

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

III. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel)

Verstärkung der Zytotoxizität der anti-CD22 Immuntoxine durch
Bryostatin 1 in B-Zelllymphomen

Viola Maria Biberacher

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. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. I. Ringshausen

2. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

3. Univ.-Prof. Dr. D. Busch

Die Dissertation wurde am 09.08.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und von der Fakultät für Medizin am 12.06.2013 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Anhang:	6
1	Einleitung 1
1.1	Chronisch lymphatische Leukämie 1
1.1.1	Epidemiologie 1
1.1.2	Pathogenese 1
1.1.3	Zyto- und Molekulargenetische Aberrationen 2
1.1.4	Klinik 3
1.1.5	Therapie 4
1.2	Molekulare Mechanismen der Apoptoseresistenz in der CLL 5
1.3	Proteinkinase C 9
1.4	Immuntoxine 10
1.5	Bryostatin 1 12
1.6	Aufgabenstellung 14
2	Material und Methoden 16
2.1	Material 16
2.1.1	Zellproben 16
2.1.2	Reagenzien 17
2.1.3	Medien 18
2.1.4	Puffer und Lösungen 18
2.1.5	Bryostatin 19
2.1.6	Immuntoxine 20
2.1.7	Antikörper 20

2.1.8	Oligonukleotide	20
2.1.9	Interleukin 2	21
2.1.10	Chemotherapeutika und niedermolekulare Inhibitoren ...	21
2.1.11	sonstige Materialien und Geräte	21
2.2	Methoden.....	23
2.2.1	Separationsverfahren.....	23
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl.....	23
2.2.3	Einfrieren und Auftauen	23
2.2.4	Kulturbedingungen	24
2.2.5	Apoptoseanalyse	24
2.2.6	Immunphänotypisierung	25
2.2.7	Immunoblots	26
2.2.8	Zellstimulierung	28
2.2.9	MCL-1 Knock Down	28
2.2.10	Statistische Analysen	28
3	Ergebnisse.....	29
3.1	Bryostatin sensibilisiert CLL-Zellen für das Immuntoxin BL22	29
3.1.1	Apoptoseinduktion durch BL22 in Kombination mit Bryostatin	29
3.1.2	Zytotoxischer Effekt der Kombination von BL22 und Bryostatin ist unabhängig von Patientencharakteristika	30
3.1.3	Apoptoseinduktion durch BL22 in Kombination mit PMA..	31
3.2	Bryostatin erhöht die CD22-Expression der CLL-Zellen	33
3.2.1	Bryostatin verstärkt dosisabhängig die CD22-Expression der CLL-Zellen	33

3.2.2	Bryostatin verstärkt die CD 22 Expression bei „Niedrig- und Hoch-Expriemierern“	34
3.2.3	Proteinkinase C Signalweg ist an der Hochregulation von CD 22 beteiligt.....	35
3.2.4	Rolle solubler Faktoren bei der Hochregulation von CD22 durch Bryostatin	36
3.2.5	Die Expression von CD 20 und CD 52 wird durch Bryostatin nicht beeinflusst	38
3.3	Bryostatin verändert das Proteinkinase C-Expressionsmuster der CLL-Zellen	39
3.3.1	Bryostatin 1 bewirkt in hoher Konzentration eine Depletion von PKC-βII	39
3.3.2	PKC-β Inhibitor Enzastaurin verstärkt Zytotoxizität von BL22 41	
3.4	Antiapoptotische Wirkung von Bryostatin in vitro	43
3.4.1	Antiapoptotische Wirkung von Bryostatin 1 in vitro interferiert mit der Sensibilisierung für das Immuntoxin	43
3.4.2	Bryostatin 1 attenuiert Chemotherapie-induzierte Zytotoxizität in CLL-Zellkulturen	44
3.4.3	Veränderung verschiedener Apoptoseproteine durch Bryostatin	46
3.4.4	BL22 antagonisiert die Bryostatin-induzierten antiapoptotischen Proteinveränderungen nur teilweise	47
3.4.5	Relevanz von MCL-1 für die Apoptose der CLL-Zellen – MCL-1 Knockdown	49
3.5	Sequentielle Gabe von Bryostatin und BL22	51
3.5.1	Die Erhöhung antiapoptotischer Proteine durch Bryostatin ist im zeitlichen Verlauf rückläufig	51
3.5.2	PKC-βII Depletion ist lang anhaltend	53
3.5.3	Hochregulation der CD 22 Expression ist über 72 Stunden anhaltend	55

3.5.4	Sensibilisierender Effekt von Bryostatin bei sequentieller Gabe des Immuntoxins	56
3.6	MCL-1 Hochregulation und PKC- β II-Depletion in der CLL-Kokultur mit LTK ⁻	57
3.7	Wirkung von Bryostatin und BL22 auf proliferierende Zellen	59
3.8	Wirkung von Bryostatin und BL22 auf Lymphom-Zelllinien	61
3.9	Vergleich der Wirkung von BL22 mit dem weiterentwickelten Immuntoxin HA22	63
4	Diskussion	64
4.1	Monoklonale Antikörper in der Therapie der CLL	64
4.2	CD22 als Zielmolekül auf CLL-Zellen	65
4.2.1	Nativer CD22 Antikörper Epratuzumab	65
4.2.2	Entwicklung „bewaffneter“ CD22 Antikörper: BL22 und HA22	65
4.2.3	Niedrige CD22-Expression limitiert Wirkung von CD22-Immuntoxinen auf CLL-Zellen	66
4.2.4	CD22	67
4.3	Wirkungsverstärkung monoklonaler Antikörper durch Erhöhung der Zielmoleküle – Beispiele in der Literatur	68
4.4	Bryostatin als potentieller Verstärker der BL22 Wirkung	68
4.4.1	Phorbol ester und Bryostatin steigern CD22 Expression auf CLL-Zellen	68
4.4.2	Bryostatin in klinischen Studien	69
4.5	Bryostatin verstärkt die Zytotoxizität von BL22 durch Hochregulation von CD22 und Depletion von PKC- β II	70
4.6	Einfluss der Proteinkinase-C-Expression auf die Immuntoxinwirkung	72
4.6.1	Veränderung verschiedener PKC-Isoformen durch Bryostatin	72

4.6.2	PKC-Depletion sensibilisiert CLL-Zellen für Toxine	72
4.7	Veränderungen des Apoptose – Antiapoptose Gleichgewichts durch Bryostatin.....	74
4.7.1	Antiapoptotische Wirkung von Bryostatin in Zellkulturen.	74
4.7.2	Hochregulation von MCL-1 und pSer(70)-BCL-2 durch Bryostatin	75
4.7.3	Relevanz von MCL-1 für die Wirkung von BL22.....	76
4.7.4	Wirkweise von BL22 auf zellulärer Ebene - Einfluss verschiedener Apoptose-regulierender Proteine	77
4.8	Applikation von Bryostatin in vivo.....	79
4.9	Sequentielle Applikation von Bryostatin und BL22	82
4.10	Vergleich der Wirkung von BL22 mit HA22	84
4.11	Ausblick	85
5	Zusammenfassung	87
6	Vorveröffentlichungen	88
7	Literaturverzeichnis	89

Anhang:

Biberacher V*, Decker T*, Oelsner M, Wagner M, Bogner C, Schmidt B, Kreitman RJ, Peschel C, Pastan I, Meyer Zum Büschenfelde C, Ringshausen I
The cytotoxicity of anti-CD22 immunotoxin is enhanced by bryostatin 1 in B-cell lymphomas through CD22 upregulation and PKC-βII depletion
 Haematologica. 2012 May;97(5):771-9. Epub 2011 Dec 16

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Apoptose	6
Abbildung 2: Immuntoxin BL22	12
Abbildung 3: Bryostatin	13
Abbildung 4: Phänotypische Veränderungen an der CLL durch Bryostatin 1	14
Abbildung 5: Apoptoseinduktion durch BL22 mit und ohne Broystatin in der CLL in Kokultur mit Ltk	30
Abbildung 6: Apoptoseinduktion durch BL22 in Kombination mit PMA	32
Abbildung 7: CD 22 Expression in Abhängigkeit von Bryostatin 1	34
Abbildung 8: Hochregulation von CD 22 in Abhängigkeit von der Grundexpression	35
Abbildung 9: Blockade der CD 22 Hochregulation durch Inhibition der klassischen PKC's ...	36
Abbildung 10: Apoptoseinduktion durch BL22 in konditioniertem Medium	37
Abbildung 11: Expression von CD 20 und CD 52 nach Behandlung mit Bryostatin.....	38
Abbildung 12: Veränderung des PKC-Expressionsmusters durch Bryostatin (Western Blot)	41
Abbildung 13: Verstärkung der Immuntoxinwirkung durch Enzastaurin	42
Abbildung 14: Antiapoptotischer Effekt von Bryostatin 1.....	43
Abbildung 15: Apoptoseinduktion durch BL22 mit und ohne Bryostatin in der CLL-Reinkultur	44
Abbildung 16: Wirkung verschiedener Chemotherapeutika kombiniert mit Bryostatin.....	45
Abbildung 17: Veränderung verschiedener Apoptoseproteine durch Bryostatin (Western Blot)	47
Abbildung 18: Expression verschiedener Apoptoseproteine nach Behandlung mit Bryostatin und BL22.....	49

Abbildung 19: MCL-1 Knockdown (Western Blot und Annexindaten)	51
Abbildung 20: Expression verschiedener Apoptoseproteine nach Entfernung von Bryostatin (Western Blot)	53
Abbildung 21: Veränderung der Proteinkinase C Expression nach Broystatin über 72h (Western Blot)	54
Abbildung 22: Verlauf der CD 22 Expression nach Entfernung von Bryostatin.....	56
Abbildung 23: Apoptoseinduktion durch BL22 nach Vorbehandlung mit Bryostatin 1	57
Abbildung 24: MCL-1 und PKC- β II Expression in Kokultur mit LTK-.....	58
Abbildung 25: CLL-Zellen, stimuliert mit DSP 30 und IL-2	59
Abbildung 26: Wirkung von Broystatin 1 und BL22 auf stimulierte Zellen.....	60
Abbildung 27: Wirkung von BL22 in Kombination mit Bryostatin an Lymphomzelllinien.....	62
Abbildung 28: Vergleich der Zytotoxizität von BL22 und HA 22.....	63

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
APAF-1	Apoptotic protease activating factor 1
ATM	Ataxia-teleangiectasia-mutated protein
BAD	BCL-2 antagonist of cell death
BAK	BCL-2 homologous antagonist-killer
BAX	BCL-2-associated X protein
BCL-2	B-cell leukemia and lymphoma 2 protein
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell Typ
BCL-XL	BCL-2-related-gene, long isoform
BID	BCL-2 interacting domain death agonist
BIM	BCL-2-interacting mediator of cell death
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovine serum albumin
CD	Cluster of differentiation
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSP30	CpG-Oligodeoxynukleotid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ERK	Extracellular-signal-regulated kinase
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HCL	Hydrogenchlorid
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-l-piperazinesulphonic acid
IAP	Inhibitor of apoptosis protein

Ig	Immunglobulin
Il-2	Interleukin-2
Jak	Janus kinase
LTK ⁻	Leukocyte thymidine kinase negative cells
MAP	Mitogen-activated protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCL-1	Myeloid cell leukemia-1 protein
MEK	MAPK/ERK-kinase
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major Histocompatibility Complex
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
P53	Protein 53
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBMNC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PE	Phycoerythrin
PEST-Sequenz	Aminosäuresequenz reich an Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T)
PI	Propidium Jodid
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-azetat (=TPA)
PMSF	Phenylmethylsulphonyl fluoride
PUMA	P53-upregulated modulator of apoptosis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rb	Retinoblastoma protein
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Standard deviation scores

Stat	Signal transducer and activator of transcription
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TPA	Tetradecanoylphorbolazetat (= PMA)
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
ZAP 70	Zeta-chain-associated protein kinase 70

1 Einleitung

1.1 Chronisch lymphatische Leukämie

1.1.1 Epidemiologie

Die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) ist mit 30% aller Leukämien die häufigste Leukämieform in der westlichen Welt.

Die CLL wird zu den niedrig malignen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen gerechnet. Betroffen sind vor allem ältere Menschen, das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 70 Jahren. Männer erkranken etwas häufiger als Frauen mit einer Geschlechterverteilung von Männern zu Frauen von 1,7:1 [91].

1.1.2 Pathogenese

Pathophysiologisch ist die CLL gekennzeichnet durch die Akkumulation von funktionell inkompetenten monoklonalen B-Lymphozyten vorrangig in Blut, Knochenmark, Lymphknoten, Leber und Milz. Die klonalen Zellen sind in einem intermediären Stadium zwischen Prä-B-Zellen und reifen B-Zellen arretiert.

Als Auslöser der Erkrankung wird eine Stimulation durch Auto- und Fremdantigene, zum Beispiel im Rahmen chronischer Infektionen, diskutiert [21].

Die Pathogenese der CLL ist bis heute nicht vollständig geklärt, man geht jedoch davon aus, dass zu einem großen Teil ein Apoptosedefekt für die Akkumulation der malignen Zellen verantwortlich ist. Entsprechend zeichnen CLL-Zellen sich durch eine Überexpression verschiedener antiapoptotischer Proteine, einhergehend mit einer verlängerten Lebenszeit, aus [83].

Der größte Teil der malignen B-Zellklone ist in der G0/frühen G1-Phase des Zellzyklus arretiert. Proliferierende Zellen hingegen finden sich in Pseudo-

follikeln in sogenannten Proliferationszentren in Lymphknoten und Knochenmark. Sie füllen den Bestand an malignen Zellen im peripheren Blut und können Ausgangspunkt von Rezidiven sein [20, 21].

Bisher ging man davon aus, dass nur ein sehr kleiner Teil der CLL-Zellen proliferiert. Neuere kinetische Studien konnten jedoch Proliferationsraten von bis zu 1,75 % der Zellklone nachweisen mit großen interindividuellen Unterschieden zwischen den Patienten. Höhere Proliferationsraten scheinen mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf einherzugehen [73].

Die in vivo sehr langlebigen CLL-Zellen sterben in vitro meist sehr rasch, so dass offensichtlich Milieufaktoren zum Überleben der Zellen beitragen. Diesen sogenannten „Microenvironmental factors“ wird heute eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der CLL zugeschrieben. Verantwortlich hierfür sind in erster Linie Stromazellen und aktivierte T-Zellen beziehungsweise andere CD40-Liganden. Die Überlebenssignale werden sowohl durch lösliche Liganden über den B-Zellrezeptor, Zyto- und Chemokinrezeptoren, als auch durch direkten Zellkontakt vermittelt [21].

Um diese Bedingungen in vitro zu imitieren, können CLL-Zellen zusammen mit Helferzellen kokultiviert werden. Hierfür werden in erster Linie humane oder murine Fibroblastenzelllinien oder auch primäre Stromazellen verwendet. Durch direkten Zell-Zell-Kontakt mit den CLL-Zellen vermindern sie deren Spontanapoptose [60, 61].

1.1.3 Zyto- und Molekulargenetische Aberrationen

CLL-Zellen zeichnen sich durch stark verminderte Oberflächenimmunoglobuline aus. Am häufigsten wird aberrant IgM mit oder ohne IgD exprimiert. Die malignen Zellen tragen das T-Zell-assoziierte Antigen CD5, sowie die B-Zell-assoziierten Antigene CD19, CD20 und CD23 an ihrer Oberfläche [90].

Die CLL ist eine sehr heterogene Erkrankung mit variablen Verläufen. In den letzten Jahren wurden verschiedene Marker als mögliche Prädiktoren für den Verlauf der Erkrankung identifiziert. So ist die Expression von CD38, sowie von ZAP70, einem intrazellulären Signaltransduktionsprotein, mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf assoziiert. Ebenso gehen fehlende somatische Mutationen in den umgelagerten Immunglobulingenen mit einer ungünstigeren Prognose einher.

Es wurden verschiedene chromosomale Aberrationen gefunden, jedoch keine einheitliche Mutation in allen CLL-Zellen. Die häufigste zytogenetische Alteration (über 50% der Fälle) ist eine Deletion von Chromosom 13q14.3, aber auch Deletionen auf den Chromosomen 11 und 17 konnten nachgewiesen werden. Diese sind mit dem Verlust von Tumorsuppressorgenen assoziiert, wie regulatorischer micro-RNAs, p53, RB oder ATM [21].

1.1.4 Klinik

Klinisch findet sich neben Lymphknotenvergrößerungen häufig eine Spleno- und Hepatomegalie, teilweise auch eine leukämische Infiltration der Haut. Nur etwa 10 % der Erkrankten zeigen initial die typischen B-Symptome mit Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust und Fatigue.

Im Labor zeigt sich eine Lymphozytose im peripheren Blut (meist über 10 000 B-Lymphozyten/ μ l) und Knochenmark mit monoklonalen, histopathologisch reif wirkenden Zellen.

Bereits bei Krankheitsbeginn kann eine Anämie, Granulo- oder Thrombozytopenie vorliegen. Diese ist meist mild ausgeprägt und häufig durch begleitende autoimmunologische Phänomene bedingt. Ebenfalls charakteristisch ist eine Hypogammaglobulinämie.

In fortgeschrittenen Krankheitsstadien kommt es zu zunehmender Infiltration verschiedener Organsysteme mit Knochenmarkinsuffizienz, meist sterben die Patienten an interkurrierenden Infekten.

Die CLL wird nach Rai (1976, 1990) und Binet (1981) in drei verschiedene Stadien eingeteilt. Zur Einteilung der Patienten in dieser Arbeit wurde die Klassifikation nach Binet verwendet, die im Folgenden kurz dargestellt sei:

Stadium	Merkmale	Überlebenszeit (Monate)
A	< 3 vergrößerte Lymphknotenregionen *	> 120
B	> 3 vergrößerte Lymphknotenregionen *	60
C	Hb < 10,0 g/dl und/oder Thrombozytopenie < 100.000/ μ l Lymphknotenstatus irrelevant	24

(* Hb > 10,0 g/dl und Thrombozyten > 100.000 / μ l)

[11, 91]

1.1.5 Therapie

Asymptomatische Patienten in den Stadien Binet A und B werden nicht therapiert, sondern engmaschig überwacht.

Eine Therapieindikation besteht im Stadium Binet C oder bei rascher Krankheitsprogression (Lymphozytenverdopplungszeit unter sechs Monaten) sowie auch in frühen Stadien bei symptomatischen Patienten, z.B. mit B-Symptomatik, symptomatischer Anämie oder Thrombozytopenie, autoimmunologischen Phänomene oder wiederholten Infektionen.

Für die Chemotherapie werden Purinanaloga wie Fludarabin und Alkylantien wie Chlorambucil und Bendamustin verwendet. Neuere Entwicklungen stellen monoklonale Antikörper wie Rituximab (anti-CD20) und Alemtuzumab (anti-CD52) dar.

Alle bisher angewandten Therapieschemata können jedoch den Krankheitsverlauf lediglich hinauszögern und die CLL bleibt meist eine unheilbare Erkrankung. Eine Ausnahme ist die allogene Stammzelltransplantation, die jedoch nur bei jüngeren Patienten nach Versagen der konventionellen Therapie in Erwägung gezogen werden kann [11, 35, 89].

1.2 Molekulare Mechanismen der Apoptoseresistenz in der CLL

Für die Akkumulation maligner Zellklone bei der chronisch lymphatischen Leukämie sind sehr viele verschiedene Parameter verantwortlich. Eine zentrale Rolle spielt dabei ein verändertes Expressionsprofil Apoptose-regulierender Proteine. In Abbildung 1 ist ein vereinfachtes Schema des Apoptosemechanismus dargestellt. Man unterscheidet einen extrinsischen (aktiviert über Ligandenbindung an Rezeptoren der TNF- α -Rezeptorfamilie, z.B. CD95) und einen intrinsischen Aktivierungsweg (aktiviert unter anderem durch Zellstress, Zytotoxine, Bestrahlung, fehlende Signale durch Wachstumsfaktoren), bei dem die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien eine zentrale Rolle spielt. Dieses bindet an APAF-1, welches daraufhin Heterodimere mit Procaspase 9 ausbildet, das sogenannte Apoptosom, die aktive Form der Caspase 9. Gemeinsame Endstrecke von extrinsischem und intrinsischem Apoptoseweg ist die Aktivierung von Effektorcaspasen, insbesondere der Caspasen 3,6 und 7, welche schließlich die apoptotischen Veränderungen einleiten. Dabei kommt es zu Zellschrumpfung, Vesikelbildung („Blebbing“), Verlust der Membran-assymetrie, Kernfragmentierung, Chromatinkondensation und letztlich zum Zelltod [13, 48].

Die BCL-2-Familie ist eine Familie Apoptose-regulierender Proteine, die bis zu vier homologe Domänen gemeinsam haben: BCL-2 homology domains 1-4

(BH1-4). Die antiapoptotischen Proteine der Familie enthalten alle vier Homologiedomänen. Wichtige Vertreter sind BCL-2, BCL-XL und MCL-1.

Die proapoptotischen Mitglieder der Familie werden unterteilt in Effektorproteine und regulatorische BH3-only Proteine. Die Effektorproteine BAX und BAK enthalten die homologen Domänen BH1-3. Bei Aktivierung durch proapoptotische Stimuli formen sie Oligomere, die Poren in der äußeren Mitochondrienmembran ausbilden. Durch diese Poren gelangen Aktivatoren der Apoptose, insbesondere Cytochrom c, aus dem intermembranösen Raum in das Zytosol.

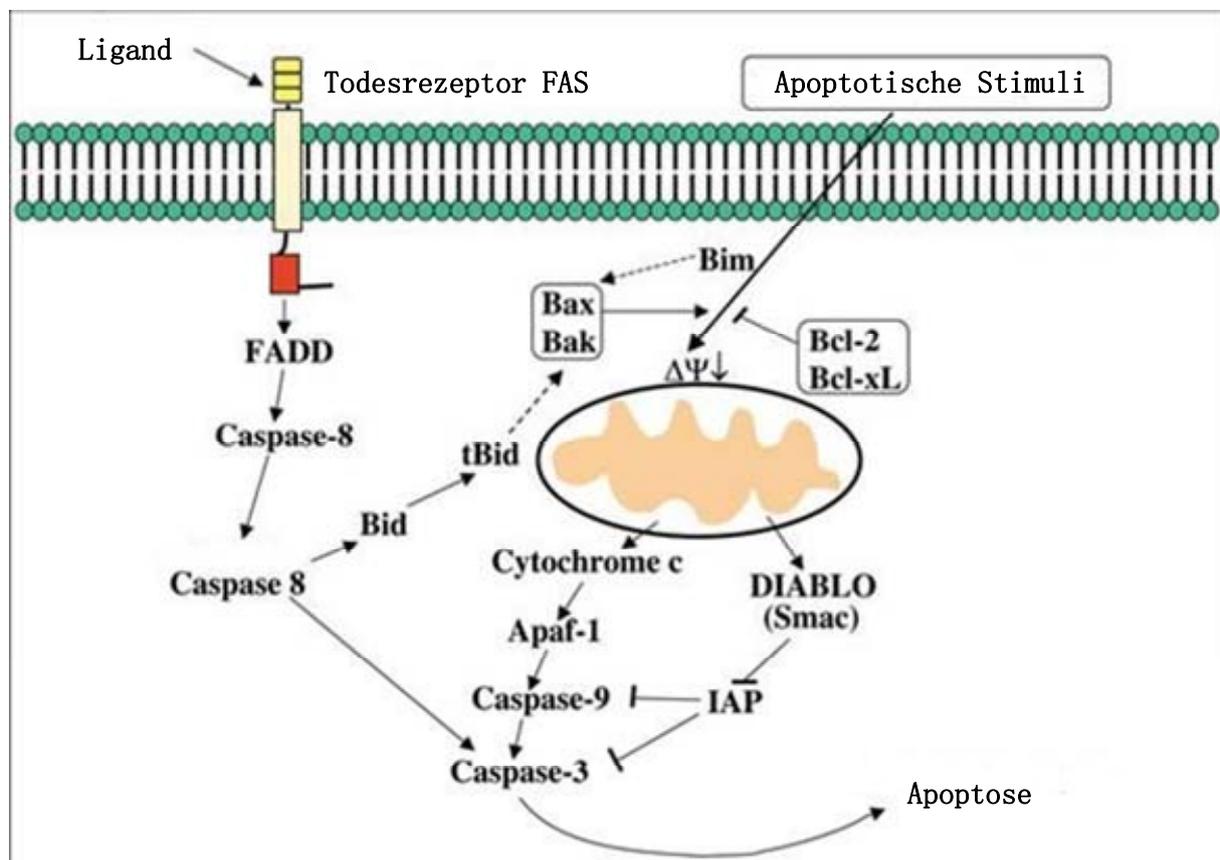


Abbildung 1: Apoptose

(modifizierte Abbildung aus Arthritis Res., Mak et al., Signaling for survival and apoptosis in the immune system [70])

Die Mitglieder der proapoptotischen regulatorischen Untergruppe der BCL-2-Familie entsprechen sich nur in der BH3 Domäne, die Proteine werden dementsprechend „BH3-only proteins“ genannt. Dazu gehören unter anderem

BID, BAD, BIM, PUMA und Noxa. Man geht davon aus, dass alle Proteine der BH3-Untergruppe Apoptosevorgänge indirekt durch Bindung und Antagonisierung antiapoptotischer Proteine unterstützen. In der Folge wird die Schwelle für die Aktivierung von BAX und BAK herabgesetzt und die Apoptose begünstigt. Dabei binden BID, BIM und PUMA an alle antiapoptotischen BCL-2-Proteine, während andere „BH3-only proteins“ jeweils spezifische Bindungen eingehen, zum Beispiel Noxa mit MCL-1.

Der exakte Mechanismus der Aktivierung von BAX und BAK und die Rolle der „BH3 only Proteine“ ist nicht abschließend geklärt. Hierzu gibt es zwei gängige Modellvorstellungen:

Das „indirekte Modell“ geht davon aus, dass BAX und BAK normalerweise an antiapoptotische Proteine gebunden und dadurch inaktiviert sind. Bei Zellstress kommt es zur Induktion und Aktivierung von BH3-only Proteinen, die daraufhin an die Inhibitoren binden, diese antagonisieren und somit indirekt zur Freisetzung und Aktivierung von BAX und BAK führen.

Beim „direkten Modell“ wird vermutet, dass die Proteine BID und BIM die Effektorproteine BAX und BAK auch direkt aktivieren können. Mittels Kernspinresonanzspektroskopie konnten direkte Interaktionen zwischen BIM und BAX nachgewiesen werden [36], auch eine Bindung zwischen BID und BAX konnte in vitro gezeigt werden [68], was beides die Theorie einer direkten Aktivierung unterstützt [22].

Die Wirkweise der antiapoptotischen Proteine ist ebenfalls Gegenstand intensiver Forschung. Dabei konnte gezeigt werden, dass BCL-2 Heterodimere mit proapoptotischen Proteinen wie BAX und BAK bildet und dadurch deren Aktivierung verhindert. Zum anderen kann BCL-2 das proapoptotische BIM direkt binden und sequestrieren [30], [18].

Für die volle antiapoptotische Aktivität ist eine Phosphorylierung von BCL-2 nötig, insbesondere an Serin 70: p(ser)70-BCL-2 [41]. Die Phosphorylierung

reguliert die Interaktion mit proapoptotischen Proteinen und verhindert den Abbau von BCL-2 [17]. Verschiedene potentielle BCL-2-Kinasen wurden Zelltyp-abhängig identifiziert, darunter insbesondere PKCs und MAP-Kinasen [97].

BCL-2 wird in der CLL verstärkt exprimiert, ursächlich ist vermutlich die Deletion oder verminderte Expression regulatorischer micro-RNA's: miR-15 und miR16 [23]. Auch eine verminderte Methylierung des BCL-2-Promotors wird diskutiert [37]. Zudem liegt BCL-2 in CLL-Zellen im Vergleich zu normalen B-Zellen vermehrt in phosphorylierter und somit aktiver Form vor, was mutmaßlich mitunter durch Veränderungen im PKC-Expressionsprofil bedingt ist [115].

Ebenso wie BCL-2 wird auch MCL-1 in CLL-Zellen vermehrt exprimiert. MCL-1 befindet sich zum großen Teil an der äußeren Mitochondrienmembran. Wie BCL-2 begünstigt MCL-1 das Zellüberleben, indem es an proapoptotische Proteine bindet und diese inhibiert. MCL-1 ist ein wichtiger Inhibitor von BAK [110], aber auch Interaktionen mit BH3-only Proteinen, insbesondere BIM und BID sind beschrieben [74], [114].

MCL-1 zeichnet sich durch eine sehr kurze Halbwertszeit aus. Bedingt durch zwei PEST Domänen in der Proteinstruktur (Aminosäuresequenz, reich an Prolin, Glutamat, Serin und Threonin, welche eine rasche Degradation des Proteins bedingt) wird MCL-1 in der Zelle rasch abgebaut [74].

Eine weitere Gruppe Apoptose hemmender Proteinen sind die „Inhibitor of apoptosis Proteine“ (IAPs), welche nicht zur BCL-2-Familie gehören. Wichtige Vertreter mit vermehrter Expression in der CLL sind XIAP und Survivin. Sie verhindern die Apoptose durch direkte Inhibierung von Caspasen.

Zusammenfassend ist das Apoptose–Antiapoptose–Gleichgewicht in der CLL stark in Richtung Antiapoptose verschoben. Zentrale Ursache ist die

Überexpression verschiedener antiapoptotischer Proteine. Diese ist zum einen bedingt durch Veränderungen in den CLL-Zellen selbst, zum anderen induziert durch die protektiv wirkenden Stromazellen [17], (siehe auch 1.1.2).

1.3 Proteinkinase C

Die Proteinkinase C ist eine Familie von intrazellulären Signaltransduktionsmolekülen, die in verschiedene Signaltransduktionswege involviert sind. PKCs sind an der Regulierung wichtiger Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung, Zellüberleben und Apoptose beteiligt [26, 84].

Es werden drei Subfamilien unterschieden: Die klassischen PKCs (PKC- α , PKC- β I, PKC- β II, PKC- γ) benötigen DAG und Calcium zur Aktivierung, die neuen PKCs (PKC- δ , PKC- ϵ , PKC- η , PKC- θ) werden durch DAG alleine aktiviert, atypische PKCs (PKC- ζ , PKC- ι) benötigen weder Calcium noch DAG als Kofaktor. Nach Aktivierung werden PKCs an zelluläre Membranen transportiert und fungieren dort als Serin/Threonin-Kinasen. Zudem geht die Aktivierung mit einer Auto- und Transphosphorylierung der PKC einher, wodurch die Signaltransduktion moduliert werden kann [85, 96]. Das Expressionsprofil der Isoformen variiert zwischen den verschiedenen Zelltypen. In CLL-Zellen werden vor allem die Isoformen β , γ , δ und ζ exprimiert [75]. Die Ergebnisse verschiedener Gruppen legen nahe, dass eine Veränderung des PKC-Expressionsprofils eine Rolle bei der Pathogenese der CLL spielt und zur Verminderung der Apoptoserate und Begünstigung des Überlebens beiträgt. So konnten zum Beispiel Abrams et al. zeigen, dass PKC- β II in CLL-Zellen überexprimiert wird, einhergehend mit Veränderungen der Signaltransduktion über den B-Zellrezeptor [2]. In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe demonstrierten zum Beispiel Büschenfelde et al., dass in ZAP-70-positiven Zellen (siehe 1.1.3 Zyto- und Molekulargenetische Aberrationen) B-Zellrezeptor vermittelte Signale

konstitutiv verstärkt sind und dies mit einer vermehrten Aktivierung von PKC- β II assoziiert ist [115].

