steigt die Konzentration dieses Proteins.

Procedere

Die Zellen wurden zur Färbung in ein FACS-Röhrchen überführt und zentrifugiert (5 min, 1500rpm). Auf ca. 100 µl des Überstandes gab man 100 µl Medium A und inkubierte den Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur (im Dunkeln). Nach erneuter Zentrifugation, Abnahme des Überstandes und zweimaligem Waschen der Zellen mit FACS-Puffer wurden 100 µl Medium B, 1 µg Anti-Bax-Antikörper bzw. die äquivalente Menge des Kontrollantikörpers zum Pellet gegeben. Auf die 20-minütige Inkubation bei 4 °C im Kühlschrank folgten die oben genannten Waschschrte. Anschließend wurde das Pellet in 100 ml FACS-Puffer aufgenommen und mit 1 µg Anti-Mouse-IgG₁-FITC 20 min lang bei 4 °C inkubiert. Danach folgte die Messung mit den gewaschenen und in 500 µl FACS-Puffer resuspendierten Zellen.

3.8.4 Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzahl

Material

Anti-CD19-FITC-Antikörper

Anti-Mouse-IgG₁-FITC

Beckman Coulter GmbH (Krefeld, D)

Flow-Count-Fluorospheres
(Konzentration chargenabhängig)

Beckman Coulter GmbH (Krefeld, D)

Prinzip

Mit Hilfe einer im FACS konstant eingezählten Menge Flow-Count-Fluorospheres, deren Konzentration im Messansatz bekannt ist, kann die Zahl der gleichzeitig eingezählten CD19-positiven (also der CLL-) Zellen bestimmt werden. Diese Methode fand bei Versuchen mit CLL-Stroma-Kokultur Verwendung. Die Berechnung wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$N = \frac{\text{Eingezählte Zellen}}{\text{Anzahl Fluorospheres}} \times [\text{Fluorospheres}] \times \frac{\text{Gesamtvolumen}}{\text{Verdünnung}}$$

Abb. 3 zeigt die vor den eigentlichen Versuchen durchgeführten Kontrollmessungen.

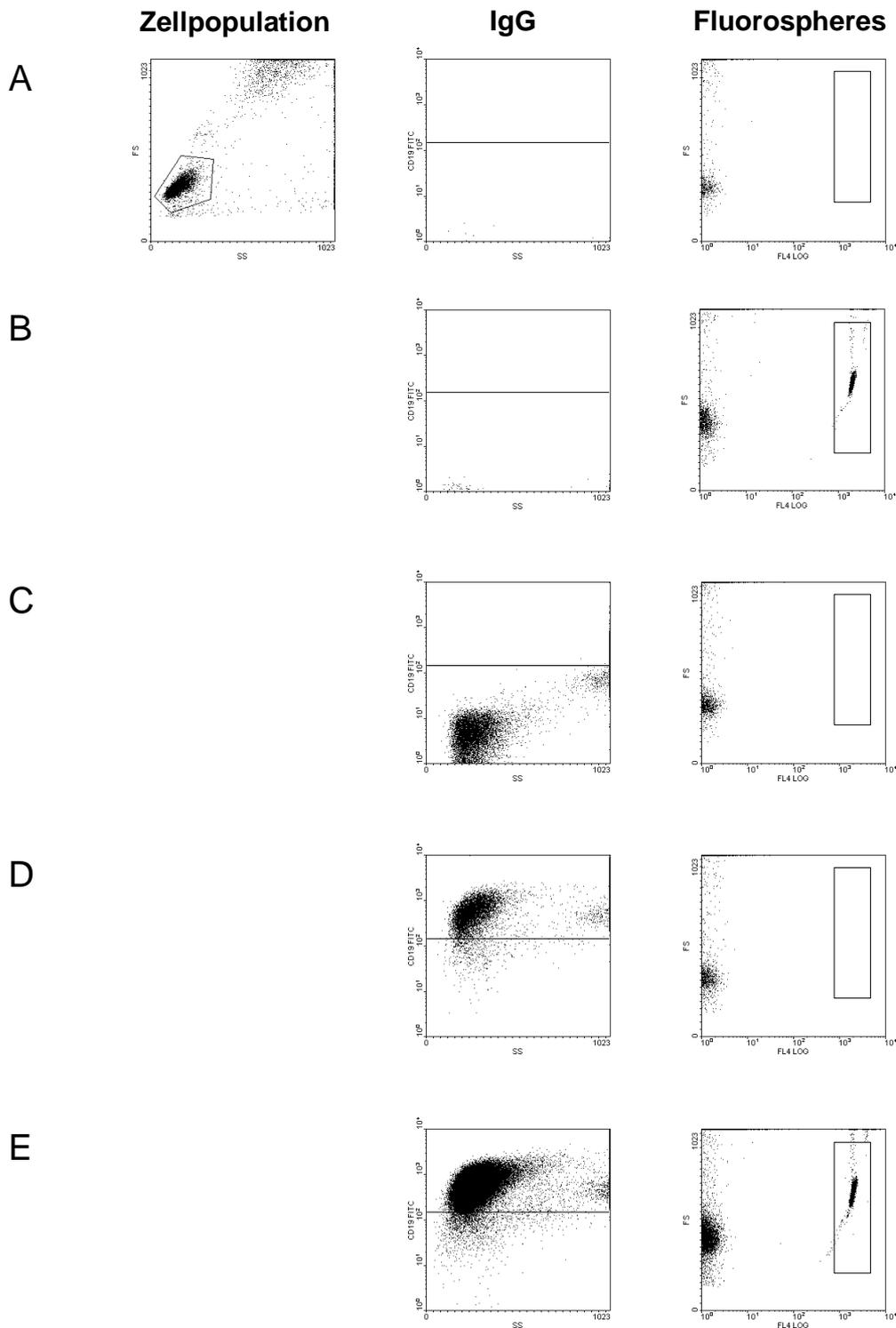


Abb. 3: Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzahl

A Messung ohne IgG und Fluorospheres **B** Messung mit Fluorospheres **C** Messung mit Ig-Isotypkontrolle **D** Messung mit Anti-CD19-FITC **E** Messung mit Anti-CD19-FITC und Fluorospheres

Procedere

Nach Abnahme der Zellen und Zentrifugation (5 min, 1500 rpm) wurden 200 µl FACS-Puffer sowie 10 µl Anti-CD19-Antikörper respektive Kontrollantikörper hinzupipettiert. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei 4 °C. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit FACS-Puffer nahm man die Zellen in 200 µl FACS-Puffer und 100 µl Fluorospheres-Suspension auf.

3.9 Western-Blot

Material

Acryl/Bis 1.69 Rotiphorese Gel 30	<i>Roth</i> (Karlsruhe, D)
Albumin Fraction V	<i>Roth</i> (Karlsruhe, D)
APS	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, D)
Anti-Maus-Antikörper	<i>GE Healthcare UK Limited</i> (Little Chalfont Buckinghamshire, UK)
Anti-Kaninchen-Antikörper	<i>GE Healthcare UK Limited</i> (Little Chalfont Buckinghamshire, UK)
Bax-Antikörper (Maus)	<i>BD Pharmingen</i> (Franklin Lakes, USA)
β-Aktin-Antikörper (Maus)	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, D)
Bcl-2-Antikörper (Maus)	<i>BD Pharmingen</i> (Franklin Lakes, USA)
Benzamidine 5 mM 100x	<i>Fluka Chemika</i> (Buchs, CH)
BioMax MR Film	<i>Kodak</i> (Cedex, F)
DTT	<i>Fluka Chemika</i> (Buchs, CH)
D _c -Protein-Assay Reagent A, B, S	<i>Bio-Rad Laboratories</i> (München, D)
EDTA	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, D)
Elektrophoresekammer	<i>Biometra</i> (Göttingen, D)
Gel Blotting Paper BG 005	<i>Whatman GmbH</i> (Dassel, D)
Gele	
▪ Trenngel (12%):	
- 9 ml Acryl/Bis 1.69 Rotiphorese Gel 30	
- 5,625 ml 4x Trenngelpuffer pH 8,8	
- 7,875 ml Aqua dest.	

- 75 µl 10% APS
- 15 µl TEMED
- **Sammelgel :**
 - 1,8 ml Acryl/Bis 1.69 Rotiophorese Gel 30
 - 3,5 ml Sammelgelpuffer pH 6,8
 - 8,54 ml Aqua dest.
 - 70 µl 10% APS
 - 14 µl TEMED

Glasplatten (14,7 x 14,3 mm)	<i>Biometra</i> (Göttingen, Deutschland)
Glycerol 100%	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, D)
Glycin	<i>Roth</i> (Karlsruhe, D)
Hypercassette™	<i>Amersham Life Science</i> (Little Chalfont Buckinghamshire, UK)
Hyperfilm™ECL™:	<i>Amersham Bioscience</i> (Buckinghamshire, UK)
Hyperprocessor	<i>Amersham Life Science</i> (Little Chalfont Buckinghamshire, UK)
Isoliergummis	<i>Biometra</i> (Göttingen, D)
Kämme	<i>Biometra</i> (Göttingen, D)
Kühleppendorffzentrifuge, Mikro 22 R	<i>Hettich</i> (Tuttlingen, D)
Mcl-1-Antikörper (Kaninchen)	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc.</i> (Santa Cruz, USA)
Milchpulver	<i>Roth</i> (Karlsruhe, D)
NaCl	<i>Roth</i> (Karlsruhe, D)
NaF 0,5M 10x	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, D)
NaH ₂ PO ₄ pH 4,4	<i>Merck</i> (Darmstadt, D)
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O pH 8,8	<i>Merck</i> (Darmstadt, D)
NaN ₃	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, D)
Na-Pyrophosphat 50mM pH 7,0-7,5 5x	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, D)
Orthovanadate 100 mM 100x	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
Phospo-Bcl-2-Antikörper (Kaninchen)	<i>Cell Signaling Technology</i> (Danvers, USA)
PKCβ-Antikörper (Maus)	<i>BD Pharmingen</i> (Franklin Lakes, USA)
PMSF 1 mM 100x	<i>Roche</i> (Mannheim, Deutschland)

Precision Plus Protein Dual Colors Standard	<i>Bio-Rad Laboratories</i> (München, D)
Protease-Inhibitor Tablette 1x	<i>Roche</i> (Mannheim, D)
Protein Assay Standard II (3mg/ml)	<i>Bio-Rad Laboratories</i> (München, D)

Puffer

- Blocking-Puffer:
 - 2 g Milchpulver bzw. 1 g BSA (je nach Antikörper)
 - auf 20 ml mit PBS + 1% Tween aufgefüllt

- 10x-Lauf-Puffer:
 - 288 g Glycin
 - 60 g Tris
 - 20 g SDS
 - mit Aqua dest. auf 2 l aufgefüllt

- 5x-Lyse-Puffer:
 - 10 ml TRIS 1M pH 7,5 mit HCl eingestellt
 - 52 ml NaCl 2,5M
 - 10 ml 0,5 M EDTA pH8
 - 10 g (ca. 12 ml) Triton X-100 (5%)
 - auf 200ml dest. Wasser aufgefüllt

- 1x-Lyse-Puffer:
 - 2,0 ml 5x Lysis-Puffer
 - 0,4 ml 25x Phosphat-Puffer pH 7,0 (bestehend aus: NaH_2PO_4 pH 4,4; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 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 5 mM
 - 0,1 ml 100x PMSF 1 mM
 - 0,1 ml 100x Orthovanadate 100 mM
 - 1x-Protease-Inhibitor (1 Tablette)
 - mit 10 ml Aqua dest. aufgefüllt

- Protein-Loading-Puffer:
 - 10 ml 1M DTT
 - 5 ml 1M TRIS pH 6,8 mit HCl eingestellt
 - 20 ml SDS 10%
 - 2,5 ml Bromphenolblau 1%
 - 10 ml Glycerol 100%

- Sammelgelpuffer (4x) pH 6,8:
 - 6,05 g TRIS
 - 0,4 g SDS
 - auf 100 ml Aqua dest.
 - pH-Einstellung mit HCL

- Stripping-Puffer (Amido Black Destain):
 - 100 ml Methanol (100%)
 - 100 ml Essigsäure (100%)
 - 800 ml Aqua dest.

- Transfer-Puffer:
 - 3,5 l Aqua dest.
 - 1 l Methanol
 - 0,5 l 10%-Lauf-Puffer

- Trenngelbuffer (4x) pH 8,8:
 - 91 g TRIS
 - 2 g SDS
 - auf 500 ml Aqua dest.
 - pH-Einstellung mit HCL

- Wasch-Puffer:
 - PBS + 1% Tween

Schüttler WT 12	<i>Biometra</i> (Göttingen, D)
SDS	<i>Fluka Chemika</i> (Buchs, CH)
Stromquelle Power Pack P25 T	<i>Biometra</i> (Göttingen, D)
Super Signal Chemoluminiszenz- substrate: Pico, Dura, Femto ⁴⁷ Peroxid-Puffer Verstärker-Lösung	<i>Pierce Biotechnology</i> (Bonn, D)
TEMED	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, D)
Thermomixer	<i>Eppendorf</i> (Hamburg, D)
Tissue Culture Flasks	<i>Greiner</i> (Frickenhausen, D)
Transfer-Kammer	<i>Biometra</i> (Göttingen, D)
Transfer-Membran	<i>Millipore Corporation</i> (Bedford, USA)
TRIS 1M	<i>Roth</i> (Karlsruhe, D)
Triton X-100	<i>Roth</i> (Karlsruhe, D)
Tween	<i>Fluka Chemika</i> (Buchs, CH)
Universal Microplate Reader Software: kc junior	<i>BioTek</i> (Bad Friedrichshall, D)
XIAP-Antikörper (Kaninchen)	<i>Cell Signaling Technology</i> (Danvers, USA)

⁴⁷ Stärken der Entwicklungslösung in aufsteigender Reihenfolge

Prinzip

Mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens kann die Konzentration einzelner zellulärer Proteine semiquantitativ ermittelt werden. Dazu werden nach Zelllyse und Bestimmung der Proteingesamtkonzentration im jeweiligen Ansatz die Proteinlysate auf ein SDS-Gel aufgetragen und nach Molekulargewicht elektrophoretisch getrennt. Die aufgetrennten Proteine werden anschließend vom Gel auf eine Membran übertragen („geblottet“), die mit spezifischen Primärantikörpern gegen bestimmte Proteine und enzymgekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert werden. Schließlich können mittels einer speziellen Entwicklungslösung Banden unterschiedlicher Intensität auf einem Film sichtbar gemacht werden, wodurch ein Rückschluss auf die Menge des exprimierten Proteins möglich ist.

Procedere

Lyse. Für die Zelllyse wurde der Lyse-Puffer jeweils frisch angesetzt. Zunächst wurden die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellpellets aufgetaut und mit ca. 50 µl (je nach Größe des Pellets) 1x-Lyse-Puffer in Eppendorfgefäße überführt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis folgte die Zentrifugation in der Kühlzentrifuge (20 min, 14.000 rpm, 4 °C). Der Überstand, der die lysierten Proteine des Zytoplasmas enthält, wurde abgenommen und in neue Gefäße überführt.

Proteinbestimmung (Methode nach Lowry). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde zunächst eine Verdünnungsreihe ausgehend von einem Proteinstandard (Protein Assay Standard II, 3mg/ml) in Eppendorfgefäße pipettiert (3; 1,5; 0,75; 0,375; 0,19; 0,09 mg/ml). Anschließend entnahm man dem Lysat 10 µl und verdünnte diese mit Lyse-Puffer (Volumen je nach Größe des Pellets nach Lyse). Je 5 µl der jeweiligen Probenverdünnung sowie je 5 µl der Verdünnungsreihe wurden nun in eine 96-Well-Platte pipettiert. In jedes Well gab man ferner 25 µl einer Mischung aus Reagent A (1 ml) und Reagent S (20 µl) sowie je 200 µl Reagent B. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Bestimmung.

Laufgelherstellung. Zunächst wurden 10,5 ml des flüssigen Trenngels (Zusammensetzung vgl. Kap. 3.9) zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und mit Methanol überschichtet. Nach 30 min goss man das Methanol ab und füllte das inzwischen angesetzte Sammelgel (Zusammensetzung vgl. Kap. 3.9) ein. Zur Bildung von Geltaschen für die Aufnahme des lysierten Proteins wurde ein Kamm eingesetzt. Nach weiteren 30 min war das Gel für die Elektrophorese ausgehärtet.

Gelelektrophorese. Für die Gelelektrophorese wurde das Gel in den Glasplatten in eine Laufkammer gespannt, die mit 500 ml 1x-Lauf-Puffer (10x-Lauf-Puffer 1:10 mit Aqua dest. verdünnt) gefüllt war. Das Proteinlysate wurde mit 2x-Loading-Puffer im Verhältnis 1:2 verdünnt und anschließend 10 min bei 95 °C zum Aufbrechen der Raumstruktur (Tertiär-, Quartärstruktur) der Proteine aufgekocht und zentrifugiert. Darauf wurde das mit Hilfe der Proteinbestimmung ermittelte Volumen der jeweiligen Probe in die Taschen des Gels gefüllt. Um die Position der Banden sichtbar zu machen, wurde in die erste Tasche ein farbmarkierter Proteinstandard gegeben. An die Laufkammer wurde dann für die erste halbe Stunde eine Spannung von 60 V angelegt. Die weitere elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 30 V über Nacht.