1.4 Immuntoxine

Monoklonale Antikörper haben in den letzten Jahren die Tumorthherapie revolutioniert, da sie einen tumorzellspezifischeren Ansatz bieten und somit geringere systemische Nebenwirkungen haben. Sie sind gegen bestimmte Marker gerichtet, die auf der Oberfläche maligner Zellen im Vergleich zu gesunden Zellen verstärkt exprimiert sind, und vermitteln so gezielter den Zelltod der Tumorzellen. Die Mechanismen, welche letztendlich zum Zelltod führen, sind vom Target abhängig und beinhalten zum Beispiel die Induktion einer zellvermittelte Lyse der antikörpermarkierten Zellen (durch zytotoxische T-Zellen, natürliche Killerzellen oder Makrophagen), eine Aktivierung des Komplementsystems oder die Apoptoseinduktion infolge der Antikörperbindung [67]. Allerdings sind die Zielmoleküle meist auch in geringerer Anzahl auf gesunden Zellen exprimiert, so dass auch monoklonale Antikörper keinen vollständig tumorspezifischen Ansatz darstellen. Zudem vermögen sie als Monotherapie die malignen Zellen meist nicht hinreichend zu reduzieren, so dass sie häufig in Kombination mit einer systemischen Chemotherapie eingesetzt werden müssen.

Immuntoxine sind Fusionsproteine aus einer zellbindenden Komponente, meist ein monoklonaler Antikörper, und einem Toxin. Sie verbinden somit die Spezifität eines monoklonalen Antikörpers mit der zytotoxischen Potenz eines Toxins. Als toxische Komponente werden überwiegend bakterielle Toxine wie das Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa* oder das Diphtherietoxin verwendet. Immuntoxine werden heute meist rekombinant hergestellt.

BL22 ist ein chimäres Protein aus der variablen Region eines monoklonalen Antikörpers gegen CD22 und dem Fragment PE38 des Pseudomonas Exotoxins. Letzteres blockiert nach Aufnahme in die Zelle die Proteinbiosynthese durch ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors 2 [87] (siehe Abbildung 2).

CD22 ist ein Oberflächenmolekül der Immunglobulin-Superfamilie und moduliert B-Zellrezeptorsignale. CD22 wird stark exprimiert in der Haarzell-leukämie und in geringerem Ausmaß auch in der CLL, verschiedenen Lymphomen sowie reifen B-Zellen [38, 56].

Dementsprechend zeigt BL22 in klinischen Studien gute Wirkung bei Patienten mit Haarzell-Leukämie mit kompletten Remissionsraten zwischen 40-60% [54, 55]. Unerwünschte Nebenwirkungen sind Fatigue, Myalgien, milde Transaminasenerhöhungen, ein Hämolytisch-urämisches Syndrom sowie ein Vascular-Leak-Syndrom [55].

Bei Patienten mit CLL konnten in einer Phase I Studie mit BL22 nur marginale Erfolge verzeichnet werden, vermutlich da nur unzureichend Zielmoleküle in Form von CD22 auf der Zelloberfläche exprimiert sind [54]. Immuntoxine auf Basis von Pseudomonas Exotoxin A führen über eine Inhibition der Proteinbiosynthese zur Induktion von Apoptose. So konnten Decker et al. [28] nachweisen, dass BL22 bei CLL-Zellen über Induktion des intrinsischen Apoptosewegs in vitro zytotoxisch wirkt. Die Apoptoseinduktion ist jedoch auch abhängig von der Zahl der CD22-Moleküle auf der Oberfläche und nur moderat in Zellen mit niedriger CD22-Expression. Die molekularen Mechanismen, welche nach Blockade der Proteinbiosynthese zur Einleitung der Apoptose führen, sind unbekannt.

Eine Weiterentwicklung von BL22 stellt HA22 (R490A) dar, welches sich durch eine stärkere Bindungsaffinität für CD22 und demzufolge verbesserte spezifische Zytotoxizität auszeichnet [6].

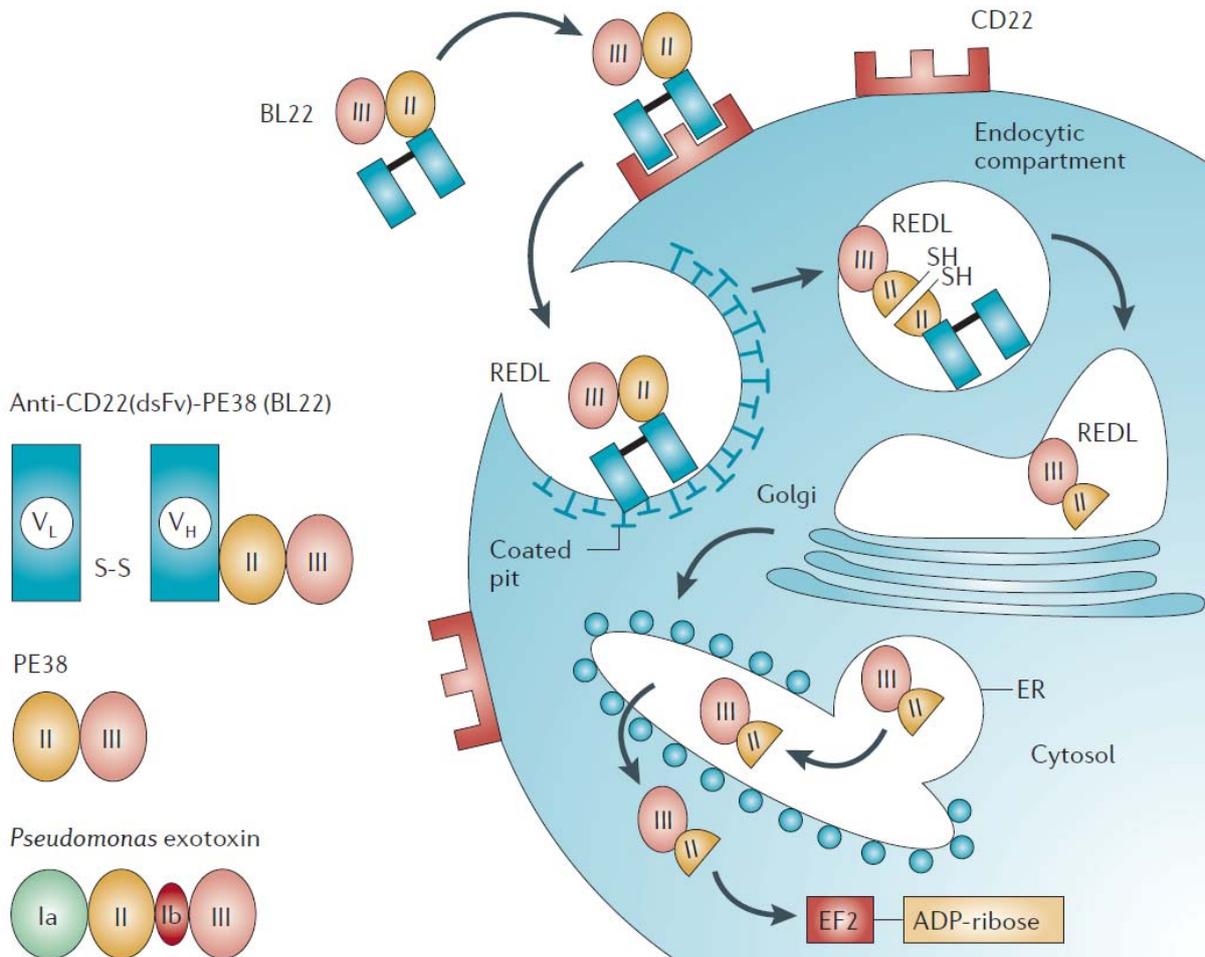


Abbildung 2: Immuntoxin BL22
 Aus Nature Reviews / Cancer, Pastan et al., Immunotoxin therapy of cancer [87]

1.5 Bryostatin 1

Bryostatin 1 ist ein makrozyklisches Lakton, das aus der Meeresalge *Bugula neritina* isoliert wurde. Die molekulare Struktur ist sehr komplex (siehe Abbildung 3). Heute werden Bryostatin-1-Analoga überwiegend synthetisch hergestellt. Bisher wurden über zwanzig verschiedene Bryostatine identifiziert. Im Folgenden wird für Bryostatin 1 vereinfachend die Bezeichnung Bryostatin verwendet.

Bryostatin wirkt als potenter Proteinkinase-C-Modulator, vermutlich aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit dem PKC-aktivierenden Second Messenger DAG. Kurzzeitexposition von Zellen mit Bryostatin führt zu einer

Aktivierung der PKC, während Langzeitexposition eher zu einer Verminderung der PKC-Aktivität führt. Offensichtlich kommt es durch Bryostatin nach der PKC-Aktivierung über eine negative Rückkopplungsschleife zu Ubiquitynylierung und Abbau von Proteinkinase-C-Isoformen im Proteasom [62, 63]. Die Wirkung auf die verschiedenen PKC-Isoformen variiert stark, ebenso der Effekt auf unterschiedliche Zellpopulationen.

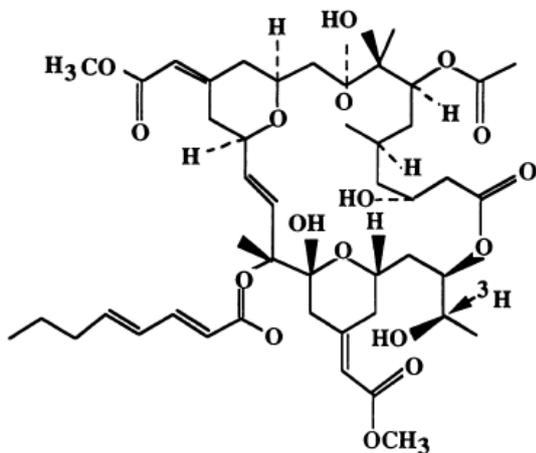


Abbildung 3: Bryostatin

(Aus Cancer Res , Zhang et al., Preclinical pharmacology of the natural product anticancer agent bryostatin 1, an activator of protein kinase C. [112])

Während In-vitro-Versuche eine antineoplastische Aktivität von Bryostatin nahelegten, konnte diese in zahlreichen klinischen Studien in vivo nicht bestätigt werden. Marginale Erfolge zeigten sich in Kombination mit Chemotherapeutika bei verschiedenen Tumorentitäten [51, 95, 105, 106].

Ein Problem bei der klinischen Anwendung von Bryostatin stellt seine schwer berechenbare und variable Pharmakokinetik dar. Zudem gab es lange Zeit keine valide Methode zur Messung der Bryostatinspiegel im peripheren Blut nach intravenöser Applikation. Zhao et al. konnten 2004 eine erfolgversprechende massenspektrometrische Methode entwickeln, die in einer klinischen Studie bereits erfolgreich eingesetzt wurde [88, 100, 113].

In CLL-Zellen induziert Bryostatin eine Zelldifferenzierung mit Ausbildung eines Haarzell-Leukämie-ähnlichen Phänotyps. Lichtmikroskopisch erkennt

man vergrößerte, vermehrt adhärenzte Zellen mit unregelmäßigen Zytoplasmaausläufern (siehe Abbildung 4). Die Differenzierung geht einher mit einer gesteigerten Expression von CD11c und CD22 [3, 4, 31]. Zudem wirkt Bryostatin in vitro antiapoptotisch auf CLL-Zellen, unter anderem durch Hochregulation von MCL-1 und verstärkte Phosphorylierung von BCL-2 an Serin 70 [104].

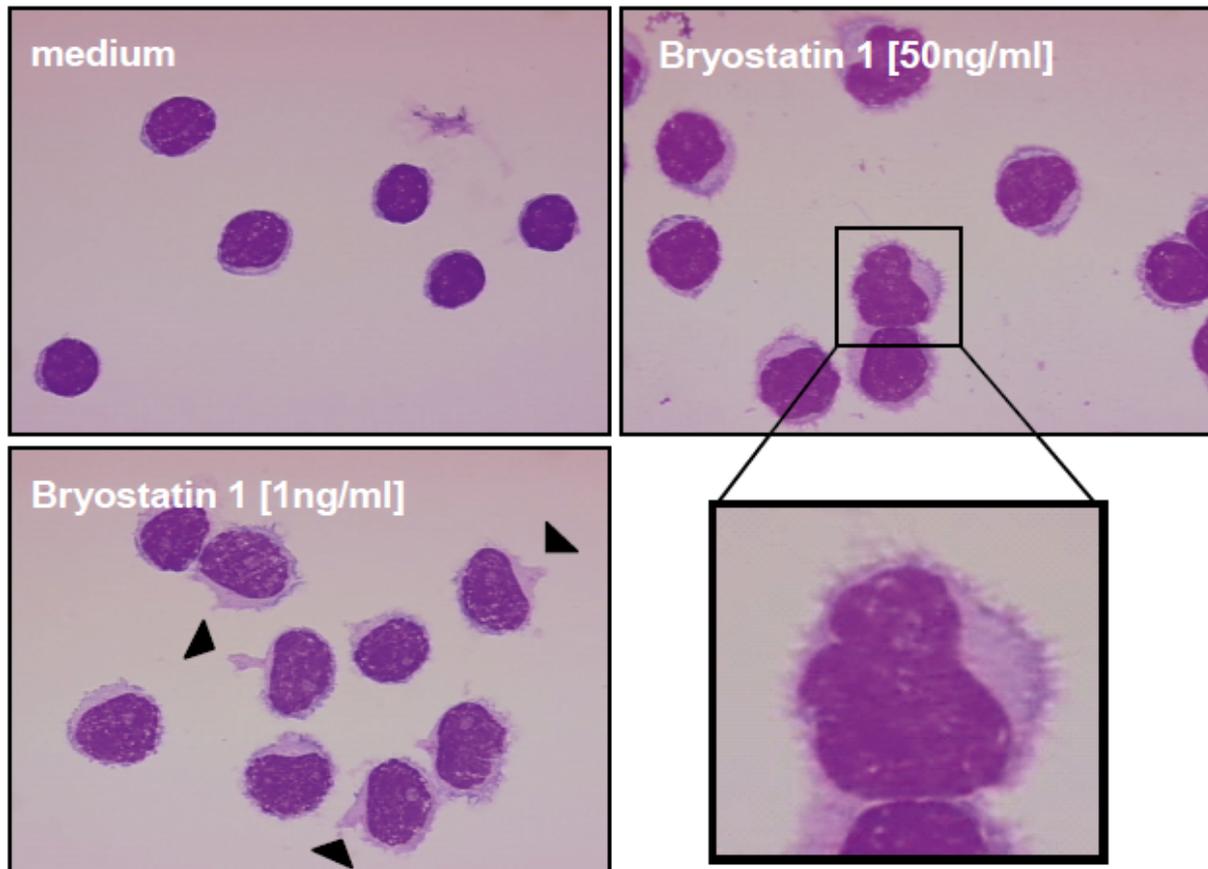


Abbildung 4: Phänotypische Veränderungen an der CLL durch Bryostatin 1

1.6 Aufgabenstellung

Wie weiter oben dargelegt, konnte in klinischen Studien mit dem Immuntoxin BL22 eine gute Wirksamkeit bei Patienten mit Haarzell-Leukämie mit Remissionsraten von bis zu 61% nachgewiesen werden. CLL-Patienten hingegen profitierten praktisch nicht von der Therapie [54]. Es ist davon auszugehen, dass die niedrige CD22-Expression auf CLL-Zellen die Zytotoxizität von BL22 bei der CLL limitiert.

Unsere primäre Hypothese war, dass mit Bryostatin durch Erhöhung der CD22-Expression die zytotoxische Wirkung von BL22 auf CLL-Zellen gesteigert werden kann.

Dies konnten wir durch In-Vitro-Experimente an primären CLL-Zellen bestätigen. Darüber hinaus wurde deutlich, dass neben der erhöhten CD22-Expression weitere Bryostatineffekte zu einer verstärkten Immuntoxinwirkung beitragen müssen.

Der zweite Teil der Arbeit konzentrierte sich darauf, auf molekularer Ebene die Mechanismen der Bryostatinwirkung zu untersuchen, welche zur Sensibilisierung der Zellen für das CD22-Immuntoxin führen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellproben

Patienten mit der Diagnose einer chronisch lymphatischen Leukämie vom B-Zelltyp wurden ausführlich über die Verwendung ihrer Zellen zu wissenschaftlichen Zwecken unter anderem mit dem Ziel der Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten für diese Erkrankung informiert. Das Einverständnis der Patienten vorausgesetzt, wurden zwischen 10 und 50 Milliliter peripheren venöses Blut entnommen. Die Diagnose einer CLL wurde nach klinischen und immunphänotypischen Kriterien gesichert. Die Patienten waren unbehandelt oder hatten innerhalb der letzten drei Monate keine zellreduzierende Chemotherapie erhalten. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme waren alle Patienten klinisch stabil, infektfrei und wurden regelmäßig ambulant betreut. Alle Lymphomzelllinien (Diffus großzelliges B-Zelllymphomlinien: Karpas, DB, Sudhl-4 sowie Mantelzelllymphomlinien: Granta und Jeko) wurden von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikro-Organismen und Zellkulturen, GmbH, Braunschweig) bezogen.

Die murine Fibroblastenzelllinie LTK⁻ wurde von Paloma Perez Aciego, Universität Madrid, Spanien, zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Reagenzien

2-Propanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Acrylamid/bis-Acrylamid Gel 30 (Rotiphorese)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Sigma Aldrich St. Louis, Missouri, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich St. Louis, Missouri, USA
Annexin-V-binding Buffer	BDPharmingen, San Diego, Ca., USA
Biocoll (Ficoll) Separating Solution	Biochrom AG, Berlin
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
BSA	Sigma Aldrich St. Louis, Missouri, USA
CD2 Microbeads, human	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
CD14 Microbeads, human	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Coulter Clenz Reinigungslösung	Beckman Coulter
Coulter Isoton II Diluent	Beckman Coulter
DC Protein Assay	Bio-Rad, München
Destilliertes Wasser	Delta Pharma GmbH, Pfullingen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
D-MEM +4500mg/l Glucose, +L-Glutamin, +Pyruvat, 500ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ethanol absolut zur Analyse	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
FCS Gold	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycerol	Sigma Aldrich St. Louis, Missouri, USA
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
L-Glutamin, 200 mM, 100fach, steril	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Methanol	J.T.Baker, USA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumfluorid	Sigma Aldrich St. Louis, Missouri, USA
Natrium-Orthovanadate	Honeywell, Riedel de Haen, Seelze
Natrumdodecylsulfat (SDS)	SERVA GmbH, Heidelberg
Nucleofector Kit V, Cell line	Amaxa Biosystems GmbH, Köln, Deutschland
PBS steril	Dulbecco's, Gibco BRL
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Potassium Bicarbonat KHCO ₃	Sigma Aldrich St. Louis, Missouri, USA
Progenitor Cell Isolation Kit CD34, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Propidium-Iodid-Lösung	BDPharmingen, San Diego, Ca., USA
Protease-Inhibitor Tablette	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RPMI 1640 Medium –L-Glutamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Skim Milk Powder	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
Super Signal ® Chemolumineszenzsubstrate (Femto, Dura, Pico)	Pierce Chemical Company, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
TEMED	Sigma Aldrich St. Louis, Missouri, USA
TRIS HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin EDTA 100ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Sigma Aldrich St. Louis, Missouri, USA
Wasser, steril	Braun, Melsungen

2.1.3 Medien

Reagenzien	Konzentration	Firma
<u>Zellkulturmedium</u> RPMI 1640 FCS Penicillin/Streptomycin Na-Pyruvat L-Glutamin L-Asparagin 2-Mercaptoethanol HEPES D-MEM	10% 50 IU/ml 1 mM 2 mM 20 µg/ml 0,05 mM 10 mM 0,7x	Invitrogen GmbH, Karlsruhe PAA, Pasching, Österreich Invitrogen GmbH, Karlsruhe Invitrogen GmbH, Karlsruhe Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<u>Einfriermedium</u> FCS DMSO	10%	PAA, Pasching, Österreich Serva Electrophoresis, Heidelberg

2.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Reagenzien
Amidoschwarz-entfärbelösung	100 ml Methanol 100 ml Essigsäure 800 ml destilliertes Wasser
Annexinpuffer	10x Annexin-V-Bindepuffer 1:10 mit PBS verdünnt
Blockierpuffer	PBS 10% Trockenmilch oder 5% BSA 0,1% Tween
FACS-Puffer	PBS 0,1 % Natriumazid 2 % FCS
Laufpuffer (10-fach)	288 g Glycin 60 g TRIS 20g SDS mit destilliertem Wasser auf 2l aufgefüllt
Lysepuffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5 130 mM NaCl 5 mM EDTA, pH 8,0 1% Triton X-100 20 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 50 mM Natriumfluorid 50 nM Benzamidin 1 mM PMSF 10 mM Natriumpyrophosphat, pH 7,0

	1 mM Natriumorthovanadat 1 x Protease-Inhibitor Cocktail Tablette (je 10 mg/ml Phenantrolin, Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin)
PBS-Tween	PBS 0,1 % Tween
Propidium-Iodid-Lösung	25 mg Propidium-Jodid
Protein-Ladepuffer	200 mM DTT 0,1 M TRIS HCl 4% SDS 0,05% Bromphenolblau 20% Glycerol
Sammelgel	1,8 ml Rotiphorese 3,5 ml Sammelgelpuffer 8,5 ml destilliertes Wasser 14 µl Temed 10% APS
Sammelgelpuffer	0,5 M TRIS HCl, pH 8,8 6,05 g TRIS 0,4 g SDS Auf 100 ml destilliertes Wasser
Transferpuffer	3,5 l destilliertes Wasser 1 l Methanol 0,5 l 10x Laufpuffer
Trenngel (12%)	9 ml Rotiphorese 5,6 ml Trenngelpuffer 7,9 ml destilliertes Wasser 15 µl Temed 10% APS
Trenngelpuffer (4-fach)	1,5 M TRIS HCl, pH 8,8 91 g TRIS 2g SDS Auf 500 ml destilliertes Wasser

2.1.5 Bryostatin

Bryostatin 1 wurde von der Firma Biomol (Hamburg) bezogen. Das Pulver wurde in DMSO (25mg/ml) gelöst.

2.1.6 Immuntoxine

Die Immuntoxine CAT-3888 (BL22) und R490A (HA22) wurden vom Center for Cancer Research, National Cancer Institute, NIH, Bethesda, USA freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.1.7 Antikörper

Durchfluss-zytometrie	Markierung	Firma
Annexin	FITC	BD Pharmingen, San Diego, Ca., USA
CD20	FITC	
CD22	FITC	Beckmann Immunotech, Marseille, Frankreich
CD52		
Westernblot	Spezies	Firma
β -Aktin	Maus	Sigma Aldrich St. Louis, Missouri, USA
BIM	Hase	PDP Pharmingen, San Diego, Ca., USA
MCL-1	Hase	Santa Cruz, Ca., USA
BCL-2	Maus	PDP Pharmingen, San Diego, Ca., USA
BCL-XL	Hase	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Phospho BCL-2 (Serin 70)	Hase	Sigma Aldrich St. Louis, Missouri, USA
PKC- β II (Clone C18)	Hase	Santa Cruz, Ca., USA
PKC- δ	Maus	BD Pharmingen, San Diego, Ca., USA
PKC- ϵ	Maus	BD Pharmingen, San Diego, Ca., USA
XIAP	Maus	BD Pharmingen, San Diego, Ca., USA
Sekundärantikörper Maus/Hase		GE Healthcare, UK

2.1.8 Oligonukleotide

Das Oligonukleotid DSP 30 (TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTGCC), einzelsträngig verwendet, wurde von der Firma TibMolBiol (Berlin, Deutschland) bezogen.

Für den MCL-1 Knockdown wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

MWG Biotech (Ebersberg)

MCL-1 siRNA: 5`-AAGTATCACAGACGTTCTC-3`

Qiagen (Hilden)

Alexa Fluor 488 konjugierte nicht bindende siRNA

Nicht bindende Kontroll siRNA

2.1.9 Interleukin 2

Interleukin 2 (IL-2) wurde von der Firma Roche aus Mannheim erworben.

2.1.10 Chemotherapeutika und niedermolekulare Inhibitoren

Doxorubicin	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
Enzastaurin	Lilly cooperation, Indianapolis, USA
Fludarabin	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
Gö 6976	Calbiochem/ Merck, Darmstadt
Gö 6983	Calbiochem/ Merck, Darmstadt
LY 333,531	Alixis Biochemicals, Axxora D, Lörrach
Mitomycin C	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
PD 98059	Calbiochem/ Merck, Darmstadt
Vincristin	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri

2.1.11 sonstige Materialien und Geräte

Gerät	Name	Firma
CO2 Inkubator	NUNC	Nalge NUNC International, Roskilde, Dänemark
Digitalwaage	Kern PLJ 2100-2M	Kern, Balingen-Frommern
Elektrophorese Netzgerät	Power Pac	BioRad, Hercules, Californien
Elektrophorese Kammer	Multi Gel Long	Biometra, Göttingen
FACS	EPICS® XL	Beckman-Coulter, Krefeld
FACS-röhrchen	5 ml Rundbodenröhrchen	Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich
Gelkammer	Whatman Gel Casting System, Horizon 11-14	Whatman, Kent, GB
Glasplatten		Biometra GmbH, Göttingen

Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Isoliergummis		Biometra GmbH, Göttingen
Kämme	Whatman Biometra Comb Horizon, 20 well 1mm und 2mm	Whatman, Kent, GB
Kühlzentrifuge	Mikro 22 R	Hettich, Tuttlingen
Magnetrührer	IKAMAG RCT	IKA, Staufen
Mikroskop	Zeiss Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Mikroplatten-Messgerät	EL _x 800, Universal Microplate Reader	Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, USA
Nukleofektor	Nukleofektor II Gerät	Amaxa Biosystems GmbH, Köln, Deutschland
Pipetboy	Pipetboy acu	Integra Bioscience, Fernwald
Pipetten	Reference	Eppendorf, Hamburg
PVDF Membranen		Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA, USA
Schüttler	Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
Sterilbank	HeraSafe Kendro HSP 18	Heraeus Instruments, Hanau
Thermal Cycler	MyCycler	BioRad, München
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 D	Eppendorff, Hamburg
Transferkammer für Immunoblots	Trans-Blot Cell	BioRad, München
Vortexer	Reax top	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zellkulturplatten – und flaschen		Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschalen	Nunclon Surface	Nalge NUNC International, Roskilde, Dänemark
Zentrifuge	Kendro Megafuge 1.0 R	Heraeus Insturments, Hanau

2.2 Methoden

2.2.1 Separationsverfahren

Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMNC) wurden aus heparinisierten Blutproben durch Zentrifugation über eine Biocoll-Hypaque Schicht in einer Dichte von 1,077g/ml gewonnen. Zur Separation von CLL Zellen wurden die PBMNC laut Anweisungen des Herstellers mit anti-CD2 und anti-CD14 magnetischen Beads inkubiert. Die so präparierten CLL Zellen waren nach Separation zu über 98% rein, überprüft mittels Durchflusszytometrie. Der Anteil an nicht malignen B-Zellen war zu vernachlässigen.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Hierzu wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit einer 0,5%-igen Trypanblaulösung im Verhältnis 1:1 verdünnt und ein Tropfen auf die Neubauer-Zählkammer gegeben. Anschließend wurden die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt.

2.2.3 Einfrieren und Auftauen

5×10^6 bis 1×10^7 Zellen wurden in 700 μ l frischem Medium unter Zusatz von 200 μ l FCS und 100 μ l DMSO als Schutz vor Kristallbildung in ein Kryoröhrchen gegeben, in einer vorgekühlten Einfrierbox bei -80° C gelagert und später in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37° C erwärmt, die Zellen rasch in Medium aufgenommen und das toxische DMSO in einem Zentrifugationsschritt entfernt. Durch Zentrifugation über eine Biocoll-Hypaque Schicht in einer Dichte von 1,077g/ml wurden die toten Zellen

abgetrennt. Anschließend konnten die Zellen unter unten genannten Bedingungen im Brutschrank inkubiert werden.

2.2.4 Kulturbedingungen

Aufgereinigte CLL Zellen wurden in RPMI 1640 Medium, versetzt mit 10% fetalem Kälberserum, Penicillin/Streptomycin 501 U/ml, Na-Pyruvat 1 mM, L-Glutamin 2 mM, L-Asparagin 20 µg/ml, 2-Mercaptoethanol 0,05 mM, HEPES 10 mM und MEM nichtessentiellen Aminosäuren 0,7x im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in einer Atmosphäre mit 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zur Annäherung an die Verhältnisse in vivo und Verminderung der Spontanapoptose wurden die CLL Zellen mit Helferzellen, sogenannten Feederzellen, kokultiviert. Hierzu wurde die murine Fibroblastenzelllinie LTK⁻ verwendet. Die aufgereinigten CLL Zellen wurden in 12-Wellplatten gemeinsam mit 2x 10⁵ Ltk⁻ Zellen pro Well unter den oben genannten Bedingungen kultiviert. Um eine weitere Proliferation der Feederzellen während der Kokultur zu verhindern, wurden die LTK⁻ Zellen mit Mitomycin C 10µg/ml für 2 Stunden vorbehandelt und dieses vor Beginn der Kokultur durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt.

2.2.5 Apoptoseanalyse

Das Phospholipid Phosphatidylserin ist bei gesunden Zellen fast ausschließlich an der Innenseite der Membran zu finden und wird im Rahmen von Apoptosevorgängen an die Außenseite der Zellmembran transloziert. Annexin-V bindet bei geeigneter Ca⁺⁺-Konzentration an Phosphatidylserin und markiert auf diese Weise apoptotische Zellen.

Jedoch binden auch nekrotische Zellen aufgrund des Verlustes der Membranintegrität Annexin-V, daher wird zur Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose mit Propidium-Jodid (PI) gegengefärbt. Es handelt

sich hierbei um eine DNA-Färbung, die nur nach Verlust der Membranintegrität bei nekrotischen Zellen möglich ist.

Für die Analyse wurden aufgereinigte CLL Zellen in einer Konzentration von 1 Million Zellen/ml in 24-well-Platten in einem Gesamtvolumen von 1 ml in Medium alleine, beziehungsweise zusammen mit den zu untersuchenden Wirkstoffen für die gewünschte Zeit im Brutschrank kultiviert. Im Anschluss daran wurden die Zellen abgenommen und 5 Minuten bei 1.400 U/min zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen, in FACS-Röhrchen überführt und in 500 µl Annexinpuffer pro Ansatz zusammen mit 5 µl Annexin-FITC und 10 µl PI Workingsolution in einer Konzentration von 50 µg/ml aufgenommen. Nach 15 Minuten Inkubation bei 4°C unter lichtgeschützten Bedingungen wurden die Proben zur Bestimmung des Transportes von Phosphatidylserin zur äußeren Membran im Durchflusszytometer analysiert, wobei jeweils 10.000 Ereignisse gemessen wurden.