Transfer. Zum Transfer der aufgetrennten Proteine wurde das Gel vorsichtig von den Glasplatten getrennt, auf die in Methanol getränkte Transfermembran verbracht und zwischen zwei Whatman-Papers und Polstern in Kunststoffgitter gespannt. Selbige wurden anschließend in die mit Transfer-Puffer gefüllte Transferkammer gehängt. Diese wurde an eine Stromquelle angeschlossen (Stromstärke 0,8 mA). Die Transferzeit betrug i.d.R. ca. 40 min (abhängig vom Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine).

Antikörper-Inkubation und Filmentwicklung. Die Primärantikörper wurden 1:2000 in 20 ml Milch oder BSA eingesetzt. Dazu wurde jeweils 1g Milchpulver bzw. BSA abgewogen und in ein 50 ml-Tube gegeben, das auf 20 ml mit PBS/Tween aufgefüllt wurde. Dieser Mischung wurden zur Konservierung noch 100 µl NaN₃ zugesetzt. Die Sekundärantikörper wurden jeweils frisch 1:10.000 in 20 ml 5%-iger Milch bzw. BSA eingesetzt (s.o.).

Zur Minimierung unspezifischer Antikörperbindung wurde die Membran zunächst 1 h auf dem Schüttler in 10%-Milch bzw. 5%-BSA eingelegt („Blocken“). Anschließend wurde die Membran mit einem spezifischen Primärantikörper für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach 10-minütiger Behandlung der Membran mit Wasch-Puffer, wurde der Sekundärantikörper für 30 min auf die Membran gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/Tween für 20 min und PBS für 10 min, pipettierte man eine Mischung aus je 2 ml der Entwicklerlösung A und B (Piko, Dura, Femto, je nach Protein) auf die Membran. Die Membran wurde daraufhin in einer Klarsichtfolie in eine Entwicklungskassette eingelegt und in der Dunkelkammer unter einen Film gelegt (Dauer der Filmauflage unterschiedlich). Zuletzt wurde dieser Film im Hyperprocessor entwickelt.

3.10 In den Experimenten verwendete Agenzien

Bisindolylmaleimide I	<i>CALBIOCHEM</i> (Gibbstown; USA)
Doxorubicin	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, D)
Gö 6976	<i>CALBIOCHEM</i> (Gibbstown; USA)
Gö 6983	<i>CALBIOCHEM</i> (Gibbstown; USA)
1D09C3	<i>GPC Biotech AG</i> (Martinsried, D)
LY 294002	<i>CALBIOCHEM</i> (Gibbstown; USA)
Mitomycin C	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, D)
Roscovitin	<i>CALBIOCHEM</i> (Gibbstown; USA)
Rottlerin	<i>CALBIOCHEM</i> (Gibbstown; USA)
Z-VAD-FMK	<i>CALBIOCHEM</i> (Gibbstown; USA)

4 Versuche und Ergebnisse

4.1 Expression und Regulation von Bcl-2, Mcl-1 und XIAP

4.1.1 Basale Expression in CLL-Zellen und gesunden B-Zellen

Das antiapoptotische Protein Bcl-2 ist in leukämischen B-Zellen überexprimiert (vgl. Kap.1.2.4). Ferner wird eine erhöhte Chemoresistenz bei manchen Patienten mit einer vermehrten Konzentration von Mcl-1 korreliert, XIAP scheint in CLL-Zellen ebenfalls in erhöhter Konzentration vorzuliegen. In einem ersten Versuch sollten diese in der Literatur passim beschriebenen Befunde bestätigt werden. Abb. 4 zeigt daher im Western-Blot die basale Expression von Bcl-2, Mcl-1 und XIAP in den Zellen sechs verschiedener Patienten, die in ZAP-70-positiv und –negativ differenziert sind. Zusätzlich wurden zum Vergleich auch die Zellen zweier gesunder Donatoren (C1 und B1) isoliert und ihr Gehalt an diesen Proteinen bestimmt.

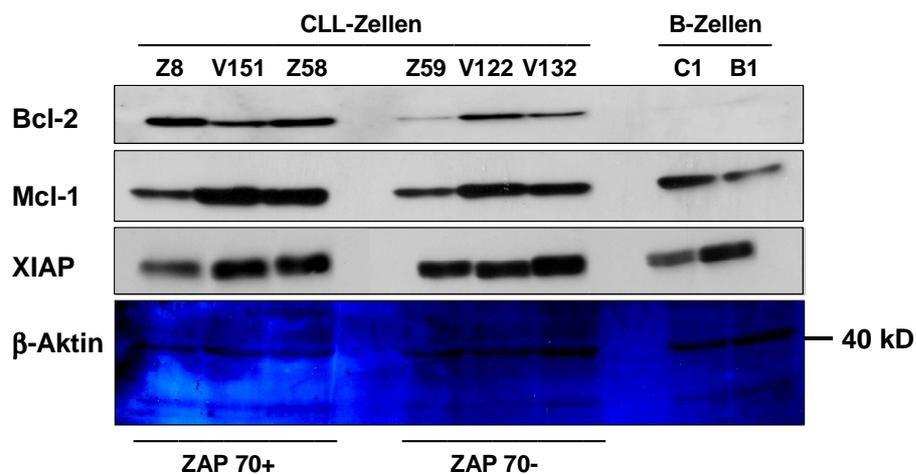


Abb. 4: Basale Expression von Bcl-2, Mcl-1 und XIAP in CLL-Zellen und gesunden B-Zellen

Western-Blot: Als Ladungskontrolle ist die mit Amido-Black gefärbte Membran gezeigt, die Bande bei 40 kD kann als β -Aktin identifiziert werden.

Sehr auffällig ist, dass Bcl-2 in gesunden B-Zellen nahezu nicht nachweisbar ist, wohingegen die Proteinbanden der CLL-Zellen deutlich erkennbar sind. Für Mcl-1 ist dagegen kein solch eklatanter Unterschied zwischen gesunden und leukämischen Zellen zu sehen. Allerdings ist es zumindest bei zwei der ZAP-70-positiven Patienten (Z51 und Z58) im Vergleich zu den restlichen Zellen deutlich überexprimiert (bei relativer Unterbeladung aller ZAP-70-positiven

Patienten, wie die β -Aktin-Bande zeigt). Ein ähnliches Bild ergibt sich für XIAP, das aber im Unterschied zu Bcl-2 und Mcl-1 in den ZAP-70-positiven Zellen nicht wesentlich höher exprimiert ist als in den ZAP-70-negativen. Insgesamt zeigt sich bei allen Proteinen ein eher heterogenes Expressionsmuster, so liefert beispielsweise unter den ZAP-70-positiven Patienten Z8 die höchste Bcl-2-Konzentration, gleichzeitig aber die geringsten Konzentrationen von Mcl-1 und XIAP. Z59 dagegen weist unter den ZAP-70-Negativen durchgehend bei allen Proteinen die geringste Expression auf. Bei den gesunden Spendern verhalten sich die Konzentrationen von Mcl-1 und XIAP geradezu invers.

Dem Befund dieses Experiments nach zu urteilen, müsste man für Bcl-2 eine wesentliche Rolle innerhalb des defekten Apoptosegeschehens in den CLL-Zellen postulieren, da es in CLL-Zellen überexprimiert wird, in normalen B-Zellen aber – anders als Mcl-1 – kaum vorhanden ist. Bisher publizierten Erkenntnissen⁴⁸ und den Ergebnissen eigener Versuch zufolge scheint es aber ebendiese Rolle nicht zu spielen (s.u.).

4.1.2 Reaktion antiapoptotischer Proteine auf verschiedene proapoptotische Agenzien

In einem zweiten Experiment sollte gezeigt werden, wie sich die Konzentration der verschiedenen antiapoptotischen Proteine als Reaktion auf unterschiedliche Noxen verändert und ob sich eine Assoziation zwischen dieser Veränderung und einer erhöhten Apoptose herstellen lässt. Dazu wurden die Zellen mit folgenden Substanzen behandelt, die ihre Wirkung über differente Mechanismen entfalten: LY 294002, Rottlerin, 1D09C3, Doxorubicin und Roscovitin. Bei LY 294002 und Rottlerin handelt es sich um Kinase-Inhibitoren, die die PI3-Kinase respektive die Proteinkinase C δ relativ spezifisch hemmen. Die genaue Wirkungsweise des HLA-DR-Antikörpers 1D09C3 konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Carlo-Stella et al. zeigten jedoch, dass der Antikörper sowohl in Zelllinien als auch in primären B-Zellen massiv Apoptose induziert, die caspasenunabhängig abläuft.⁴⁹ Das Anthrazyklin Doxorubicin gehört zu den zytostatisch wirkenden Antibiotika, die durch eine Interkalation in die DNA oder RNA zu einer gestörten Nukleinsäuresynthese führen. Daneben verursacht Doxorubicin Strangbrüche und induziert die Bildung von zellschädigenden Radikalen. Schließlich fand der CdK2-Inhibitor Roscovitin Verwendung, der den Anteil der im Zellzyklusarrest befindlichen Zellen erhöht und zusätzlich Apoptose induziert.⁵⁰

⁴⁸ Vgl. Kap. 1.2.4

⁴⁹ Vgl. Carlo-Stella et al. 2006, S. 1802 f.

⁵⁰ Vgl. Decker et al. 2004, S. 147

Um die Wirkung auf die Expression von Bcl-2, Mcl-1 und XIAP und die Apoptose zu ermitteln, wurden die CLL-Zellen 24 h mit den entsprechenden Agenzien kultiviert.⁵¹ Anschließend wurde ein Western-Blot sowie ein Annexin-V-Assay durchgeführt (Abb. 5).

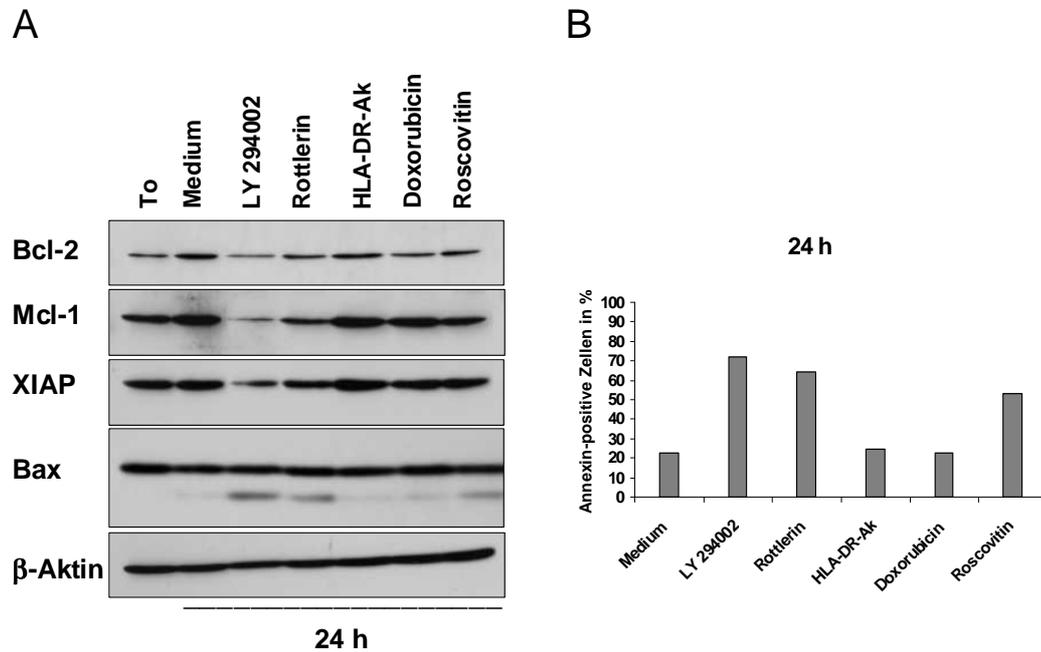


Abb. 5: Wirkung verschiedener proapoptotischer Agenzien auf CLL-Zellen.

Eingesetzte Konzentrationen: LY 294002, 10 μ M; Rottlerin, 5 μ M; HLA-DR-Antikörper 1D09C3, 100 ng/ml; Doxorubicin, 300 ng/ml; Roscovitin, 20 μ M.

A Western-Blot nach 24h. Für Bax wurde eine separate Elektrophorese durchgeführt. **B** Annexin-V-Assay nach 24 h

Im Western-Blot (Abb. 5 A) fällt auf, dass sich bei allen Substanzen die Konzentration von Bcl-2 kaum verändert. Bei Mcl-1 und XIAP dagegen ist im Falle von LY 294002, Rottlerin und – allerdings weit weniger ausgeprägt – Roscovitin eine Abnahme der Proteinkonzentration zu beobachten. Ebendiese Agenzien zeigen auch in der Annexin-Messung (Abb. 5 B) deutliche Effekte. Eine Abnahme von Mcl-1 und XIAP korreliert also negativ mit dem Anteil Annexin-positiver Zellen. Die Apoptoseaktivierung belegt zusätzlich das Auftreten von Bax-Spaltprodukten im Western-Blot bei den wirksamen Inhibitoren LY 294002, Rottlerin und Roscovitin (zu sehen als zusätzliche Bande unterhalb der Bax-Bande in Abb. 5 A).

⁵¹ Zu den eingesetzten Konzentrationen: Zu LY 294002 und Rottlerin vgl. Ringshausen et al. 2002, S. 3743, S. 3746; zu Roscovitin vgl. Decker et al. 2004, S. 145. Die Konzentrationen von 1D09C3 und Doxorubicin orientierten sich an den Ergebnissen von in der Arbeitsgruppe durchgeführten Dositrationen; es wurde jeweils eine wirksame mittlere Konzentration gewählt.

Da die durch eine Zellschädigung bewirkte Apoptosezunahme mit einer verminderten Konzentration von Mcl-1 und XIAP einhergeht, ist anzunehmen, dass diese beiden Proteine maßgeblich am Defekt der Apoptose in der CLL beteiligt sind. Diese Bedeutung scheint das in CLL-Zellen generell überexprimierte Bcl-2 nicht zu besitzen.

Wichtig zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang, dass die Regulation der Proteine in den Zellen verschiedener Patienten sehr heterogen ist. Demensprechend sind die Apoptoseraten unter Behandlung mit proapoptotischen Substanzen ebenfalls sehr unterschiedlich. Abb. 6 zeigt eine Übersicht von Annexin-Messungen an den Zellen von fünf Patienten.

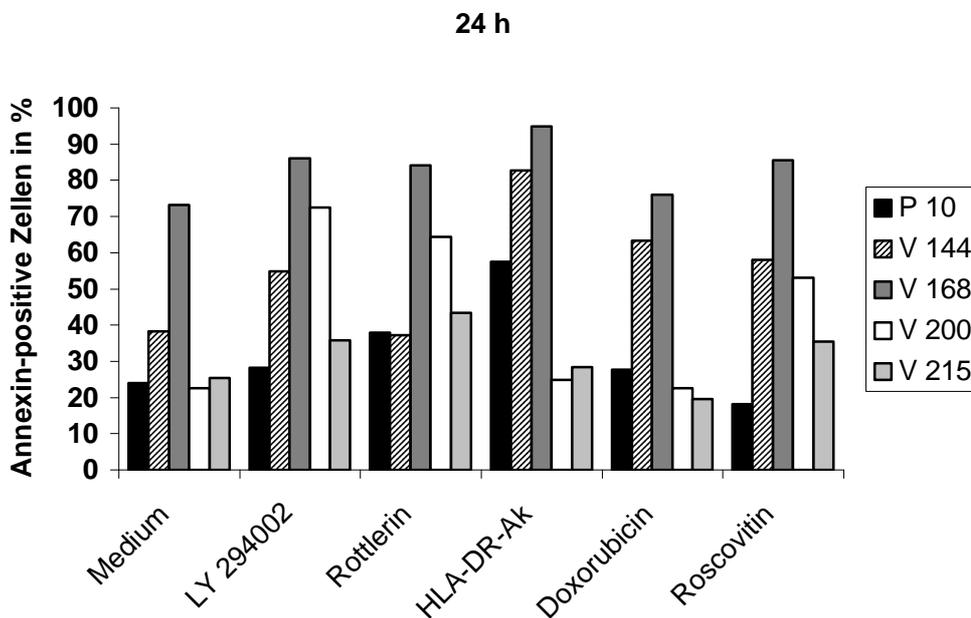


Abb. 6: Synopsis der Annexin-V-Messungen nach 24 h an den Zellen fünf verschiedener Patienten.

Konzentrationen wie in Abb. 6.

Grundsätzlich unterscheidet sich die Wirksamkeit der einzelnen Agenzien von Patient zu Patient, wenngleich LY 294002, Rottlerin und Roscovitin, die auch bei dem Patienten in Abb. 5 die potentesten sind, mit jeweils einer Ausnahme einen deutlichen Effekt zeitigen. Bei dem Patienten V168, der mit einer extrem hohen Spontanapoptose imponiert, bewirken die Substanzen erwartungsgemäß nur eine geringere Zunahme der apoptotischen Zellen. Der Patient V144 reagiert kaum auf Rottlerin, P10 hingegen fällt dadurch auf, dass er im Wesentlichen nur auf den HLA-DR-Antikörper anspricht. Der HLA-DR-Antikörper 1D09C3 bewirkt – unabhängig davon, ob er bei einem bestimmten Patienten Apoptose induzieren kann – keine Verminderung der Konzentration von Mcl-1 oder XIAP im Western-Blot (nicht

gezeigt). Diese Tatsache weist auf neben den klassischen Proteinen der Bcl-2-Familie und der IA-Proteine vorhandene Regulatoren der Apoptose hin, die bislang aber nicht bekannt sind.