2.2.6 Immunphänotypisierung

Aufgereinigte CLL Zellen in einer Menge von 1 Million Zellen/ml wurden in 24-well-Platten in einem Gesamtvolumen von 1 ml in Medium alleine, beziehungsweise zusammen mit den zu untersuchenden Wirkstoffen für die gewünschte Zeit im Brutschrank kultiviert. Im Anschluss daran wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und 5 Minuten bei 1.400 U/min zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen, und mit FACS-Puffer resuspendiert. Je 200 µl der Zellsuspension wurden mit 5 µl eines fluorochrommarkierten Antikörpers oder 5 µl eines nichtbindenden Isotyp-identischen Kontrollantikörpers für 15 min bei 4°C inkubiert. Die verwendeten Fluorochrome waren entweder FITC oder PE. Anschließend wurden die Zellen mehrmals mit 500 µl FACS-Puffer gewaschen und bei 1600 U für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen erneut in 500 µl

FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Es wurden jeweils 10 000 Ereignisse gezählt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der WinMDI 2.8 FACS-Software. Die relative Expression des Oberflächenantigens wurde als mittlere Fluoreszenzintensitätsrate angegeben, dem Quotienten der mittleren Fluoreszenzintensität der Zellen gefärbt mit dem Fluorochrom-konjugierten Antigen-spezifischen Antikörper und der mittleren Fluoreszenzintensität der Zellen gefärbt mit dem Fluorochrom-konjugierten Isotyp-Kontrollantikörper.

2.2.7 Immunoblots

Zur Untersuchung zellulärer Proteine mittels Immunoblot wurden CLL Zellen in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml bei einer Gesamtzellzahl von 5 bis 10×10^7 Zellen pro Ansatz in 6-well-Platten in Medium alleine, beziehungsweise zusammen mit den zu untersuchenden Wirkstoffen kultiviert. Nach der gewünschten Zeit wurden die Ansätze aus der Kultur entnommen, 5 Minuten bei 1.400 U/min zentrifugiert, einmal in PBS gewaschen, und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C in Eppendorfgläsern tiefgekühlt gelagert. Zur Weiterverarbeitung wurden die einzelnen Ansätze in 50 μl eiskaltem Lysepuffer aufgenommen, in ein 1,5 ml Tube übernommen, mit einer Eppendorf 20 - 200 μl - Pipette bis zum Aufschäumen der Proben resuspendiert, 20 Minuten auf Eis gelegt, bei 12.000 U/min 20 Minuten zentrifugiert und die Überstände (50 μl) zusammen mit 50 μl Protein-Ladepuffer in 1,5 ml Tubes überführt. 10 μl pro Ansatz wurden zur Proteinmengenbestimmung separat in ein 1,2 ml Tube pipettiert. Die 50 μl Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C tiefgefroren. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte anhand der Bio-Rad Assay Methode an einem Photometer der Firma Bio Tek. Zur Erstellung von Immunoblots wurden die

Proben zuerst 10 Minuten bei 95°C aufgekocht und anschließend für 10 Minuten bei 14.000 U/min zentrifugiert. Um einen gleichmäßigen Proteinanteil in allen Proben zu erreichen, wurden diese je nach einzelnen ermitteltem Proteinanteil im Bio Rad Assay, mit einer entsprechenden Menge an Ladepuffer auf insgesamt 40 µl pro Probe verdünnt und in einer Menge von 40 µg Protein pro Bahn auf ein 12%-iges SDS-Agarosegel, bestehend aus Sammelgel und Trenngel, aufgetragen. Als Marker diente Full range Rainbow™ Molecular weight marker. In einer Elektrophoresekammer, gefüllt mit 1% Laufpuffer liefen die Proben bei einer Voltzahl von 28V über Nacht ins Gel und wurden am nächsten Tag in einer Transferkammer 40 Minuten bei 800 mA auf PVDF-Membranen transferiert. Nach dem Transfer wurden die Membranen in je 20 ml einer Lösung aus 20 ml PBS-Tween 1% + 2 g/20 ml Trockenmilchpulver (beziehungsweise + 1 g BSA/20 ml) 60 Minuten bei 37°C geblockt und anschließend 3x10 Minuten mit PBS + 1% Tween gewaschen. Danach wurden die Membranen 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einem für das zu untersuchende Protein spezifischen primären Maus- oder Hase-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000, aufgelöst in 20 ml PBS-Tween 1% + 1 g/20 ml Trockenmilchpulver (beziehungsweise 500 mg BSA/20ml) pro Membran, inkubiert. Nach erneutem 3 mal 10-minütigem Waschen mit PBS + 1% Tween wurden die Membranen mit einem Sekundärantikörper spezifisch für Mouse oder Rabbit, in einer Verdünnung von 1:10000, aufgelöst in 20 ml PBS-Tween 1% + 1 g/20 ml Trockenmilchpulver (beziehungsweise 500 mg/20 ml BSA), für 45 Minuten inkubiert. Nach erneutem 3 mal 10-minütigem Waschen, zuletzt nur mit PBS ohne Tween, wurden die Membranen kurz in 2 ml Super Signal® Chemolumineszenz Substrat der Stärke Femto, Dura oder Pico getaucht und anschließend in der Dunkelkammer in einem Hyperprocessor auf Chemolumineszenzfilme entwickelt.

2.2.8 Zellstimulierung

Aufgereinigte CLL Zellen in einer Menge von 1 Million Zellen/ml wurden in 24-well-Platten in einem Gesamtvolumen von 1 ml in Medium zusammen mit DSP30 (1 μ M) und IL-2 (100 U/ml) kultiviert und für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und mit Bryostatin beziehungsweise Bryostatin und BL22 weiterkultiviert. Die Analyse der Apoptoserate und CD22-Expression erfolgte 24 und 48 Stunden später wie unter 2.2.5 und 2.2.6 beschrieben.

2.2.9 MCL-1 Knock Down

Für die Downregulation von MCL-1 mittels siRNA wurden jeweils 3×10^7 Zellen mit 100 μ l Cell Line Nucleofektor Lösung V und 3 μ g siRNA gemischt. Es wurde siRNA gegen die MCL-1 kodierende Region verwendet, sowie nicht bindende siRNA als Kontrolle. Alexa Fluor 488 konjugierte nicht bindende siRNA diente zur Evaluation des Transfektionserfolges. Für die Nucleofektion wurde das U-013 Programm des Amaxa Nucleofektor II Geräts verwendet (Amaxa Biosystems GmbH, Köln). Direkt nach der Transfektion wurden die Zellen in RPMI Medium mit 10% FCS überführt.

2.2.10 Statistische Analysen

Die Daten wurden mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Test sowie des Kolmogorov-Smirnoff-Test auf Normalverteilung überprüft. Diese konnte für alle Daten bestätigt werden und somit wurden statistische Signifikanzen durch Verwendung gepaarter und nicht gepaarter T - Tests ermittelt.

P - Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Bryostatin sensibilisiert CLL-Zellen für das Immuntoxin BL22

3.1.1 Apoptoseinduktion durch BL22 in Kombination mit Bryostatin

Von Bryostatin ist bekannt, dass es in CLL-Zellen einen Haarzell-ähnlichen Phänotyp induziert, einhergehend mit einer Hochregulation des Oberflächenmarkers CD22, dem Zielmolekül für das Immuntoxin BL22 [3]. Wir vermuteten, dass Bryostatin durch Erhöhung der CD22-Expression die Zahl der Bindungsstellen für das Immuntoxin auf den CLL-Zellen vermehren und somit die Apoptoseinduktion durch BL22 verstärken kann. CLL-Zellen von zwölf Patienten wurden in der Zellkultur für 48 Stunden mit Bryostatin (1 und 50 ng/ml), BL22 (1µg/ml) oder einer Kombination der beiden Substanzen inkubiert. Zur Annäherung an die Verhältnisse in vivo wurden die CLL-Zellen mit der Stromazelllinie LTK⁻ kokultiviert, wodurch die spontane Apoptoserate deutlich gesenkt wurde (Abbildung 5, vergleiche Balken 1 und 2).

Die CLL-Zellen wurden anschließend abgenommen, mit Annexin und PI gefärbt und die Apoptoserate am Durchflusszytometer bestimmt. Während Bryostatin allein keinen Einfluss auf die Apoptoserate hatte, wurde die Apoptoseinduktion durch BL22 nach Zugabe von Bryostatin signifikant verstärkt (siehe Abbildung 5). Im Durchschnitt betrug die Apoptoseinduktion durch BL22 allein 9%, in Kombination mit Bryostatin in niedriger Dosis (1ng/ml) 28% und in Kombination mit Bryostatin in hoher Dosis (50ng/ml) 46% der Zellen im Vergleich zur spontanen Apoptoserate in der Kokultur. Es hatte sich also bestätigt, dass Bryostatin die Wirkung von BL22 zu verstärken

vermag. Dabei zeigte sich eine höhere Konzentration von Bryostatatin mit 50ng/ml wirkungsvoller als eine niedrige Konzentration mit 1ng/ml.

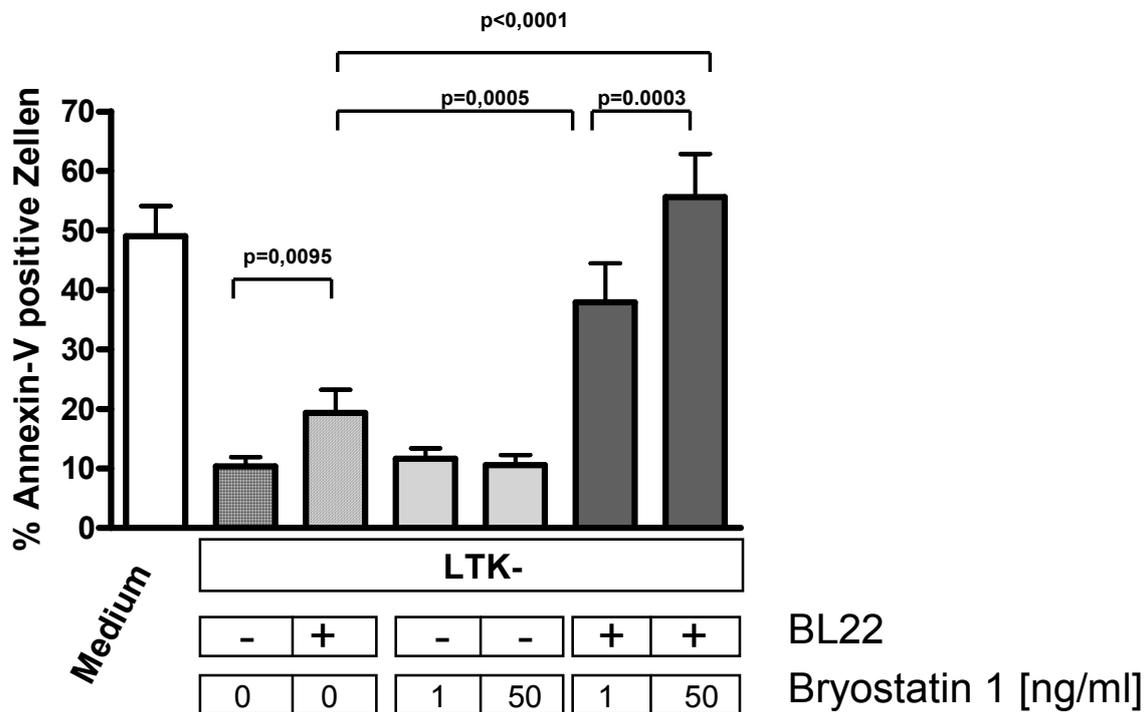


Abbildung 5: Apoptoseinduktion durch BL22 mit und ohne Broystatin in der CLL in Kokultur mit Ltk⁻

3.1.2 Zytotoxischer Effekt der Kombination von BL22 und

Bryostatatin ist unabhängig von Patientencharakteristika

Die Wirksamkeit der Kombination aus BL22 und Bryostatatin bei CLL-Zellen, gemessen an der Apoptoseinduktion, war bei den einzelnen Patienten sehr unterschiedlich ausgeprägt. Wir stellten uns die Frage, ob es bestimmte Patientencharakteristika gibt, die mit einem besseren oder schlechteren Ansprechen einhergehen und ob auch Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien von der Therapie profitieren. Wir untersuchten daher an den 12 Patienten aus Abbildung 5, ob die Apoptoseinduktion durch BL22 bzw. die Kombination aus Bryostatatin und BL22 mit den Merkmalen Alter, Geschlecht, Binet Stadium, CD38-, ZAP70- und IgH-Mutationsstatus sowie den bislang erfolgten Vortherapien in Zusammenhang steht (siehe Tabelle 1).

ID	Alter & Geschlecht	Binet Stadium	CD38	ZAP70	IgH Mutation	Vortherapien	% Apoptose-induktion BL22	% Apoptose-induktion BL22+ Bryo1	% Apoptose-induktion BL22+ Bryo50
V125	73m	B	positiv	negativ	n.b.	0	- 3,8	12.1	33
V132	83m	A	negativ	negativ	n.b.	Chlorambucil	4,1	17.9	59
V180	44m	A	negativ	negativ	mutiert	0	13,2	17.9	34.4
V190	70w	A	negativ	negativ	n.b.	0	7,5	17.4	48.8
V194	67m	A	negativ	positiv	n.b.	0	0,9	64.2	78.5
V204	55m	C	negativ	positiv	nicht mutiert	R-FC, R-CHOP, R-Bendamustin	2,7	0.4	0
V225	45w	B	partiell	positiv	nicht mutiert	Fludarabin, Dexamethason, TBI, ASCT	4,4	42.8	69.5
V226	84w	C	partiell	positiv	n.b.	Chlorambucil	33,0	34.6	45.7
V231	68w	C	negativ	positiv	n.b.	0	2,1	10.6	29.7
P8	80m	B	negativ	negativ	n.b.	0	17,8	21.8	24.1
P16	77m	C	n.b.	positiv	nicht mutiert	Chlorambucil	15,7	57.2	71.9
W3	78w	A	negativ	n.b.	n.b.	0	10.0	34.2	48.5

n.b.= nicht bestimmt

* ZAP70-Positivität wenn Durchflusszytometrie >20% ZAP-70 positive Zellen zeigt

Tabelle 1:
Patientencharakteristika zu Abbildung 5

Dabei konnte kein Zusammenhang der untersuchten Parameter mit dem Therapieerfolg durch BL22 +/- Bryostatine festgestellt werden. Es zeigte sich, dass auch Zellen von Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien (Binet C) und mit ungünstigen Prognosemarkern wie positivem ZAP 70- oder CD 38-Status (z.B. V 225) gut auf die Kombination der beiden Substanzen ansprechen.

3.1.3 Apoptoseinduktion durch BL22 in Kombination mit PMA

Der Phorbol-ester PMA (auch TPA genannt) zeigt eine funktionelle Ähnlichkeit zu Bryostatine. Er wirkt als reiner PKC-Aktivatoren und kann ebenso wie Bryostatine in CLL-Zellen einen Haarzell-Leukämie-ähnlichen Phänotyp mit Hochregulation der CD22-Expression induzieren [4]. PMA ist jedoch im Gegensatz zu Bryostatine als Tumorpromotor bekannt und führt auch in normalen B-Zellen zu Haarzelleukämie-ähnlichen Veränderungen [108], so

dass sich ein klinischer Einsatz verbietet. Da PMA durch Hochregulation der CD22-Expression ebenfalls die Bindungsstellen für das Immuntoxin vermehrt, vermuteten wir, dass es analog zu unseren Ergebnissen mit Bryostatin die Toxizität von BL22 verstärkt. Wir behandelten CLL-Zellen von 4 Patienten für 24 Stunden mit PMA (0,1nM und 1nM) oder BL22 (1µg/ml), beziehungsweise einer Kombination der beiden Substanzen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt. PMA allein wirkte stark antiapoptotisch, verstärkte jedoch in hoher Konzentrationen (1nM) die Wirkung des Immuntoxins BL22. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant.

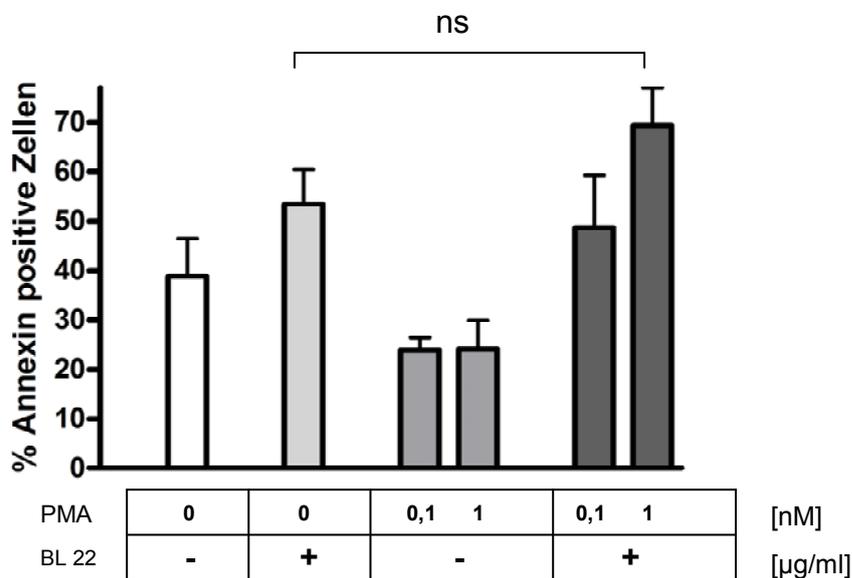


Abbildung 6: Apoptoseinduktion durch BL22 in Kombination mit PMA

Beide Substanzen, Bryostatin und PMA können also insbesondere in hoher Konzentration die Wirkung von BL22 potenzieren. Da die Gemeinsamkeit dieser beiden Substanzen in der Aktivierung der Proteinkinase C besteht, lässt sich daraus bereits vermuten, dass eine PKC-Aktivierung eine wichtige Rolle bei der Sensibilisierung für das Immuntoxin spielt.

3.2 Bryostatin erhöht die CD22-Expression der CLL-Zellen

3.2.1 Bryostatin verstärkt dosisabhängig die CD22-Expression der CLL-Zellen

Unsere folgenden Versuche konzentrierten sich auf die Entschlüsselung des Mechanismus, über den Bryostatin dosisabhängig die zytotoxische Wirkung von BL22 verstärkt. Unsere primäre Vermutung war, dass Bryostatin durch Hochregulation der CD22-Expression die Bindungsstellen für das Immuntoxin vermehrt und somit dessen Anbindung an die CLL-Zellen erleichtert. Zur Bestimmung der CD22-Expression nach Bryostatinbehandlung inkubierten wir CLL-Zellen für 24 Stunden mit Bryostatin in verschiedenen Konzentrationen. Anschließend zentrifugierten wir die Zellen ab, färbten sie mit einem Fluoreszenz-markierten CD22-Antikörper und einer Isotypkontrolle und bestimmten die CD22-Expression am Durchflusszytometer. In Abbildung 7 sind repräsentativ die Ergebnisse der Durchflusszytometrie eines Patienten, sowie die gemittelten Werte von zehn Patienten dargestellt. Es bestätigte sich, dass Bryostatin die CD22-Expression verstärkt. Der Effekt war ebenfalls dosisabhängig. Bereits minimale Konzentrationen von 1ng/ml Bryostatin reichten jedoch aus um die CD22-Expression zu verstärken, bei höheren Konzentrationen war der Effekt bei den meisten Patienten geringer ausgeprägt.

Während also die CD22 Hochregulation durch Bryostatin bereits bei minimalen Konzentrationen voll ausgeprägt ist und bei höheren Konzentrationen zurückgeht, verhält es sich mit dem Effekt auf die Immuntoxinwirkung genau umgekehrt: Hohe Konzentrationen verstärken die BL22-Toxizität effektiver als niedrige Konzentrationen. Daraus schlossen wir, dass die CD22-Hochregulation nicht der einzige Mechanismus sein kann, über den Bryostatin die Immuntoxinwirkung beeinflusst.

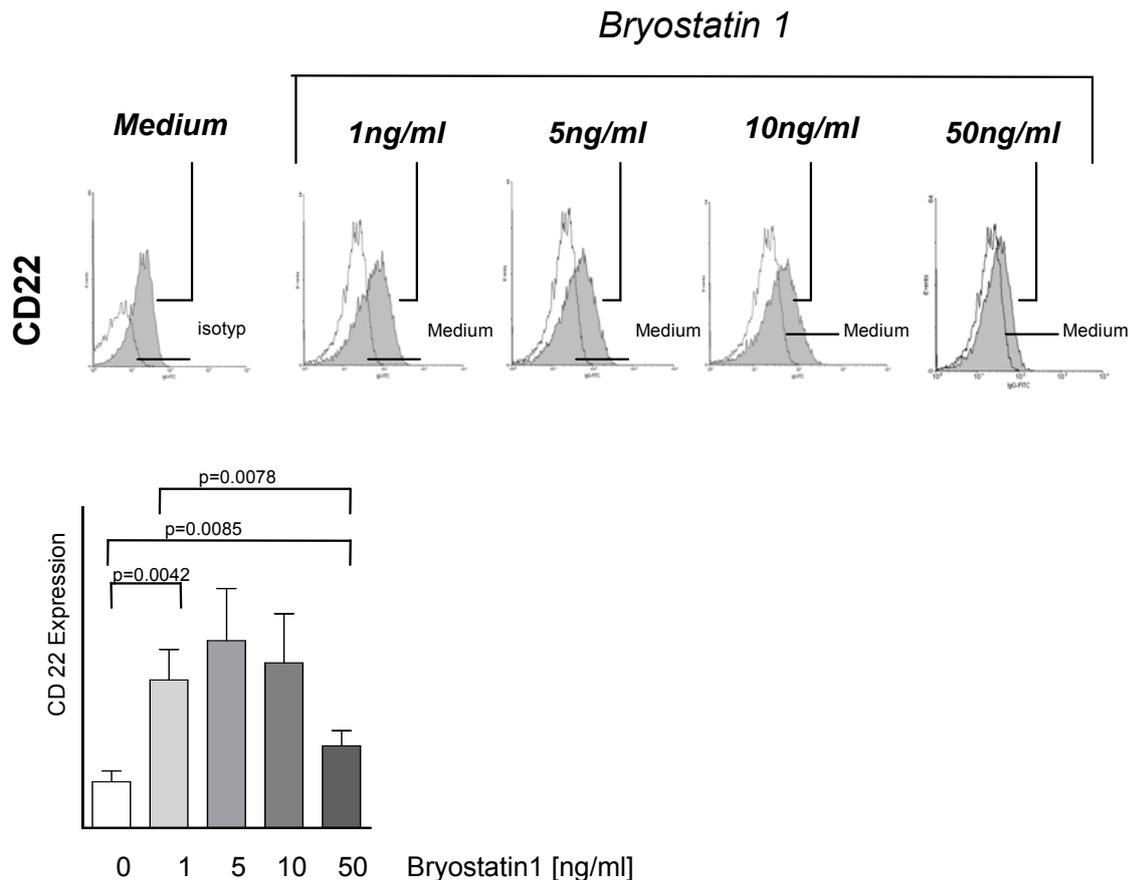


Abbildung 7: CD 22 Expression in Abhängigkeit von Bryostatin 1

3.2.2 Bryostatin verstärkt die CD 22 Expression bei „Niedrig- und Hoch-Expriemierern“

Wie bereits aus Vorarbeiten unserer Gruppe bekannt war, variiert die CD22-Expression stark zwischen den verschiedenen Patientenzellen [28]. Wir untersuchten, inwiefern die Veränderung der CD22-Expression durch Bryostatin von der Grundexpression abhängt. Dazu bestimmten wir die CD22-Expression von 18 Patienten mit und ohne Bryostatin 1ng/ml nach 24 Stunden in der Zellkultur wie oben dargestellt. Anschließend unterteilten wir die Patienten in „Niedrig-Expriemierer“, bei denen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der unbehandelten Zellen weniger als 10% über der MFI der Isotypkontrolle lag (n=8), und „Hoch-Expriemierer“ bei denen die MFI mehr als 10% über der MFI der Isotypkontrolle lag (n=10). Die Inkubation der Zellen

mit Bryostatin erhöhte die CD22-Expression sowohl von „Niedrig- als auch von Hoch-Expriemierern“, deutlicher ausgeprägt war der Effekt jedoch bei Zellen mit einer höheren Ausgangsexpression von CD22 (siehe Abbildung 8).

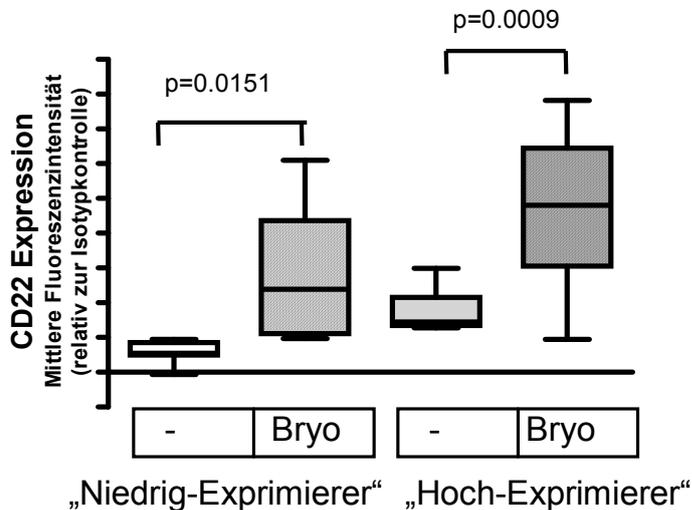


Abbildung 8: Hochregulation von CD 22 in Abhängigkeit von der Grundexpression

3.2.3 Proteinkinase C Signalweg ist an der Hochregulation von CD 22 beteiligt

Aus Untersuchungen von Thomas et al. [104] war bekannt, dass die Bryostatin-induzierte Differenzierung von unreifen CLL-Zellen zu einem Haarzell-ähnlichen Phänotyp sowohl über den Proteinkinase-C-, als auch über den ERK-Signalweg vermittelt wird. Wir untersuchten im Folgenden, ob diese Signalwege auch an der CD22-Hochregulation beteiligt sind. Hierzu behandelten wir die Zellen für eine Stunde mit dem MEK1-Inhibitor PD 98059 (50 μ M), der die Phosphorylierung von ERK inhibiert, und GÖ 6976 (1 μ M), einem Inhibitor der klassischen, Calcium-abhängigen PKC's α und β . Danach wurden die Zellen für 24 Stunden mit Bryostatin 1ng/ml inkubiert und anschließend die CD22-Expression bestimmt. Das Ergebnis eines Patienten ist repräsentativ in Abbildung 9 dargestellt. Wir wiederholten den Versuch mit dem PKC-Inhibitor Enzastaurin und PD 98059 an vier weiteren Patienten, wobei sich das Ergebnis an drei der vier reproduzieren ließ: Durch

Vorbehandlung mit dem PKC-Inhibitor ließ sich die CD22-Hochregulation blockieren, die CD22-Expression entsprach den Werten der Medium-Kontrollen. Der MEK1-Inhibitor beeinflusste die CD22-Hochregulation nicht. Dies lässt vermuten, dass die Hochregulation der CD22-Expression durch Bryostatin 1 über den Proteinkinase-C-Signalweg vermittelt wird, unabhängig vom MEK/MAPK(ERK)-Signalweg.

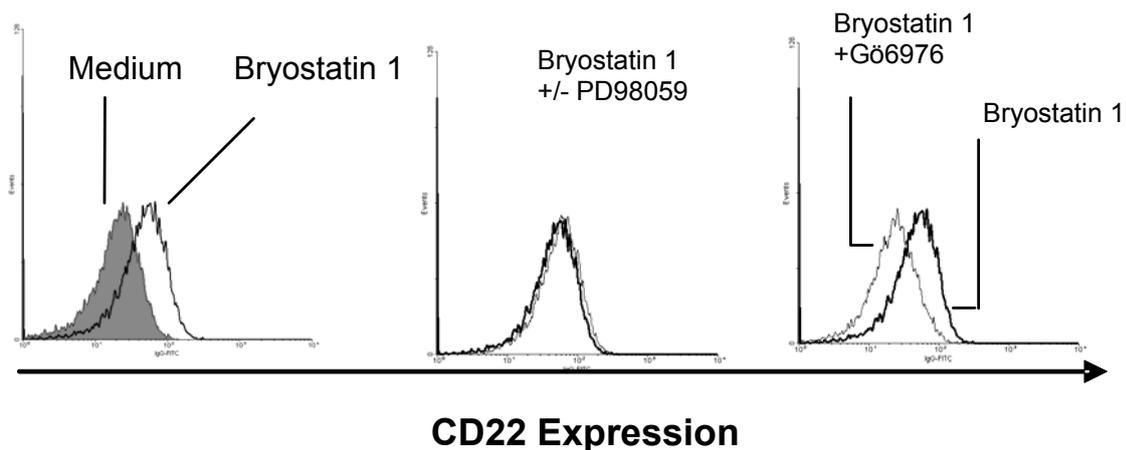


Abbildung 9: Blockade der CD 22 Hochregulation durch Inhibition der klassischen PKC's

3.2.4 Rolle löslicher Faktoren bei der Hochregulation von CD22 durch Bryostatin

Battle et al. [9] konnten in Versuchen an konditioniertem Medium zeigen, dass die differenzierende Wirkung von Bryostatin unter anderem durch lösliche Faktoren vermittelt wird. Sie konnten nachweisen, dass Bryostatin zur Ausschüttung von Interferon γ führt, welches in einer autokrinen Aktivierungsschleife an der Hochregulation von CD22 beteiligt ist. Wir stellten uns deshalb die Frage, ob die sensibilisierende Wirkung für das Immuntoxin ebenfalls über lösliche Faktoren vermittelt wird. Hierfür inkubierten wir CLL-Zellen von drei Patienten für 24 Stunden mit Bryostatin in den Konzentrationen 0,1 und 50 ng/ml. Anschließend nahmen wir die Zellen durch Zentrifugation ab und gaben frische CLL-Zellen des gleichen Patienten zu dem derart konditionierten Medium, jeweils mit und ohne

Zugabe von BL22. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen wiederum abzentrifugiert, mit Annexin und PI gefärbt und die Apoptoserate im Durchflusszytometer bestimmt. Es zeigte sich ebenfalls eine dosisabhängige Verstärkung der Immuntoxinwirkung durch die Vorbehandlung mit Bryostatatin. Die Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant (siehe Abbildung 10).

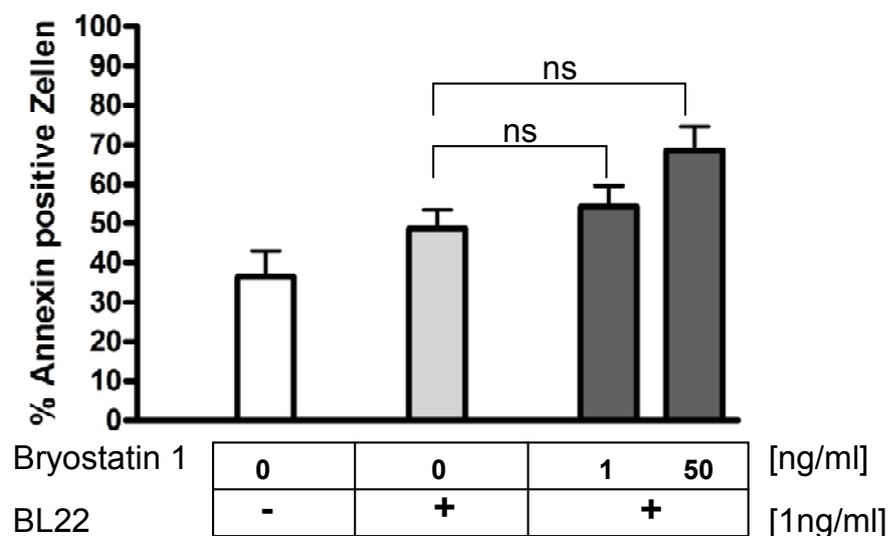


Abbildung 10: Apoptoseinduktion durch BL22 in konditioniertem Medium

Wir erhöhten die Fallzahl nicht weiter, da uns keine Methode zur Verfügung stand, Bryostatatin aus dem konditionierten Medium zu entfernen. Bryostatatin zeichnet sich durch eine sehr lange Halbwertszeit* aus und ist höchstwahrscheinlich noch nach 24 Stunden in ausreichender Wirkkonzentration in dem konditionierten Medium vorhanden. Es kann also bei diesem Versuchsaufbau nicht differenziert werden, ob die Verstärkung der Immuntoxinwirkung durch die Bryostatatinvorbehandlung durch die Restkonzentration an Bryostatatin im konditionierten Medium oder durch soluble Faktoren, die von den behandelten Zellen ausgeschüttet werden, verursacht wird.

*Über die genaue Halbwertszeit von Bryostatatin in Zellkulturen gibt es keine Angaben, jedoch konnte nachgewiesen werden, dass Bryostatatin in physiologischer Kochsalzlösung bei 27° Celsius 28 Tage ohne messbare Verluste stabil bleibt [19]

3.2.5 Die Expression von CD 20 und CD 52 wird durch Bryostatin nicht beeinflusst

Weitere Oberflächenproteine leukämischer Zellen, die sich als alternative Zielmoleküle für eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern eignen, sind CD20 (z.B. Rituximab) und CD52 (z.B. Alemtuzumab). Wir untersuchten, ob Bryostatin auch deren Expression reguliert, da bei einer Hochregulation ebenfalls eine synergistische Wirkung denkbar wäre, bei einer Verminderung der Expression jedoch auch ein Wirkverlust durch eine Bryostatinvorbehandlung nicht auszuschließen wäre. Die Zellen wurden analog dem Versuchsaufbau in 3.2.1 behandelt und anschließend die Expression von CD20 und CD52 durchflusszytometrisch bestimmt, jeweils ohne und mit Bryostatin in verschiedener Konzentration. Für beide Zellmarker konnte keine Veränderung der Expression nachgewiesen werden (siehe Abbildung 11).

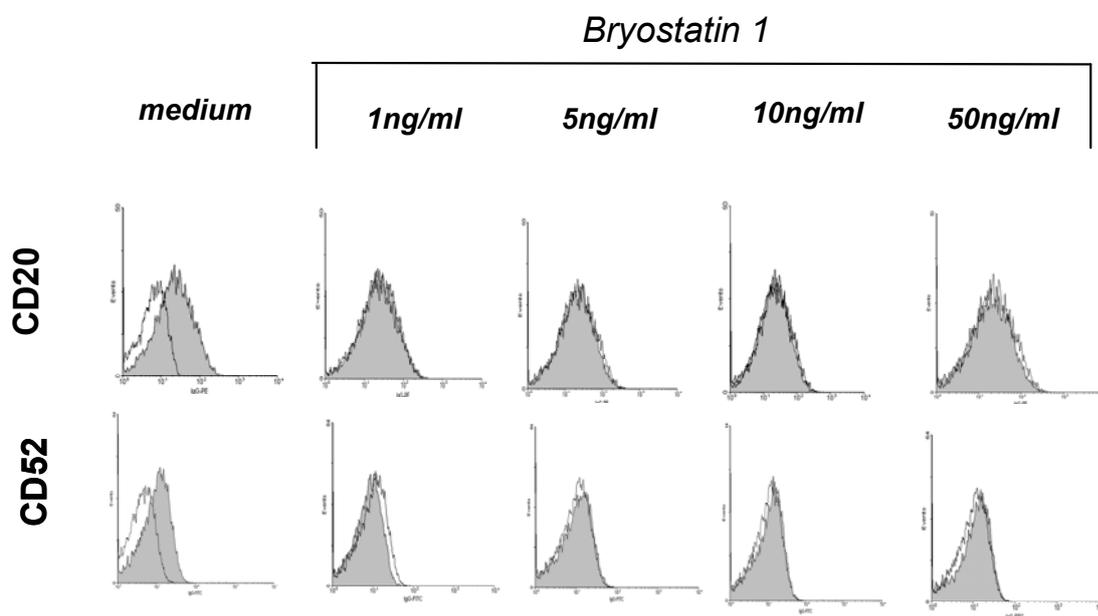


Abbildung 11: Expression von CD 20 und CD 52 nach Behandlung mit Bryostatin

3.3 Bryostatin verändert das Proteinkinase C-Expressionsmuster der CLL-Zellen

3.3.1 Bryostatin 1 bewirkt in hoher Konzentration eine Depletion von PKC- β II

Unsere bisherigen Experimente hatten gezeigt, dass Bryostatin die Toxizität von BL22 verstärkt und die CD22-Expression der CLL-Zellen erhöht; letzteres trägt mutmaßlich zur verbesserten Wirkung des Immuntoxins bei. Es besteht jedoch nur ein schwacher Zusammenhang zwischen der Ausprägung der CD22-Hochregulation und der Sensibilisierung für das Immuntoxin. Somit müssen weitere Bryostatineffekte die Immuntoxinwirkung zusätzlich beeinflussen. Bryostatin wird in der Literatur aufgrund seiner modulierenden Wirkung auf die Proteinkinase-C als antineoplastische Substanz diskutiert [24], so dass wir darin einen weiteren Faktor der verbesserten Immuntoxinwirkung vermuteten. Daher untersuchten wir mittels Western Blot, inwiefern sich die PKC-Expression durch die Behandlung mit Bryostatin verändert. CLL-Zellen wurden für 24 Stunden mit Bryostatin in den Konzentrationen 0, 1 und 50 ng/ml inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgenommen, lysiert und aus den Lysaten Western-Blot-Analysen durchgeführt. Wir bestimmten an drei Patienten die Expression verschiedener PKC-Isoformen nach 24 Stunden Inkubation mit den angegebenen Bryostatin-Konzentrationen, sowie der frisch aufgetauten Zellen (T_0). Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt. Bei den Isoformen β und δ konnten teilweise zwei verschieden große Formen detektiert werden. Die größeren (etwa 80 kDa), in der Abbildung oben abgebildeten Formen, stellen möglicherweise phosphorylierte PKCs dar (siehe 1.3).

Bei allen drei Patienten ließ sich eine vollständige Depletion von PKC- β II erkennen. Bereits bei der niedrigen Konzentration mit 1ng/ml zeigte sich bei

einigen Patienten ein Rückgang der Proteinmenge, bei der hohen Konzentration war PKC- β II im Western Blot nicht mehr zu detektieren (Abbildung 12, siehe Reihe 1).

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass PKC-Aktivatoren negative Rückkopplungsschleifen auslösen können, die innerhalb weniger Stunden zum Abbau der PKCs führen. Nach 24 Stunden, unserem kürzesten Untersuchungszeitpunkt, sind diese Prozesse bereits lange abgeschlossen [45, 86]. Obwohl Bryostatine in niedriger Konzentration (1ng/ml) die CD22-Expression suffizient erhöhen kann (siehe Abbildung 7), ist es offensichtlich hier nicht in der Lage diesen Feedbackmechanismus vollständig zu aktivieren.

Auch bei den anderen untersuchten PKC-Isoformen fanden sich Veränderungen, diese waren jedoch nicht dosisabhängig und tragen somit vermutlich nicht zur unterschiedlichen Effektivität der verschiedenen Bryostatin-Konzentrationen bei:

Bei zwei der drei Patienten (V 172, V 131) konnte ein Rückgang der Proteinmenge der PKC- ϵ beobachtet werden. Die kleinere, vermutlich native Form (unten, etwa 70 kDa groß), verschwand völlig, während die größere Form (80 kDa) leicht rückläufig war (Abbildung 12, siehe Reihe 2).

Auch PKC- δ wurde bei allen drei Patienten durch Bryostatin vollständig depletiert, sowohl in niedriger als auch in hoher Konzentration (siehe Abbildung 12, Reihe 3).

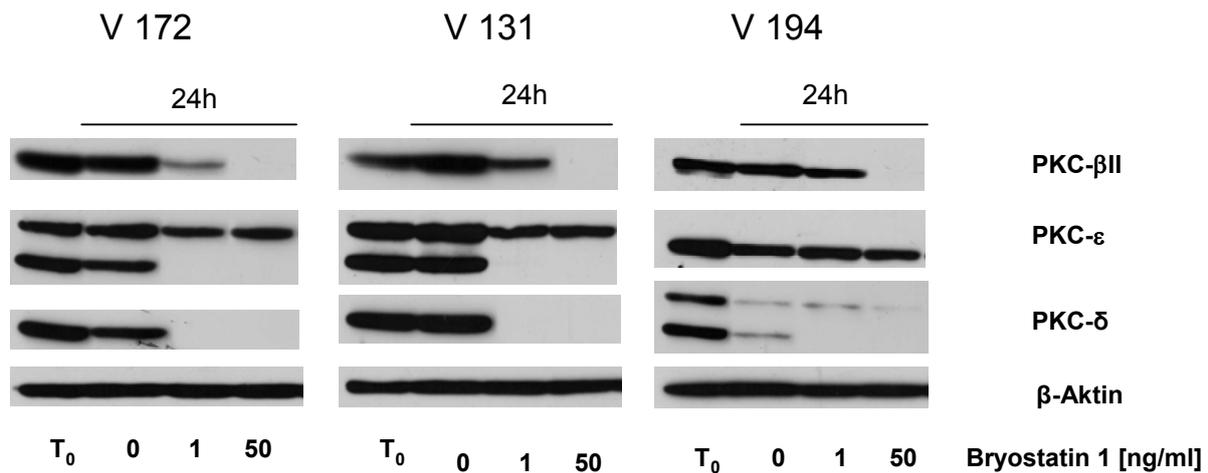


Abbildung 12: Veränderung des PKC-Expressionsmusters durch Bryostatin (Western Blot)

3.3.2 PKC-β Inhibitor Enzastaurin verstärkt Zytotoxizität von BL22

Zahlreiche Arbeiten haben in der Vergangenheit einem veränderten PKC-Expressionsprofil und insbesondere einer Überexpression von PKC-βII eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der CLL zugewiesen [2, 40]. Wir vermuteten, dass die Depletion von PKC-βII für die ausgeprägte Immuntoxinsensibilisierende Wirkung von Bryostatin in hoher Konzentration verantwortlich ist. Um diese Hypothese zu überprüfen und auszuschließen, dass es sich bei der PKC-βII-Depletion lediglich um ein Epiphänomen handelt, untersuchten wir den Einfluss der PKC-βII-Aktivität auf die BL22-Wirkung. Hierzu blockierten wir PKC-βII mit dem PKC-β-Inhibitor Enzastaurin [34]. Aus Vorexperimenten unserer Arbeitsgruppe war bereits bekannt, dass Enzastaurin *in vitro* zytotoxisch auf CLL-Zellen wirkt [115], was wir bestätigen konnten. Abbildung 13 zeigt die Apoptoseinduktion an 11 Patienten im Vergleich zur Mediumkontrolle von Enzastaurin (5μM), BL22 (1ng/ml) und der Kombination der beiden Substanzen nach jeweils 48 Stunden. Daraus wird ersichtlich, dass Enzastaurin die Apoptoserate um 13,8% steigern kann, BL22 um 18,7%. Die Kombination der beiden wirkt mit

41% Apoptoseinduktion deutlich stärker zytotoxisch als die jeweiligen Einzelsubstanzen. Eine Blockade der PKC- β II-Aktivität durch den Inhibitor Enzastaurin verstärkt also die toxische Wirkung von BL22. Wir vermuten, dass analog die Depletion von PKC- β II durch Bryostatine in hoher Konzentration die CLL-Zellen für das Immuntoxin BL22 sensibilisiert.

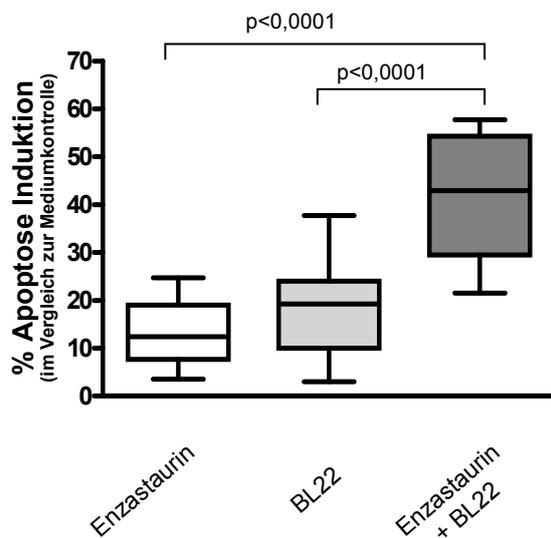


Abbildung 13: Verstärkung der Immuntoxinwirkung durch Enzastaurin

Aus unseren bisherigen Untersuchungen vermuteten wir, dass Bryostatine die BL22-Wirkung durch zwei verschiedene Mechanismen potenziert: Zum einen durch eine Erhöhung der CD22-Expression und somit der Immuntoxinbindungsstellen und zum anderen durch eine Depletion der Proteinkinase C- β II. Während Erstgenanntes insbesondere bei niedrigen Konzentrationen von Bryostatine zum Tragen kommt, erfordert die Depletion der PKC- β II durch Auslösung einer negativen Rückkopplungsschleife höhere Konzentrationen von Bryostatine. Insgesamt vermag somit Bryostatine in hoher Konzentration durch das Zusammenwirken beider Mechanismen CLL-Zellen effektiver für das Immuntoxin BL22 sensibilisieren.

3.4 Antiapoptotische Wirkung von Bryostatin in vitro

3.4.1 Antiapoptotische Wirkung von Bryostatin 1 in vitro

interferiert mit der Sensibilisierung für das Immuntoxin

Bei Kultivierung von CLL-Zellen in Reinkultur zeigt Bryostatin bei vielen Patienten eine antiapoptotische Wirkung. Dies war bereits aus den Arbeiten verschiedener anderer Gruppen bekannt [49, 104]. In Abbildung 14 wurde der Anteil der Patienten, bei denen Bryostatin (1ng/ml) in vitro antiapoptotisch wirkt, anhand der Daten von zwölf Patienten graphisch dargestellt. Ein antiapoptotischer Effekt findet sich bei etwa zwei Drittel der Patientenzellen.

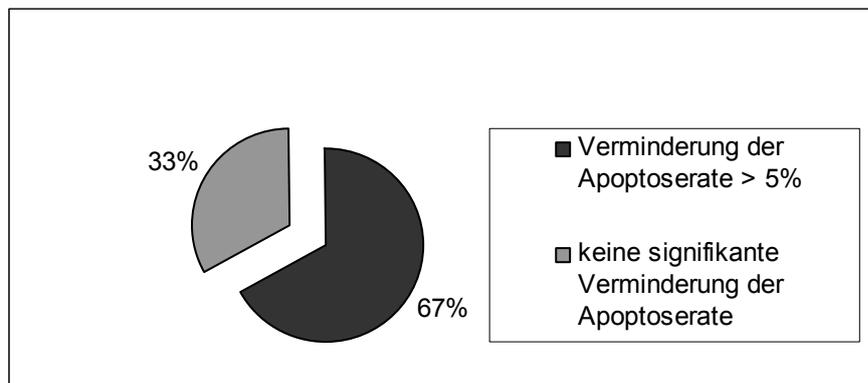


Abbildung 14: Antiapoptotischer Effekt von Bryostatin 1

Dabei handelt es sich offensichtlich um einen In-Vitro-Effekt, der in Kokultur mit Stromazellen sowie an Lymphomzelllinien nicht nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 5 und Abbildung 27).

Neben unseren Versuchen in Kokultur mit Stromazellen führten wir auch Versuche in CLL-Reinkultur durch. Hierfür wurden CLL-Zellen von 17 Patienten für 24 Stunden mit Bryostatin 0, 1 und 50 ng/ml jeweils mit und ohne Zugabe von BL22 inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen abgenommen und die Annexinexpression gemessen. In der Reinkultur schwächte der antiapoptotische Effekt die sensibilisierende Wirkung für das Immuntoxin ab (siehe Abbildung 15). Der Unterschied zwischen Apoptose-

induzierender Wirkung von BL22 alleine im Gegensatz zur Kombination mit Bryostatin war geringer ausgeprägt, die Kombination war dennoch der BL22-Monotherapie signifikant überlegen.

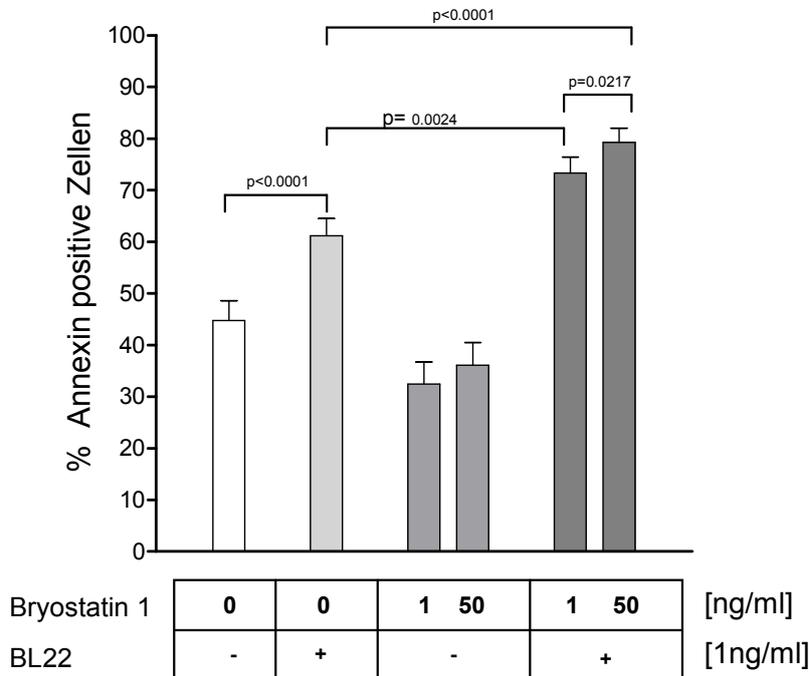


Abbildung 15: Apoptoseinduktion durch BL22 mit und ohne Bryostatin in der CLL-Reinkultur

3.4.2 Bryostatin 1 attenuiert Chemotherapie-induzierte Zytotoxizität in CLL-Zellkulturen

Neben einem Rückgang der Spontanapoptose ist auch eine Verminderung der Toxin-induzierten Apoptose durch Bryostatin in der Literatur beschrieben [49, 104]. In Vorexperimenten unserer Gruppe konnten wir dies bestätigen und zeigen, dass Bryostatin in vitro die toxische Wirkung verschiedener Chemotherapeutika mit Ausnahme von BL22 attenuiert. Dafür wurden CLL-Zellen von drei Patienten mit Vincristin (100 ng/ml), Fludarabin (50 ng/ml) oder Doxorubicin (300 ng/ml) jeweils mit und ohne Bryostatin (5ng/ml) für 24 Stunden kultiviert und anschließend die Apoptoserate bestimmt (Abbildung 16, siehe Säulen 1-8). Es zeigte sich eine deutliche Abschwächung der zytotoxischen Wirkung aller drei Chemotherapeutika durch Bryostatin. Die

Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant, wir beließen es jedoch bei der geringen Fallzahl, da uns lediglich der gegensätzliche Trend im Vergleich zu BL22 interessierte. Hier verhält es sich nämlich genau umgekehrt, wie in den Säulen 9 und 10 in Abbildung 16 dargestellt. Abgebildet sind die Ergebnisse von 15 Patienten welche für 24 Stunden mit BL22 (1µg/ml) jeweils mit und ohne Bryostatin (1ng/ml) behandelt wurden.

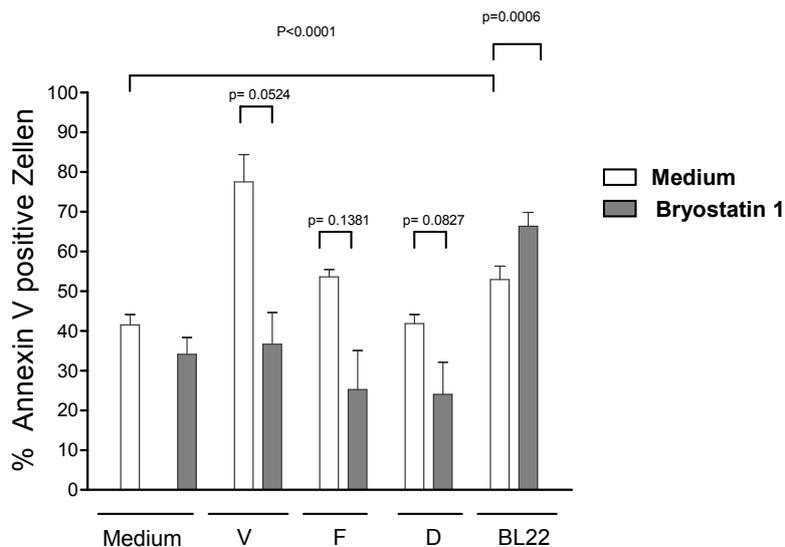


Abbildung 16: Wirkung verschiedener Chemotherapeutika kombiniert mit Bryostatin

Bryostatin zeigt also insbesondere in CLL-Reinkulturen antiapoptotische Effekte, welche das Überleben der CLL-Zellen in vitro begünstigen und sie weniger empfindlich für gängige Chemotherapeutika machen. BL22 hingegen scheint diese antiapoptotische Wirkung nicht nur überwinden zu können, sondern im Gegenteil sogar in seiner Wirkung verstärkt zu werden. Ursächlich für diese Verstärkung vermuten wir die Erhöhung der CD22-Expression sowie die Depletion der PKC-βII durch Bryostatin. Im Folgenden untersuchten wir, worauf die antiapoptotische Wirkung von Bryostatin beruht und inwiefern BL22 diese antagonisieren kann.

3.4.3 Veränderung verschiedener Apoptoseproteine durch Bryostatin

Aus der Literatur ist bekannt, dass Bryostatin bei der CLL zur Hochregulation von MCL-1 und verstärkter Phosphorylierung von BCL-2 führt und dadurch das Überleben der Zellen begünstigt [49, 104]. Wir vermuteten daher, dass diese beiden Proteine auch an dem von uns beobachteten antiapoptotischen Effekt von Bryostatin beteiligt sind und untersuchten die Wirkung von Bryostatin auf die Expression dieser und weiterer Apoptose-regulierender Proteine. Dazu behandelten wir Zellen von drei Patienten für 24 Stunden mit Bryostatin (0, 1 und 50 ng/ml), nahmen die Zellen anschließend ab und gewannen daraus Lysate für Western-Blot-Analysen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt. Wie erwartet fand sich nach 24 Stunden Behandlung mit Bryostatin eine deutliche Erhöhung der Proteinmenge von MCL-1 sowie von phosphoryliertem BCL-2, während die Expression von nativem BCL-2 praktisch nicht beeinflusst wurde. Die niedrige Konzentration zeigte sich dabei deutlich potenter als die hohe Konzentration. Bei einem der drei Patienten (V 194) konnte auch eine Erhöhung von XIAP beobachtet werden und bei allen Patienten eine leichte Zunahme von BCL-XL.

Von dem proapoptotisch wirkenden BH3-only Protein BIM konnten die Varianten BIM_{EL} und BIM_L detektiert werden. Nach Bryostatinbehandlung war bei allen Patienten die Variante BIM_{EL} nicht mehr nachweisbar, bei zwei von drei Patienten trat eine zusätzliche Variante von BIM_L mit etwas höherem Molekulargewicht auf, was vermutlich auf eine Phosphorylierung zurückzuführen ist. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass Phorbolester, die eine funktionelle Ähnlichkeit zu Bryostatin aufweisen, durch Aktivierung von PKC-βII zu Phosphorylierung von BIM führen, so dass dieser Mechanismus auch hier vermutet werden kann [115].

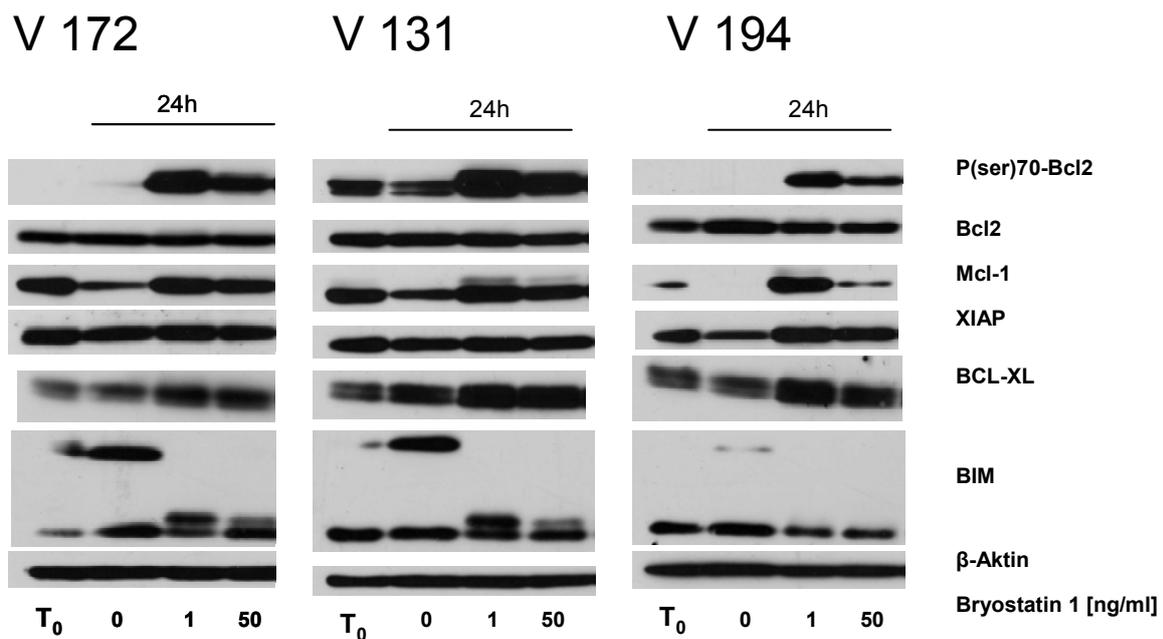


Abbildung 17: Veränderung verschiedener Apoptoseproteine durch Bryostatin (Western Blot)

Insgesamt scheint also Bryostatin komplexe Veränderungen der Expression verschiedener Apoptoseproteine auszulösen. Konstant beobachtete Mechanismen sind die Erhöhung der antiapoptotischen Proteine MCL-1 und p(ser)70-BCL-2. Diese sind vermutlich von zentraler Wichtigkeit für die antiapoptotische Wirkung von Bryostatin in Zellkulturen.

3.4.4 BL22 antagonisiert die Bryostatin-induzierten anti-apoptotischen Proteinveränderungen nur teilweise

Trotz der antiapoptotischen Effekte von Bryostatin mit deutlicher Erhöhung von MCL-1 und p(ser)70-BCL-2, wirkt es dennoch in Kombination mit BL22 zytotoxisch. Darum stellten wir uns die Frage, ob die antiapoptotischen Proteinveränderungen von Bryostatin durch Zugabe von BL22 aufgehoben werden können. Zu diesem Zweck kultivierten wir Zellen von drei Patienten für 24 Stunden mit Bryostatin (0, 1 und 50 ng/ml) jeweils mit und ohne BL22 (1 µg/ml). Die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen wichtiger Apoptoseproteine sind in Abbildung 18 dargestellt. BL22 alleine verminderte MCL-1

(vergleiche erste Reihe, jeweils Bahn 2 und 3) und vermochte in Kombination mit Bryostatin die Verstärkung der MCL-1- und P(ser)-BCL-2-Expression abschwächen, jedoch nicht völlig aufheben. Die Expression beider Proteine blieb über den Werten der Mediumkontrolle (Vergleiche Reihe 1 und 2, jeweils Bahn 2,4 und 7).

Die Expression von BIM wurde durch BL22 allein nicht verändert, Bryostatin führte unabhängig von der Zugabe des Immuntoxins zu einer Depletion von BIM_{EL} und einer Molekulargewichtsänderung von BIM_L (vergleiche Abbildung 17).

Inkonstant zeigte sich eine Verminderung von XIAP durch BL22 (V 231), beziehungsweise durch die Kombination aus BL22 und Bryostatin 50 ng/ml (V 232).

Um zu untersuchen, inwiefern diese Veränderung verschiedener Apoptoseproteine die zytotoxische Wirkung der Kombination aus Bryostatin und BL22 beeinflusst, stellten wir im unteren Teil der Abbildung die Proteinexpression der jeweiligen Apoptoserate gegenüber. Daraus lässt sich ablesen, dass die Expression der untersuchten antiapoptotischen Proteine nicht mit der Apoptoserate korreliert. Am deutlichsten wird dies bei Patient V 231: Trotz stärkerer MCL-1 und p(ser)70-BCL-2 Expression bei den Ansätzen mit Bryostatin und BL22 im Vergleich zu BL22 allein, fand sich dort eine höhere Apoptoserate (Vergleiche Abbildung 22, V 231, Bahn 3 versus 4 und 5).

Bei Betrachtung von Patient V 190 fällt jedoch auf, dass bei diesem die niedrige Bryostatinkonzentration eine sehr ausgeprägte Erhöhung von MCL-1 und p(ser)70-BCL-2 provozierte und die Kombination in diesem Fall keine zusätzliche Verstärkung der BL22-Toxizität bewirken konnte (Abbildung 18, V 190, Bahn 4 versus 3). Wurde Bryostatin hingegen in höheren Konzentrationen eingesetzt, war die MCL-1-Hochregulation geringer

ausgeprägt und die Toxizität von BL22 konnte durch Bryostatın verstärkt werden (Abbildung 18, Bahn 5).

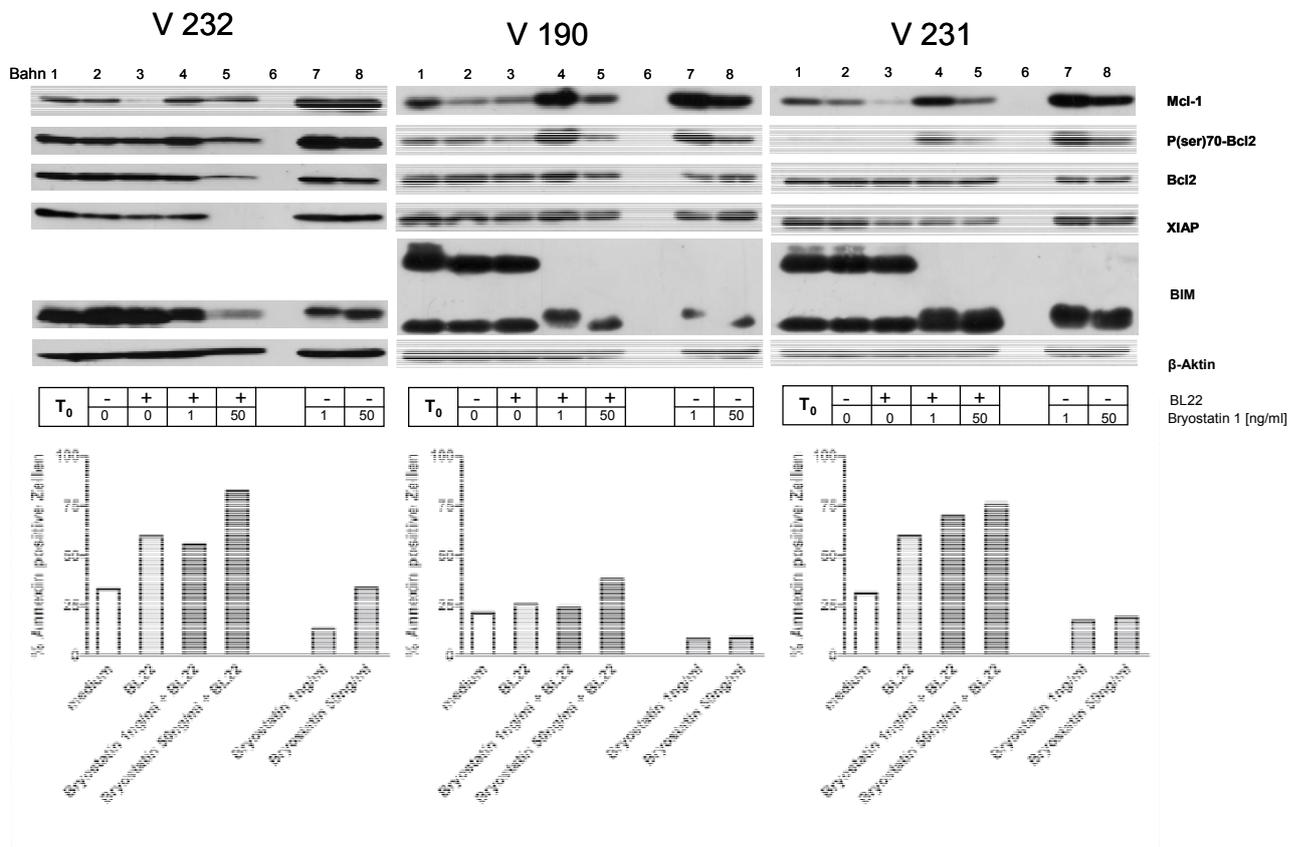


Abbildung 18: Expression verschiedener Apoptoseproteine nach Behandlung mit Bryostatın und BL22

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die erhöhte Expression von MCL-1 und p(ser)70-BCL-2 die zytotoxische Wirkung der Kombination negativ beeinflusst, wenngleich die Höhe der Expression beider Proteine nicht direkt mit der Apoptoseinduktion korreliert und sicher noch weitere, unbekannte Faktoren eine Rolle spielen.