Insgesamt lässt sich also kein Agens als das potenteste identifizieren, was der bereits erwähnten Heterogenität der CLL geschuldet ist. Dabei entspricht die Variabilität *in vitro* einer ebenso ausgeprägten *in vivo*, allerdings wäre es verfehlt, von der *In-vitro*-Reaktion eines Patienten auf das *In-vivo*-Ansprechen auf eine bestimmte Chemotherapie zu schließen, da *in vivo* unzählige Faktoren wirksam sein können, die im Zellmodell fehlen. Auch die im Folgenden beschriebenen Versuchsergebnisse sind immer unter dem Aspekt dieser biologischen Heterogenität der CLL zu sehen.

4.1.3 Regulation von Mcl-1 durch PI3-Kinase und PKC δ

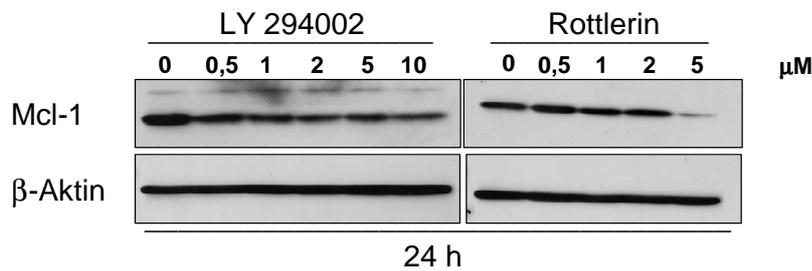
4.1.3.1 Dosis titration von LY 294002 und Rottlerin

In Abb. 5 zeigt sich insbesondere für Mcl-1 eine deutliche Verminderung der Proteinkonzentration nach einer Behandlung mit LY 294002 und Rottlerin. Dies lässt auf eine maßgebliche Bedeutung des PI3-Kinase-/Proteinkinase-C-Signalweges für die Regulation von Mcl-1 schließen. Um die Spezifität und die dosisabhängige Wirkung von LY 294002 und Rottlerin zu zeigen, wurden die beiden Inhibitoren bis zur in der Literatur angegebenen Konzentration⁵² titriert. Dabei wurden sowohl Proteinmengen als auch der Anteil Annexin-positiver Zellen bestimmt. Abb. 7 A zeigt den Western-Blot für Mcl-1 nach 24 h. Zu erkennen ist eine stetige Abnahme der Konzentration, die mit dem stetigen Anstieg der Annexin-positiven Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse korreliert (Abb. 7 B).

Nach der Inkubation mit Rottlerin erbringt der Western-Blot ein etwas anderes Ergebnis. Bis zur Konzentration von 2 μ M bleibt die Intensität der Banden annähernd gleich, um dann erst bei 5 μ M stark abzufallen. Wiederum findet dieser Befund seine Entsprechung in der Annexin-Messung: Während der Anteil der positiven Zellen von 0 μ M bis 2 μ M lediglich von etwa 25 % auf 40 % ansteigt, nimmt er bei 5 μ M auf beinahe 70 % zu.

⁵² Vgl. Kap. 4.1.2, Anm. 51

A



B

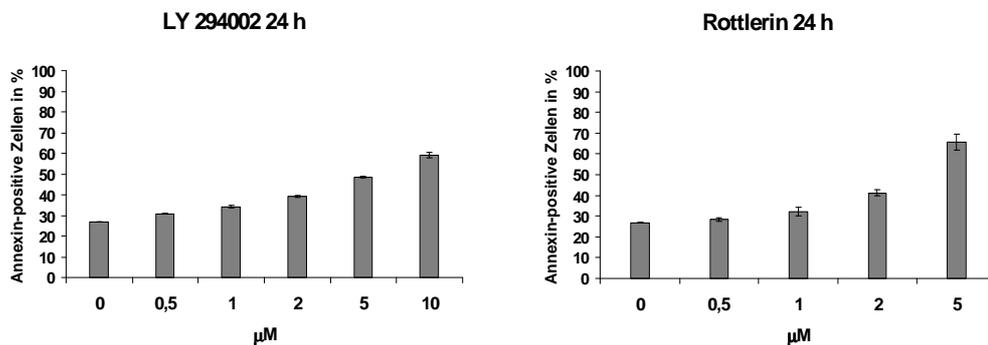


Abb. 7: Dosis titration von LY 294002 und Rottlerin.

A Western-Blot nach 24 h **B** Annexin-V-Assay nach 24 h; gezeigt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung der Ergebnisse dreier Versuchsansätze mit Zellen desselben Patienten. Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit den Zellen anderer Patienten ermittelt werden.

Wie bereits in Abb. 5 gezeigt, besteht also eine enge Assoziation zwischen der verminderten Konzentration von Mcl-1 und der vermehrten Apoptose. Des Weiteren lässt die nach einer Hemmung der PI3-Kinase bzw. Proteinkinase C konsekutiv verminderte Mcl-1-Expression eine Regulation innerhalb dieses Signalweges vermuten.

4.1.3.2 Koinkubation mit LY 294002 und Z-VAD.FMK

Aus dieser Beobachtung erwächst die Frage, ob Mcl-1 (und auch XIAP) als Bestandteil des Signalweges direkt reguliert wird oder ob es als Folge der nach der Inhibition der PI3-Kinase/Proteinkinase C aktivierten intrinsischen Apoptose durch Caspasen degradiert wird. Zur Beantwortung dieser Frage wurden leukämische B-Zellen für 6 h bzw. 24 h mit LY 294002 kultiviert, jeweils mit und ohne Zugabe des Caspase-Inhibitors Z-VAD.FMK, um durch die Ausschaltung der Caspasen einen etwaigen direkten Regulationseffekt nachweisen zu können.

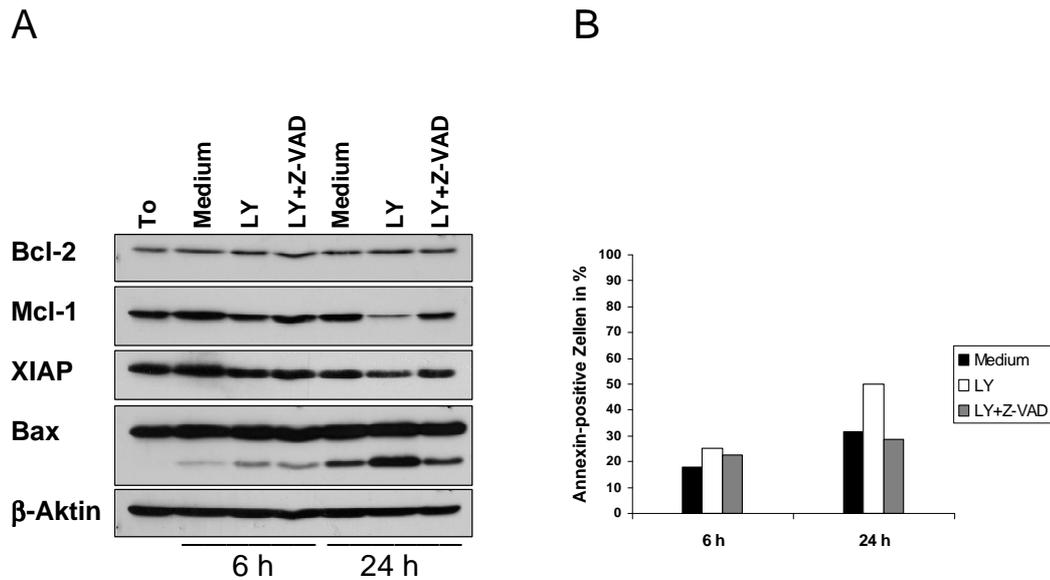


Abb. 8: Regulation der Apoptoseproteine durch PI3-Kinase: Wirkung des PI3-Kinase-Inhibitors LY 294002 mit und ohne den Caspase-Inhibitor Z-VAD.FMK

A Western-Blot nach 6 h und 24 h **B** Annexin-V-Assay nach 6 h und 24 h. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von dreien.

Mcl-1 weist im Western-Blot (Abb. 8 A) bereits nach 6 h gegenüber dem Medium unter Behandlung mit LY 294002 einen leichten Expressionsverlust auf, der nach 24h wesentlich zunimmt. In Zellen, die zusätzlich mit Z-VAD.FMK inkubiert worden waren, bleibt Mcl-1 dagegen konstant. Ein ähnliches Bild ergibt sich für XIAP, bei dem die Effekte aber weniger deutlich ausgeprägt sind. Die Bcl-2-Konzentration dagegen bleibt unverändert.

Die Ergebnisse der Annexin-Messung (Abb. 8 B) korrespondieren für Mcl-1 und XIAP mit dem Western-Blot. Nach 6 h zeigt LY 294002 nur einen geringen Effekt gegenüber dem Medium. Allerdings ist hier schon zu sehen, dass Z-VAD.FMK durch die Hemmung der Caspasen die Apoptose erwartungsgemäß reduziert. Nach 24 h ist die Apoptose unter LY 294002 gegenüber den Zellen in Medium bzw. den zusätzlich Z-VAD.FMK-behandelten signifikant erhöht. Auf die verstärkte Apoptoseaktivierung deutet wiederum das als besonders intensive Bande im Western-Blot sichtbare Bax-Spaltprodukt hin (Abb. 8 A).

Da Mcl-1 und XIAP unter der Behandlung der Zellen mit LY 294002 zwar abnehmen, dieser Effekt aber durch die Koinkubation mit dem Caspase-Inhibitor aufgehoben wird, kann zumindest unter den experimentellen Bedingungen nicht von einer direkten Regulation innerhalb des PI3-Kinase-Signalweges ausgegangen werden. Vielmehr scheint über andere,

bisher ungeklärte Mechanismen Apoptose induziert zu werden, innerhalb deren es dann sekundär zum Abbau von Mcl-1 und XIAP kommt. Dass die durch LY 294002 ausgelöste Apoptose dabei von Caspasen abhängig ist und nicht etwa auch caspasenunabhängige Vorgänge beinhaltet, belegt der mit dem Mediumwert beinahe identische Anteil Annexin-positiver Zellen in dem Ansatz, der mit Z-VAD-FMK inkubiert worden war. Eine Degradation von Bcl-2 ist allerdings nicht festzustellen. Somit belegt auch dieser Versuch, dass die Apoptose nicht entscheidend von der absoluten Bcl-2-Konzentration abhängig ist.

4.1.4 Knock-down von Mcl-1

Mcl-1 zeigt in den vorhergehenden Versuchen konstant die deutlichste Reaktion auf die Behandlung mit Inhibitoren respektive Chemotherapeutika. Da sich dieser Befund gleichzeitig mit einem wesentlich erhöhten Prozentsatz Annexin-positiver Zellen in der Durchflusszytometrie korrelieren lässt, kann man vermuten, dass Mcl-1 wesentlich an der Vermittlung des Apoptosedefekts beteiligt ist. Freilich können auch für XIAP im Western-Blot Regulationseffekte gezeigt werden, nur sind diese weitaus geringer.

Um der Bedeutung von Mcl-1 weiter nachzugehen und zu klären, ob die reduzierte Apoptosediatese von leukämischen B-Zellen Mcl-1-dependent ist, wurde mittels siRNA-Transfektion ein Mcl-1-Knock-down durchgeführt und anschließend durchflusszytometrisch die Apoptose gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 dargestellt. Der Western-Blot zeigt die Wirkung der spezifischen siRNA gegenüber der Kontroll-siRNA (Abb. 9 A). Um die Effektivität der Transfektion per se zu überprüfen, wurden die Zellen mit einer mit Alexa 488 markierten siRNA elektroporiert; die Konzentration wurde dann gegenüber einer Kontrolle zeitgleich mit den übrigen Messungen nach 24 h im Zytometer bestimmt (Abb. 9 B). Für die Erfassung der Apoptose wurden Annexin, Membranpotential und das proapoptotische Protein Bax gemessen (Abb. 9 C, D, E).

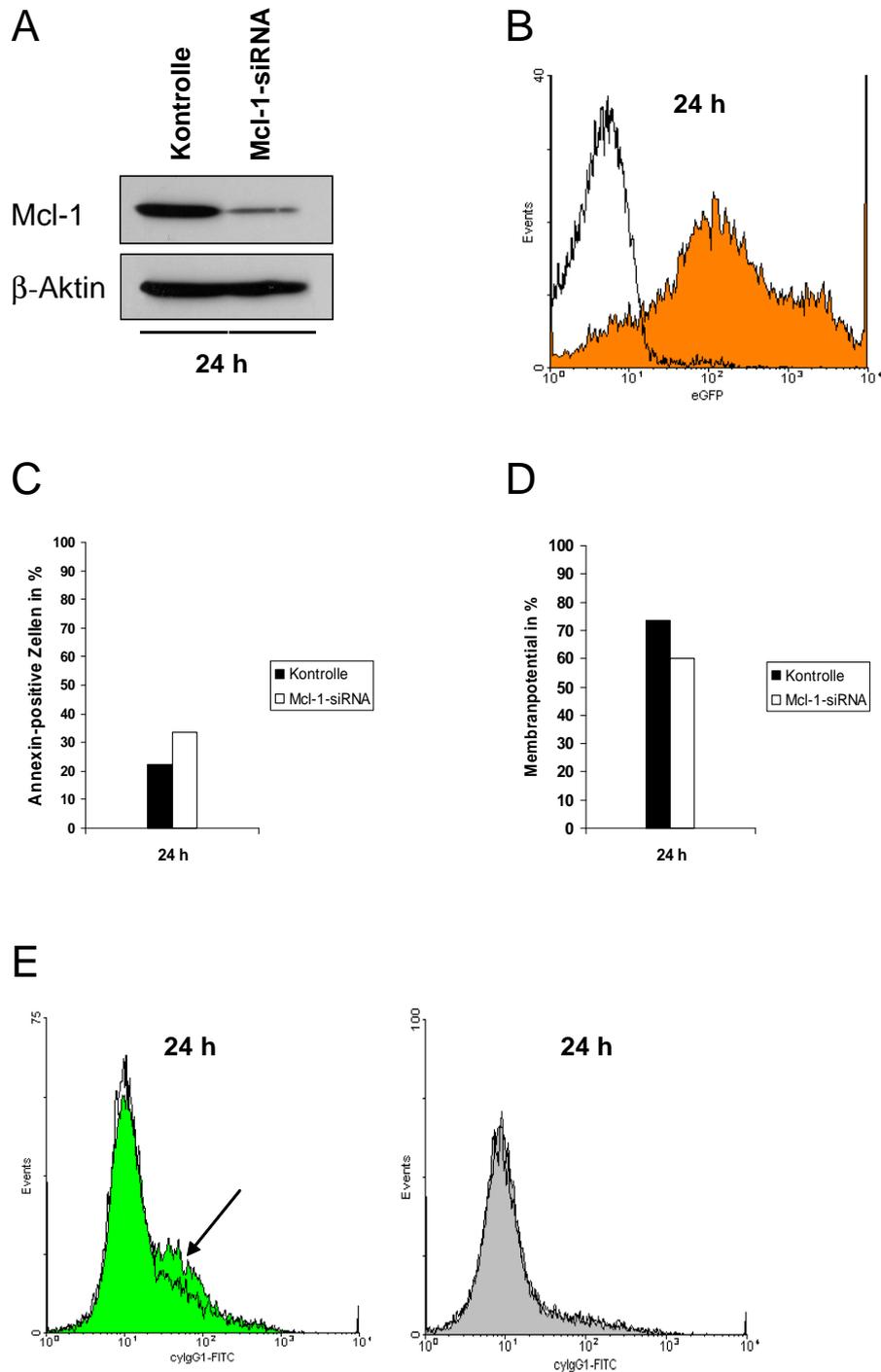


Abb. 9: Mcl-1-Knock-down mit spezifischer siRNA.

Messungen jeweils nach 24 h. **A** Western-Blot **B** Überprüfung der Transfektionseffizienz mittels Alexa-488-Titer **C** Annexin-V-Assay **D** $\Delta\psi$ -Assay **E** Intrazytoplasmatische Baxfärbung: Bax-Aktivierung nach Mcl-1-Knock-down (Pfeil); daneben: Isotypkontrolle

Der Western-Blot zeigt eine infolge des Knock-downs beträchtliche Reduktion der Proteinmenge. Sowohl die Annexin- als auch die DiOC₆-Färbung weisen eine signifikante Zunahme der apoptotischen Zellen nach, die auch die beginnende Bax-Aktivierung belegt (siehe Pfeil in Abb. 9 E). Somit kann man folgern, dass für den vermehrten Zelluntergang die partielle Ausschaltung von Mcl-1 durch die siRNA-Transfektion kausal ist.

Dasselbe Experiment wurde dann an den Zellen von vier weiteren Patienten durchgeführt (Abb. 10).

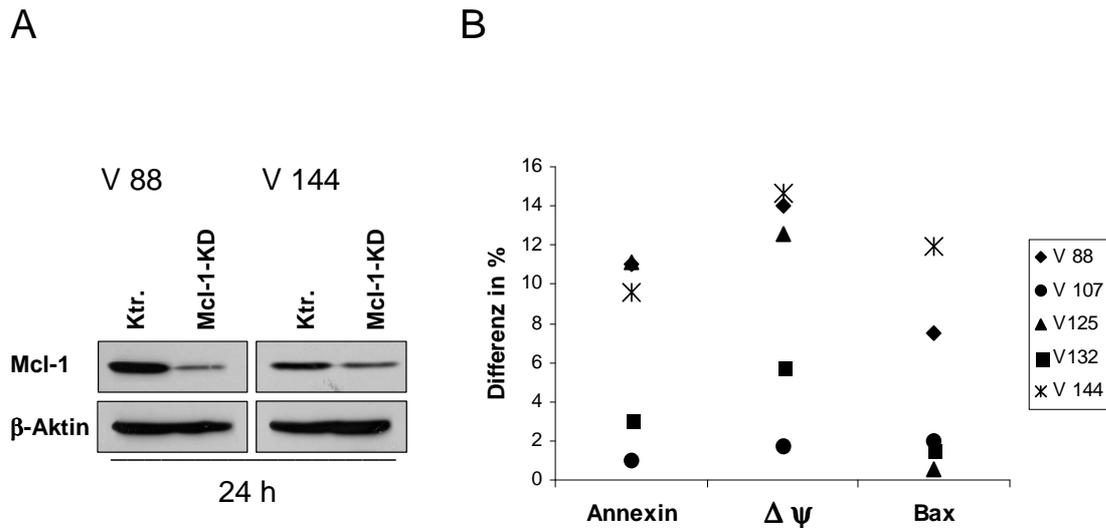


Abb. 10: Mcl-1-Knock-down an verschiedenen Patienten.