3.4.5 Relevanz von MCL-1 für die Apoptose der CLL-Zellen – MCL-1 Knockdown

Zur weiteren Untersuchung der Relevanz der MCL-1-Expression für die zytotoxische Wirkung von BL22, schalteten wir MCL-1 mittels Protein Knockdown aus und untersuchten die Auswirkungen auf die BL22-Toxizität.

Hierzu antagonisierten wir MCL-1 an CLL-Zellen von drei Patienten mittels RNA-Interferenz. Wir transfizierten die Zellen mit si-RNA gegen MCL-1 sowie mit nicht bindender Kontroll-RNA und stimulierten die Hälfte der Zellen direkt im Anschluss an die Transfektion mit Bryostatin 1ng/ml. Dabei stellten wir jeweils einen Ansatz für Western-Blot-Analysen sowie für die Durchflusszytometrie her. Nach 24 Stunden gewannen wir die Lysate für die Western-Blot-Analysen, aus denen wir gleichzeitig die Apoptoseraten nach 24 Stunden durchflusszytometrisch bestimmten. Gleichzeitig gaben wir BL22 (1µg/ml) zu der Hälfte der mit Bryostatin stimulierten Ansätze für die Durchflusszytometrie, kultivierten diese für weitere 24 Stunden und bestimmten anschließend die Apoptoserate im Durchflusszytometer. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt. Der Knockdown war bei allen Patienten erfolgreich und MCL-1 konnte im Western Blot praktisch nicht mehr nachgewiesen werden (vergleiche Abbildung 19, Western Blots jeweils dritte Bahn). Durch Bryostatin wurde MCL-1 wie erwartet hochreguliert (Abbildung 19, Western Blots, jeweils Bahn 2 und 4). Diese Hochregulation konnte durch RNA-Interferenz deutlich vermindert werden, es ließ sich allerdings mehr MCL-1 Protein nachweisen als nach Transfektion der unbehandelten Zellen (vergleiche Western Blots, jeweils Reihe 3 und 5). Im Annexin-assay zeigte sich eine Zunahme der Apoptoserate der Bryostatin-behandelten CLL-Zellen durch Unterdrückung von MCL-1 (Vergleiche Abbildung 19 jeweils Säule 1 und 2). Die Apoptoseinduktionsrate durch BL22 nach Bryostatinvorbehandlung, dargestellt durch die vertikalen Pfeile, war allerdings bei den Patienten V107 und V226 weitgehend unabhängig von der MCL-1 Expression, beziehungsweise bei dem Patienten V231 nach MCL-1 Knockdown sogar geringer ausgeprägt. Allerdings ist in diesem Fall der Ausgangswert apoptotischer Zellen nach MCL-1 Knockdown mit 46% als relativ hoch anzusehen.

Somit gehen wir davon aus, dass die Erhöhung der MCL-1 Expression durch Bryostatin die zytotoxische Wirkung von BL22 zwar vermindert aber nicht in größerem Maße einschränkt. Ansonsten wäre zu erwarten, dass durch den MCL-1 Knockdown die zytotoxische Wirkung von BL22 auf Bryostatin-vorbehandelte Zellen potenziert werden kann.

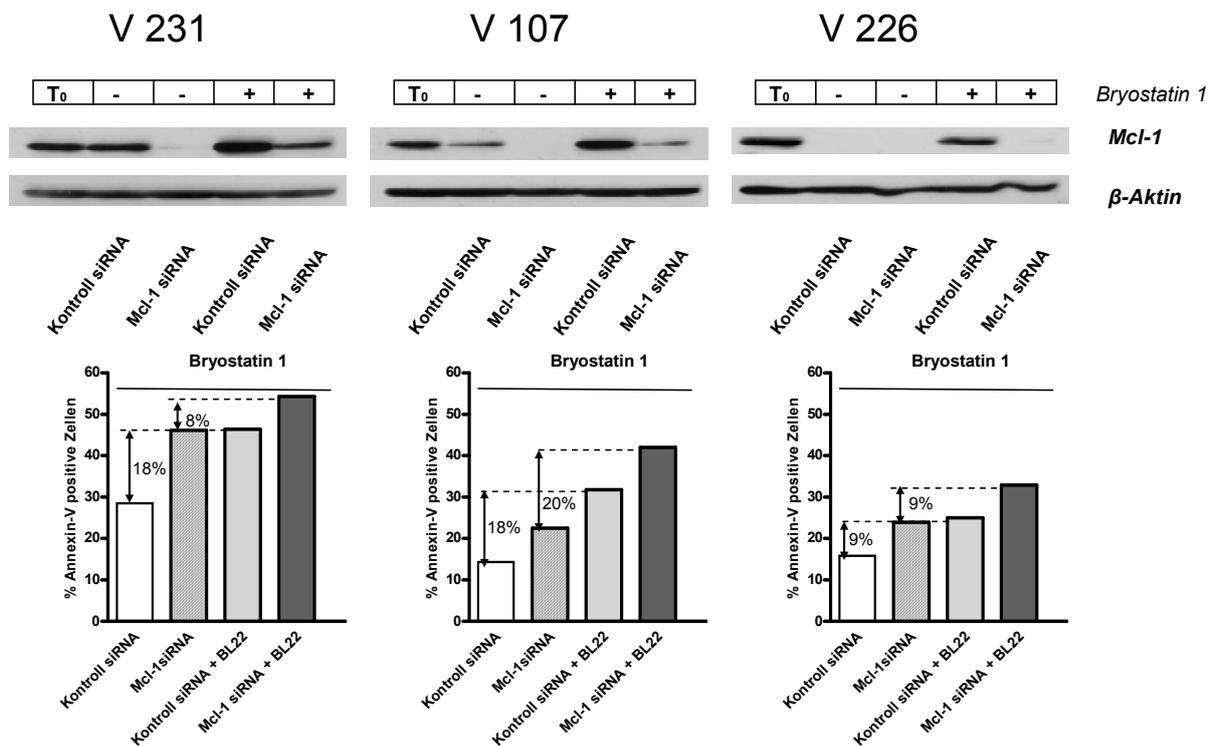


Abbildung 19: MCL-1 Knockdown (Western Blot und Annexindaten)

3.5 Sequentielle Gabe von Bryostatin und BL22

3.5.1 Die Erhöhung antiapoptotischer Proteine durch Bryostatin ist im zeitlichen Verlauf rückläufig

Eine sequentielle Gabe verschiedener Medikamente, insbesondere bei Kombination von Chemotherapeutika, wird in der Klinik häufig angewandt um Nebenwirkungen und unerwünschte Wechselwirkungen zwischen den Medikamenten zu vermeiden. Wir untersuchten im Folgenden die Wirksamkeit einer sequentiellen Gabe von Bryostatin und BL22. Dies erachteten wir als erfolgversprechenden Ansatz, da die kurze Halbwertszeit von MCL-1 einen

raschen Abfall dessen Expression auf das Ausgangsniveau nach Beendigung der Bryostatineexposition vermuten ließ. Darum untersuchten wir zunächst die Expression der verschiedenen Apoptoseproteine nach Entfernung von Bryostatin.

Wir behandelten CLL-Zellen von drei Patienten mit Bryostatin (0,1 und 50ng/ml) für 24 Stunden und entfernten dieses anschließend durch dreimaliges Waschen mit PBS. Anschließend kultivierten wir die Zellen in frischem Medium weiter und gewannen jeweils nach weiteren 24, 48 und 72 Stunden Lysate für Western-Blot-Analysen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt. Es handelt sich um eine Fortführung des in 3.4.3 dargestellten Versuchs und somit um die selben Patienten wie in Abbildung 17.

Wie bereits gezeigt, verstärkte Bryostatin nach 24 Stunden deutlich die Expression von MCL-1 sowie die Phosphorylierung von BCL-2, ausgeprägter bei der niedrigen Konzentration. Nach Entfernung von Bryostatin verminderte sich die Expression von MCL-1, ebenso wie die Phosphorylierung von BCL-2 und es ließ sich kein Unterschied zwischen beiden Konzentrationen mehr erkennen. Im Vergleich zu den Mediumwerten nach 24 Stunden blieben beide Werte jedoch erhöht.

BIM_{EL} verschwand nach Behandlung mit Bryostatin und blieb bis auf eine Ausnahme (V 194) über den gesamten Zeitraum nicht detektierbar.

Bei V 172 und V 131 erzeugte Bryostatin eine Veränderung des molekularen Gewichts von BIM_L, die vermutlich auf eine Phosphorylierung zurückzuführen ist. Diese war im zeitlichen Verlauf rückläufig.

Die unerwünschten antiapoptotischen Effekte von Bryostatin, insbesondere die Erhöhung von MCL-1 und p(ser)70-BCL-2 sind also nach Entfernung von Bryostatin rückläufig.

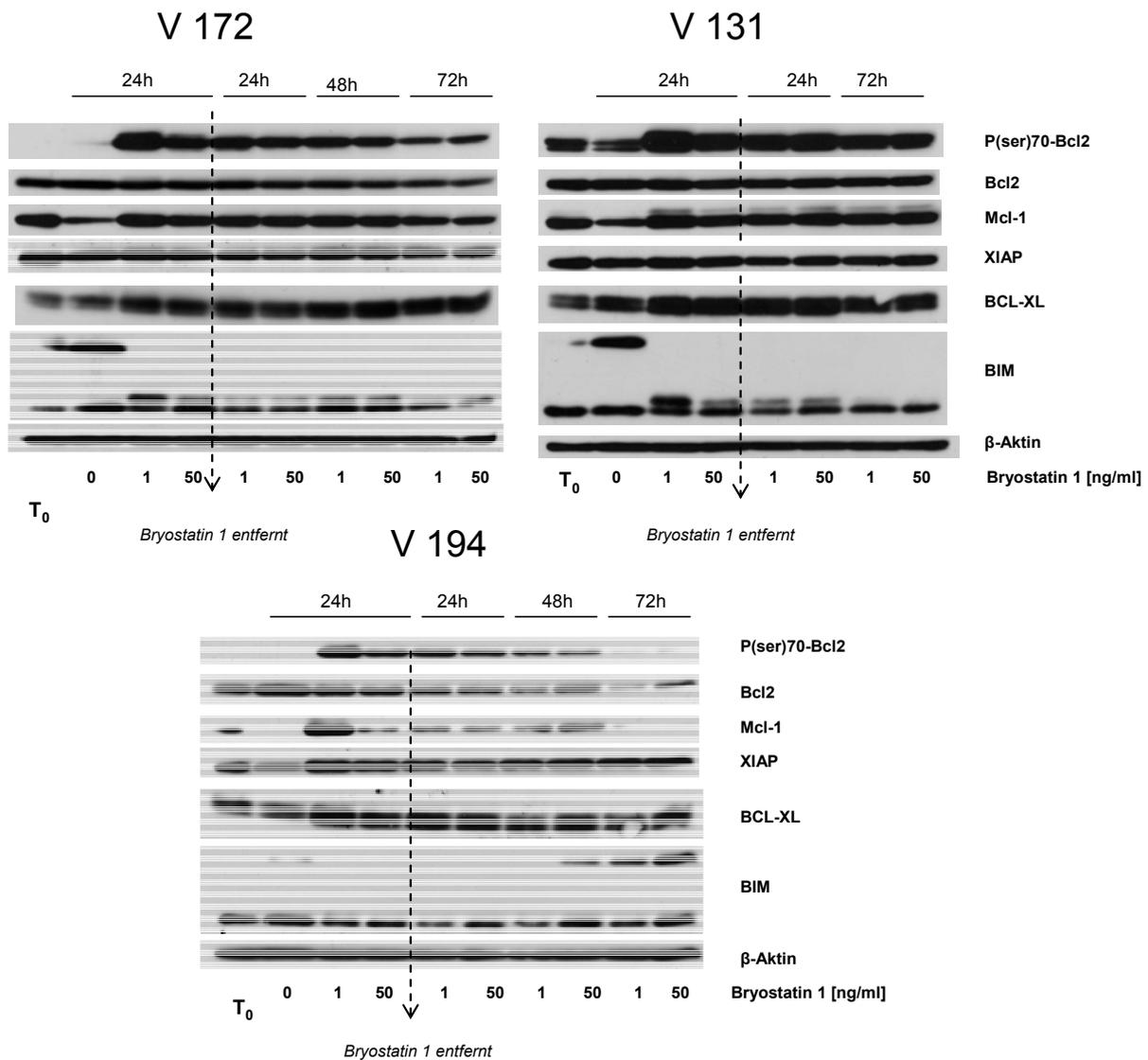


Abbildung 20: Expression verschiedener Apoptoseproteine nach Entfernung von Bryostatin (Western Blot)

3.5.2 PKC-βII Depletion ist lang anhaltend

Als nächstes stellten wir uns die Frage, wie lange die Depletion von PKC-βII nach Bryostatinbehandlung andauert. Da wir diese als essentiell für die Verstärkung der Immuntoxinwirkung bei hohen Konzentrationen von Bryostatin erachten, sollte im Falle einer sequentiellen Therapie die PKC-βII Expression bei Zugabe von BL22 möglichst supprimiert sein. Optimal wäre ein Zeitpunkt, zu dem die antiapoptotischen Veränderungen bereits rückläufig sind, während die PKC-βII Depletion noch anhält. Zu diesem Zweck

bestimmen wir die Expression von PKC- β II und weiteren PKC-Isoformen aus den Lysaten des in 3.5.1 geschilderten Versuchs (Bryostatin 0, 1, 50ng/ml für 24 Stunden – Waschen – Weiterkultivierung in frischem Medium für die angegebenen Zeiträume). Das Ergebnis eines Patienten ist repräsentativ in Abbildung 21 dargestellt. Zwei weitere Patienten zeigten gleiche Resultate.

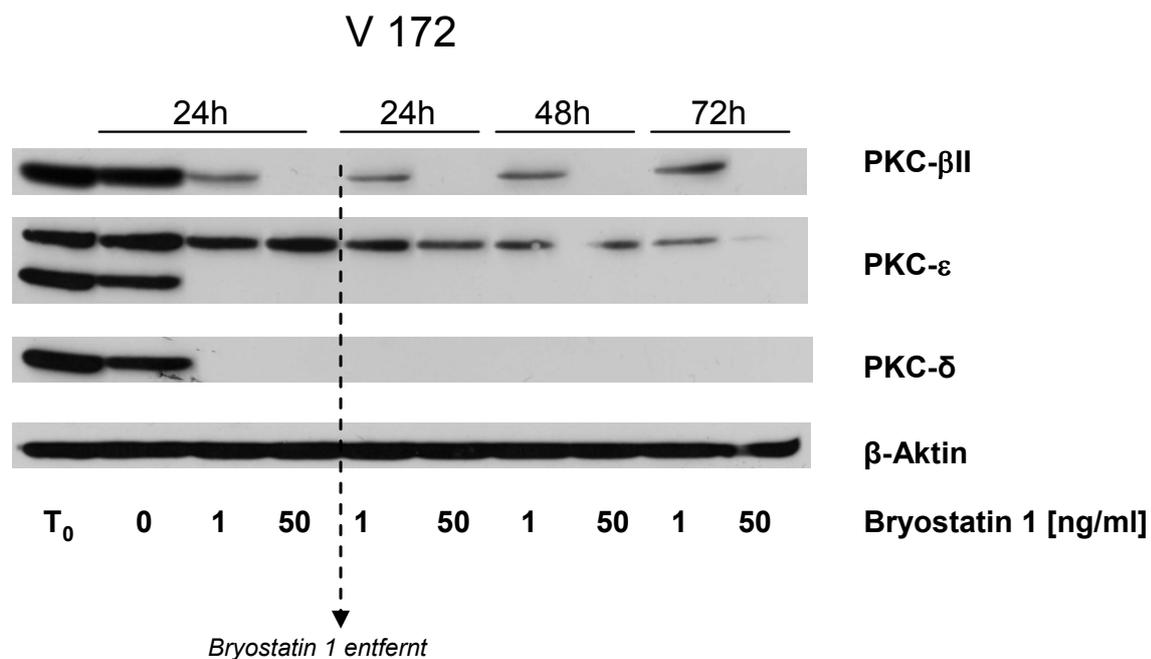


Abbildung 21: Veränderung der Proteinkinase C Expression nach Bryostatin über 72h (Western Blot)

Selbst 72 Stunden nach Entfernung von Bryostatin in hoher Konzentration ließ sich PKC- β II im Western Blot nicht nachweisen, während es nach Behandlung mit der niedrigeren Konzentration von 1ng/ml über den gesamten Zeitraum unverändert detektierbar war (siehe Abbildung 21, Reihe 1).

Ähnliches gilt für die PKC- ϵ : Bryostatin führte zur Depletion dieser Isoform und die Proteinexpression blieb auch nach 72 Stunden nicht nachweisbar. Das größere, vermutlich phosphorylierte, PKC- ϵ Molekül, im Western Blot oberhalb der nativen Isoform abgebildet, war im Verlauf vermindert nachweisbar. (siehe Abbildung 21, Reihe 2).

PKC- δ wurde durch Bryostatin ebenfalls depletiert und war auch nach 72 Stunden im Western Blot nicht nachweisbar (siehe Abbildung 21, Reihe 3).

3.5.3 Hochregulation der CD 22 Expression ist über 72

Stunden anhaltend

Als weiteren wichtigen Parameter des sensibilisierenden Mechanismus von Bryostatin hatten wir die Hochregulation von CD22 identifiziert. Auch diese sollte bei sequentieller Therapie möglichst zum Zeitpunkt der Zugabe des Immuntoxins noch andauern. Wir untersuchten also, wie sich die CD22-Expression nach Entfernung von Bryostatin verhält. Analog zu dem in 3.5.1 geschilderten Vorgehen, inkubierten wir CLL-Zellen für 24 Stunden mit Bryostatin, entfernten dieses anschließend durch Waschen und kultivierten die Zellen in frischem Medium weiter. Jeweils nach weiteren 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zellen abgenommen und die CD22-Expression durchflusszytometrisch bestimmt. Das Ergebnis eines Patienten ist in Abbildung 22 repräsentativ dargestellt, zwei weitere Patienten erbrachten ähnliche Resultate. Es zeigte sich, dass die Hochregulation von CD22 ebenfalls über 72 Stunden anhält, sich sogar visuell ein Trend zu einer weiteren Zunahme der Expression über den Zeitraum der Bryostatineexposition hinaus erkennen lässt. Da die Hochregulation der CD22-Expression, wie oben dargelegt, ein PKC-abhängiger Prozess ist, kann daraus vermutet werden, dass die kurze Phase der PKC-Aktivierung bereits ausreicht um die CD22-Expression langfristig zu erhöhen.

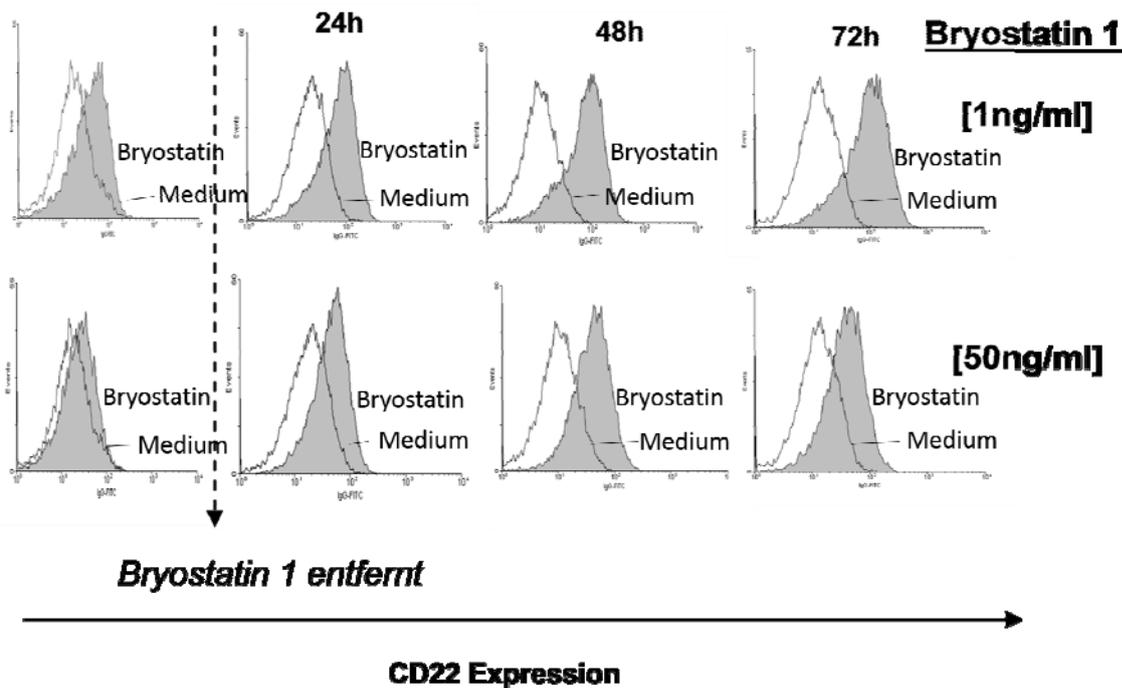


Abbildung 22: Verlauf der CD 22 Expression nach Entfernung von Bryostatin

3.5.4 Sensibilisierender Effekt von Bryostatin bei sequentieller Gabe des Immuntoxins

Es scheint also, dass sowohl die Hochregulation der CD22-Expression, als auch die Depletion von PKC- β II lang anhaltende Effekte sind, während die unerwünschte Erhöhung antiapoptotischer Proteine im zeitlichen Verlauf abnimmt. Dies ließ uns hoffen, dass eine verzögerte Gabe des Immuntoxins nach Bryostatinbehandlung wirksam sein könnte und eventuell sogar der zeitgleichen Verabreichung überlegen, da die interferierende Erhöhung antiapoptotischer Proteine geringer ausgeprägt ist.

Wir behandelten CLL-Zellen von drei Patienten mit Bryostatin (0, 1 und 50 ng/ml) für 24 Stunden und entfernten dieses anschließend durch Waschen mit PBS. Danach wurden die Zellen in frischem Medium weiterkultiviert und jeweils nach 48 oder 72 Stunden BL22 (1 μ g/ml) zugegeben. Jeweils 24 Stunden nach Zugabe des Immuntoxins wurden die Zellen abgenommen, mit Annexin und PI gefärbt und die Apoptoserate bestimmt. Die Apoptose-

induktion wurde berechnet durch Subtraktion der spontanen Apoptoserate in Medium von der Apoptoserate nach Behandlung. Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der drei Patienten jeweils nach 24 Stunden Vorbehandlung in Medium, Bryostatatin 1ng/ml und 50 ng/ml. Man kann erkennen, dass auch 72 Stunden nach Entfernung von Bryostatatin dieses noch eine deutliche Zunahme der Apoptoserate im Vergleich zur Vorkultivierung in Medium bewirkt. Bei der sequentiellen Gabe zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Bryostatinkonzentrationen bei einem Trend zu einer besseren Wirksamkeit der niedrigeren Konzentration (Vergleiche Abbildung 5 und Abbildung 15).

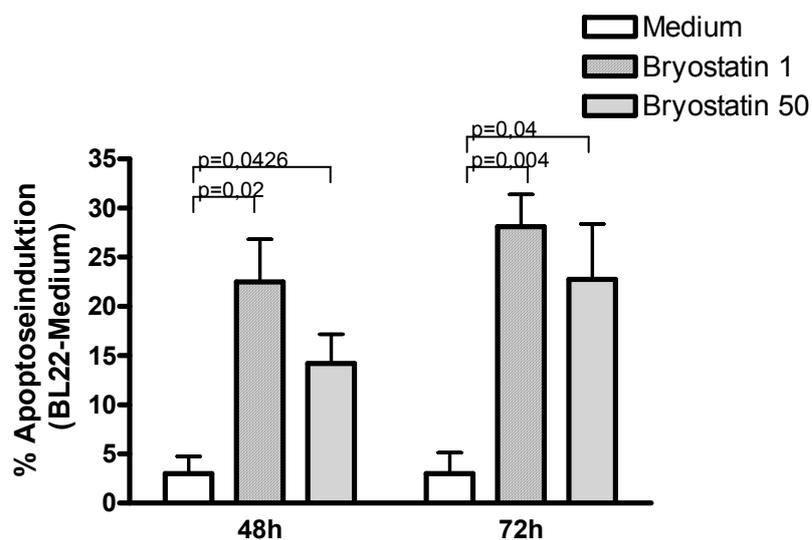


Abbildung 23: Apoptoseinduktion durch BL22 nach Vorbehandlung mit Bryostatatin 1

3.6 MCL-1 Hochregulation und PKC- β II-Depletion in der CLL-Kokultur mit LTK⁻

Wie bereits in 3.1.1 und 3.4.1 dargestellt, konnte in Kokultur mit LTK⁻ kein antiapoptotischer Effekt von Bryostatatin beobachtet werden (siehe Abbildung 5). Dies warf die Frage auf, ob unter diesen Kulturbedingungen ebenfalls eine Hochregulation von MCL-1 und eine Phosphorylierung von BCL-2 stattfinden. Um dem nachzugehen kultivierten wir CLL-Zellen für 72 Stunden

gemeinsam mit LTK⁻ jeweils mit und ohne Bryostatin (1 und 50ng/ml). Jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden gewannen wir Lysate für Western-Blot-Analysen, die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt. Es zeigte sich, dass Bryostatin in Kokultur mit der Stromazelllinie die MCL-1-Expression ebenfalls deutlich verstärkt. Bei der niedrigen Konzentration lässt sich über den gesamten Zeitraum von 72 Stunden eine gegenüber den Mediumwerten erhöhte MCL-1-Expression nachweisen (Vergleiche Abbildung 24, Bahn 5-7 versus 2-4). Bei der hohen Konzentration von 50 ng/ml Bryostatin nähert sich die MCL-1 Expression nach 72 Stunden wieder den Mediumwerten an (Bahn 8-10).

Eine weitere wichtige Frage war, ob Bryostatin in Kokultur mit Stromazellen ebenfalls eine Depletion von PKC-βII auslösen kann.

Wie aus Abbildung 24 ersichtlich, bleibt die Depletion von PKC-βII von der Anwesenheit der Stromazellen unbeeinflusst und lässt sich nach Behandlung mit Bryostatin 50 ng/ml über 72 Stunden durchgehend nachweisen (siehe Abbildung 24, Reihe 2).

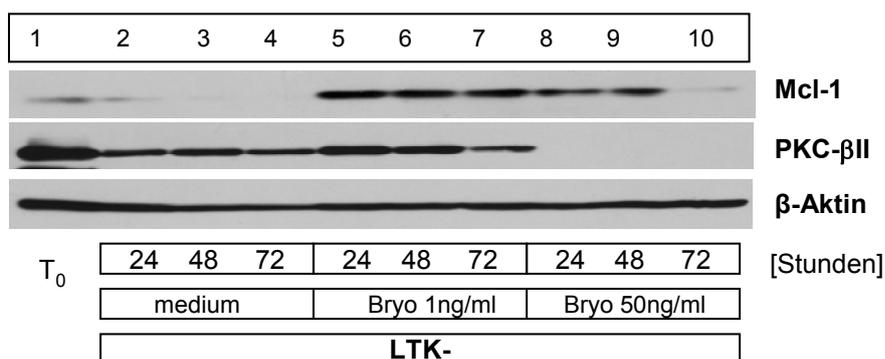


Abbildung 24: MCL-1 und PKC-β II Expression in Kokultur mit LTK-

Zudem untersuchten wir die CD22-Expression der CLL-Zellen in der Kokultur. Diese gab deckungsgleiche Ergebnisse mit den Kulturen in Medium, analog Abbildung 22 in 3.5.3 (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Kokultur mit Stromazellen beeinflusst also die untersuchten Bryostatineffekte auf CLL-Zellen nicht. Sowohl die Hochregulation von CD22 und

Depletion von PKC- β II, als auch die unerwünschte verstärkte Expression von MCL-1 konnten im Stromazellmodell nachgewiesen werden.

3.7 Wirkung von Bryostatin und BL22 auf proliferierende Zellen

Während die Protektion von CLL-Zellen durch Stromazellen eine Ursache für ein Krankheitsrezidiv nach intensiver Chemotherapie darstellen kann, werden proliferierende CLL-Zellen als Vermittler der Krankheitsprogression angesehen (siehe 1.1.2). Decker et al. [29] konnten ein In-Vitro-Modell für proliferierende CLL-Zellen entwickeln, indem sie CLL-Zellen mit DSP 30 und Interleukin 2 stimulierten. DSP 30 ist ein synthetisches CpG-Oligonukleotid, welches durch seine Ähnlichkeit mit bakterieller DNA, vermittelt über den Toll-like-Rezeptor 9, immunstimulatorisch wirkt [39]. Obwohl CLL-Zellen nur wenig auf verschiedene andere B-Zellstimuli ansprechen, sind sie durch CpG-Oligonukleotide ähnlich wie normale B-Zellen aktivierbar und proliferieren. Zusätzlich wird die Expression eines hochsensiblen IL-2-Rezeptors induziert, was die potenzierte Wirkung in Kombination mit dem B-Zellproliferationsfaktor Interleukin 2 erklärt [27, 29]. Nach Stimulation mit diesen beiden Substanzen in vitro bilden die Zellen Cluster von vergrößerten und sich teilenden Zellen (siehe Abbildung 25) aus.