A Western-Blot von zwei exemplarisch gezeigten Patienten **B** Apoptoseaktivierung nach Mcl-1-Knock-down. Gezeigt sind die Differenzen zwischen Kontroll-siRNA und spezifischer Mcl-1-siRNA bei fünf Patienten.

Abb. 10 A vergleicht die Wirksamkeit des Knock-downs bei zwei Patienten (V 88 wurde bereits in Abb. 9 gezeigt) anhand von Western-Blots. Der Patient V 144 besitzt von vornherein eine geringere Mcl-1-Konzentration, die Reduktion des Proteins durch die siRNA ist weniger effektiv als bei V 88. In Abb. 10 B sind die Werte aber denen von V 88 ähnlich, die Bax-Aktivierung ist sogar stärker ausgeprägt. Es scheint also nicht möglich, von der im Western-Blot gezeigten Reduktion der Proteinkonzentration auf die Apoptosezunahme zu schließen. Denn im Falle von V 88 müsste der Effekt viel größer sein, da Mcl-1 hier viel stärker exprimiert ist als bei V 144. Die Frage, weshalb dies nicht der Fall ist, kann an dieser Stelle nicht befriedigend beantwortet werden. Möglicherweise sind in den Zellen von V 88 noch andere Faktoren wirksam, die bei V 144 fehlen oder weniger ausgeprägt sind.

Weiter fällt auf, dass bei dem Patienten V 125 eine nur geringfügige Bax-Zunahme zu detektieren ist, wobei die Differenzen im Annexin- und $\Delta\psi$ -Assay gut zu sehen sind. Bei V 107 hingegen sind in allen drei Messungen die Unterschiede sehr gering.

Es bleibt also zu konstatieren, dass sich durch die Mcl-1-spezifische RNA-Interferenz Apoptose induzieren lässt. Die Zunahme ist dabei sehr vom jeweiligen Patienten abhängig. Weder die basale Expression noch der Grad des Expressionsverlustes lassen einen Schluss auf die in den Apoptose-Assays gemessene Steigerung des programmierten Zelltodes zu.

4.2 Bedeutung der Proteinkinase C in der Kokultur mit Knochenmarkstroma

4.2.1 Protektiver Effekt von Ltk⁻ auf CLL-Zellen

Obwohl CLL-Zellen einen Apoptosedefekt und *in vivo* eine pathologisch verlängerte Überlebensdauer aufweisen, sterben sie bei Kultivierung in FCS und RPMI-1640-Medium innerhalb weniger Tage. Hält man die Zellen dagegen in einer Kokultur mit Knochenmarkstromazellen, können sie z.T. bis zu mehreren Wochen überleben. Um diesen protektiven Effekt zu zeigen, wurden Zellen dreier verschiedener Patienten 48 h auf die murine Stromazelllinie Ltk⁻ gesetzt. Jeweils nach 24 h und 48 h wurden die Zellen mit Annexin-FITC gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer gemessen (Abb. 11).

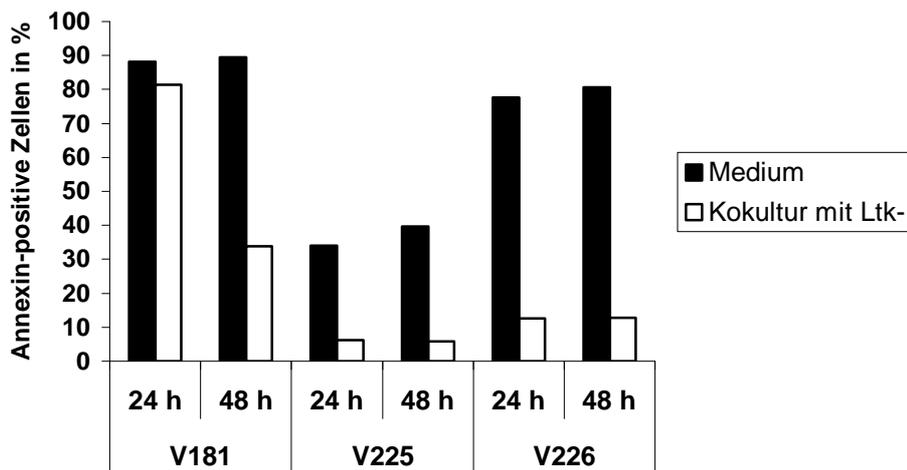


Abb.11: Protektiver Effekt der murinen Fibroblastenzelllinie Ltk⁻ auf CLL-Zellen

Annexin-V-Messung nach 24 h und 48 h.

Die Zellen der drei gezeigten Patienten weichen in Hinblick auf ihre Apoptoserate in Medium deutlich von einander ab. Der Patient V225 zeigt mit 35% bzw. knapp 40% Annexin-positiven Zellen nach 24 h bzw. 48 h nur eine etwa halb so hohe Spontanapoptose wie die beiden anderen Patienten. Entsprechend verringert sich dieser Anteil in der Kokultur auf den niedrigsten Wert. Relativ zum Mediumwert allerdings ist die Reduktion bei V226 noch stärker ausgeprägt. Bei V181 ist nach 24 h der Anteil der positiven Zellen bei den mit Ltk⁻ kultivierten Zellen gegenüber den in Medium gehaltenen nur geringfügig vermindert; nach 48 h aber ist ein starker Abfall zu beobachten. Zu erklären ist dieser Befund mit der sehr hohen Spontanapoptose dieses Patienten. Ein großer Anteil der anfangs noch Annexin-positiven

Zellen ist nach 48 h bereits nicht mehr detekierbar. Somit zeigt sich der supportive Effekt des Stromas erst nach diesem längeren Intervall.

Während bei V225 und V226 im Medium ein diskreter Anstieg der apoptotischen Zellen zu erkennen ist, bleibt dieser in der Kokultur aus. Die Stromazellen reduzieren also nicht nur die Spontanapoptose im Vergleich zum Medium, sondern verhindern auch deren Progression über die Zeit.

4.2.2 Proliferationshemmung von Ltk⁻ – Etablierung der Mitomycin-C-Behandlung

Für die folgenden Versuche waren Langzeitkulturen mit CLL- und Stromazellen geplant. Da die Ltk⁻-Zellen keine Kontaktinhibierung zeigen, war die starke Proliferation der Zelllinie anfangs der limitierende Faktor für die Kultivierungsdauer (vgl. Kap. 3.5). Bereits nach zwei bis drei Tagen überwuchsen die Fibroblasten die CLL-Zellen, was nicht zuletzt durch die Deprivation von Nährstoffen zu ungünstigen Kulturbedingungen führte. Daher wurden die Stromazellen zunächst bestrahlt, um ihre Proliferation zu inhibieren. Die Radiatio jedoch führt zu einer Reihe unspezifischer Schäden innerhalb der Zelle, deren Auswirkungen den Metabolismus der Stromazellen und damit indirekt auch die CLL-Zellen betreffen könnten. Daher wurde nach einer weiteren Methode gesucht, die das Wachstum ebenso effektiv hemmt, die Zellen aber weniger schädigt. Zu diesem Behufe wurden Ltk⁻-Zellen neben der Bestrahlung auch mit dem DNA-Synthese-Inhibitor Mitomycin C inkubiert. Anschließend wurden die unbehandelten, bestrahlten und Mitomycin-C-behandelten Zellen hinsichtlich der proliferationshemmenden (Abb. 12 A) und zellschädigenden (Abb. 12 B) Wirkung miteinander verglichen.

Bereits innerhalb von vier Tagen versiebenfacht sich die Zahl der unbehandelten Zellen annähernd (Abb. 12 A). Während nach Bestrahlung gegenüber dem Zeitpunkt T₀ nur noch knapp die Hälfte der Zellen vital ist, erkennt man bei den mit Mitomycin C behandelten Zellen kaum einen Unterschied. Radiatio und Mitomycin-C-Behandlung hemmen also effektiv die Proliferation, jedoch bewirkt die Bestrahlung einen wesentlich höheren Zelluntergang.

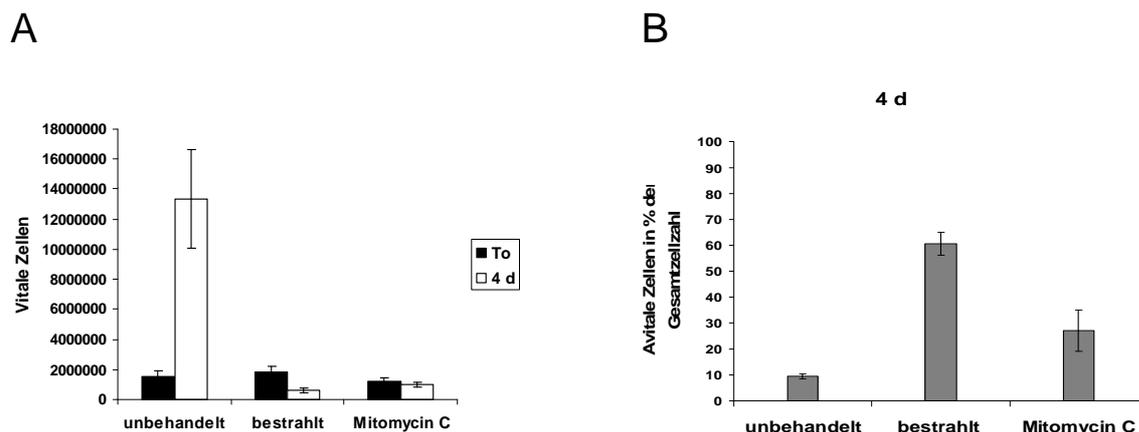


Abb. 12: Vergleich der Wirkung von Bestrahlung und Mitomycin-C-Behandlung auf die murine Stromazelllinie Ltk⁻¹: Trypanblau-Färbung

Strahlendosis: 30 Gy; Mitomycin-C-Konzentration: 10µg/ml.

A Lebende Zellen zum Zeitpunkt T₀ und nach 4 d **B** Anteil der Trypanblau-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl nach 4 d. Gezeigt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung dreier separater Zählungen. Die Versuche wurden mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

Dieser Befund bestätigt sich auch, wenn man die Trypanblau-positiven, also avitalen Zellen zur Gesamtzellzahl ins Verhältnis setzt (Abb. 12 B). Der unbehandelte Ansatz zeigt den geringsten Prozentsatz toter Zellen, der bestrahlte mit über 60% den höchsten. Unter Mitomycin-C-Behandlung ist der Anteil der untergegangenen Zellen mit knapp 30% deutlich kleiner. Mitomycin C führt also bei annähernd gleich wirksamer Proliferationsinhibition zu weit weniger Zelluntergang und kann damit als die „schonendere“ Methode gelten.

Jedoch stellt sich die Frage, welche Auswirkungen Mitomycin C auf die Stromazellen und damit auf den Support der leukämischen B-Zellen hat. Denn schon allein der Aspekt der behandelten Zellen unterscheidet sich deutlich von dem der unbehandelten (Abb. 13). So erscheinen die behandelten Fibroblasten weitaus größer, besitzen ausgeprägtere Zellfortsätze und sind weniger dicht, was sich aus der gehemmten DNA-Synthese und der dadurch unterdrückten Zellteilung bei gleichzeitigem Wachstum der einzelnen Zelle erklären lässt.

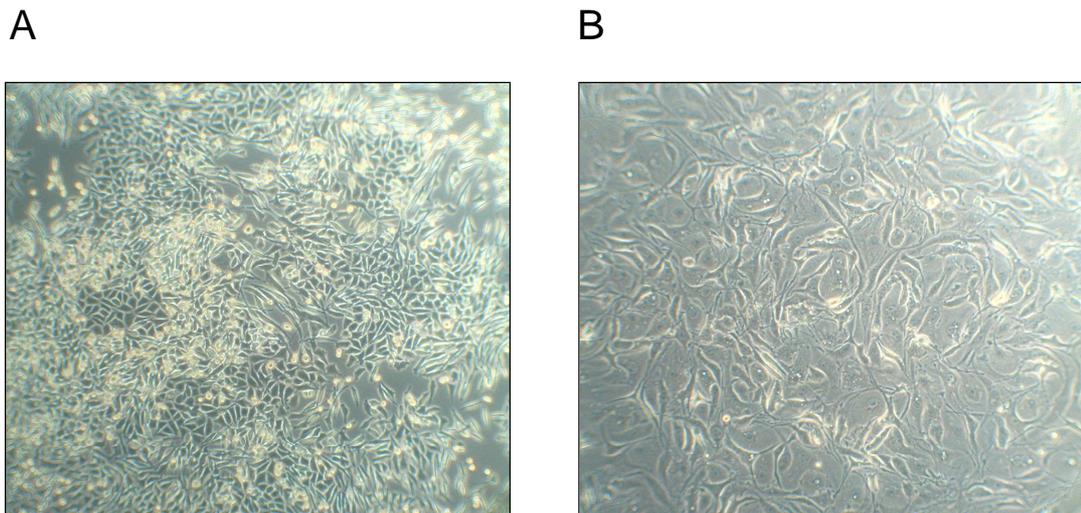


Abb. 13: Veränderung der Morphologie der Ltk⁻-Zellen nach Mitomycin-C-Behandlung

Mitomycin-C-Konzentration wie in Abb. 15; Vergrößerung 200-fach. **A** Unbehandelte Zellen
B Behandelte Zellen 4 d nach Behandlung

Um zu untersuchen, ob die protektiven Effekte der Stromazellen auf CLL-Zellen bei Verwendung von Mitomycin C noch vorhanden sind, wurden Kokulturen von behandelten und unbehandelten Zellen miteinander verglichen. Nach 48 h und fünf Tagen wurde für die CLL-Zellen jeweils Annexin-V gemessen sowie die Zellzahl nach Färbung mit Trypanblau bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt.

Die Annexin-Messung erbringt ein recht uniformes Bild (Abb. 14 A). Sowohl nach 48 h als auch nach 5 d ist der Anteil Annexin-positiver CLL-Zellen in der Kokultur eklatant vermindert. Dabei bewirkt die Mitomycin-C-Behandlung gegenüber den unbehandelten Zellen kaum einen Unterschied. Die Wirkung der Stromazellen auf die Zellzahl (Abb. 14 B) zeigt sich erst nach 5 d deutlich. Bei V131 und V194 überleben deutlich mehr Zellen in der Kolkultur als im Medium. Auch hier ist zu sehen, dass der Support der Mitomycin-C-behandelten Ltk⁻-Zellen nach 5 d nicht wesentlich geringer ist als der der unbehandelten. Die relativ ausgeprägte Differenz bei V131 nach 48 h nivelliert sich nach 5 d.

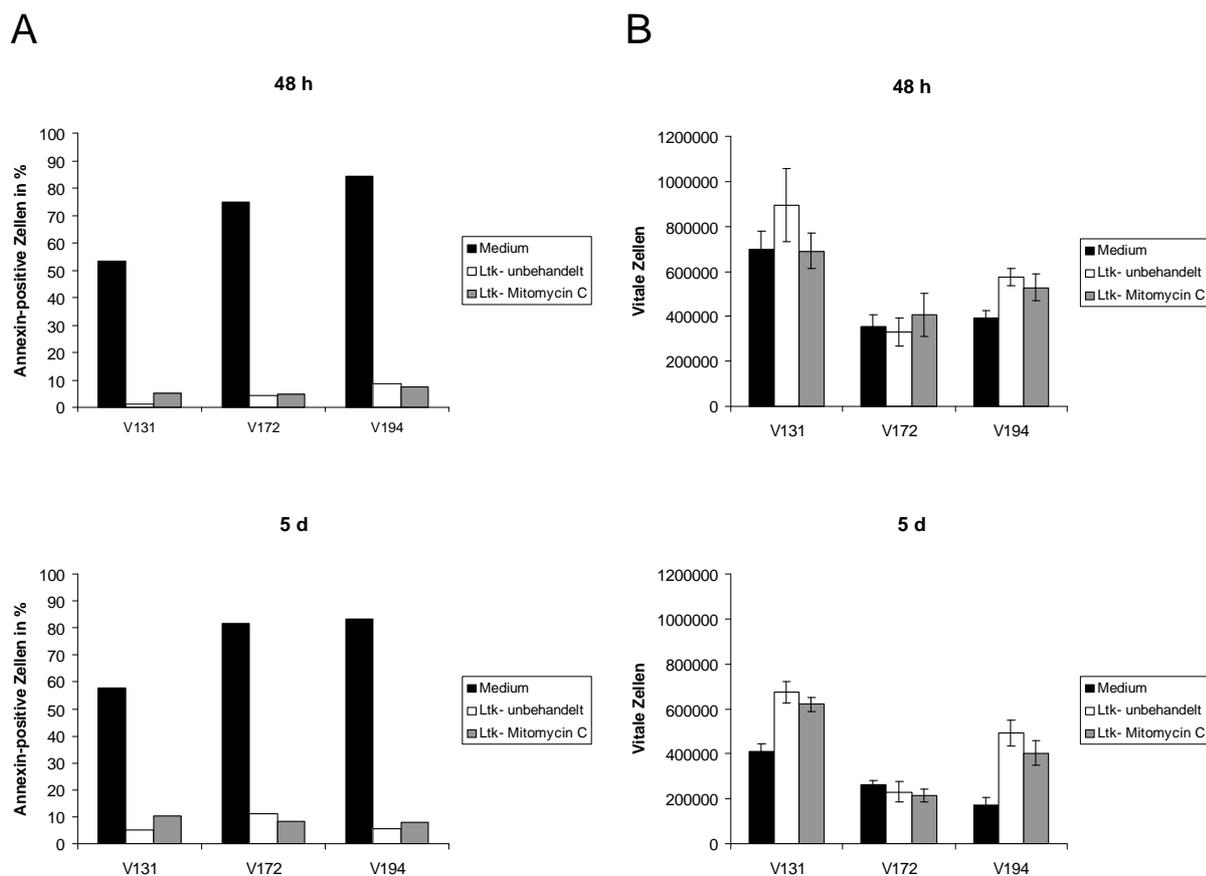


Abb. 14: Vergleich der protektiven Wirkung unbehandelter und Mitomycin-C-behandelter Ltk⁻-Zellen auf CLL-Zellen

A Annexin-V-Assay nach 48 h und 5 d **B** Trypanblau-Färbung und Zellzählung nach 48 h und 5 d. Alle Werte für CLL-Zellen.

Im Falle von V172 zeitigen die Stromazellen unabhängig davon, ob sie behandelt wurden, keinen Effekt auf die Zellzahl. Dieser Befund überrascht insofern, als nach dem Annexin-Ergebnis ein ähnliches Resultat wie bei den anderen Patienten zu erwarten gewesen wäre. Hier muss man also konstatieren, dass sich nach Stromakokultur in der Zellzählung nicht mehr Zellen als vital erfassen ließen. Da aber der Anteil Annexin-positiver Zellen weit geringer ist als in der Mediumkultur, kann man auch diesem Falle durchaus von einem Support seitens der Ltk⁻-Zellen sprechen.

Insgesamt scheint die Mitomycin-C-Behandlung den Stromasupport nicht nennenswert zu kompromittieren. Freilich kann man nach diesen Versuchen keine Aussagen über molekulare Auswirkungen von Mitomycin C treffen. Für länger dauernde Kokulturen von Ltk⁻-Zellen mit CLL-Zellen ist die Methode jedenfalls zu empfehlen, da die Proliferation der Fibroblasten effektiv unterbunden wird, die protektiven Effekte dieser Zellen aber erhalten bleiben.

4.2.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzahl

Neben den herkömmlichen Methoden der Annexin-Messung und der Zellzählung nach Trypanblaufärbung wurde als weitere Möglichkeit, den programmierten Zelltod quantitativ zu erfassen, im Zuge dieser Arbeit die Bestimmung der Zellzahl mittels Durchflusszytometrie etabliert (zum Vorgehen vgl. Kap. 3.8.4). Es zeigte sich im Verlauf, dass es bei dieser Methode auf Grund von möglichen Interferenzen in der Bindung der CD19-Antikörper an ihr Zielantigen durch das Stroma und auf Grund der Tatsache, dass beim Abnehmen der CLL-Zellen von der Stromazellschicht möglicherweise nicht alle Zellen erfasst werden, zu Messfehlern kommen kann. Daher wurden die gemessenen bzw. errechneten Absolutzahlen immer durch den Bezug zu einem Ausgangswert relativiert.

Des Weiteren muss hier angemerkt werden, dass bei einigen Messungen keine plausiblen Ergebnisse zu bestimmen waren. Dies war insbesondere dann der Fall, wenn eine CD19-positive Population nicht – wie in Abb. 3 gezeigt – sauber abgrenzbar war. Abb. 15 stellt einen solchen Fall exemplarisch dar.

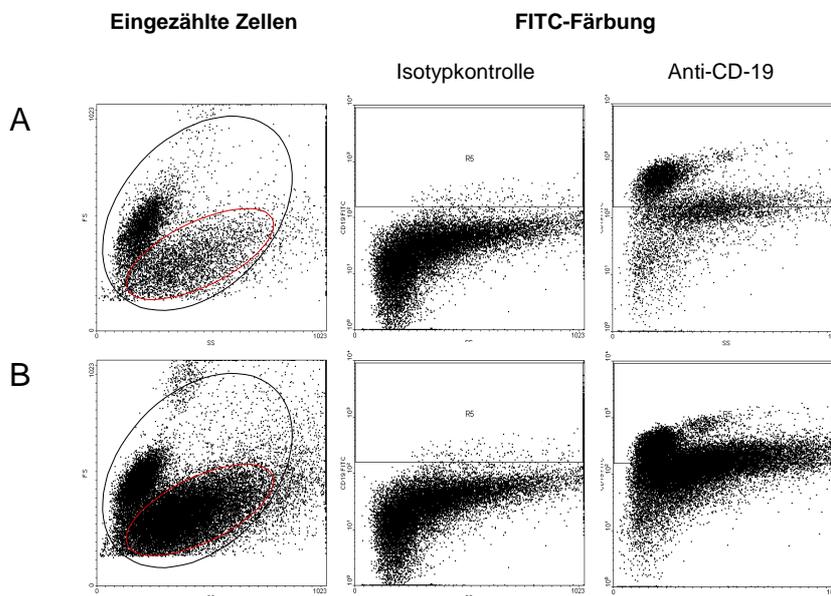


Abb. 15: Messprobleme bei der Bestimmung der Anzahl CD19-positiver Zellen

A CLL in Kokultur mit humanem Stroma (10 d) **B** CLL in Kokultur mit humanem Stroma und dem PKC-Inhibitor Gö 6976

Zu erwarten war in diesem Experiment, dass es in dem mit Gö 6976 inkubierten Ansatz (Abb. 15 B) zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl kommen würde. Die Zahl der als CD19-positiv detektierten Zellen ist aber in ebendieser Probe wesentlich höher, zu sehen im Gate für die CD19-positiven Zellen, Abb. 15 A und B, rechts. Jedoch ist es nicht möglich, die positive Population in diesem mittels der Isotypkontrolle (Abb. 15, Mitte) eingestellten Gate scharf gegen die negative abzugrenzen. Im Forward-Sideward-Scatter-Bild (Abb. 15 A und B, links) kann man ferner erkennen, dass die Anzahl der avitalen Zellen, die wegen ihrer abweichenden Größe und Granularität unten im Gate erscheinen, bei den mit Gö 6976 behandelten Zellen stark zunimmt (rot umrandete Population). Daraus ist zu schließen, dass eine große Zahl noch CD-19-positiver, aber bereits avitaler Zellen oder CD-19-tragender Fragmente im Anti-CD-19-Gate erscheint. Ein verwertbares Ergebnis liefert die Methode also nur, wenn zum Zeitpunkt der Messung die CD19-positiven vitalen Zellen deutlich gegen die schon degradierten Zellen demarkiert sind. Die mit dieser Methode ermittelten Zellzahlen erscheinen nur dann in den Ergebnissen, wenn sie auf eindeutigen Messungen beruhen.

4.2.4 Wirkung von PKC-Inhibitoren in der Kokultur mit der Zelllinie Ltk⁻

Um die Bedeutung der Proteinkinase C für das Überleben der CLL-Zellen in der Kokultur mit Stromazellen zu untersuchen, wurden CLL-Zellen mit den PKC-Inhibitoren Bisindolylmaleimide I, Gö 6976 und Gö 6983 behandelt. Die drei Substanzen besitzen unterschiedliche Aktivität bezüglich der verschiedenen Isoformen des Enzyms. Bisindolylmaleimide I inhibiert die Isoformen α , β , γ , δ und ϵ , Gö 6976 ist spezifisch für PKC α und PKC β I, Gö 6983 hemmt die Isoenzyme α , β , γ , δ und ζ .⁵³

Zunächst wurden alle drei Inhibitoren in einem 24-h-Ansatz mit CLL-Zellen in Medium bis zu einer Maximaldosis von 1000 nM titriert. Nach 24 h wurde ein Annexin-Assay durchgeführt (Abb. 16 A). Der Prozentsatz der Annexin-positiven Zellen bleibt dosisunabhängig annähernd konstant. Dieses Ergebnis schließt eine direkte Toxizität der Inhibitoren aus.

⁵³ Vgl. Datenblätter der Inhibitoren von CALBIOCHEM unter <http://www.calbiochem.com>

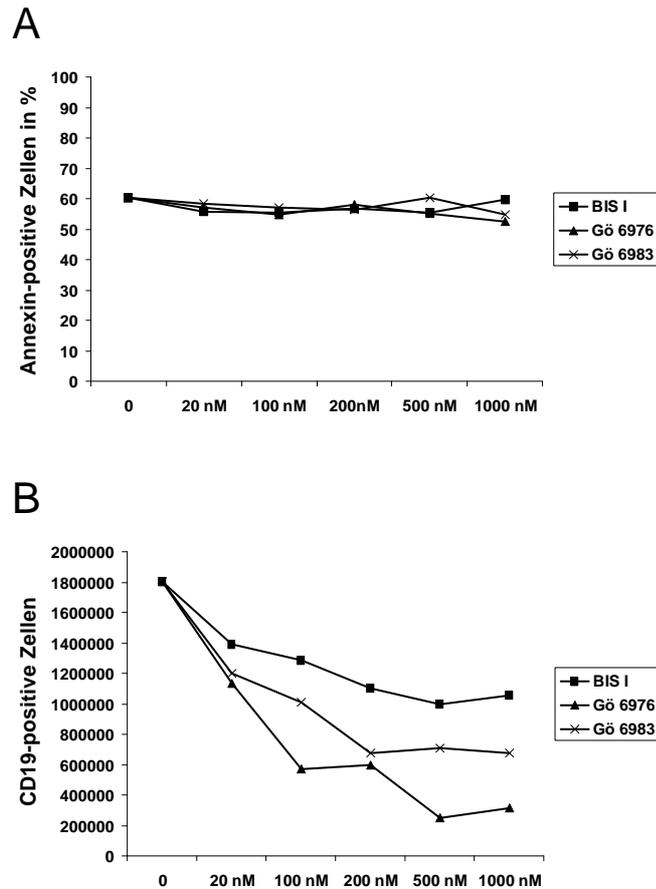


Abb. 16: Dosistitration von Bisindolylnmaleimide I (BIS I), Gö 6976 und Gö 6983

A CLL in Medium (24 h): Annexin-V-Assay. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von vieren.

B CLL auf Ltk⁻ (10 d): CD19-positive Zellen

In einem weiteren Schritt wurden nun CLL-Zellen in Kokultur mit Ltk⁻-Stroma mit den Inhibitoren in aufsteigender Dosis inkubiert. Zunächst wurden die Stromazellen in 12-Well-Platten ausgesät; nach 24 h begann mit der Zugabe der CLL-Zellen die Kokultur. Nach weiteren 24 h wurden die Inhibitoren hinzupipettiert. Die Messung von Annexin- bzw. CD-19-positiven Zellen im FACS erfolgte nach 3 d und 10 d. Um die starke Proliferation der Zelllinie zu unterdrücken, wurde sie vor dem Versuch bestrahlt (Zieldosis 30 Gy)⁵⁴. Die Annexin-Messung nach 3 d (Daten nicht gezeigt) erbrachte wiederum keine dosisabhängige Steigerung der Apoptose. Nach 10 d jedoch zeitigten die Inhibitoren einen deutlichen dosisabhängigen Effekt (Abb. 16 B). Bereits bei 20 nM ist ein wesentlich verminderte Zellzahl zu verzeichnen. Die wirksamste Substanz in diesem Experiment ist Gö 6976.

⁵⁴ Dieses Experiment wurde zeitgleich mit den Versuchen zur Proliferationshemmung mit Mitomycin durchgeführt. Der einfacheren Durchführung wegen wurde anfangs die etablierte Methode der Radiatio zur Wachstumsinhibition gewählt.

4.2.5 Wirkung der PKC-Inhibitoren in der Kokultur mit humanem Primärstroma

In der Kokultur mit der murinen Zelllinie Ltk⁻ konnte bereits ein dosisabhängiger Effekt der PKC-Inhibitoren Bisindolylmaleimide I, Gö6976 und Gö 6983 auf das Überleben leukämischer B-Zellen nachgewiesen werden. Um zu eruieren, ob die Substanzen eine ähnliche Wirkung auch in Kokultur mit humanem Primärstroma entfalten, wurden Ansätze mit Humanstroma und CLL-Zellen mit zwei mittleren (in der Ltk⁻-CLL-Kokultur bereits wirksamen) Dosen zehn Tage inkubiert. Zu diesem Zweck wurden zunächst die Stromazellen ausgesät, und nach deren Adhäsion (24 h nach Aussaat) die CLL-Zellen hinzugegeben. Erst nach weiteren 24 h wurden die Inhibitoren eingesetzt, um zunächst einen Kontakt zwischen den Zellen zu ermöglichen. Eine Proliferationshemmung mittels Bestrahlung oder Mitomycin C erübrigte sich wegen der Kontaktinhibition des Primärstromas. Die Messung der Zellzahl erfolgte am zehnten Tag nach Zugabe der Substanzen (Abb. 17).

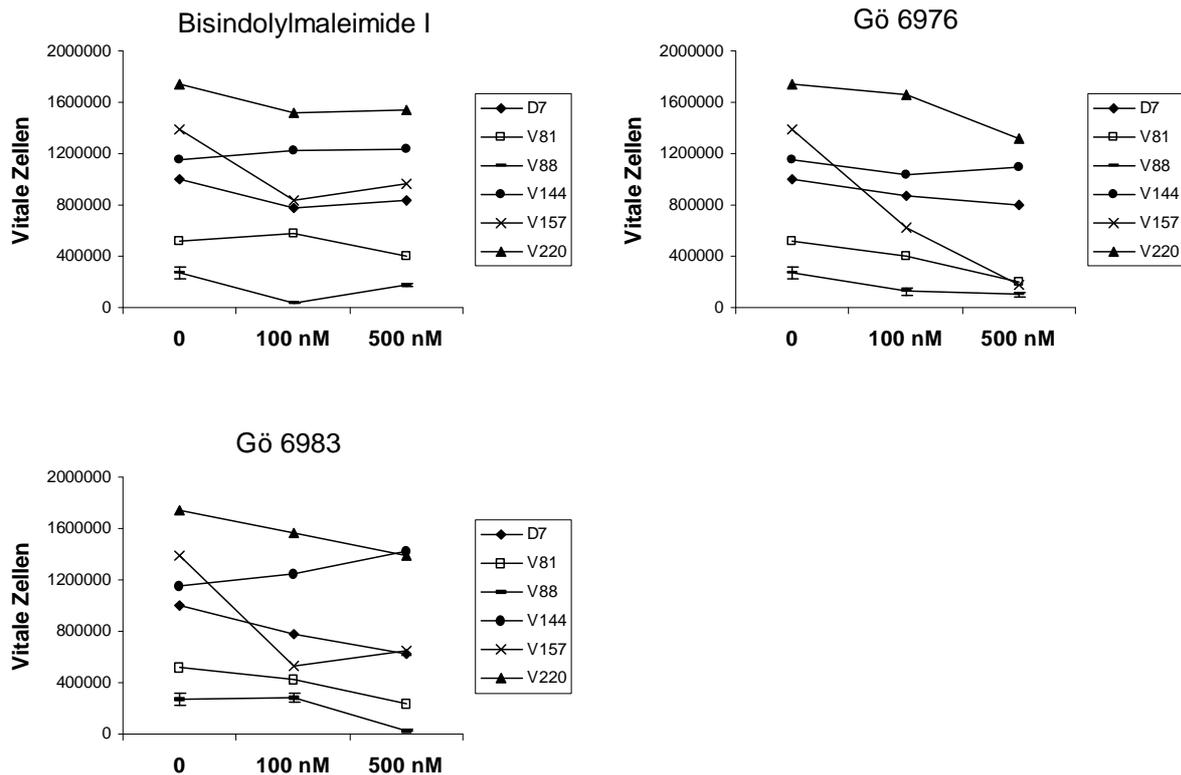


Abb. 17: Wirkung von Bisindolylmaleimide I, Gö 6976 und Gö 6983 in der Kokultur mit humanem Primärstroma (10 d)

Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzahl. Im Falle von V88 ist die nach Trypanblau-Färbung ermittelte Zellzahl gezeigt (Mittelwert und Standardabweichung dreier separater Zählungen).

Alle drei Agenzien erweisen sich in den verwendeten Konzentrationen als wirksam. Gö 6976 aber zeichnet sich einerseits dadurch aus, dass er ausnahmslos bei allen Patienten wirkt – anders als Bisindolylmaleimide I und Gö 6983, die bei V144 keine Reduktion der Zellzahl bewirken. Allerdings muss man konzedieren, dass auch der Effekt von Gö 6976 bei diesem Patienten sehr gering ist. Andererseits bewirkt Gö 6976 am ehesten eine dosisabhängige Abnahme der vitalen Zellen. Die hohe Potenz dieser Substanz überrascht insofern, als sie die selektivste unter den getesteten ist und spezifisch PKC α und β 1 hemmen soll.

In einem weiteren Schritt wurde Gö 6976 im Bereich von 20 nM bis 1000 nM titriert, um die dosisabhängige Wirkung innerhalb eines weiteren Bereichs zu zeigen (Abb. 18). Das Vorgehen entsprach dem eben geschilderten. Die Messung wurde ebenfalls am zehnten Tag nach Zugabe des Inhibitors durchgeführt.