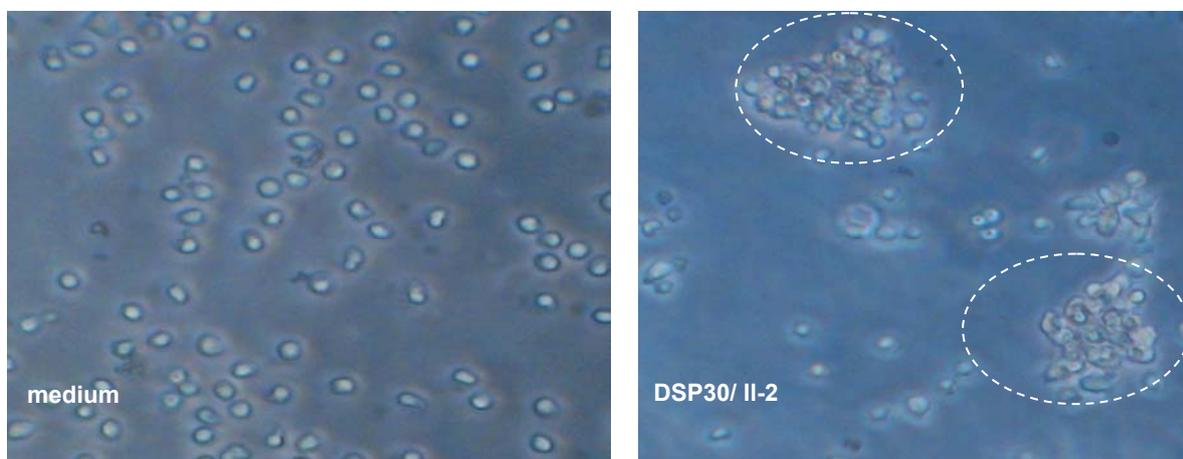


Abbildung 25: CLL-Zellen, stimuliert mit DSP 30 und IL-2

Wir stellten uns die Frage, ob die Kombination aus Bryostatin und BL22 auch auf proliferierende Zellen wirkt und somit ein Fortschreiten der Krankheit verhindern könnte. Dazu stimulierten wir CLL-Zellen von sechs Patienten für 72 Stunden mit dem Oligonukleotid DSP 30 (1 μ M) und IL-2 (100 U/ml) und gaben anschließend für weitere 24 Stunden BL22 mit und ohne Bryostatin 1 (1 und 50 ng/ml) hinzu. Die Ergebnisse der Apoptoseanalyse mittels Annexinprobe sind in Abbildung 26 dargestellt. Der Erfolg der Stimulation wurde mit BrdU-Färbungen bestätigt und durch CD22-Färbungen wurde ein Einfluss der Proliferationsinduktion auf die CD22-Expression ausgeschlossen (Ergebnisse nicht dargestellt). Es zeigte sich, dass BL22 auch auf proliferierende Zellen zytotoxisch wirkt, insbesondere in Kombination mit Bryostatin (siehe Abbildung 26, Säule 4 und 6) und somit auch einen erfolgversprechenden Ansatz für die Verhinderung einer Krankheitsprogression darstellen könnte.

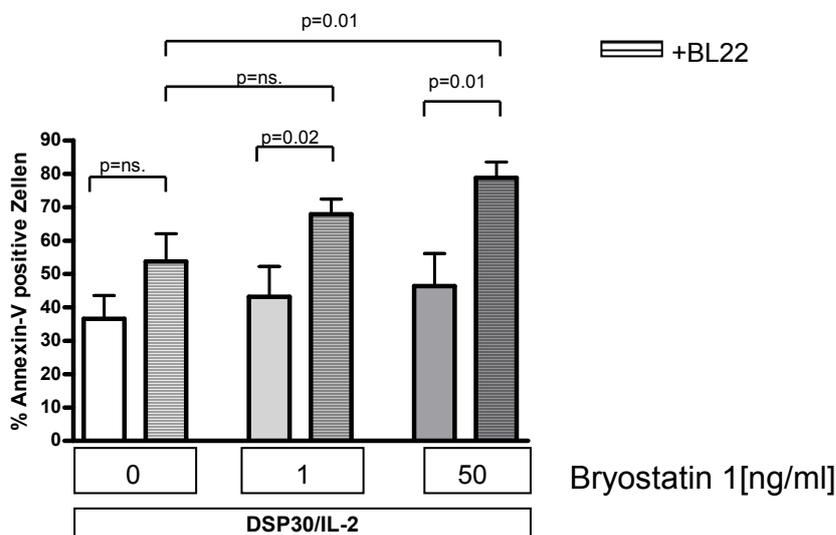


Abbildung 26: Wirkung von Bryostatin 1 und BL22 auf stimulierte Zellen

3.8 Wirkung von Bryostatin und BL22 auf Lymphom-Zelllinien

Nachdem die kombinierte Behandlung mit Bryostatin und BL22 bei primären CLL-Zellen vieler Patienten durchgehend gute Wirkung gezeigt hatte, stellten wir uns die Frage, ob damit auch ein Behandlungserfolg bei anderen malignen lymphoproliferativen Erkrankungen vom B-Zelltyp erzielt werden kann.

Expression von CD22 findet sich auch bei der B-Prolymphozytenleukämie, Mantelzelllymphomen, Marginalzonenlymphomen, Diffus großzelligen B-Zelllymphomen und bei 70% der folliculären B-Zelllymphome [16, 102, 103]. Wir untersuchten die Wirkung von Bryostatin auf die CD22-Expression und BL22-Toxizität an verschiedenen Zelllinien von Diffus großzelligen B-Zelllymphomen (Karpas 422 [33], DB [10] und SU-DHL-4 [111]) und Mantelzelllymphomen (Granta [42], Jeko [43]). Die Experimente wurden jeweils in Triplikaten angefertigt.

Die Zelllinien wurden für 48 Stunden mit Bryostatin (1ng/ml) behandelt und anschließend die CD22-Expression gemessen.

Bei den Mantelzelllymphomlinien zeigten alle drei eine Hochregulation von CD22 durch Bryostatin, deutlicher ausgeprägt bei den Linien DB und Sudhl-4 als bei Karpas 422 (siehe Abbildung 27 A).

In einem weiteren Versuch wurden die Zelllinien für 48 Stunden mit Bryostatin (1ng/ml), BL22 (100 ng/ml) oder einer Kombination der beiden inkubiert und anschließend die Apoptoserate mittels Annexinfärbung bestimmt. BL22 zeigte als Monosubstanz auf alle Zelllinien zytotoxische Wirkung, die Linie Sudhl-4 sprach extrem stark an mit Apoptoseraten über 90%. In der Zelllinie DB konnte die BL22-Zytotoxizität durch Zugabe von Bryostatin (1ng/ml) deutlich verstärkt werden, nicht jedoch in der Karpas 422, was vermutlich auf die ungenügende Hochregulation der CD22-Expression

durch Bryostatin zurückzuführen ist (vergleiche Abbildung 27 A). Die ohnehin sehr hohe Toxizität von BL22 auf Sudhl-4 konnte trotz deutlicher Erhöhung der CD22-Expression durch Bryostatin nicht weiter gesteigert werden.

Bei den Mantelzelllymphomlinien sprachen beide Zelllinien auf eine Therapie mit BL22 an (Vergleiche Abbildung 27 D). Bei der Linie Jeko konnte die Wirkung durch Bryostatin verstärkt werden, nicht jedoch bei der Linie Granta. Dies ist vermutlich auf die fehlende Erhöhung der CD22-Expression bei dieser Zelllinie zurückzuführen (Vergleiche Abbildung 27C).

Überraschenderweise hatte Bryostatin allein bei allen fünf Zelllinien zytotoxische Effekte gezeigt, ganz im Gegenteil zu der antiapoptotischen Wirkung an primären CLL-Zellen in vitro.

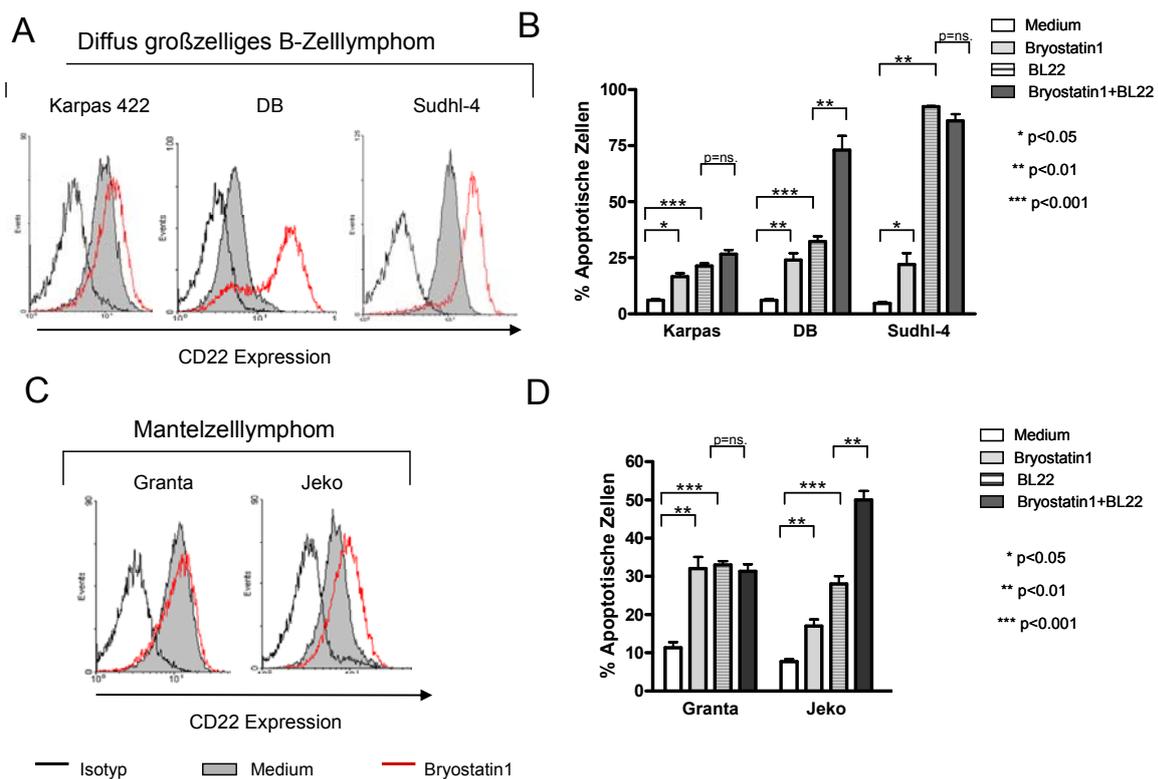


Abbildung 27: Wirkung von BL22 in Kombination mit Bryostatin an Lymphomzelllinien

3.9 Vergleich der Wirkung von BL22 mit dem weiterentwickelten Immuntoxin HA22

Eine Weiterentwicklung von BL22 mit stärkerer Bindungsaffinität zu CD 22 und damit größerer Spezifität ist HA 22 ([6], siehe auch 1.2). Wir untersuchten wie sich die Wirkung dieses neuen Immuntoxins in CLL-Zellkulturen von BL22 unterscheidet. Dafür verglichen wir die Apoptoserate nach 48 Stunden Behandlung mit BL22 und HA 22 (1µg/ml) jeweils mit und ohne Bryostatin (1 und 50 ng/ml). Der Vergleich an vier verschiedenen Patienten zeigte keinen Unterschied in Bezug auf die Zytotoxizität. Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Annexinbestimmung eines Patienten ist in Abbildung 28 repräsentativ dargestellt.

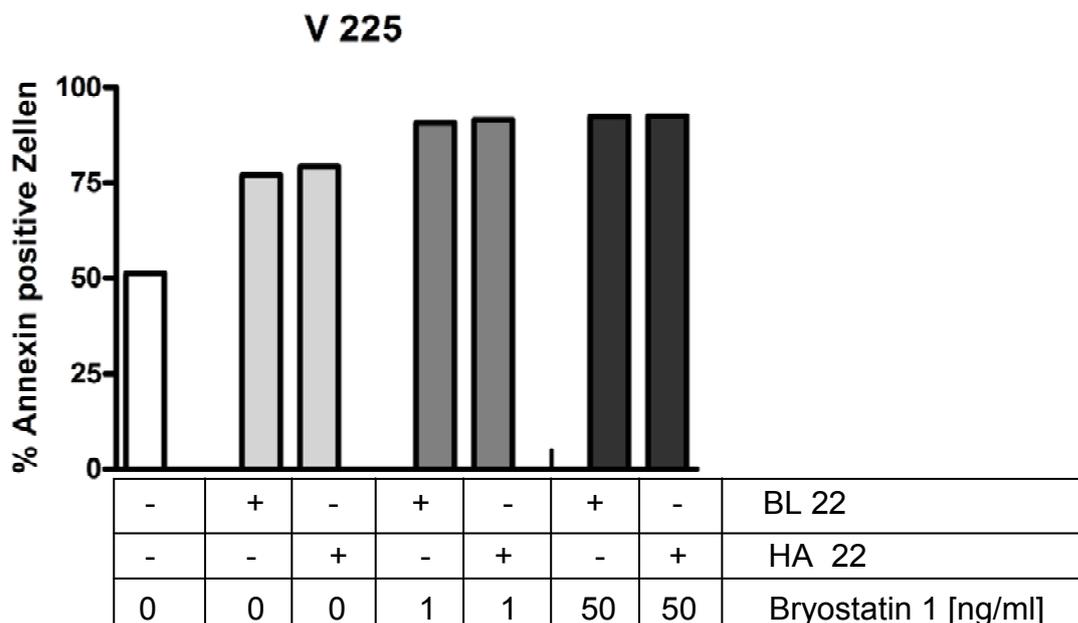


Abbildung 28: Vergleich der Zytotoxizität von BL22 und HA 22

HA 22 wird derzeit in Studien an verschiedenen malignen B-Zellerkrankungen getestet und hat bereits gute Wirkung bei der Haarzelleukämie [58] und bei der Akuten Lymphatischen Leukämie im Kindesalter gezeigt [81].

4 Diskussion

4.1 Monoklonale Antikörper in der Therapie der CLL

In den vergangenen Jahren haben monoklonale Antikörper in der Tumorthherapie eine zunehmende Bedeutung erlangt. Insbesondere maligne hämatologische Erkrankungen bieten sich für ihren Einsatz an, da sie an ihrer Oberfläche zahlreiche, teilweise sehr spezifische Marker als potentielle Zielmoleküle exprimieren. Zudem vermindert die bei diesen Erkrankungen meist vorhandene Immunsuppression die Bildung neutralisierender Antikörper und die Tumorzellen sind im Blutstrom für die monoklonalen Antikörper leicht erreichbar [87].

Der monoklonale CD20-Antikörper Rituximab hat mittlerweile einen festen Platz in der Therapie der chronisch lymphatischen Leukämie. Allerdings ist die Expression von CD20 auf CLL-Zellen niedrig, verglichen mit anderen malignen B-Zellerkrankungen und normalen B-Zellen [5] und hohe Konzentrationen oder eine Kombination mit Chemotherapeutika werden nötig, um eine ausreichende Wirkstärke zu erzielen, beides verbunden mit verstärkten systemischen Nebenwirkungen.

Weitere Zielmoleküle für eine spezifische Tumorthherapie der CLL sind CD52 (Alemtuzumab), HLA-DR (1D09C3), CD23 (IDEC-152, Lumiliximab), 1D10 (Hu1D10, Apolizumab) sowie CD22 (Epratuzumab) [80]. Diese und zahlreiche weitere Antikörper werden derzeit in klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit getestet. (Ein Überblick ist unter <http://www.clinicalTrials.gov> einsehbar)

4.2 CD22 als Zielmolekül auf CLL-Zellen

4.2.1 Nativer CD22 Antikörper Epratuzumab

Der monoklonale CD22 Antikörper Epratuzumab zeigte als Monosubstanz in klinischen Studien gute Erfolge bei Patienten mit follikulärem- und diffus großzelligem B-Zell-Lymphom, während CLL-Patienten praktisch nicht ansprachen. Dies liegt möglicherweise an einer zu geringen Expression von Zielmolekülen auf der Oberfläche [64, 65]. Der molekulare Wirkmechanismus von Epratuzumab nach Bindung an die Zellen umfasst eine Phosphorylierung von CD22, eine Modulation des B-Zellrezeptors sowie eine moderate Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität. Im Gegensatz zu Rituximab erfolgt keine Apoptoseinduktion oder Komplement-vermittelte Zelllyse [15, 66].

4.2.2 Entwicklung „bewaffneter“ CD22 Antikörper: BL22 und HA22

Um die Wirkstärke der monoklonalen Antikörper zu erhöhen wurden „bewaffnete Antikörper“ entwickelt. Durch Kopplung eines Toxins mit dem monoklonalen Antikörper kann dessen spezifische zytotoxische Wirkung erhöht werden. CD22 bietet sich hier als Zielmolekül besonders an, da es im Gegensatz zu vielen anderen Oberflächenmarkern nach Antikörperbindung internalisiert wird und somit das Toxin in die Zelle transportiert wird [44]. BL22 ist ein monoklonaler Antikörper gegen CD22, gekoppelt mit dem aktiven Fragment des Pseudomonas Exotoxins A. Nach Bindung an CD22 und Internalisierung blockiert es die zelluläre Proteinbiosynthese durch Inhibition des Elongationsfaktors 2. Eine Weiterentwicklung stellt HA22 dar, das sich durch eine noch stärkere Bindungsaffinität zu CD22 auszeichnet.

4.2.3 Niedrige CD22-Expression limitiert Wirkung von CD22-Immuntoxinen auf CLL-Zellen

In einer klinischen Studie an Patienten mit malignen B-Zellerkrankungen hat BL22 nur marginale Erfolge bei drei von elf behandelten CLL-Patienten gezeigt. Ganz anders stellten sich die Ergebnisse bei den Patienten mit Haarzelleukämie dar, mit einer kompletten Remissionsrate von 61% und partiellen Remissionen bei 19% der 31 bereits multipel vorbehandelten Patienten [54]. Die mittlere progressionsfreie Überlebensrate bei den Patienten, die eine komplette Remission erreicht hatten, betrug 36 Monate [56].

Generell wurde BL22 von allen Patienten gut vertragen, es traten vorrangig leichte reversible Nebenwirkungen auf, insbesondere Fatigue, Myalgien, Leberenzymerrhöhung und Hypalbuminämie. Eine schwere, aber selten beobachtete Nebenwirkung war das Vascular-Leak-Syndrom.

Auch mit dem weiterentwickelten Immuntoxin HA22 wurden klinische Studien an Patienten mit CLL, Haarzelleukämie und anderen Non-Hodgkin-Lymphomen durchgeführt. Das Nebenwirkungsspektrum war mit BL22 vergleichbar. Bei wiederum gutem Ansprechen in der Haarzelleukämie zeigte sich bei der CLL lediglich ein Rückgang zirkulierender maligner Zellen im peripheren Blut [52, 59]. Grund für den markanten Unterschied zwischen diesen beiden verwandten Erkrankungen ist vermutlich die deutlich geringere Expression von CD22-Molekülen auf der Oberfläche von CLL-Zellen mit unter 1000 Molekülen pro Zelle im Gegensatz zur Haarzelleukämie mit 5000 - 70000 Bindungsstellen pro Zelle [53]. In-Vitro-Studien an verschiedenen malignen B-Zellerkrankungen zur Abhängigkeit der BL22-Zytotoxizität von der Zahl der CD22-Moleküle pro Zelle konnten im Bereich über 2000 Molekülen pro Zelle eine Korrelation der beiden Parameter nachweisen ($r^2=0,72$). Bei Zellen mit weniger CD22-Molekülen pro Zelle (400-1900) fand sich keine

Korrelation und das Ansprechen auf das Immuntoxin war geringer, bei sehr variablen mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50}) [53]. Analog konnten wir in Vorexperimenten unserer Gruppe bestätigen, dass das Ansprechen auf BL22 in vitro mit der Dichte der CD22-Oberflächenmoleküle korreliert und die CD22-Expression auf CLL-Zellen unabhängig von Alter, Geschlecht, Lymphozytenzahl und Krankheitsstadium in 50% der Fälle niedrig ist [28].

Es scheint also, dass die niedrige CD22-Expression die Wirkung der CD22-Immuntoxine auf CLL-Zellen limitiert.

4.2.4 CD22

CD22 ist ein B-zellspezifisches Transmembranprotein der Immunglobulin-superfamilie. Es ist mit dem B-Zellrezeptor assoziiert und regulierend an dessen Signaltransduktion beteiligt [25].

Es tritt bereits früh in der B-Zellentwicklung, in der Phase der späten Pro-B-Zellen, vorrangig als intrazelluläres Protein auf. Erst in späteren Entwicklungsstufen findet sich CD22 in größerer Dichte an der Zelloberfläche [46]. Die malignen CLL-Zellen sind in einem Stadium zwischen Prä-B-Zellen und reifen B-Zellen arretiert und damit vermutlich in einem Stadium vor Translokation der CD22-Moleküle zur Zellmembran. Eventuell liegt die intrazelluläre CD22-Expression, welche mit Westernblot-Analysen erfasst werden kann, deutlich über der durchflusszytometrisch gemessenen Oberflächenexpression [72]. Die Zellen der Haarzelleukämie entstammen späteren Entwicklungsstufen der B-Zelllinie, wie Prä-Plasmazellen und Post-Keimzentrums-B-Gedächtniszellen [76] und haben damit die Translokation von CD22 vom Zytoplasma zur Zellmembran bereits vollzogen.

Früher ging man davon aus, dass eine relevante Oberflächenexpression von CD22 nur bei malignen Zellen, ausgehend von späten Stadien der B-Zell-

entwicklung, auftritt. Dies ist jedoch nicht haltbar, da auch in den unreifen Blasten der B-ALL CD22 auf der Oberfläche exprimiert wird [103].

4.3 Wirkungsverstärkung monoklonaler Antikörper durch

Erhöhung der Zielmoleküle – Beispiele in der Literatur

Die Wirkungsverstärkung monoklonaler Antikörper durch Erhöhung der Zielmolekülexpression wurde bereits für andere Oberflächenproteine erforscht. So ist auch bei dem Immuntoxin LMB-2, welches gegen CD25 (die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors) gerichtet ist, die Wirkung auf CLL-Patienten unter anderem durch eine niedrige Oberflächenexpression limitiert [57, 94]. Decker et al. [27] konnten zeigen, dass über eine Verstärkung der CD25-Expression durch das bakterielle Oligodeoxynukleotid DSP30 auch die Zytotoxizität des spezifischen Immuntoxins in vitro gesteigert werden kann. Neben CD25 erhöht DSP30 im Rahmen immunstimulatorischer Effekte auch die Expression von CD20. In klinischen Studien wird derzeit erprobt ob die Wirkung von Rituximab bei Non-Hodgkin-Lymphomen durch Zugabe von Oligonukleotiden gesteigert werden kann [1, 109].

4.4 Bryostatin als potentieller Verstärker der BL22 Wirkung

4.4.1 Phorbolster und Bryostatin steigern CD22 Expression auf CLL-Zellen

Analog zu den oben angeführten Beispielen suchten wir nach einer Möglichkeit, die CD22-Expression auf den CLL-Zellen zu erhöhen und somit die Zytotoxizität der CD22-Immuntoxine zu steigern. Seit langem war bekannt, dass Phorbolster zu einer Differenzierung von B-Zellen einhergehend mit einer Erhöhung der CD22 Expression an der Oberfläche führen [4]. In vitro Studien an verschiedenen ALL-Zelllinien konnten zeigen,

dass der Phorbolester PMA nach 48 Stunden zum Erscheinen von CD22 an der Zellmembran führt, während dieses vorher nur im Zytoplasma zu detektieren war [14]. Möglicherweise wird also im Rahmen des Differenzierungsprozesses die Translokation von zytoplasmatischem CD22 zur Zellmembran ausgelöst.

Bryostatin ist eine funktionell ähnliche Substanz, welche in vitro ebenfalls eine Differenzierung der CLL-Zellen induziert, jedoch im Gegensatz zu den Phorbolestern keinen tumorfördernden Effekt aufweist [3]. Bryostatin bewirkt morphologische Veränderungen der CLL-Zellen mit Bildung vergrößerter, unregelmäßig geformter Zellen mit zahlreichen Zytoplasmaausläufern (siehe Abbildung 4). Diese Veränderungen zu einem Haarzell-Leukämie-ähnlichen Phänotyp sind ebenfalls von einer Erhöhung der CD22-Expression auf der Zellmembran begleitet. Der zentrale Wirkmechanismus von Bryostatin ist die Modulation der PKC-Aktivität, wodurch auch die Differenzierung und Erhöhung der CD22-Expression vermittelt werden. In unseren Versuchen konnten wir bestätigen, dass Bryostatin die CD22-Expression auf CLL-Zellen PKC-abhängig verstärkt (siehe Abbildung 7) und zwar sowohl bei Zellen mit hoher als auch mit niedriger CD22-Grundexpression (siehe Abbildung 8).

Es ist nicht bekannt, über welche PKC-Isoform die verstärkte CD22-Expression vermittelt wird. Wir vermuten, dass PKC- β II daran beteiligt sein könnte, da die Hochregulation durch den selektiven PKC- α und - β Inhibitor Gö6976 blockiert werden kann (siehe 3.2.3) und PKC- α im Gegensatz zu PKC- β II in der CLL nur inkonsistent exprimiert wird [75].

4.4.2 Bryostatin in klinischen Studien

Bryostatin hatte in präklinischen Studien an verschiedenen Tumorentitäten proliferationshemmende und proapoptische Eigenschaften gezeigt. Ebenso vermochte es die Zytotoxizität verschiedener Chemotherapeutika in vitro zu steigern, andere jedoch zu hemmen (zusammengefasst in [69], S. 558-559).

Auch an verschiedenen CLL-Zelllinien konnten proapoptotische und Toxinsensibilisierende Effekte nachgewiesen werden [77-79]. Daraufhin wurde Bryostatin in klinischen Studien an verschiedenen soliden und hämatologischen Tumorerkrankungen getestet. Bei CLL-Patienten zeigte sich mit Bryostatin als Monotherapie bei Applikation hoher Dosen teilweise ein Rückgang der Leukozytenzahl im peripheren Blut, jedoch keine anhaltende Krankheitsremission [105, 106]. Es wurden weitere klinische Studien mit Bryostatin in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika an der CLL durchgeführt. Die sequentielle Gabe von Bryostatin und Fludarabin an CLL- und Non-Hodgkin-Lymphom-Patienten zeigte erfolgversprechende Ergebnisse mit einer Ansprechrate von insgesamt 40%, wobei nur ein Patient eine komplette Remission erreichte [95].

Die Applikation von Bryostatin erwies sich als sehr sicher und nebenwirkungsarm. Am häufigsten wurden dosisabhängige Myalgien und Fatigue beobachtet, sowie Thrombophlebitiden nach peripher-venöser Applikation [69]. Eine Myelosuppression trat mit Bryostatin als Monotherapie nicht auf, war jedoch in Kombination mit Fludarabin teilweise dosislimitierend [95, 105, 106].

Insgesamt blieben jedoch die aufgrund präklinischer Studien erwarteten klinischen Erfolge mit Bryostatin bislang aus, sowohl bei der CLL, als auch bei anderen Tumorentitäten, was möglicherweise an der ambivalenten Wirkweise mit gleichzeitig auftretenden pro- und antiapoptotischen Effekten liegen könnte.

4.5 Bryostatin verstärkt die Zytotoxizität von BL22 durch Hochregulation von CD22 und Depletion von PKC- β II

Wir interessierten uns für Bryostatin in erster Linie aufgrund seiner Eigenschaft die CD22-Expression zu erhöhen und somit eventuell die

Aufnahme des CD22-Immuntoxins BL22 in CLL-Zellen zu steigern. In der Tat konnten wir nachweisen, dass Bryostatin die Wirkung von BL22 in vitro signifikant steigert (vergleiche Abbildung 5), was zu einem Teil sicherlich durch Vermehrung der Zielmoleküle auf den CLL-Zellen bedingt ist. Dafür spricht zum einen die Tatsache, dass die BL22-Toxizität nachweislich mit der Dichte der Zielmoleküle korreliert [28, 53] und zum anderen, dass es sich um einen anti-CD22-Immuntoxin-spezifischen Effekt handelt, der in Kombination mit anderen Chemotherapeutika nicht auftritt (vergleiche Abbildung 16). Interessant wäre ein Vergleich mit einem analog aufgebauten Immuntoxin gewesen, welches gegen ein anderes Oberflächenprotein gerichtet ist, das durch Bryostatin nicht in seiner Expression beeinflusst wird. Leider stand uns ein solches nicht zur Verfügung.

Weiterhin konnten wir zeigen, dass die Wirkung von Bryostatin auf CLL-Zellen dosisabhängig ist. Bei einer niedrigen Konzentration von Bryostatin (1ng/ml) überwiegen die PKC-aktivierenden Effekte mit einer ausgeprägten Hochregulation der CD22-Expression. BL22 wird so mutmaßlich verstärkt gebunden und internalisiert und wirkt somit stärker zytotoxisch. In hohen Konzentrationen (50ng/ml) führt Bryostatin zu Degradation und Abbau der Proteinkinase C- β II, während die CD22-Hochregulation nur moderat ausgeprägt ist (Abbildung 7). Unklar ist, wie diese moderate Erhöhung der CD22 Expression trotz PKC-Depletion aufrechterhalten wird. Während die initiale Hochregulation von CD22 abhängig von PKC- β II zu sein scheint und durch den spezifischen Inhibitor Gö 6976 blockiert werden kann (siehe 3.2.3), bleibt die CD22-Expression auch bei vollständiger PKC- β II-Depletion über Tage hinweg erhöht. Ob es sich dabei um einen persistierenden Effekt nach kurzzeitiger PKC- β II-Aktivierung handelt, oder ob andere Mechanismen für die Aufrechterhaltung verantwortlich sind, bleibt unklar.

4.6 Einfluss der Proteinkinase-C-Expression auf die Immuntoxinwirkung

4.6.1 Veränderung verschiedener PKC-Isoformen durch Bryostatin

Die Effekte von Bryostatin auf die Proteinkinase-C-Expression sind sehr komplex und variieren von Zelltyp zu Zelltyp, sowie zwischen den einzelnen PKC-Isoformen. Grundsätzlich kann Bryostatin als gemischter PKC-Agonist/Antagonist beschrieben werden. So scheint Bryostatin initial eine Aktivierung der Proteinkinase C, einhergehend mit Autophosphorylierung und Translokation zu Zellmembranen, zu induzieren, während es im Verlauf eine Ubiquitinylierung und proteosomale Degradation der PKC's bewirkt [24]. Tendenziell kommt es bei Langzeitexposition der Zellen mit Bryostatin zu einer Verminderung der PKC-Aktivität [62, 63]. Battle et al. [9] konnten an primären CLL-Zellen nachweisen, dass die PKC-Isoformen $\alpha - \epsilon$ 30 Minuten nach Behandlung mit Bryostatin (10ng/ml) aktiviert werden (die Kinaseaktivität stieg jeweils um 40-100%) und nach 24 Stunden alle (auch PKC- β) im Westernblot nicht mehr oder deutlich vermindert (PKC- ϵ) nachzuweisen sind. Dies deckt sich mit unseren Beobachtungen, (siehe Abbildung 12 und Abbildung 21), in dem berichteten Experiment reichte bereits eine Konzentration von 10ng/ml Bryostatin aus, um die Degradation von PKC- β II einzuleiten.