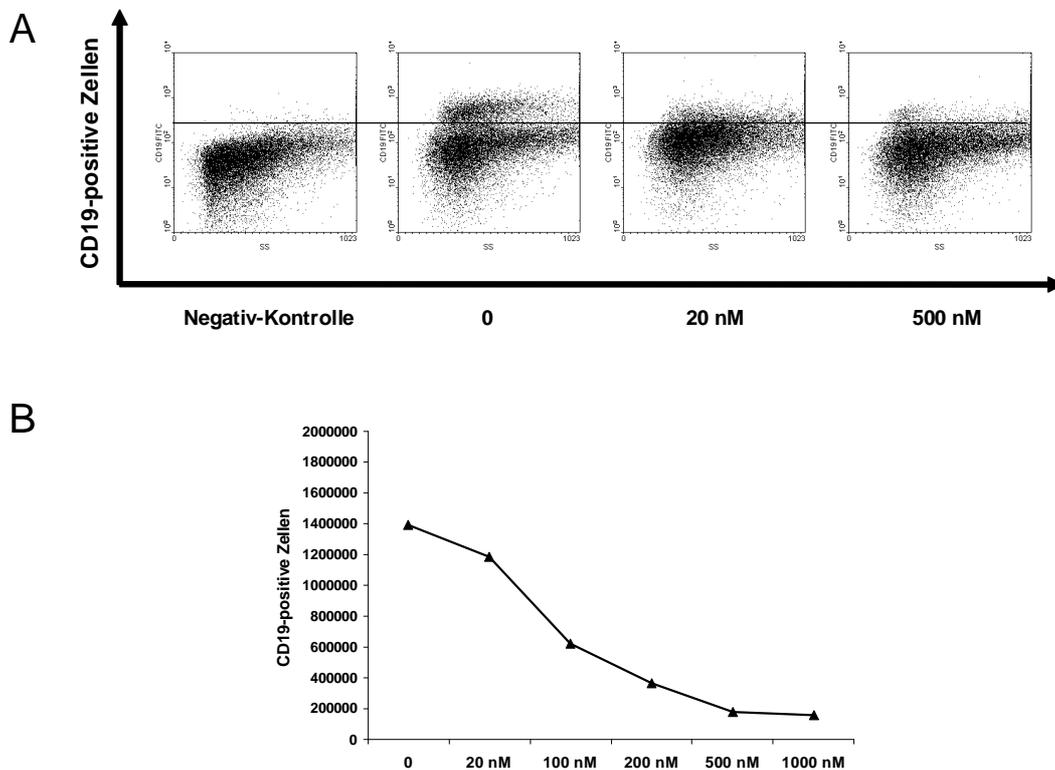


Abb. 18: Wirkung des PKC-Inhibitors Gö 6976 auf CLL-Zellen in Kokultur mit humanem Primärstroma

Durchflusszytometrische Bestimmung der absoluten Zellzahl (10 d). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von fünf. **A** Abnahme der CD19-positiven Zellen (Dot-Blot). **B** Titrationskurve

Im Dot-Blot (Abb. 18 A) ist die CD19-positive Population bereits bei einer Konzentration von 20 nM im Vergleich zum Nullwert stark reduziert; bei einer Dosis von 500 nM sind kaum noch CD19-positive Zellen detektierbar. Die Titrationskurve (Abb. 18 B) zeigt eine annähernd lineare Abnahme der Zellen. Dieser Befund konnte auch mit den Zellen anderer Patienten reproduziert werden.

4.2.6 Effekt der PKC-Inhibitoren auf primäre Stromazellen

In den vorhergehenden Experimenten konnte erwiesen werden, dass die PKC-Inhibitoren Bisindolylmaleimide I, Gö 6976, Gö 6983 die Anzahl vitaler CLL-Zellen vermindern. Da die Substanzen aber in Kokulturen von CLL- und Stromazellen eingesetzt wurden, schließt sich die Frage an, ob primär die Proteinkinase C der leukämischen B-Zellen gehemmt wird und die Zellen dadurch zugrunde gehen. Denkbar wäre auch, dass die Inhibitoren in erster Linie auf die Stromazellen wirken, die in der Folge den Support für die CLL nicht mehr aufrechterhalten können. Des Weiteren könnten die Agenzien auch in gleichem Maße auf beide Zellarten wirken; somit entspräche der Zelluntergang auf Seiten der CLL-Zellen einem additiven Effekt.

Zur Klärung der Frage, welche Zellen den primären Angriffspunkt der Inhibitoren darstellen, wurden zwei Versuche angestellt, deren Ergebnisse in Abb. 19 zu sehen sind. Im ersten Experiment (Ergebnisse in Abb. 19 A) wurden primäre Stromazellen zunächst für 24 h mit den PKC-Inhibitoren in einer Dosis von 200 nM inkubiert. Anschließend wurde das mit den Substanzen versetzte Medium abgespült. Nach mehrmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden dann CLL-Zellen zugegeben, und die Ansätze zehn Tage kultiviert. Zum Vergleich wurden CLL-Stroma-Kokulturen angesetzt, die – wie im Vorhergehenden – 10 d mit den Inhibitoren inkubiert wurden.

In beiden Ansätzen zeitigen Bisindolylmaleimide I, Gö 6976 und Gö 6983 gegenüber dem Mediumwert einen klaren Effekt. Jedoch überleben – sieht man von Bisindolylmaleimide I ab – weniger Zellen in den Ansätzen, die nicht vorinkubiert waren und deren Medium den Inhibitor über zehn Tage enthielten. Da die Vorinkubation ebenfalls einen Untergang von CLL-Zellen bewirkt, ist davon auszugehen, dass die Stromazellen zumindest an der Vermittlung der Inhibitorwirkung beteiligt sind.

Im Anschluss an diesen Versuch wurden nun primäre humane Stromazellen ohne CLL-Zellen mit den PKC-Inhibitoren behandelt. Die Substanzen wurden in einer Konzentration

von 100 nM und 500 nM eingesetzt, die Zellzählung wurde nach zehn Tagen durchgeführt. In Abb. 19 B ist der Anteil der Trypanblau-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl gezeigt.

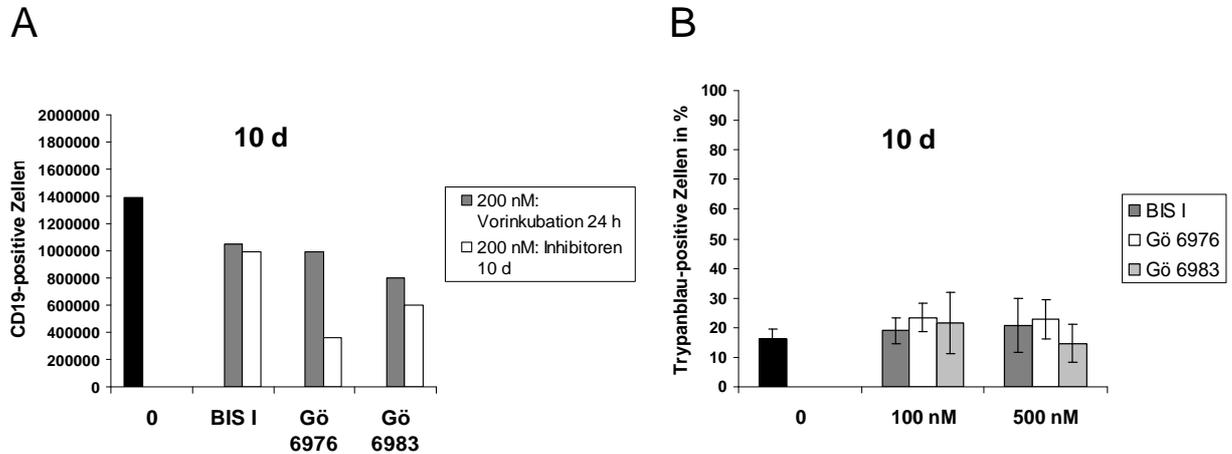


Abb. 19: Wirkung der PKC-Inhibitoren auf primäre Stromazellen

A Wirkung nach 24-stündiger Vorinkubation des Stromas und anschließender Kokultivierung mit CLL (10 d) verglichen mit 10-tägiger Kokultivierung und Inhibitorinkubation: Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzahl **B** Wirkung der Inhibitoren auf Stromazellen allein (10 d): Anteil der Trypanblau-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl. Gezeigt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung von drei separaten Zählungen. Beide Experimente wurden mit ähnlichen Resultaten wiederholt.

Der höchste Prozentsatz Trypanblau-positiver Zellen findet sich für Gö 6976 bei einer Konzentration von 100 nM. Die maximale Differenz zum Nullwert beträgt, bezogen auf die Mittelwerte, etwa 7 % (16 % bei 0 versus 23 % bei 100 nM Gö 6976). Die Wirkung der Inhibitoren auf das Knochenmarkstroma allein ist also eher gering. Allerdings sind die Bedingungen in der Stromazellmonokultur nicht mit denen der Kokultur identisch, weshalb über die Wirkung auf das Stroma in Anwesenheit von CLL-Zellen nur wenig ausgesagt werden kann.

4.2.7 Basale Expression der antiapoptotischen Proteine in der Kokultur mit humanem Primärstroma

Die bisher durchgeführten Versuche zeigen, dass die Hemmung der Proteinkinase C in der Kokultur eine Verminderung lebender CLL-Zellen nach sich zieht. Welche Auswirkungen hat eine solche Inhibition auf die antiapoptotischen Proteine der CLL? Mit den im Folgenden beschriebenen Versuchen sollte dieser Frage nachgegangen werden.

Bevor mit Hilfe von Western-Blots die basale Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2, Mcl-1 und XIAP in CLL-Zellen nach Kokultivierung mit humanem Primärstroma untersucht wurde, sollte zunächst die protektive Wirkung der primären Stromazellen im Annexin-V-Assay gezeigt werden.

Um für den Annexin-V-Assay und den Western-Blot CLL- und Stromazellen voneinander zu trennen, wurden erstere durch vorsichtiges Spülen von der Stromazellschicht abgelöst. Auf Grund der starken Haftung der Fibroblasten an der Unterlage kann die Kontamination der CLL-Proteinansätze als vernachlässigbar gering eingeschätzt werden. Im FACS konnten die (wenigen) Stromazellen ausgegated werden. Im Übrigen blieben nur wenige Leukämie-Zellen zwischen den Stromazellen zurück, wie sich mikroskopisch überprüfen ließ.

In der Annexin-Messung (Abb. 20 A) besteht bei keinem der Patienten nach 24 h ein wesentlicher Unterschied zwischen den in Medium und den zusammen mit Stroma kultivierten Zellen. Nach 5 d jedoch ist der Anteil Annexin-positiver Zellen auf Stroma weit geringer als in Medium. Bei V121 ist er nach 5 d auf Stroma sogar kleiner als nach 24 h. Bei allen Patienten konnte also ein Support durch das Stroma nachgewiesen werden.

Mit den Zellen derselben Patienten wurden Kokulturen für Western-Blots angesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 20 B dargestellt. Die Konzentration von Bcl-2 bleibt auch nach fünf Tagen auf Stroma unverändert. Mcl-1 dagegen liegt bei zwei Patienten (V81 und V144) bereits nach 24 h gegenüber dem Medium in erhöhter Konzentration vor; nach fünf Tagen steigt die Proteinmenge weiter an. Für XIAP gilt Ähnliches: Bei V81 ist der Anstieg deutlich zu erkennen, auch bei den anderen beiden Patienten nimmt die Konzentration, wenn auch diskret, über die Zeit zu. Diesem Befund nach zu urteilen, vermittelt das Stroma seinen antiapoptotischen Effekt über eine Hochregulation von Mcl-1, in geringerem Maße auch von XIAP, das aber bei den Patienten V121 und V144 abgesehen von den T₀-Werten nur sehr gering exprimiert wird. Bcl-2 wird in der Stromakokultur nicht induziert.

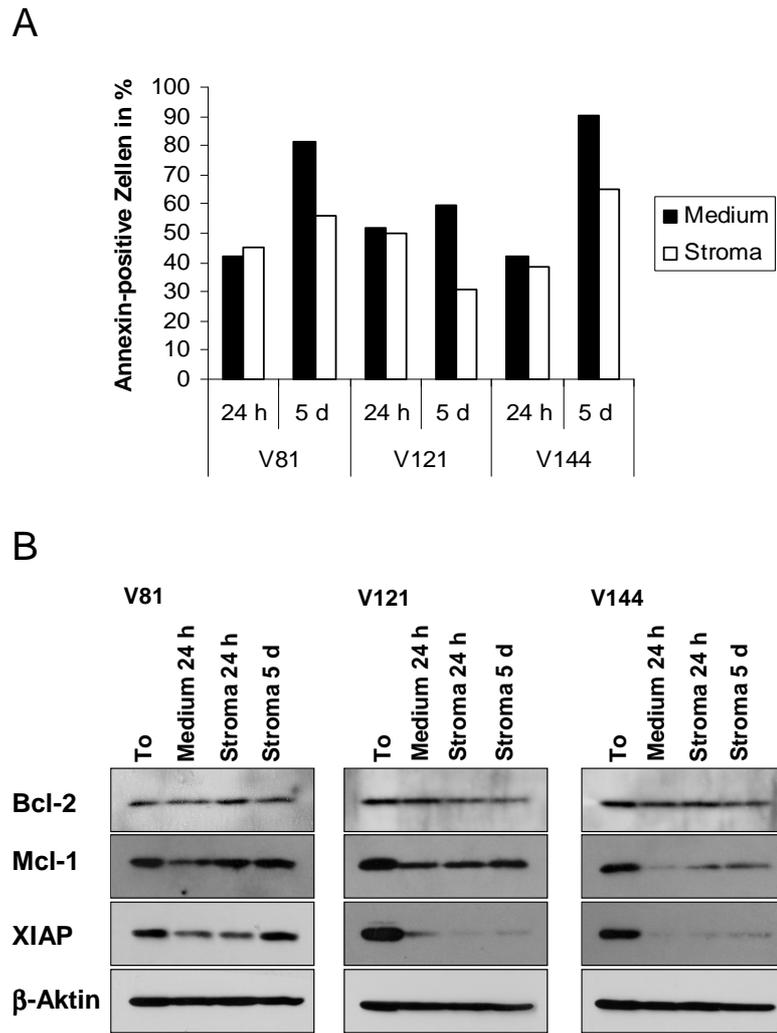


Abb. 20: Support und basale Expression der antiapoptotischen Proteine in der Kokultur mit humanem Primärstroma

A Annexin-V-Assay nach 24 h und 5 d **B** Expression von Bcl-2, Mcl-1 und XIAP

4.2.8 Wirkung von Gö 6976 auf antiapoptotische Proteine und Apoptose in der Kokultur mit humanem Primärstroma

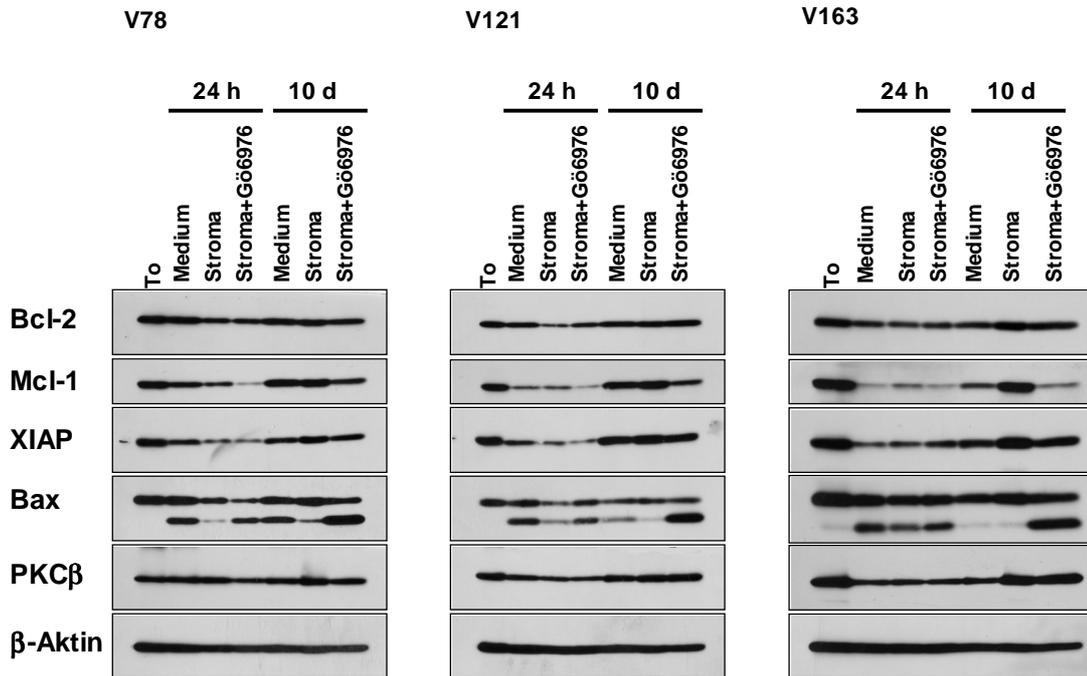
Die oben geschilderten Versuche ergeben einerseits, dass sich durch den Einsatz von PKC-Inhibitoren in der Kokultur von leukämischen B-Zellen und Knochenmarkstromazellen die Anzahl vitaler CLL-Zellen signifikant vermindern lässt. Andererseits nimmt die Konzentration von Mcl-1 und XIAP in den leukämischen Zellen zu, wenn sie Kontakt zum Stroma haben. Welche Auswirkungen die Hemmung der Proteinkinase C auf die Expression der antiapoptotischen Proteine der CLL hat und wie diese mit der vermehrten Apoptose korreliert ist, wurde bisher noch nicht gezeigt.

In einem letzten Experiment wurden daher Kokulturen von CLL-Zellen und primären humanen Stromazellen mit einem PKC-Inhibitor behandelt; anschließend wurde die Expression der Apoptoseproteine im Western-Blot ermittelt. Als Inhibitor wurde Gö 6976 gewählt, da die Substanz einen relativ linearen dosisabhängigen Effekt zeitigt und in ihrer Wirksamkeit Bisindolylmaleimide I überlegen ist. Ferner zeichnet sie sich durch eine größere Spezifität im Vergleich zu den beiden anderen verwendeten Inhibitoren aus (vgl. Kap. 4.2.4).

Für das Experiment wurden CLL-Zellen von drei verschiedenen Patienten zehn Tage lang in Medium, mit primärem Humanstroma oder mit Humanstroma und Gö 6976 kultiviert (Abb. 21). Nach 24 h sowie nach 10 d wurde ein Annexin-V-Assay durchgeführt und eine entsprechende Anzahl CLL-Zellen für den Western-Blot tiefgefroren.

Im Western-Blot (Abb. 21 A) fallen deutliche Expressionsunterschiede insbesondere bei Mcl-1, XIAP und Bax auf. Schon nach 24 h ist die Konzentration von Mcl-1 in der Kokultur mit Gö 6976 gegenüber den anderen beiden Ansätzen vermindert (deutlich bei V78 und V121, weniger ausgeprägt bei V163). XIAP reagiert bei V78 und V121 ähnlich, bei V163 bestehen nach 24 h kaum Unterschiede. Im Bax-Blot ist bei V78 und V121 im Ansatz mit Stroma und Gö 6976 eine Zunahme des Bax-Spaltprodukts zu beobachten. Im Falle von V163 korrespondiert die homogene Bande von Bax und seinem Spaltprodukt mit der geringen Expression von Mcl-1 in allen 24-h-Ansätzen. Bei Bcl-2 und PKC β erscheinen nach 24 h keine Veränderungen.

A



B

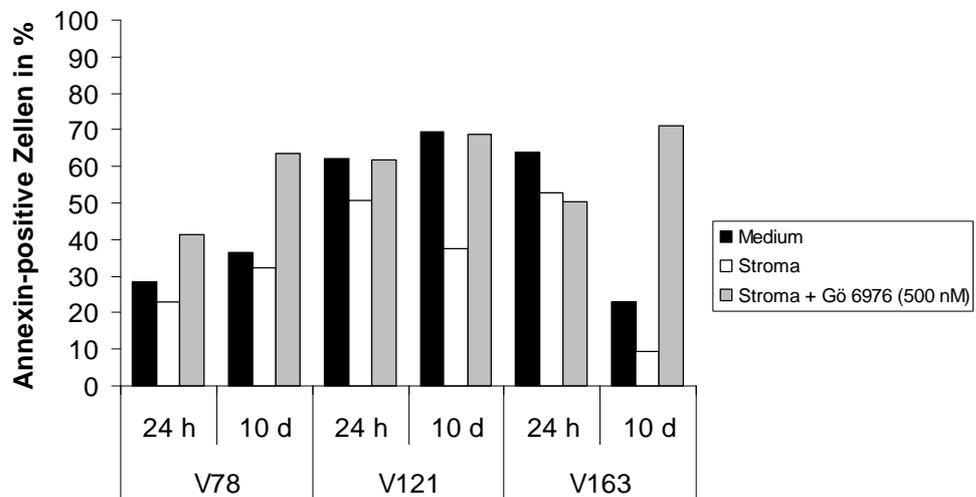


Abb. 21: Effekt von Gö 6976 auf CLL-Zellen in der Kokultur mit humanem Primärstroma: Expression von Apoptoseproteinen und Apoptose

A Western-Blots von drei verschiedenen Patienten B Annexin-V-Assays derselben Patienten (jeweils 24 h und 10 d)

Nach 10 d kommt es auf Stroma zu einer Induktion von Mcl-1 bei allen gezeigten Patienten. Überraschenderweise steigt die Konzentration dieses Proteins auch im Medium an (insbesondere bei V78 und V121). Dieser Anstieg ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass in den Zellen, die so lange überleben, Mcl-1 hochreguliert wird, was zum Überleben dieser Zellen entscheidend beiträgt. Auch XIAP reagiert in ähnlicher Weise. Gö 6976 reduziert in der Kokultur jedoch effektiv die Proteinmenge von Mcl-1 und XIAP, wohingegen Bcl-2 kaum affiziert wird. Die Spaltung von Bax erreicht unter der Behandlung mit Gö 6976 ein Maximum, ein klarer Hinweis auf gesteigerte Apoptose. Ferner wird die Proteinkinase C β nach 10 d in der Kokultur induziert. Da diese Induktion mit einer erhöhten Mcl-1- und XIAP-Expression einhergeht, und die Hemmung der PKC andererseits zu einer Mcl-1-Verminderung führt, kann man eine Regulation dieser Proteine durch PKC β annehmen. Die Induktion des Enzyms könnte die stärkere Wirkung des Inhibitors in der Kokultur erklären.

Die Befunde des Western-Blots korrelieren größtenteils mit dem Annexin-V-Assay. Nach 24 h sind die Effekte noch moderat ausgeprägt, bei V78 und V121 bestätigt sich zum einen die protektive Wirkung der Stromazellen, i.e., der Prozentsatz Annexin-positiver Zellen ist in der Kokultur vermindert, zum andern hebt Gö 6976 diesen Support auf. Dies gilt allerdings nicht für den Patienten V163. Hier ist Gö 6976 nach 24 h unwirksam. Damit korrespondierend sind im Western-Blot Mcl-1 und XIAP bei diesem Patienten nicht vermindert.

Nach 10 d sind die Differenzen in der FACS-Messung wesentlich größer. In den mit dem PKC-Hemmer behandelten Ansätzen ist der Anteil Annexin-positiver Zellen zum Teil bis zu einem Vielfachen des Stromawertes angestiegen. Interessant ist, dass Gö 6976 bei dem Patienten am wirksamsten ist, bei dem gemäß dem Ergebnis der Annexin-Messung die protektive Wirkung der Stromazellen am deutlichsten ist (V163). Dieser Patient zeigt im Western-Blot auf Stroma die höchste Mcl-1- und XIAP-Expression und gleichzeitig die stärkste Induktion von PKC β . Dass in diesem Fall die Spontanapoptose in Medium nach 10 d so gering ist, muss damit erklärt werden, dass die Zellen, die nach so langer Zeit überhaupt noch messbar waren, mehrheitlich vital waren und kein Phosphatidylserin exponierten.

Zusammenfassend kann man konstatieren: Der laut Literaturangaben hauptsächlich gegen PKC β (und α) wirksame Inhibitor Gö 6976 induziert in der CLL-Stroma-Kokultur massiv Apoptose und führt auf Proteinebene gleichzeitig zu reduzierten Leveln von Mcl-1 und XIAP. Die Induktion des Enzyms erhöht vielleicht die Effizienz von Gö 6976.

5 Diskussion

5.1 Bedeutung und Regulation von Mcl-1

In der November-Ausgabe der Zeitschrift *Blood* veröffentlichten Gandhi et al. einen Kommentar zu einer kurz zuvor im selben Journal publizierten Arbeit von Pepper und Kollegen⁵⁵, die sich mit der Bedeutung der Mcl-1-Expression in der CLL und ihrer Assoziation mit prognostischen Faktoren beschäftigt. Der Titel dieses Kommentars lautet: „Mcl-1: the 1 in CLL“.⁵⁶ In dieser prägnanten Formulierung kommt zum Ausdruck, welche Bedeutung für das alterierte Apoptoseverhalten und damit für die Aufrechterhaltung der Erkrankung diesem Protein beigemessen wird. Auch in der vorliegenden Untersuchung galt der Expression und Regulation von Mcl-1 besonderes Interesse.

In vielen Arbeiten wurde gezeigt, dass Mcl-1 in CLL-Zellen überexprimiert ist, dasselbe gilt für Bcl-2 (vgl. Kap.1.2.4). Interessant ist jedoch, dass Bcl-2 im Gegensatz zu Mcl-1 in gesunden B-Zellen nahezu nicht exprimiert wird. Mcl-1 und XIAP sind auch in normalen B-Zellen vorhanden, wenn auch in geringerer Konzentration als in den leukämischen. Zunächst würde man also vermuten, dass die geringe Apoptoseneigung der CLL auf die hohe Bcl-2-Menge zurückzuführen ist. Wie sich jedoch in einem großen Teil der durchgeführten Experimente in Übereinstimmung mit publizierten Daten zeigen ließ, wird in den CLL-Zellen trotz hoher Bcl-2-Expression Apoptose induziert. Eine höhere Apoptoserate lässt sich aber mit einem Expressionsverlust von Mcl-1 und XIAP korrelieren, was belegt, dass die Bcl-2-Überexpression keinen wesentlichen Schutz vor Apoptose gewährleistet. Daneben ist auffällig, dass sich die Bcl-2-Konzentration bei einer Behandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika bzw. Inhibitoren kaum verändert. Bcl-2 scheint also im Unterschied zu Mcl-1 und XIAP ein wenig reguliertes Protein zu sein, das konstitutiv überexprimiert ist und vielleicht supportiv wirkt, die Zellen aber nicht effektiv vor Apoptose schützen kann.

In den mit Zellen mehrerer Patienten durchgeführten Experimenten zur Wirkung verschiedener proapoptotischer Substanzen auf CLL-Zellen wurde deutlich, dass sich Proteinexpression und Apoptose sehr patientenabhängig verändern. Jedoch konnte man – mit Ausnahme des HLA-DR-Antikörpers 1D09C3, dessen genau Wirkweise bislang unbekannt ist – einen höheren Prozentsatz Annexin-positiver Zellen immer mit verminderten Konzentrationen von Mcl-1 (und teilweise XIAP) in Verbindung bringen. Besonders wirksam

⁵⁵ Vgl. Pepper et al. 2008; vgl. auch Kap. 1.2.4, Anm. 34

⁵⁶ Vgl. Gandhi et al. 2008

in diesen Versuchen waren der PI3K-Inhibitor LY 294002 und die PKC δ -spezifische Substanz Rottlerin. Ringshausen et al. konnten bereits nachweisen, dass die Inkubation mit diesen Substanzen zur Verminderung von Mcl-1 und vermehrter Apoptose führt. Dieser Befund konnte in eigenen unabhängigen Versuchen bestätigt werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass ein dosisabhängiger Abfall der Proteinkonzentration mit einem ebenso dosisabhängigen Anstieg der Apoptose einhergeht. Die Bcl-2-Konzentration dagegen ist nicht von der Hemmung der PI3K oder der PKC δ abhängig.

Die Hemmung der PI3K führt zwar zu einer verminderten Mcl-1-Konzentration, jedoch stellt sich die Frage, ob Mcl-1 direkt von PI3K reguliert oder ob seine Konzentration sekundär auf Grund einer Degradation durch Caspasen reduziert wird. Durch eine Hemmung der Caspasen mit der Substanz Z-VAD.FMK konnte der sekundäre Effekt ausgeschaltet werden. Mit diesem Versuch wurden Ergebnisse von Ringshausen et al. bestätigt, die erwiesen, dass Mcl-1 offensichtlich keiner direkten Regulation durch PI3K unterworfen ist, da die Zellen, die gleichzeitig mit LY 294002 und Z-VAD.FMK behandelt worden waren, weder einen Expressionsverlust von Mcl-1 noch eine gegenüber dem Mediumwert gesteigerte Apoptose aufweisen.⁵⁷ Die Hemmung der PI3K scheint also zu einer Aktivierung von Caspasen zu führen, die dann Mcl-1 abbauen. Bcl-2 ist von der Degradation durch die Caspasen nicht betroffen. Der Grund dafür könnte einerseits in der wesentlich höheren Halbwertszeit von Bcl-2 liegen, so dass nach kurzer Zeit im Western-Blot keine Verminderung der Proteinkonzentration detektierbar ist, andererseits darin, dass Bcl-2 weniger Spaltungsstellen exponiert, an denen Caspasen angreifen können.

Bisher wurde gezeigt, dass die Inhibierung von übergeordneten Enzymen (PI3K, PKC δ) zu einer Verminderung von Mcl-1 und gleichzeitig zu einer größeren Zahl apoptotischer Zellen führt. Um aber etwaige pleiotrope Effekt der benutzten Agenzien auszuschließen und zu belegen, dass die höhere Apoptose im Wesentlichen Mcl-1-abhängig ist, wurde die Expression durch siRNA unterdrückt. Die in den Apoptose-Assays gemessenen Differenzen zwischen den mit spezifischer siRNA und den mit der Kontroll-siRNA behandelten Zellen waren von Patient zu Patient sehr verschieden und nicht unbedingt abhängig von der Effektivität des Knock-Downs, die mittels Western-Blot bestimmt wurde. Auch das Maß der Überexpression ließ keinen Schluss auf die durch die Transfektion erreichte Steigerung der Apoptose zu. Die maximale Zunahme apoptotischer Zellen lag bei den fünf getesteten Patienten im Annexin-Assay bei etwa 11%, im $\Delta\psi$ -Assay bei ca. 13%.

⁵⁷ Vgl. Ringshausen et al. 2002, S. 3744

In diesem Kontext sei erwähnt, dass Hussain et al. etwa zeitgleich mit den eigenen Experimenten ähnliche Ergebnisse publiziert haben.⁵⁸ Allerdings suggerieren ihre Daten einen größeren und homogeneren Effekt des Knock-downs auf die Apoptose als die eigenen.⁵⁹ Ob diese Unterschiede durch das verwendete Kulturmedium⁶⁰ oder durch eine Auswahl geeigneter Patienten zustande kommt, bleibt fraglich. Im Übrigen zeigen ihre Versuche, dass sich durch den Knock-down von Mcl-1 die (Chemo-)Sensitivität der Zellen – insbesondere gegenüber Rituximab – erhöhen lässt. Dies belegt wiederum die Bedeutung von Mcl-1 für die Chemoresistenz.

Obgleich kein Zweifel daran besteht, dass Mcl-1 für die Vermittlung des Apoptosedefekts in der CLL von großer Relevanz ist, scheint es nicht gerechtfertigt, dieses Protein als den antiapoptotischen Faktor katexochen zu betrachten. Zu wenig ist bisher bekannt über die Funktion und Regulation anderer Proteine, wie XIAP und Bcl-2 bzw. dessen phosphorylierte Form pBcl-2(Ser70).

5.2 Bedeutung der PKC in der Kokultur mit Knochenmarkstroma

Die bisher erörterten Ergebnisse beruhen auf *in-vitro*-Versuchen mit primären Patientenzellen. Das Zellmodell allgemein besitzt den Nachteil, dass weder den systemischen Reaktionen *in vivo* noch möglichen Interaktionen mit anderen Zellen oder Geweben Rechnung getragen wird. Im Falle der CLL ist seit einiger Zeit bekannt, dass nicht im peripheren Blut zirkulierende Leukämie-Zellen von einem Microenvironment umgeben sind, das von T-Zellen und Knochenmarkstroma gebildet wird. Zwischen diesem Microenvironment und den CLL-Zellen bestehen mannigfaltige Interaktionen, die sich protektiv auf die leukämischen Zellen auswirken.⁶¹ Um diese Effekte *in vitro* zu imitieren, wurden CLL- zusammen mit Stromazellen kultiviert.

Innerhalb dieses Versuchsdesigns war die Bedeutung der Proteinkinase C und ihrer Isoformen von Interesse. Um ihrer Relevanz für das Überleben von CLL-Zellen und der Expression von antiapoptotischen Proteinen nachzugehen, wurden drei verschiedene Inhibitoren getestet. Eine Inkubation von CLL-Zellen allein (24 h) in einem Dosisbereich von 20 nM bis 1000 nM ergab keine direkte Toxizität.

⁵⁸ Vgl. Hussain et al. 2007, S. 2144 ff.

⁵⁹ Vgl. Hussain et al. 2007, S. 2148 Abb. 3, S. 2149 Abb. 4

⁶⁰ ebd. S. 2145; Hussain et al. verwendeten Hybridoma SFM (*Invitrogen*). In den eigenen Versuchen wurden die Zellen nach Elektroporation in RPMI-1640-Medium (mit FCS und Additiva versetzt, vgl. Kap. 3.4) kultiviert.

⁶¹ Vgl. Ghia et al. 2008, S. 550 f.; ferner: Munk-Pedersen et Reed 2004, S. 2366 ff.; Lagneaux et al. 1998, S. 2389 ff. ; vgl. auch Kap. 1.1

Bevor die Substanzen in Kokulturen mit primären humanen Stromazellen verwendet wurden, erfolgte ihr Einsatz zunächst in Experimenten mit der murinen Zelllinie Ltk⁻. Hier zeigte sich nach zehn Tagen dosisabhängig eine deutliche Abnahme der CLL-Zellen. Vor das Problem gestellt, dass die Zelllinie stetig proliferiert, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, dieses Wachstum zu unterbinden. Dafür standen mit der Bestrahlung und der Behandlung mit Mitomycin C zwei Methoden zu Verfügung, die die Proliferation wirksam verhindern. Die Mitomycin-C-Behandlung erwies sich insofern als günstiger, als sie weit geringere Zellverluste als die Bestrahlung herbeiführte. Auch der Support wird durch die Vorinkubation mit dem DNA-Synthese-Inhibitor nicht kompromittiert. Daher kann diese Methode für die Arbeit mit der Ltk⁻-Zelllinie empfohlen werden, wenn Versuche mit längerer Kultivierungsdauer durchgeführt werden sollen.