4.6.2 PKC-Depletion sensibilisiert CLL-Zellen für Toxine

Wir vermuten, dass die Depletion der verschiedenen Isoformen und insbesondere PKC- β II die Zellen zusätzlich zur CD22-Erhöhung für die toxische Wirkung des Immuntoxins sensibilisiert. CLL-Zellen sind durch ein verändertes Proteinkinase-C-Expressionsprofil charakterisiert, unter anderem

eine Überexpression von PKC- β II [2, 40] sowie eine konstitutive Aktivierung von PKC- δ [92, 93]. In vitro konnten verschiedene PKC-Inhibitoren Apoptose in CLL-Zellen induzieren, einhergehend mit einer Verminderung anti-apoptotischer Proteine [7, 50, 101]. In einer klinischen Studie an 13 CLL-Patienten mit dem Inhibitor klassischer und neuer PKC-Isoformen PKC₄₁₂ (Midostaurin) konnte eine Reduktion der Tumorlast beobachtet werden [107]. Wir fokussierten auf die Rolle der Isoform PKC- β II, deren Expression essentiell für die Entwicklung einer CLL im Tiermodell zu sein scheint [40]. Zudem ist das PKC- β II-Expressionslevel in CLL-Zellen positiv mit Tumorstadium und Tumorzelllast korreliert, während in normalen B-Zellen deutlich weniger PKC- β II exprimiert wird [2]. Die selektive Inhibition von PKC- β II durch den Inhibitor LY379196 bei CLL-Zellen in vitro, führt jedoch nur zu marginaler Abnahme der Zellviabilität [2]. Analog zeigte in unseren Experimenten Bryostatin allein in hoher Konzentration keinen Einfluss auf die Apoptoserate trotz vollständiger Depletion von PKC- β II (Vergleiche Abbildung 5, Säule 2 und 4). Enzastaurin hingegen, das neben PKC- β auch AKT inhibiert, ein Signalmolekül welches in der CLL durch PKC- β aktiviert wird [8], kann bekannterweise in CLL-Zellen Apoptose auslösen [40]. Wir konnten bestätigen, dass Enzastaurin allein bereits zytotoxisch wirkt und zeigen, dass es die Toxizität von BL22 deutlich verstärkt (siehe Abbildung 13). Die Inhibition von PKC- β /AKT scheint also neben einer direkten proapoptotischen Wirkung (vergleiche Abbildung 13, Säule 1) die Zellen auch empfindlicher für das Immuntoxin zu machen. (Vergleiche Abbildung 13, Säule 2 und 3). Wir vermuten, dass die Depletion von PKC- β allein nicht zytotoxisch wirkt, die Zellen jedoch für weitere Noxen sensibilisiert.

4.7 Veränderungen des Apoptose – Antiapoptose

Gleichgewichts durch Bryostatin

4.7.1 Antiapoptotische Wirkung von Bryostatin in Zellkulturen

Der Einfluss von Bryostatin auf das Apoptose – Antiapoptose Gleichgewicht ist sehr komplex. Je nach Zelltyp und Umgebungsfaktoren wurden sowohl pro- als auch antiapoptotische Effekte beobachtet. Diese divergenten Effekte stehen vermutlich in Zusammenhang mit einer kontextabhängigen Modulation verschiedener PKC-Isoformen. Auf molekularer Ebene liegt der antiapoptotischen Wirkung auf CLL-Zellen mutmaßlich in erster Linie eine Bryostatin-induzierte Hochregulation von MCL-1 und Phosphorylierung von BCL2 zugrunde [49, 104].

Bei den meisten primären CLL-Zellen vermindert Bryostatin in vitro sowohl die spontane als auch die Medikamenten-induzierte Apoptoserate [49, 104] (siehe auch Abbildung 14 und Abbildung 16), während es an verschiedenen CLL-Zelllinien proapoptotische und Toxin-sensibilisierende Effekte zeigt [77-79]. Wir konnten zeigen, dass bei CLL-Zellen in Kokultur mit einer Stromazelllinie, ein Modell, das den Bedingungen in vivo angenähert ist, Bryostatin die spontane Apoptoserate der CLL-Zellen nicht beeinflusst (siehe Abbildung 5). Wodurch dieser Unterschied zwischen der Kokultur und der CLL-Reinkultur bedingt ist, bleibt unklar. Sicher ist jedoch, dass die hohe Spontanapoptose in CLL-Reinkulturen nicht den Bedingungen in vivo entspricht und Fehler bei der Abschätzung medikamenteninduzierter Apoptoseraten zur Folge hat. Möglicherweise vermittelt Bryostatin den CLL-Zellen Überlebenssignale, die in vivo nicht zu tragen kommen, da sie ohnehin in ausreichendem Maße von verschiedensten Milieufaktoren generiert werden, in vitro jedoch eine antiapoptotische Wirkung erzeugen.

4.7.2 Hochregulation von MCL-1 und pSer(70)-BCL-2 durch Bryostatin

Es war bereits mehrfach beschrieben, dass Bryostatin die Expression von MCL-1 und pSer(70)-BCL-2 in CLL-Zellen erhöht. Thomas et al. [104] konnten zeigen, dass beide Effekte durch Aktivierung der Proteinkinase C vermittelt werden und innerhalb von Stunden nach Behandlung der Zellen mit Bryostatin auftreten. Verschiedene Proteinkinasen wurden bisher in Abhängigkeit vom Zelltyp als potentielle BCL-2 Kinasen identifiziert (Siehe 1.2). Ergebnisse aus einem anderen Projekt unserer Arbeitsgruppe legen eine Phosphorylierung von BCL-2 durch PKC- β II in CLL-Zellen nahe [115]. Zusätzlich sind weitere PKC-Isoformen und MAP-Kinasen als BCL-2-Kinasen beschrieben [97].

An der Hochregulation von MCL-1 durch Bryostatin scheint neben der Proteinkinase C auch der MAP-Kinase-Signalweg beteiligt zu sein [104].

Wir konnten bestätigen, dass Bryostatin zu einer verstärkten Expression von MCL-1 und Phosphorylierung von BCL-2 führt (siehe Abbildung 17). Dabei zeigte sich eine niedrige Konzentration von Bryostatin potenter als eine hohe. Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise durch die PKC-Abhängigkeit beider Effekte erklären. Bei der niedrigen Konzentration von Bryostatin überwiegt die PKC-Aktivierung und die PKC-bedingten antiapoptotischen Effekte sind dementsprechend stark ausgeprägt, bei der hohen Konzentration kommt es sehr rasch zur Degradation von PKC-Isoformen und die antiapoptotischen Effekte sind weniger ausgeprägt. Die Erhöhung von MCL-1 und die Phosphorylierung von BCL-2 sind im zeitlichen Verlauf rückläufig, bleiben jedoch über Tage hinweg über dem Ausgangsniveau (siehe Abbildung 20). Obwohl der Anstieg der Expression der beiden Proteine also PKC-abhängig ist, wird die erhöhte Expression auch nach Depletion verschiedener PKC-Isoformen über Tage hinweg aufrechterhalten. Ob diese

anhaltenden Proteinveränderungen persistierende Effekte nach einer initialen Aktivierung von PKC-Isoformen sind oder anderer Signalwege und nicht depletierte PKC-Isoformen für die Aufrechterhaltung verantwortlich sind, ist nicht geklärt.

Zudem konnten wir nach Bryostatinbehandlung eine Degradation von BIM_{EL} und eine Molekulargewichtsänderung von BIM_L beobachten (siehe Abbildung 17). Dies steht im Einklang zu den Beobachtungen aus dem bereits erwähnten Projekt unserer Arbeitsgruppe [115]. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung der Proteinkinase-C- β II (in diesem Fall durch das funktionell verwandte PMA) zu einer verstärkten Phosphorylierung sowohl von BCL-2 als auch von BIM führt (mit konsekutiver Veränderung des Molekulargewichts) und BIM daraufhin ubiquitinyliert und abgebaut wird. Man kann also vermuten, dass Bryostatin analog zu PMA PKC- β II aktiviert und dies sowohl zur Phosphorylierung von BCL-2, als auch zur Phosphorylierung und Degradation von BIM führt.

4.7.3 Relevanz von MCL-1 für die Wirkung von BL22

Wir konnten zeigen, dass BL22 alleine zu einer Verminderung von MCL-1 und pSer(70)-BCL-2 führt, die Hochregulation dieser beiden Proteine durch Bryostatin jedoch nicht aufheben kann (siehe Abbildung 18). Mittels MCL-1 Knockdown konnten wir demonstrieren, dass die Gesamttoxizität der Kombination aus Bryostatin und BL22 durch Ausschaltung von MCL-1 gesteigert wird (siehe Abbildung 19). Allerdings induziert der Knockdown von MCL-1 allein bereits Apoptose in CLL-Zellen, die Apoptoseinduktionsrate durch Bryostatin und BL22 wird durch Knockdown von MCL-1 nicht gesteigert. (Abbildung 19). Es ist also zu vermuten, dass der anti-apoptische Effekt der erhöhten MCL-1 Expression bei Kombination der beiden Substanzen teilweise umgangen werden kann. Im Folgenden seien hierbei mögliche Szenarien dargestellt:

4.7.4 Wirkweise von BL22 auf zellulärer Ebene - Einfluss verschiedener Apoptose-regulierender Proteine

Eine erhöhte Expression von MCL-1 geht in CLL-Zellen mit einer niedrigeren Überlebensrate sowie einem schlechteren Ansprechen auf Chemotherapie einher [17]. Das Immuntoxin BL22 wird jedoch trotz erhöhter Expression von MCL-1 nach Bryostatinbehandlung durch dieses in seiner Wirkung verstärkt (siehe Abbildung 18). Über den Einfluss von MCL-1 auf die Wirkung von BL22 gibt es in der Literatur einzelne Daten:

An murinen Fibroblastenzelllinien konnten Du et al. nachweisen, dass die Apoptoseinduktion durch BL22 mit einer Degradation von MCL-1 und konsekutive Aktivierung von BAK einhergeht und BL22 bei Erhöhung der MCL-1 Expression (durch Proteintransfektion) keine Apoptose zu induzieren vermag [32]. Diese Degradation von MCL-1 durch BL22 bildet sich in unseren Westernblotdaten (siehe Abbildung 18) ebenfalls ab, unabhängig davon, ob MCL-1 zuvor durch Bryostatin induziert worden war. Allerdings konnte MCL-1 nach Induktion durch Bryostatin nicht vollständig sequestriert werden und die MCL-1 Expression nach Behandlung mit der Kombination aus Bryostatin und BL22 lag meist deutlich über den Mediumwerten. Wir konnten zeigen, dass trotz erhöhtem MCL-1-Level die Kombination aus Bryostatin und BL22 stärker zytotoxisch war als das Immuntoxin alleine. Dieses Ergebnis scheint mit den oben vorgestellten Daten von Du et al. in Widerspruch zu stehen, wofür verschiedene Erklärungen möglich sind:

Zum einen führte die Gruppe von Du et al. ihre Versuche an murinen Fibroblastenzellen durch, während wir primäre CLL-Zellen verwendeten. Es ist bekannt, dass bei der Apoptoseinduktion durch Hemmung der Proteinbiosynthese wie im Fall von BL22 je nach Zelltyp verschiedene apoptose-regulierende Proteine beteiligt sind und somit kein direkter Vergleich möglich ist [32].

Zudem ist die Wirkung von Bryostatin deutlich komplexer als eine alleinige Erhöhung von MCL-1 durch Proteintransfektion.

Weiterhin ist beschrieben, dass BL22 auch unabhängig von einer Apoptoseinduktion aufgrund der Inhibition der Proteinbiosynthese zytotoxisch wirkt. So sterben mit BL22 behandelte Zellen auch bei vollständiger Suppression der Apoptose mittels Caspaseinhibitoren ab [47]. Nach Inhibition der Apoptose ist die Immuntoxinwirkung jedoch abgeschwächt und tritt verzögert ein.

In den Experimenten von Du et al. konnte die MCL-1 Transfektion offensichtlich die Apoptoseinduktion durch BL22 inhibieren. Die MCL-1-transfizierten Zellen wurden für 20 Stunden dem Immuntoxin exponiert, woraufhin kein Einfluss des Immuntoxins auf die Viabilität der Zellen festgestellt werden konnte. Bei längerer Inkubation wäre vermutlich eine zytotoxische Wirkung des Immuntoxins durch persistierende Inhibition der Proteinbiosynthese zu erkennen gewesen. So ist in derselben Veröffentlichung beschrieben, dass die Ausschaltung von BAK ebenfalls die Apoptoseinduktion durch BL22 verhindert, die Zellen aber nach 48 Stunden auf Grund der dauerhaften Suppression der Proteinbiosynthese durch BL22 dennoch absterben ([32], S. 3448). Die Apoptoseinduktion ist also ein wichtiger Mechanismus der BL22-Toxizität, jedoch nicht der einzige.

Auch der Einfluss der BCL-2 Expression auf die Wirkung des Pseudomonas Exotoxins wurde untersucht. So konnte an Lymphomzelllinien gezeigt werden, dass dessen Expression nicht mit der toxischen Wirkung des Exotoxins korreliert und BL22 auch bei hoher BCL-2-Expression eine gute Wirkung zeigt [12]. Allerdings wurden die Versuche an Zelllinien durchgeführt und zudem die gesamte Proteinmenge von BCL-2 gemessen und nicht der phosphorylierte Anteil, welcher einen besseren Parameter für die BCL-2 Aktivität darstellt.

Auffällig ist weiterhin, dass Bryostatin trotz vollständiger Depletion von BIM_{EL} die Toxizität von BL22 verstärken kann (siehe Abbildung 17), was mutmaßen lässt, dass BIM nicht maßgeblich an der Apoptoseinduktion durch BL22 beteiligt ist. Dafür spricht auch, dass die Expression von BIM durch Behandlung mit BL22 nicht verändert wird (siehe Abbildung 18). Zudem konnten Shimazu et al. in ihren Untersuchungen zur Apoptoseinduktion durch Inhibition der Proteinbiosynthese nachweisen, dass diese unabhängig von BIM eingeleitet wird und auch in BIM-defizienten Zelllinien auftritt [99].

Letztlich kann nicht abschließend geklärt werden, inwiefern die erhöhte Expression antiapoptotischer Proteine durch Bryostatin die Wirksamkeit des Immuntoxins beeinflusst. Bei unseren Versuchen an primären CLL-Zellen erwies sich die Zugabe von Bryostatin trotz der Hochregulation antiapoptotischer Proteine als vorteilhaft für die Immuntoxinwirkung. Mögliche Erklärungen hierfür sind zum einen, dass die Wirkung antiapoptotischer Proteine trotz erhöhter Expression durch BL22 antagonisiert werden kann und somit die Apoptose eingeleitet wird und zum anderen, dass das Immuntoxin zusätzlich durch Inhibition der Proteinbiosynthese unabhängig von Apoptosemechanismen zytotoxisch wirkt.

4.8 Applikation von Bryostatin in vivo

Eine wichtige Frage, die unsere Arbeit aufwirft, ist, ob CLL-Patienten tatsächlich von der Therapie mit Bryostatin und BL22 profitieren können. Wir konnten zeigen, dass Bryostatin an primären CLL-Zellen in vitro die Toxizität des Immuntoxins BL22 verstärkt. Verantwortlich hierfür ist eine Hochregulation der CD22 Expression auf CLL-Zellen sowie eine Depletion verschiedener PKC-Isoformen, insbesondere PKC- β II. Ab einer Wirkkonzentration von 1ng/ml Bryostatin kann von einer Verstärkung der Immuntoxinwirkung ausgegangen werden. Von großer Wichtigkeit in Hinblick

auf die Umsetzbarkeit unserer Ergebnisse in klinische Studien ist also, ob diese Konzentration auch in vivo erreicht werden kann.

In klinischen Studien mit Bryostatatin zeigte sich, dass dessen Pharmakokinetik sehr variabel ist, zudem fehlte lange Zeit eine sensitive und valide Methode zur Detektion von Bryostatatin im Plasma nach intravenöser Infusion. Vor einiger Zeit gelang es Zhao et al. [113] eine massenspektrometrische Methode zur Detektion von Bryostatatin zu entwickeln, welche auch sehr geringe Plasmakonzentrationen bis zu 50 pg/ml nachweisen kann. Bei Anwendung dieser Methode in einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass eine Konzentration von 1ng/ml in Patienten mit einer täglichen Infusion von 16 μ g/m² über 14 Tage grundsätzlich erreicht werden kann [100]. Allerdings variierten die Plasmakonzentrationen zwischen den einzelnen Patienten und eine kontinuierliche Applikation von Bryostatatin über 14 Tage käme für unser Projekt wohl nicht in Frage. Viele weitere Infusionsschemata für Bryostatatin wurden in klinischen Studien bereits verwendet, die meisten applizierten Bryostatatin über kürzere Zeiträume mit höheren Einzelkonzentrationen, eine Bestimmung der Bryostatatinplasmakonzentration erfolgte aber nicht. Entscheidend für die Wirksamkeit der Kombination aus Bryostatatin und BL22 ist letztendlich nicht die erreichbare Plasmakonzentration von Bryostatatin sondern die Auslösung der CD22-Hochregulation und der Depletion von PKC-Isoformen. In einer klinischen Studie mit Bryostatatin an Patienten mit niedriggradigem Non-Hodgkin-Lymphom und chronisch lymphatischer Leukämie (n=25, davon 8 CLL-Patienten) wurde bei vier der CLL-Patienten die CD22-Expression vor und nach intravenöser Gabe von Bryostatatin gemessen, wobei bei zwei Patienten eine Hochregulation von CD22 beobachtet werden konnte [106]. Bryostatatin wurde in einer kontinuierlichen Infusion über 72 Stunden in einer Dosis von 120 μ g/m² appliziert (40 μ g/m²/Tag). Die Hochregulation von CD22 ist also

auch in vivo möglich, die Stichprobe von vier Patienten ist aber sicher nicht aussagekräftig genug um zu entscheiden, ob es sich um einen konsistenten Effekt handelt.

In einer anderen klinischen Studie an CLL-Patienten mit dem gleichen Applikationsschema wurde die Veränderung der Gesamt-PKC-Aktivität nach Gabe von Bryostatin untersucht, ebenfalls an vier Patienten. Bei allen Patienten konnte eine initiale PKC-Aktivierung ein bis zwei Stunden nach Beginn der Infusion nachgewiesen werden, nach 24 Stunden fand sich bei drei der vier Patienten keine PKC-Aktivität mehr, diese blieb über den gesamten Zeitraum der Bryostatinfusion (72 Stunden) supprimiert. Bei einem Patienten zeigte sich ein verzögerter Rückgang der PKC-Aktivität, nach 72 Stunden war sie jedoch ebenfalls vollständig supprimiert. [105]. Auch die Depletion der Proteinkinase C durch Bryostatin scheint also bei CLL Patienten durch intravenöse Infusion von Bryostatin möglich zu sein.

Ein Problem hinsichtlich der klinischen Anwendung von Bryostatin könnten die antiapoptotischen Effekte darstellen, insbesondere da diese stark dosisabhängig und bei niedrigeren Konzentrationen stärker ausgeprägt sind. Bisher hat sich jedoch Bryostatin in der klinischen Anwendung als relativ sicher erwiesen und es sind keine Daten über tumorfördernde Eigenschaften in vivo bekannt. Zudem muss betont werden, dass in unseren Experimenten Bryostatin in niedriger Konzentration trotz der Erhöhung antiapoptotischer Proteine die BL22-Toxizität verstärkt.

Alle vorgestellten klinischen Studien untersuchten jeweils nur Konzentration und Wirkung von Bryostatin im Plasma. In Tierstudien konnte gezeigt werden, dass Bryostatin aufgrund seiner Lipophilie im Knochenmark akkumuliert und dort in höheren Konzentrationen als im Plasma vorliegt. Interessant ist weiterhin, dass Bryostatin in vivo nur geringen Abbauprozessen unterliegt und in verschiedenen Geweben relativ stabil bleibt [112].

4.9 Sequentielle Applikation von Bryostatin und BL22

Sequentielle Therapieschemata werden häufig bei Kombination von Medikamenten, insbesondere von Chemotherapeutika, angewandt um Nebenwirkungen und Wechselwirkungen zwischen den Medikamenten zu vermindern. Zum Beispiel wird Rituximab bei Patienten mit malignen B-Zellerkrankungen einen Tag vor der Chemotherapie gegeben. Für Bryostatin konnte in einer klinischen Studie bereits gezeigt werden, dass die sequentielle Therapie mit Bryostatin und Fludarabin an CLL-Patienten wirksam ist [95]. Wir konnten *in vitro* demonstrieren, dass CLL-Zellen auch 72 Stunden nach Gabe von Bryostatin sensibler auf das Immuntoxin BL22 reagieren als ohne Vorbehandlung (siehe Abbildung 23). Dies lässt sich dadurch erklären, dass sowohl die Hochregulation von BL22 als auch die Depletion von PKC-Isoformen durch Bryostatin lang anhaltende Effekte sind und noch Tage nach der Behandlung mit Bryostatin andauern. Die Hochregulation von MCL-1 und p(Ser)70-BCL-2 hingegen ist im zeitlichen Verlauf rückläufig (siehe Abbildung 20). Wir vermuten daher, dass eine sequentielle Applikation von Bryostatin und BL22 an CLL-Patienten nicht nur wirksam sein könnte, sondern eventuell sogar einer gleichzeitigen Therapie in der Wirkung überlegen. Allerdings bleibt unklar, inwiefern sich unsere Experimente auf die Bedingungen *in vivo* anwenden lassen. Wir behandelten CLL-Zellen für 24 Stunden mit Bryostatin und entfernten dieses anschließend durch dreimaliges Waschen mit PBS. Vermutlich war ein großer Teil von Bryostatin in den Zellen gespeichert und konnte durch den Austausch des Mediums nicht entfernt werden. Durch den Blutstrom und die Metabolisierung *in vivo* kann Bryostatin vermutlich effektiver aus den Zellen eliminiert werden und es bleibt offen wie sich die verschiedenen Bryostatineffekte *in vivo* im zeitlichen Verlauf verhalten. Nur wenige klinische Studien haben das Verhalten der PKC-Expression in CLL-Zellen oder gesunden Blutzellen

während und nach Bryostatinfusion untersucht. Wie in 4.8 bereits erwähnt konnte an einer kleinen Stichprobe von CLL-Patienten gezeigt werden, dass die PKC-Aktivität bei Infusion von Bryostatin über 72 Stunden nach initialer Aktivierung sinkt und nach 72 Stunden keine PKC-Aktivität mehr in den CLL-Zellen nachzuweisen ist. [105]. Andere Studien untersuchten die PKC-Aktivität an mononukleären Zellen des peripheren Blutes: Marshall et al. [71] bestimmten die Aktivität verschiedener PKC-Isoformen in Lymphozyten aus dem peripheren Blut nach Infusion von Bryostatin über fünf beziehungsweise sechs Tage. Bei höheren Konzentrationen von Bryostatin konnte nach initialer Aktivierung eine Verminderung der Proteinmenge verschiedener PKC-Isoformen beobachtet werden, die teilweise bis zu drei Wochen nach Beendigung der Bryostatinbehandlung anhielt. Die Ergebnisse variierten jedoch bei den verschiedenen Patienten und Dosisstufen von Bryostatin. Zudem konnte kein konsistenter Effekt auf die Isoform beta beobachtet werden, der wir eine zentrale Rolle bei der Sensibilisierung für das Immuntoxin zuweisen [71]. Diese Isoform ist allerdings in den hier untersuchten gesunden Lymphozyten im Vergleich zu CLL-Zellen deutlich geringer exprimiert [2]. Die Wirkung von Bryostatin auf verschiedene PKC-Isoformen ist stark abhängig vom Zelltyp [82]. Es ist also durchaus denkbar, dass an CLL-Patienten nach intravenöser Infusion von Bryostatin eine anhaltende Depletion der normalerweise konstitutiv aktivierten Isoform beta auszulösen ist, so wie es unsere Daten aus den in vitro Experimenten vermuten lassen.

Die extrem lang anhaltende Depletion verschiedener PKC-Isoformen bis zu 3 Wochen nach Bryostatinbehandlung in Lymphozyten des peripheren Blutes in der vorgestellten Studie, lässt vermuten, dass Bryostatin in Knochenmark und Lymphknoten verstärkt und verlängert wirkt. Über einen Zeitraum von drei Wochen findet bereits ein erheblicher Austausch der Lymphozyten im

peripheren Blut statt. Eventuell wird also auch die PKC-Aktivität der neu gebildeten Lymphozyten durch die länger anhaltende Bryostatinwirkung in Knochenmark und Lymphknoten supprimiert.

4.10 Vergleich der Wirkung von BL22 mit HA22

Wir verglichen die Wirkung von BL22 und HA22 in Kombination mit Bryostatin. Dabei konnten wir keine verstärkte Wirksamkeit des neu entwickelten HA22 im Vergleich zu BL22 nachweisen.

Dies scheint im Widerspruch zu stehen zu den Untersuchungen von Salvatore et al., die eine stärkere Zytotoxizität von HA22 im Vergleich zu BL22 sowohl an Zelllinien als auch an primären B-Zellen nachweisen konnten [98].

Vermutlich war unsere Konzentration mit 1µg/ml Immuntoxin zu hoch gewählt, um die vermehrte Wirkstärke von HA22 nachzuweisen. Diese beruht auf einer erhöhten Bindungsaffinität zu CD22. Bei der hohen Konzentration des Immuntoxins waren die Bindungsstellen wahrscheinlich bereits bei BL22 relativ stark gesättigt und der Sättigungsgrad konnte durch das stärker bindende HA22 nicht weiter gesteigert werden. Salvatore et al. konnten die größten Unterschiede bei niedrigeren Konzentrationen von 10 und 100 ng/ml nachweisen. Zu gleichem Ergebnis kamen Decker et al. ([28], S. 2723) und konnten zeigen, dass bei Immuntoxinkonzentrationen von 1000 ng/ml beide Immuntoxine gleichermaßen toxisch auf primäre CLL-Zellen wirken, während HA22 bei Konzentrationen zwischen 10 ng/ml und 100 ng/ml deutlich wirksamer ist. Leider stand uns nur eine limitierte Menge beider Immuntoxine zur Verfügung, so dass wir die Versuche nicht mit niedrigeren Immuntoxin-konzentrationen wiederholen konnten. Wir konnten jedoch zeigen, dass Bryostatin auch die Zytotoxizität von HA22 verstärkt und gehen davon aus, dass niedrigere Konzentrationen von HA22 in Kombination mit Bryostatin eingesetzt werden können um die gleiche Wirkung wie BL22 zu erzielen.

Zudem spielen die Vorteile von HA 22 sicher im menschlichen Organismus mit einer Vielzahl von (gesunden) Zelltypen als Zielzellen eine weitaus größere Rolle als in reinen CLL-Kulturen, in denen ohnehin nur maligne CLL-Zellen als Bindungspartner vorhanden sind.

4.11 Ausblick

Wir gehen davon aus, dass die Zugabe von Bryostatin die Wirkung der CD22-Immuntoxine BL22 und HA22 bei CLL-Patienten in vivo verstärken kann. Aufgrund der Ergebnisse unserer Experimente in vitro denken wir, dass die Kombination dieser beiden Substanzen für therapierefraktäre CLL-Patienten eine ähnlich effektive Therapie darstellen könnte, wie die Monotherapie mit BL22/HA22 für Patienten mit Haarzelleukämie. Sowohl Bryostatin als auch BL22 wurden bereits an CLL-Patienten in klinischen Studien getestet und haben sich in ihrer Anwendung als sicher erwiesen. Wir halten ein sequentielles Therapieschema mit Vorbehandlung der Patienten mit Bryostatin erfolgversprechend, da die erwünschten Bryostatinwirkungen CD22-Hochregulation und PKC-Depletion lang anhaltend sind, während die unerwünschte Hochregulation antiapoptotischer Proteine im zeitlichen Verlauf zurückgeht. Die optimalen Zeitpunkte für die Gabe der beiden Substanzen, sowie die jeweiligen Dosen müssten sicher sorgfältig ermittelt werden. Problematisch im Hinblick auf die klinische Umsetzbarkeit unserer Ergebnisse ist vermutlich die variable Pharmakokinetik von Bryostatin, zumal die verschiedenen Bryostatineffekte stark dosisabhängig sind. Die erreichbaren Blutkonzentrationen nach Bryostatininfusion sind schwer vorherzusagen und interindividuellen Schwankungen unterworfen. Eventuell kann die erforderliche Konzentration nicht bei allen Patienten im peripheren Blut erreicht werden. Günstiger dürfte sich die Situation in Knochenmark und

Lymphknoten darstellen, wo durch Anreicherung höhere Bryostatinkonzentrationen erzielt werden können.

Aufgrund unserer Ergebnisse gehen wir davon aus, dass die Kombination sowohl eine Krankheitsprogression durch Abtötung proliferierender Zellen verhindern kann, als auch die protektive Wirkung verschiedener Milieufaktoren auf die malignen Zellen aufhebt und somit an verschiedenen Schlüsselstellen der Erkrankung ansetzen kann.

Zudem hat die Kombination aus BL22 und Bryostatin auch an verschiedenen Lymphomzelllinien gute Wirksamkeit gezeigt und es ist anzunehmen, dass auch Patienten mit B-Zelllymphomen von der kombinierten Therapie profitieren können.

Wir können allerdings nur spekulieren, dass sich unsere Ergebnisse auch auf die Bedingungen *in vivo* übertragen lassen. Um dies zu evaluieren, wären klinische Studien mit der Kombination beider Substanzen an CLL-Patienten und Patienten mit anderen malignen B-Zellerkrankungen nötig.

5 Zusammenfassung

In diesem Projekt konnten wir zeigen, dass sich die Wirkung der CD22-Immuntoxine BL22 und HA22 an CLL-Zellen in vitro durch die Zugabe von Bryostatin verstärken lässt. Wir konnten zwei verschiedene Mechanismen hierfür identifizieren. Zum einen erhöht Bryostatin unabhängig von der Grundexpression die CD22-Expression der CLL-Zellen und somit kann das Immuntoxin vermehrt an die Zellen gebunden und internalisiert werden. Zum anderen depletiert Bryostatin in hoher Konzentration verschiedene PKC-Isoformen, insbesondere PKC- β II, deren konstitutive Aktivierung eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der CLL spielt. Verschiedene Signalwege sind in CLL-Zellen PKC-abhängig konstitutiv aktiviert und tragen dadurch zur Apoptoseresistenz bei. Diese können durch die Bryostatin-induzierte PKC-Depletion unterbrochen werden, wodurch die Zellen sensibler für die zytotoxische Wirkung des Immuntoxins werden.

Ungünstig scheint die gleichzeitige Hochregulation antiapoptotischer Proteine durch Bryostatin, deren Einfluss auf die Immuntoxinwirkung nicht abschließend beurteilt werden kann. Sie kann jedoch durch eine sequentielle Gabe von Bryostatin und Immuntoxin teilweise umgangen werden, da die antiapoptotischen Veränderungen im zeitlichen Verlauf rückläufig sind, im Gegensatz zur lang anhaltenden CD22-Hochregulation und PKC-Depletion. Weiterhin konnten wir demonstrieren, dass die Kombination die protektive Wirkung von Stromazellen aufheben kann und ebenso an proliferierenden CLL-Zellen wirksam ist. Daneben zeigte sie auch gute Wirksamkeit an verschiedenen Lymphomzelllinien. Wir gehen also davon aus, dass die kombinierte Gabe von Bryostatin und BL22/HA22 einen erfolgversprechenden Ansatz zur Therapie refraktärer Patienten mit CLL und B-Zelllymphomen darstellt und erachten klinische Studien mit dieser Kombination für sinnvoll.