In der Kokultur mit primärem humanem Stroma erwiesen sich alle Inhibitoren als wirksam in Hinblick auf eine Reduktion lebender CLL-Zellen. Jedoch blieb die Substanz Bisindolymaleimide I deutlich hinter Gö 6976 und Gö 6983 zurück. Die konstanteste Wirkung erbrachte der Inhibitor Gö 6976, der die Isoformen α und β I der PKC hemmt. Zu diesem Ergebnis kamen Martiny-Baron und Kollegen, als sie die Substanz an rekombinanten PKC-Isoformen testeten.⁶² Die Ca⁺⁺-abhängigen Isoenzyme δ , ϵ und ζ wurden anders als bei dem ebenfalls getesteten Bisindolymaleimide I auch in mikromolaren Dosen nicht gehemmt. Aus der Publikation geht allerdings nicht zweifelsfrei hervor, ob nicht auch eine Hemmung der PKC β II in Betracht zu ziehen ist. Fraglich ist auch, ob sich die erhobenen Befunde ohne weiteres auf die CLL übertragen lassen. Eine Relevanz der PKC β kann aber deshalb angenommen werden, weil das andere von Gö 6976 inhibierte Isoenzym PKC α laut Alkan et al. in CLL-Zellen kaum vorhanden ist⁶³. Diese Vermutung stützt die Tatsache, dass PKC β in der Kokultur auf Seiten der CLL-Zellen nach 10 d induziert wird. Gleichzeitig zeigt sich eine massive Zunahme der Apoptose bei Inkubation mit Gö 6976. Diese erhöhte Apoptoserate ist wiederum mit einem Expressionsverlust von Mcl-1 (in geringerem Maße von XIAP) assoziiert. Dass Mcl-1 für das Überleben in der CLL-Stroma-Kokultur wichtig ist, wird durch eine im Western-Blot detektierbare Induktion der Proteins erkennbar. Ähnlich wie im Falle von PKC δ ist also auch für PKC β eine Regulation von Mcl-1 anzunehmen.

Kritisch ist an dieser Stelle anzumerken, dass die CLL-Zellen aus der Kokultur durch Abspülen von der Stromazellschicht gewonnen wurden. Obwohl die Verunreinigung durch mitabgespülte Stromazellen für sehr gering erachtet werden kann, sollten für künftige

⁶² Vgl. Martiny-Baron et al. 1993, S. 9195 f.

⁶³ Vgl. Alkan et al. 2005, S. 100 ff.

Versuche die Zellen durch geeignete Verfahren, z.B. mittels magnetischer Beads, separiert werden, um jeden Kontaminationseffekt auszuschließen.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten CLL-Stroma-Kokultur-Versuchen wurden hauptsächlich die Leukämie-Zellen untersucht. Gerade bei der Verwendung von PKC-Inhibitoren in der Kokultur stellt sich allerdings die Frage, ob die Agenzien eher auf Seiten der CLL oder des Stromas wirken. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die Stromazellen vor Beginn der Kokultur mit den Inhibitoren vorinkubiert; die Anzahl vitaler CLL-Zellen wurde dann mit Ansätzen verglichen, in denen der Inhibitor die ganze Kultivierungsdauer über wirken konnte. Ferner wurden Stromazellen alleine für 10 d mit Bisindolylmaleimide I, Gö 6976 und Gö 6983 behandelt. Den Resultaten dieser Experimente zufolge ist die Hauptwirkung der Substanzen gegen die CLL-Zellen gerichtet. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass die Bedingungen in der Stromazellmonokultur nicht denen der Kokultur entsprechen. Obgleich die Ergebnisse Hinweise darauf liefern, dass primär die Proteinkinase C der Leukämiezellen inhibiert wird, ist weiterhin unklar, welche Implikationen für die Wirkung der Inhibitoren die Interaktionen zwischen den CLL- und den Stromazellen in sich bergen. Beispielsweise könnte das Enzym durch wechselseitige Stimulation auch auf Seiten des Stromas induziert respektive aktiviert werden und damit den Inhibitoren ein Angriffsziel bieten. Dies würde das geringe Ansprechen der Fibroblasten ohne Kokultivierung ebenfalls erklären. In diesem Zusammenhang ergibt sich auch die Frage, welche Funktion die Proteinkinase C auf Seiten der Stromazellen erfüllt und ob sie für die Vermittlung und Aufrechterhaltung des Supports von Bedeutung ist. Dabei wäre interessant zu klären, wie die PKC der Stromazellen diesen Support bewirkt und ob sie beispielsweise über eine vermehrte Ausschüttung von Zytokinen oder eine verstärkte Expression von Integrinen die Interaktionen mit den Leukämiezellen ermöglicht. Da die besagten Interaktionen aber bisher nicht aufgeklärt sind und dies auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geschehen konnte, bleibt letztere Überlegung Spekulation. Auf diesem Gebiet ist fürderhin intensive Forschungsarbeit vonnöten. Versuche mit siRNA beispielsweise, in denen die PKC der Stromazellen ausgeschaltet wird, könnten hier Aufschluss geben.

Wie aktuell Thematik der PKC-Inhibition ist, zeigen klinische Phase-I- und Phase-II-Studien mit der Substanz Enzastaurin. Das peroral verabreichbare Präparat Enzastaurin-HCl inhibiert PKC β und andere Isoenzyme und wird derzeit an CLL-Patienten getestet.⁶⁴ Ob und inwieweit sich diese und andere Substanzen als Therapieoption für die chronische lymphatische Leukämie durchsetzen, wird die Zukunft zeigen.

⁶⁴ Vgl. O'Brien 2008, S. 461

Die Versuche mit PKC-Inhibitoren in der Kokultur besitzen aber auch deshalb klinische Relevanz, weil CLL-Zellen möglicherweise im Knochenmark vor der Chemotherapie geschützt sind; von dort könnte ein möglicher Relaps seinen Ausgang nehmen. In diesem Zusammenhang dürften künftig auch die Suche nach Subpopulationen der CLL und deren molekulare Charakterisierung mehr Raum einnehmen. Dadurch lässt sich vielleicht eine selektivere Therapie erreichen, die insbesondere gegen diejenigen Zellen gerichtet ist, die für den Stromasupport suszeptibel sind. Da Krankheitsaktivität und molekulare Spezifika von Patient zu Patient variieren, wird künftig das Augenmerk auf einer dem jeweiligen Patienten individuell angepassten Therapie liegen. Dabei wird der Einsatz von spezifisch wirksamen Medikamenten wie Enzyminhibitoren oder Agenzien, die proapoptotische Proteine blockieren (Wirkprinzip z.B. analog der Substanz ABT-737), im Vordergrund stehen und die unspezifische Chemotherapie mit Substanzen wie Chlorambucil ablösen. Als weiteres Forschungsziel wäre auf die Entwicklung von Substanzen zu hoffen, die spezifisch Enzyme wie die PKC in CLL-Zellen, nicht aber in anderen Zellen des Körpers hemmen, und somit ein weit geringeres Nebenwirkungsspektrum besitzen.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

A

Abrams ST, Lakum T, Lin K, Jones GM, Treweeke AT, Farahani M, Hughes M, Zuzel M, Slupsky JR.

B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia cells is regulated by overexpressed active protein kinase C beta II.

Blood. 2007 Feb 1;109(3):1193-201. Epub 2006 Sep 26.

Alkan S, Huang Q, Ergin M, Denning MF, Nand S, Maududi T, Paner GP, Ozpuyan F, Izban KF.

Survival role of protein kinase C (PKC) in chronic lymphocytic leukemia and determination of isoform expression pattern and genes altered by PKC inhibition.

Am J Hematol. 2005 Jun;79(2):97-106.

B

Barragán M, Bellosillo B, Campàs C, Colomer D, Pons G, Gil J.

Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells.

Blood. 2002 Apr 15;99(8):2969-76.

Barragán M, Campàs C, Bellosillo B, Gil J.

Protein kinases in the regulation of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia.

Leuk Lymphoma. 2003 Nov;44(11):1865-70. Review

Barragán M, de Frias M, Iglesias-Serret D, Campàs C, Castaño E, Santidrián AF, Coll-Mulet L, Cosialls AM, Domingo A, Pons G, Gil J.

Regulation of Akt/PKB by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and -independent pathways in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: role of protein kinase C{beta}.

J Leukoc Biol. 2006 Dec;80(6):1473-9. Epub 2006 Aug 29.

Boelens J, Lust S, Vanhoecke B, Offner F.

Chronic lymphocytic leukaemia

Anticancer Res. 2009 Feb;29(2):605-15. Review

Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW.

Chronic lymphocytic leukemia.

Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2004:163-83. Review

C

Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ:
B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather.
J Clin Oncol. 1999 Jan;17(1):399-408. Review

Caligaris-Cappio F, Ghia P.
Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease?
J Clin Oncol. 2008 Sep 20;26(27):4497-503. Epub 2008 Jul 28. Review

Carlo-Stella C, Di Nicola M, Turco MC, Cleris L, Lavazza C, Longoni P, Milanese M, Magni M, Ammirante M, Leone A, Nagy Z, Giofrè WR, Formelli F, Gianni AM.
The anti-human leukocyte antigen-DR monoclonal antibody 1D09C3 activates the mitochondrial cell death pathway and exerts a potent antitumor activity in lymphoma-bearing nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice.
Cancer Res. 2006 Feb 1;66(3):1799-808.

Cho BB, Toledo-Pereyra LH.
Caspase-independent programmed cell death following ischemic stroke.
J Invest Surg. 2008 May-Jun;21(3):141-7. Review.

D

Decker T, Hipp S, Hahntow I, Schneller F, Peschel C.
Expression of cyclin E in resting and activated B-chronic lymphocytic leukaemia cells: cyclin E/cdk2 as a potential therapeutic target.
Br J Haematol. 2004 Apr;125(2):141-8.

E

Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL.
Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family.
EMBO Rep. 2006 Oct;7(10):988-94. Review

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T.
Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.
Nature. 2001 May 24;411(6836):494-8.

G

Gandhi V, Balakrishnan K, Chen LS.
Mcl-1: the 1 in CLL.
Blood. 2008 Nov 1;112(9):3538-40.

Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K.
Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation.
J Intern Med. 2008 Dec;264(6):549-62. Review

Guipaud O, Deriano L, Salin H, Vallat L, Sabatier L, Merle-Béral H, Delic J:
B-cell chronic lymphocytic leukaemia: a polymorphic family unified by genomic features.
Lancet Oncol. 2003 Aug;4(8):505-14. Review

H

Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC.
bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia.
Blood. 1993 Sep 15;82(6):1820-8.

Holcik M, Gibson H, Korneluk RG.
XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target.
Apoptosis. 2001 Aug;6(4):253-61. Review.

Hussain SR, Cheney CM, Johnson AJ, Lin TS, Grever MR, Caligiuri MA, Lucas DM, Byrd JC.
Mcl-1 is a relevant therapeutic target in acute and chronic lymphoid malignancies: down-regulation enhances rituximab-mediated apoptosis and complement-dependent cytotoxicity.
Clin Cancer Res. 2007 Apr 1;13(7):2144-50.

J

Jiang X, Wang X.
Cytochrome C-mediated apoptosis.
Annu Rev Biochem. 2004;73:87-106. Review.

K

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R.
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.
Br.J.Cancer 26 (4), (1972) 239 – 257

L

Labi V, Erlacher M, Kiessling S, Villunger A.
BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy.
Cell Death Differ. 2006 Aug;13(8):1325-38. Epub 2006 Apr 28. Review

Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P.
Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells.
Blood. 1998 Apr 1;91(7):2387-96.

Liang Q, Li W, Zhou B.
Caspase-independent apoptosis in yeast.
Biochim Biophys Acta. 2008 Jul;1783(7):1311-9. Epub 2008 Mar 2. Review.

M

Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marmé D, Schächtele C.

Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976.
J Biol Chem. 1993 May 5;268(13):9194-7.

Mellor H, Parker PJ.

The extended protein kinase C superfamily.
Biochem J. 1998 Jun 1;332 (Pt 2):281-92. Review

Michels J, Johnson PW, Packham G.

Mcl-1.
Int J Biochem Cell Biol. 2005 Feb;37(2):267-71. Review.

Michie AM, Nakagawa R.

Elucidating the role of protein kinase C in chronic lymphocytic leukaemia.
Hematol Oncol. 2006 Sep;24(3):134-8. Review

Montillo M, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E.

Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies.
Haematologica. 2005 Mar;90(3):391-9. Review

Morizane Y, Honda R, Fukami K, Yasuda H.

X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO.
J Biochem. 2005 Feb;137(2):125-32.

Munk-Pedersen I, Reed J.

Microenvironmental interactions and survival of CLL B-cells.
Leuk Lymphoma. 2004 Dec;45(12):2365-72. Review

O

O'Brien S.

New Agents in the treatment of CLL
Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2008:457-64.

P

Packham G, Stevenson FK.

Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia.
Immunology. 2005 Apr;114(4):441-9. Review.

Pepper C, Lin TT, Pratt G, Hewamana S, Brennan P, Hiller L, Hills R, Ward R, Starczynski J, Austen B, Hooper L, Stankovic T, Fegan C.

Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers.
Blood. 2008 Nov 1;112(9):3807-17. Epub 2008 Jul 3.

R

Ringshausen I, Schneller F, Bogner C, Hipp S, Duyster J, Peschel C, Decker T.
Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta.
Blood. 2002 Nov 15;100(10):3741-8. Epub 2002 Jul 12.

Ringshausen I, Oelsner M, Weick K, Bogner C, Peschel C, Decker T.
Mechanisms of apoptosis-induction by rottlerin: therapeutic implications for B-CLL.
Leukemia. 2006 Mar;20(3):514-20.

S

Snowden RT, Sun XM, Dyer MJ, Cohen GM.
Bisindolylmaleimide IX is a potent inducer of apoptosis in chronic lymphocytic leukaemic cells and activates cleavage of Mcl-1.
Leukemia. 2003 Oct;17(10):1981-9.

T

Tuschl T, Borkhardt A.
Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy.
Mol Interv. 2002 Jun;2(3):158-67. Review

Z

Zhou P, Qian L, Kozopas KM, Craig RW.
Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions.
Blood. 1997 Jan 15;89(2):630

Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR.
The machinery of programmed cell death.
Pharmacol Ther. 2001 Oct;92(1):57-70. Review

6.2 Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle PD Dr. med. Ingo Ringshausen für die Überlassung des Themas. Prof. Dr. med. Christian Peschel, dem Ordinarius der III. Medizinischen Klinik am Klinikum rechts der Isar, München, danke ich für die Möglichkeit der Promotion in seiner Abteilung.

Gedankt sei ferner den Mitgliedern der AG Ringshausen für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit, im Einzelnen:

cand. med.* Viola Biberacher

Dr. med. Christian Bogner

cand. med.* Angela Lacknermeier

Dr. rer. nat. Gloria Lutzny

Madlen Oelsner (TA)

Michaela Wagner (TA)

Besonders dankbar bin ich Madlen Oelsner und Michaela Wagner für ihre Geduld und Hilfe in allen technisch-methodischen und sonstigen Belangen und Viola Biberacher für die zahlreichen kritischen und anregenden Gespräche im Labor, auch zu später Stunde.

Für materielle, technische und ideelle Unterstützung bei der Laborarbeit danke ich meinem guten Freund cand. med.* Christian Fritz, Drs. rer. nat.* Nikolas Kaltz und PD Dr. rer. nat. Robert Ostendoorp, außerdem Prof. Dr. med. Edgar Mayr, dem Ordinarius der Unfallchirurgie am Klinikum Augsburg, für seine unbürokratische und unkomplizierte Hilfe.

Ohne die Unterstützung meiner Eltern wäre diese Arbeit – wie das meiste andere in meinem Leben – nicht zustande gekommen, ihnen möchte ich an dieser Stelle herzlich danken. Als Vorbild v.a. in formalen Dingen bin ich meinem Bruder Ludwig zu besonderem Dank verpflichtet.

* Titel nur im hochschulinternen Gebrauch

6.3 Curriculum vitae

Zur Person

B e n e d i k t Martin Josef L a m p l

geboren am 29.08.1983
in Fürstenfeldbruck

Schulischer Werdegang

09/1990 – 07/1994 Friedrich-Ebert-Grundschule, Augsburg
09/1994 – 07/2003 Humanistisches Gymnasium bei St. Stephan, Augsburg
07/2003 Abitur

Studium

10/2003 – 06/2010 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität/Technischen Universität München
08/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
ab 10/2005 Klinisches Studium an der Technischen Universität München
08/2007 Chirurgische Auslands-Famulatur in Benha, Ägypten
02/2009 – 01/2010 Praktisches Jahr
02 – 06/2009 Anästhesiologie am Klinikum rechts der Isar, München, und am Deutschen Herzzentrum München
06 – 10/2009 Innere Medizin am Krankenhaus Bozen, Italien
10 – 11/2009 Gefäß- und Thoraxchirurgie am Krankenhaus Bozen, Italien
11/2009 – 01/2010 Chirurgie am Queen Mary Hospital, Hong Kong, China
06/2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
07/2010 Approbation als Arzt

Wissenschaftliche Arbeiten

12/2006 – 05/2009 Dissertation
12/2009 – 01/2010 *Lung Cancer Resection in Elderly Patients: VATS offers faster recovery*
Staffa J., Lampl B., Sihoe A.
Präsentation der Ergebnisse als Poster bei der 18th European Conference on General Thoracic Surgery in Valladolid – Spanien,
30.05.2010 – 02.06.2010