6 Vorveröffentlichungen

Ingo Ringshausen, Thomas Decker, Viola Biberacher, Christian Meyer zum Buschenfelde, Madlen Oelsner, Michaela Wagner, Christian Bogner and Christian Peschel, MD,
Bryostatin Enhances the Cytotoxic Effects of Anti-CD22 Immunotoxins in CLL by Two Distinct Mechanisms: Implications for a Sequential Therapy
Poster: Annual Meeting and Exposition am 12.12.2009, San Francisco, American Society of Hematology

Biberacher V*, Decker T*, Oelsner M, Wagner M, Bogner C, Schmidt B, Kreitman RJ, Peschel C, Pastan I, Meyer Zum Büschenfelde C, Ringshausen I
The cytotoxicity of anti-CD22 immunotoxin is enhanced by bryostatin 1 in B-cell lymphomas through CD22 upregulation and PKC- β II depletion
Haematologica. 2012 May;97(5):771-9. Epub 2011 Dec 16

* geteilte Erstautorenschaft

7 Literaturverzeichnis

1. *Biological Therapy Plus Monoclonal Antibody Therapy in Treating Patients With Relapsed or Refractory Non-Hodgkin's Lymphoma*. 2002 06.02.2009 [cited 2011 25.01.2011]; Available from: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00040950>.
2. Abrams, S.T., T. Lakum, K. Lin, G.M. Jones, A.T. Treweeke, M. Farahani, M. Hughes, M. Zuzel, and J.R. Slupsky, *B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia cells is regulated by overexpressed active protein kinase Cbetall*. *Blood*, 2007. **109**(3): p. 1193-201.
3. al-Katib, A., R.M. Mohammad, M. Dan, M.E. Hussein, A. Akhtar, G.R. Pettit, and L.L. Sensenbrenner, *Bryostatins 1-induced hairy cell features on chronic lymphocytic leukemia cells in vitro*. *Exp Hematol*, 1993. **21**(1): p. 61-5.
4. al-Katib, A., C.Y. Wang, S. McKenzie, B.D. Clarkson, and B. Koziner, *Phorbol ester-induced hairy cell features on chronic lymphocytic leukemia cells in vitro*. *Am J Hematol*, 1992. **40**(4): p. 264-9.
5. Almasri, N.M., R.E. Duque, J. Iturraspe, E. Everett, and R.C. Braylan, *Reduced expression of CD20 antigen as a characteristic marker for chronic lymphocytic leukemia*. *Am J Hematol*, 1992. **40**(4): p. 259-63.
6. Bang, S., S. Nagata, M. Onda, R.J. Kreitman, and I. Pastan, *HA22 (R490A) is a recombinant immunotoxin with increased antitumor activity without an increase in animal toxicity*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(4): p. 1545-50.
7. Barragan, M., C. Campas, B. Bellosillo, and J. Gil, *Protein kinases in the regulation of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Leuk Lymphoma*, 2003. **44**(11): p. 1865-70.

8. Barragan, M., M. de Frias, D. Iglesias-Serret, C. Campas, E. Castano, A.F. Santidrian, L. Coll-Mulet, A.M. Cosialls, A. Domingo, G. Pons, and J. Gil, *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. **80**(6): p. 1473-9.
9. Battle, T.E. and D.A. Frank, *STAT1 mediates differentiation of chronic lymphocytic leukemia cells in response to Bryostatins 1*. Blood, 2003. **102**(8): p. 3016-24.
10. Beckwith, M., D.L. Longo, C.D. O'Connell, C.M. Moratz, and W.J. Urba, *Phorbol ester-induced, cell-cycle-specific, growth inhibition of human B-lymphoma cell lines*. J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(6): p. 501-9.
11. Berger, D.P., *Das rote Buch Hämatologie und internistische Onkologie ; [mit 150 Therapie-Protokollen]*. 3., überarb. und erw. Aufl. ed. 2006, Landsberg/Lech: Ecomed Medizin. 1049 S.
12. Brinkmann, U., E. Mansfield, and I. Pastan, *Effects of BCL-2 overexpression on the sensitivity of MCF-7 breast cancer cells to ricin, diphtheria and Pseudomonas toxin and immunotoxins*. Apoptosis, 1997. **2**(2): p. 192-8.
13. Buggins, A.G. and C.J. Pepper, *The role of Bcl-2 family proteins in chronic lymphocytic leukaemia*. Leuk Res. **34**(7): p. 837-42.
14. Campana, D., G. Janossy, M. Bofill, L. Trejdosiewicz, D. Ma, A. Hoffbrand, D. Mason, A. Lebacqz, and H. Forster, *Human B cell development. I. Phenotypic differences of B lymphocytes in the bone marrow and peripheral lymphoid tissue*. The Journal of Immunology, 1985. **134**(3): p. 1524-1530.

15. Cerny, T., B. Borisch, M. Introna, P. Johnson, and A.L. Rose, *Mechanism of action of rituximab*. Anticancer Drugs, 2002. **13 Suppl 2**: p. S3-10.
16. Cesano, A. and U. Gayko, *CD22 as a target of passive immunotherapy*. Semin Oncol, 2003. **30**(2): p. 253-7.
17. Chen, L.S., K. Balakrishnan, and V. Gandhi, *Inflammation and survival pathways: chronic lymphocytic leukemia as a model system*. Biochem Pharmacol. **80**(12): p. 1936-45.
18. Cheng, E.H., M.C. Wei, S. Weiler, R.A. Flavell, T.W. Mak, T. Lindsten, and S.J. Korsmeyer, *BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis*. Mol Cell, 2001. **8**(3): p. 705-11.
19. Cheung, A.P., Y.F. Hallock, B.R. Vishnuvajjala, T. Nguyenle, and E. Wang, *Compatibility and stability of bryostatin 1 in infusion devices*. Investigational New Drugs, 1999. **16**(3): p. 227-236.
20. Chiorazzi, N., *Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells*. Best Pract Res Clin Haematol, 2007. **20**(3): p. 399-413.
21. Chiorazzi, N., K.R. Rai, and M. Ferrarini, *Chronic Lymphocytic Leukemia*. New England Journal of Medicine, 2005. **352**(8): p. 804-815.
22. Chipuk, J.E., T. Moldoveanu, F. Llambi, M.J. Parsons, and D.R. Green, *The BCL-2 family reunion*. Mol Cell. **37**(3): p. 299-310.
23. Cimmino, A., G.A. Calin, M. Fabbri, M.V. Iorio, M. Ferracin, M. Shimizu, S.E. Wojcik, R.I. Aqeilan, S. Zupo, M. Dono, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C.-g. Liu, T.J. Kipps, M. Negrini, and C.M. Croce, *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(39): p. 13944-13949.
24. Clamp, A. and G.C. Jayson, *The clinical development of the bryostatins*. *Anticancer Drugs*, 2002. **13**(7): p. 673-83.
25. Clark, E.A., *CD22, a B cell-specific receptor, mediates adhesion and signal transduction*. *J Immunol*, 1993. **150**(11): p. 4715-8.
26. Cross, T.G., D. Scheel-Toellner, N.V. Henriquez, E. Deacon, M. Salmon, and J.M. Lord, *Serine/threonine protein kinases and apoptosis*. *Exp Cell Res*, 2000. **256**(1): p. 34-41.
27. Decker, T., S. Hipp, R.J. Kreitman, I. Pastan, C. Peschel, and T. Licht, *Sensitization of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells to recombinant immunotoxin by immunostimulatory phosphorothioate oligodeoxynucleotides*. *Blood*, 2002. **99**(4): p. 1320-6.
28. Decker, T., M. Oelsner, R.J. Kreitman, G. Salvatore, Q.C. Wang, I. Pastan, C. Peschel, and T. Licht, *Induction of caspase-dependent programmed cell death in B-cell chronic lymphocytic leukemia by anti-CD22 immunotoxins*. *Blood*, 2004. **103**(7): p. 2718-26.
29. Decker, T., F. Schneller, T. Sparwasser, T. Tretter, G.B. Lipford, H. Wagner, and C. Peschel, *Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells*. *Blood*, 2000. **95**(3): p. 999-1006.
30. Del Gaizo Moore, V., J.R. Brown, M. Certo, T.M. Love, C.D. Novina, and A. Letai, *Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining*

- sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737*. The Journal of Clinical Investigation, 2007. **117**(1): p. 112-121.
31. Drexler, H.G., S.M. Gignac, R.A. Jones, C.S. Scott, G.R. Pettit, and A.V. Hoffbrand, *Bryostatins 1 induces differentiation of B-chronic lymphocytic leukemia cells*. Blood, 1989. **74**(5): p. 1747-57.
32. Du, X., R.J. Youle, D.J. Fitzgerald, and I. Pastan, *Pseudomonas exotoxin A-mediated apoptosis is Bak dependent and preceded by the degradation of Mcl-1*. Mol Cell Biol. **30**(14): p. 3444-52.
33. Dyer, M.J., P. Fischer, E. Nacheva, W. Labastide, and A. Karpas, *A new human B-cell non-Hodgkin's lymphoma cell line (Karpas 422) exhibiting both t(14;18) and t(4;11) chromosomal translocations*. Blood, 1990. **75**(3): p. 709-14.
34. Faul, M.M., J.R. Gillig, M.R. Jirousek, L.M. Ballas, T. Schotten, A. Kahl, and M. Mohr, *Acyclic N-(azacycloalkyl)bisindolylmaleimides: isozyme selective inhibitors of PKCbeta*. Bioorg Med Chem Lett, 2003. **13**(11): p. 1857-9.
35. Foon, K.A. and M.J. Hallek, *Changing paradigms in the treatment of chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia. **24**(3): p. 500-11.
36. Gavathiotis, E., M. Suzuki, M.L. Davis, K. Pitter, G.H. Bird, S.G. Katz, H.C. Tu, H. Kim, E.H. Cheng, N. Tjandra, and L.D. Walensky, *BAX activation is initiated at a novel interaction site*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1076-81.
37. Hanada, M., D. Delia, A. Aiello, E. Stadtmauer, and J. Reed, *bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1993. **82**(6): p. 1820-1828.

38. Hatta, Y., N. Tsuchiya, M. Matsushita, M. Shiota, K. Hagiwara, and K. Tokunaga, *Identification of the gene variations in human CD22*. Immunogenetics, 1999. **49**(4): p. 280-286.
39. Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira, *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. Nature, 2000. **408**(6813): p. 740-5.
40. Holler, C., J.D. Pinon, U. Denk, C. Heyder, S. Hofbauer, R. Greil, and A. Egle, *PKCbeta is essential for the development of chronic lymphocytic leukemia in the TCL1 transgenic mouse model: validation of PKCbeta as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2009. **113**(12): p. 2791-4.
41. Ito, T., X. Deng, B. Carr, and W.S. May, *Bcl-2 Phosphorylation Required for Anti-apoptosis Function*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(18): p. 11671-11673.
42. Jadayel, D.M., J. Lukas, E. Nacheva, J. Bartkova, G. Stranks, P.J. De Schouwer, D. Lens, J. Bartek, M.J. Dyer, A.R. Kruger, and D. Catovsky, *Potential role for concurrent abnormalities of the cyclin D1, p16CDKN2 and p15CDKN2B genes in certain B cell non-Hodgkin's lymphomas. Functional studies in a cell line (Granta 519)*. Leukemia, 1997. **11**(1): p. 64-72.
43. Jeon, H.J., C.W. Kim, T. Yoshino, and T. Akagi, *Establishment and characterization of a mantle cell lymphoma cell line*. Br J Haematol, 1998. **102**(5): p. 1323-6.
44. Jorge, C., W. Eric, and Q. Peter, *Newer monoclonal antibodies for hematological malignancies*. Experimental hematology, 2008. **36**(7): p. 755-768.
45. Kang, B.S., O.G. French, J.J. Sando, and C.S. Hahn, *Activation-dependent degradation of protein kinase C eta*. Oncogene, 2000. **19**(37): p. 4263-72.

46. Kehrl, J.H., A. Riva, G.L. Wilson, and C. Thévenin, *Molecular mechanisms regulating CD19, CD20 and CD22 gene expression*. Immunology today, 1994. **15**(9): p. 432-436.
47. Keppler-Hafkemeyer, A., U. Brinkmann, and I. Pastan, *Role of Caspases in Immunotoxin-Induced Apoptosis of Cancer Cells* Biochemistry, 1998. **37**(48): p. 16934-16942.
48. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
49. Kitada, S., J.M. Zapata, M. Andreeff, and J.C. Reed, *Bryostatins and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol, 1999. **106**(4): p. 995-1004.
50. Kitada, S., J.M. Zapata, M. Andreeff, and J.C. Reed, *Protein kinase inhibitors flavopiridol and 7-hydroxy-staurosporine down-regulate antiapoptosis proteins in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2000. **96**(2): p. 393-7.
51. Kortmansky, J. and G.K. Schwartz, *Bryostatins-1: a novel PKC inhibitor in clinical development*. Cancer Invest, 2003. **21**(6): p. 924-36.
52. Kreitman R. J. , M.S.T., S. E. Coutre, T. Robak, W. H. Wilson, M. Stetler-Stevenson, P. Noel, D. J. FitzGerald, J. T. McDevitt and I. Pastan, *Phase I trial of recombinant immunotoxin CAT-8015 (HA22) in multiply relapsed hairy cell leukemia*. Journal of Clinical Oncology, 2010 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition) American Society of Clinical Oncology, 2010. **28**(no. 15_suppl 6523).
53. Kreitman, R.J., I. Margulies, M. Stetler-Stevenson, Q.C. Wang, D.J. FitzGerald, and I. Pastan, *Cytotoxic activity of disulfide-stabilized recombinant immunotoxin*

- RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) toward fresh malignant cells from patients with B-cell leukemias.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(4): p. 1476-87.
54. Kreitman, R.J., D.R. Squires, M. Stetler-Stevenson, P. Noel, D.J. FitzGerald, W.H. Wilson, and I. Pastan, *Phase I trial of recombinant immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) in patients with B-cell malignancies.* J Clin Oncol, 2005. **23**(27): p. 6719-29.
55. Kreitman, R.J., M. Stetler-Stevenson, I. Margulies, P. Noel, D.J. Fitzgerald, W.H. Wilson, and I. Pastan, *Phase II trial of recombinant immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) in patients with hairy cell leukemia.* J Clin Oncol, 2009. **27**(18): p. 2983-90.
56. Kreitman, R.J., W.H. Wilson, K. Bergeron, M. Raggio, M. Stetler-Stevenson, D.J. FitzGerald, and I. Pastan, *Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia.* N Engl J Med, 2001. **345**(4): p. 241-7.
57. Kreitman, R.J., W.H. Wilson, J.D. White, M. Stetler-Stevenson, E.S. Jaffe, S. Giardina, T.A. Waldmann, and I. Pastan, *Phase I trial of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) in patients with hematologic malignancies.* J Clin Oncol, 2000. **18**(8): p. 1622-36.
58. Kreitman Robert J , M., Martin S. Tallman, MD, Steven Coutre, MD, Tadeusz Robak, MD, PhD, Wyndham H Wilson, MD, PhD, Maryalice Stetler-Stevenson, MD, PhD, Pierre Noel, MD, David J. FitzGerald, PhD, Manuela Buzoianu, PhD, Robert Lechleider, MD, Karen Kaucic, MD10 and Ira Pastan, MD, *Phase I Dose-Escalation Study of CAT-8015 (HA22), A CD22-Specific Targeted Immunotoxin, in Relapsed or Refractory Hairy Cell Leukemia* in American Society of Hematology, Annual meetings and expositions. 2009: New Orleans, LA.
59. Kreitman Robert J. , M., Wyndham H. Wilson*, Maryalice Stetler-Stevenson*, Pierre Noel*, David J. FitzGerald* and Ira Pastan, *Interim Phase I Results of Recombinant*

- Immunotoxin HA22 in Patients with Hairy Cell and Chronic Lymphocytic Leukemias in American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 2008: San Fransisco.*
60. Kurtova, A.V., K. Balakrishnan, R. Chen, W. Ding, S. Schnabl, M.P. Quiroga, M. Sivina, W.G. Wierda, Z. Estrov, M.J. Keating, M. Shehata, U. Jager, V. Gandhi, N.E. Kay, W. Plunkett, and J.A. Burger, *Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance.* Blood, 2009. **114**(20): p. 4441-50.
61. Lagneaux, L., A. Delforge, D. Bron, C. De Bruyn, and P. Stryckmans, *Chronic Lymphocytic Leukemic B Cells But Not Normal B Cells Are Rescued From Apoptosis by Contact With Normal Bone Marrow Stromal Cells.* Blood, 1998. **91**(7): p. 2387-2396.
62. Lee, H.W., L. Smith, G.R. Pettit, and J.B. Smith, *Bryostatins 1 and phorbol ester down-modulate protein kinase C- α and - ϵ via the ubiquitin/proteasome pathway in human fibroblasts.* Mol Pharmacol, 1997. **51**(3): p. 439-47.
63. Lee, H.W., L. Smith, G.R. Pettit, A. Vinitsky, and J.B. Smith, *Ubiquitination of protein kinase C- α and degradation by the proteasome.* J Biol Chem, 1996. **271**(35): p. 20973-6.
64. Leonard, J.P., M. Coleman, J.C. Ketas, A. Chadburn, S. Ely, R.R. Furman, W.A. Wegener, H.J. Hansen, H. Ziccardi, M. Eschenberg, U. Gayko, A. Cesano, and D.M. Goldenberg, *Phase I/II trial of epratuzumab (humanized anti-CD22 antibody) in indolent non-Hodgkin's lymphoma.* J Clin Oncol, 2003. **21**(16): p. 3051-9.

65. Leonard, J.P., M. Coleman, J.C. Ketas, A. Chadburn, R. Furman, M.W. Schuster, E.J. Feldman, M. Ashe, S.J. Schuster, W.A. Wegener, H.J. Hansen, H. Ziccardi, M. Eschenberg, U. Gayko, S.Z. Fields, A. Cesano, and D.M. Goldenberg, *Epratuzumab, a Humanized Anti-CD22 Antibody, in Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma*. *Clinical Cancer Research*, 2004. **10**(16): p. 5327-5334.
66. Leonard, J.P. and D.M. Goldenberg, *Preclinical and clinical evaluation of epratuzumab (anti-CD22 IgG) in B-cell malignancies*. *Oncogene*. **26**(25): p. 3704-3713.
67. Liu, N.S. and S. O'Brien, *Monoclonal antibodies in the treatment of chronic lymphocytic leukemia*. *Med Oncol*, 2004. **21**(4): p. 297-304.
68. Lovell, J.F., L.P. Billen, S. Bindner, A. Shamas-Din, C. Fradin, B. Leber, and D.W. Andrews, *Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax*. *Cell*, 2008. **135**(6): p. 1074-84.
69. Mackay, H.J. and C.J. Twelves, *Targeting the protein kinase C family: are we there yet?* *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(7): p. 554-562.
70. Mak, T.W. and W.C. Yeh, *Signaling for survival and apoptosis in the immune system*. *Arthritis Res*, 2002. **4 Suppl 3**: p. S243-52.
71. Marshall, J.L., N. Bangalore, D. El-Ashry, Y. Fuxman, M. Johnson, B. Norris, M. Oberst, E. Ness, S. Wojtowicz-Praga, P. Bhargava, N. Rizvi, S. Baidas, and M.J. Hawkins, *Phase I study of prolonged infusion Bryostatins-1 in patients with advanced malignancies*. *Cancer Biol Ther*, 2002. **1**(4): p. 409-16.

72. Mason, D., H. Stein, J. Gerdes, K. Pulford, E. Ralfkiaer, B. Falini, W. Erber, K. Micklem, and K. Gatter, *Value of monoclonal anti-CD22 (p135) antibodies for the detection of normal and neoplastic B lymphoid cells*. *Blood*, 1987. **69**(3): p. 836-840.
73. Messmer, B.T., D. Messmer, S.L. Allen, J.E. Kolitz, P. Kudalkar, D. Cesar, E.J. Murphy, P. Koduru, M. Ferrarini, S. Zupo, G. Cutrona, R.N. Damle, T. Wasil, K.R. Rai, M.K. Hellerstein, and N. Chiorazzi, *In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(3): p. 755-64.
74. Michels, J., P.W.M. Johnson, and G. Packham, *Mcl-1*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2005. **37**(2): p. 267-271.
75. Michie, A.M. and R. Nakagawa, *Elucidating the role of protein kinase C in chronic lymphocytic leukaemia*. *Hematol Oncol*, 2006. **24**(3): p. 134-8.
76. Miranda, R.N., J.B. Cousar, R.D. Hammer, R.D. Collins, and C.L. Vnencak-Jones, *Somatic mutation analysis of IgH variable regions reveals that tumor cells of most parafollicular (monocytoid) B-cell lymphoma, splenic marginal zone B-cell lymphoma, and some hairy cell leukemia are composed of memory B lymphocytes*. *Hum Pathol*, 1999. **30**(3): p. 306-12.
77. Mohammad, R.M., F.W. Beck, K. Katato, N. Hamdy, N. Wall, and A. Al-Katib, *Potentiation of 2-chlorodeoxyadenosine activity by bryostatin 1 in the resistant chronic lymphocytic leukemia cell line (WSU-CLL): association with increased ratios of dCK/5'-NT and Bax/Bcl-2*. *Biol Chem*, 1998. **379**(10): p. 1253-61.
78. Mohammad, R.M., K. Katato, V.P. Almatchy, N. Wall, K.Z. Liu, C.P. Schultz, H.H. Mantsch, M. Varterasian, and A.M. al-Katib, *Sequential treatment of human chronic*

- lymphocytic leukemia with bryostatin 1 followed by 2-chlorodeoxyadenosine: preclinical studies.* Clin Cancer Res, 1998. **4**(2): p. 445-53.
79. Mohammad, R.M., C. Limvarapuss, N. Hamdy, B.S. Dutcher, F.W. Beck, N.R. Wall, and A.M. Al-Katib, *Treatment of a de novo fludarabine resistant-CLL xenograft model with bryostatin 1 followed by fludarabine.* Int J Oncol, 1999. **14**(5): p. 945-50.
80. Montserrat, E., *Monoclonal antibodies in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: if only it were simple.* Blood, 2004. **103**(5): p. 1567-a-1568.
81. Mussai, F., D. Campana, D. Bhojwani, M. Stetler-Stevenson, S.M. Steinberg, A.S. Wayne, and I. Pastan, *Cytotoxicity of the anti-CD22 immunotoxin HA22 (CAT-8015) against paediatric acute lymphoblastic leukaemia.* British Journal of Haematology. **150**(3): p. 352-358.
82. Mutter, R. and M. Wills, *Chemistry and clinical biology of the bryostatins.* Bioorg Med Chem, 2000. **8**(8): p. 1841-60.
83. O'Brien, S., A. del Giglio, and M. Keating, *Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 1995. **85**(2): p. 307-18.
84. O'Gorman, D.M. and T.G. Cotter, *Molecular signals in anti-apoptotic survival pathways.* Leukemia, 2001. **15**(1): p. 21-34.
85. Parekh, D.B., W. Ziegler, and P.J. Parker, *Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation.* EMBO J, 2000. **19**(4): p. 496-503.
86. Parker, P.J., L. Bosca, L. Dekker, N.T. Goode, N. Hajibagheri, and G. Hansra, *Protein kinase C (PKC)-induced PKC degradation: a model for down-regulation.* Biochem Soc Trans, 1995. **23**(1): p. 153-5.

87. Pastan, I., R. Hassan, D.J. Fitzgerald, and R.J. Kreitman, *Immunotoxin therapy of cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(7): p. 559-565.
88. Pavlick, A.C., J. Wu, J. Roberts, M.A. Rosenthal, A. Hamilton, S. Wadler, K. Farrell, M. Carr, D. Fry, A.J. Murgo, R. Oratz, H. Hochster, L. Liebes, and F. Muggia, *Phase I study of bryostatin 1, a protein kinase C modulator, preceding cisplatin in patients with refractory non-hematologic tumors*. Cancer Chemother Pharmacol, 2009. **64**(4): p. 803-10.
89. Rai KR, K.M., *Initial treatment of chronic lymphocytic leukemia*. 2010.
90. Rai KR, K.M., *Pathophysiology and cytogenetics of chronic lymphocytic leukemia*. 2010.
91. Rai KR, K.M., , uptodate online Version 18.3, September 2010
[http://www.uptodate.com.eaccess.ub.tum.de/online/content/topic.do?topicKey=leukemia/12356&source=see link](http://www.uptodate.com.eaccess.ub.tum.de/online/content/topic.do?topicKey=leukemia/12356&source=see_link), Zugriff am 20.12.2010, *Clinical manifestations of Chronic lymphocytic leukemia*. 2010.
92. Ringshausen, I., M. Oelsner, K. Weick, C. Bogner, C. Peschel, and T. Decker, *Mechanisms of apoptosis-induction by rottlerin: therapeutic implications for B-CLL*. Leukemia, 2006. **20**(3): p. 514-20.
93. Ringshausen, I., F. Schneller, C. Bogner, S. Hipp, J. Duyster, C. Peschel, and T. Decker, *Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta*. Blood, 2002. **100**(10): p. 3741-8.

94. Robbins, D.H., I. Margulies, M. Stetler-Stevenson, and R.J. Kreitman, *Hairy Cell Leukemia, a B-Cell Neoplasm That Is Particularly Sensitive to the Cytotoxic Effect of Anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2)*. *Clinical Cancer Research*, 2000. **6**(2): p. 693-700.
95. Roberts, J.D., M.R. Smith, E.J. Feldman, L. Cragg, M.M. Millenson, G.J. Roboz, C. Honeycutt, R. Thune, K. Padavic-Shaller, W.H. Carter, V. Ramakrishnan, A.J. Murgo, and S. Grant, *Phase I study of bryostatin 1 and fludarabine in patients with chronic lymphocytic leukemia and indolent (non-Hodgkin's) lymphoma*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(19): p. 5809-16.
96. RON, D. and M.G. KAZANIETZ, *New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors*. *The FASEB Journal*, 1999. **13**(13): p. 1658-1676.
97. Ruvolo, P.P., X. Deng, and W.S. May, *Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis*. *Leukemia*, 2001. **15**(4): p. 515-22.
98. Salvatore, G., R. Beers, I. Margulies, R.J. Kreitman, and I. Pastan, *Improved Cytotoxic Activity toward Cell Lines and Fresh Leukemia Cells of a Mutant Anti-CD22 Immunotoxin Obtained by Antibody Phage Display*. *Clinical Cancer Research*, 2002. **8**(4): p. 995-1002.
99. Shimazu, T., K. Degenhardt, E.K.A. Nur, J. Zhang, T. Yoshida, Y. Zhang, R. Mathew, E. White, and M. Inouye, *NBK/BIK antagonizes MCL-1 and BCL-XL and activates BAK-mediated apoptosis in response to protein synthesis inhibition*. *Genes Dev*, 2007. **21**(8): p. 929-41.
100. Smith, B.D., R.J. Jones, E. Cho, J. Kowalski, J.E. Karp, S.D. Gore, M. Vala, B. Meade, S.D. Baker, M. Zhao, S. Piantadosi, Z. Zhang, G. Blumenthal, E.D. Warlick, R.A. Brodsky, A. Murgo, M.A. Rudek, and W.H. Matsui, *Differentiation therapy in poor*

- risk myeloid malignancies: Results of a dose finding study of the combination bryostatin-1 and GM-CSF.* Leukemia Research. **35**(1): p. 87-94.
101. Snowden, R.T., X.M. Sun, M.J. Dyer, and G.M. Cohen, *Bisindolylmaleimide IX is a potent inducer of apoptosis in chronic lymphocytic leukaemic cells and activates cleavage of Mcl-1.* Leukemia, 2003. **17**(10): p. 1981-9.
102. Strauss, S.J., F. Morschhauser, J. Rech, R. Repp, P. Solal-Celigny, P.L. Zinzani, A. Engert, B. Coiffier, D.F. Hoelzer, W.A. Wegener, N.K. Teoh, D.M. Goldenberg, and T.A. Lister, *Multicenter phase II trial of immunotherapy with the humanized anti-CD22 antibody, epratuzumab, in combination with rituximab, in refractory or recurrent non-Hodgkin's lymphoma.* J Clin Oncol, 2006. **24**(24): p. 3880-6.
103. Tedder, T.F., J. Tuscano, S. Sato, and J.H. Kehrl, *CD22, a B lymphocyte-specific adhesion molecule that regulates antigen receptor signaling.* Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 481-504.
104. Thomas, A., C. Pepper, T. Hoy, and P. Bentley, *Bryostatin induces protein kinase C modulation, Mcl-1 up-regulation and phosphorylation of Bcl-2 resulting in cellular differentiation and resistance to drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells.* Leuk Lymphoma, 2004. **45**(5): p. 997-1008.
105. Varterasian, M.L., R.M. Mohammad, D.S. Eilender, K. Hulburd, D.H. Rodriguez, P.A. Pemberton, J.M. Pluda, M.D. Dan, G.R. Pettit, B.D. Chen, and A.M. Al-Katib, *Phase I study of bryostatin 1 in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia.* J Clin Oncol, 1998. **16**(1): p. 56-62.
106. Varterasian, M.L., R.M. Mohammad, M.S. Shurafa, K. Hulburd, P.A. Pemberton, D.H. Rodriguez, V. Spadoni, D.S. Eilender, A. Murgo, N. Wall, M. Dan, and A.M. Al-Katib,

- Phase II trial of bryostatin 1 in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(3): p. 825-8.
107. Virchis, A., K. Ganeshaguru, S. Hart, D. Jones, L. Fletcher, F. Wright, R. Wickremasinghe, A. Man, K. Csermak, T. Meyer, D. Fabbro, K. Champain, A. Yap, H.G. Prentice, and A. Mehta, *A novel treatment approach for low grade lymphoproliferative disorders using PKC412 (CGP41251), an inhibitor of protein kinase C.* Hematol J, 2002. **3**(3): p. 131-6.
108. Visser, L.P., S., *Induction of B-cell chronic lymphocytic leukaemia and hairy cell leukaemia like phenotypes by phorbol ester treatment of normal peripheral blood B-cells.* Br J Haematol, 1990. **75**(3): p. 359-65.
109. Warren, T.L. and G.J. Weiner, *Synergism between cytosine-guanine oligodeoxynucleotides and monoclonal antibody in the treatment of lymphoma.* Semin Oncol, 2002. **29**(1 Suppl 2): p. 93-7.
110. Willis, S.N., L. Chen, G. Dewson, A. Wei, E. Naik, J.I. Fletcher, J.M. Adams, and D.C.S. Huang, *Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins.* Genes & Development, 2005. **19**(11): p. 1294-1305.
111. Winter, J.N., D. Variakojis, and A.L. Epstein, *Phenotypic analysis of established diffuse histiocytic lymphoma cell lines utilizing monoclonal antibodies and cytochemical techniques.* Blood, 1984. **63**(1): p. 140-6.
112. Zhang, X., R. Zhang, H. Zhao, H. Cai, K.A. Gush, R.G. Kerr, G.R. Pettit, and A.S. Kraft, *Preclinical pharmacology of the natural product anticancer agent bryostatin 1, an activator of protein kinase C.* Cancer Res, 1996. **56**(4): p. 802-8.

113. Zhao, M., M.A. Rudek, P. He, B.D. Smith, and S.D. Baker, *Validation and implementation of a method for determination of bryostatin 1 in human plasma by using liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Anal Biochem, 2005. **337**(1): p. 143-8.
114. Zhuang, J. and H.J.M. Brady, *Emerging role of Mcl-1 in actively counteracting BH3-only proteins in apoptosis*. Cell Death Differ, 2006. **13**(8): p. 1263-1267.
115. zum Buschenfelde, C.M., M. Wagner, G. Lutzny, M. Oelsner, Y. Feuerstacke, T. Decker, C. Bogner, C. Peschel, and I. Ringshausen, *Recruitment of PKC-beta11 to lipid rafts mediates apoptosis-resistance in chronic lymphocytic leukemia expressing ZAP-70*. Leukemia. **24**(1): p. 141-52.