

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

III. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar

Interleukin-21 und CpG-Oligonukleotide:
Untersuchungen zur Apoptoseinduktion bei
B-Zell chronisch lymphatischer Leukämie

In vitro Charakterisierung der intrazellulären Signalwege

Angela Lacknermeier

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. A. Krackhardt

Die Dissertation wurde am 12.04.2013 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.06.2014 angenommen.

Interleukin-21 und CpG-Oligonukleotide:
Untersuchungen zur Apoptoseinduktion bei
B-Zell chronisch lymphatischer Leukämie

In vitro Charakterisierung der intrazellulären Signalwege

Angela Lacknermeier

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1 Chronisch lymphatische Leukämie	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiopathogenese.....	1
1.1.3 Klassifikation	4
1.1.4 Klinik.....	5
1.1.5 Diagnostik	6
1.1.6 Therapie	6
1.1.7 Prognose	8
1.2 Apoptose.....	10
1.2.1 Intrinsischer Apoptoseweg	11
1.2.2 Extrinsischer Apoptoseweg.....	13
1.2.3 Bcl-2-Proteinfamilie	15
1.2.4 Caspasen	17
1.2.5 Inhibitoren der Apoptose	17
1.2.6 z-VAD-fmk	18
1.3 Zellzyklus.....	18
1.4 Interleukin-21 (IL-21)	22
1.5 IL-21-Rezeptor	24
1.6 CpG-Oligonukleotide	25

1.7	Stroma	26
1.8	Problemstellung.....	28
2.	Material und Methoden	29
2.1	Geräte	29
2.2	Verbrauchsmaterial	32
2.3	Chemikalien	33
2.4	Substanzen.....	37
2.5	Antikörper.....	38
2.5.1	Primäre Antikörper	38
2.5.2	Sekundäre Antikörper	40
2.6	Primer	40
2.7	Additiva, Puffer, Lösungen.....	41
2.8	Gele.....	44
2.9	Zellseparation	45
2.9.1	B-CLL-Zellen.....	45
2.9.2	Nicht-maligne B-Zellen.....	47
2.10	Zellkultur.....	47
2.11	Durchflusszytometrie	48
2.11.1	Prinzip	48
2.11.2	Annexin V/PI	49
2.11.3	Mitochondriales Membranpotential ($\Delta\Psi_m$)	50
2.11.4	ZAP-70.....	50
2.11.5	IL-21-Rezeptor	51
2.11.6	Caspase-3-Aktivität.....	51
2.12	Immunoblot.....	52
2.12.1	Prinzip	52
2.12.2	Durchführung.....	53

2.13	Semiquantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	55
2.13.1	Prinzip	55
2.13.2	Durchführung.....	56
2.13.2.1	RNA-Isolation mit Absolutely RNA Miniprep Kit	56
2.13.2.2	cDNA-Synthese mit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR	57
2.13.2.3	PCR.....	58
2.14	Statistische Analyse	59
3.	Ergebnisse	60
3.1	Wirkung von IL-21 und CpG auf B-CLL-Zellen	60
3.2	Wirkung von IL-21 und CpG auf die IL-21-Rezeptorexpression.....	67
3.2.1	PCR	67
3.2.2	Western-Blot.....	68
3.2.3	Durchflusszytometrie	70
3.3	Einfluss von IL-21 und CpG auf die intrazellulären Signalwege.....	73
3.3.1	Signal transducers and activators of transcription (STATs)	73
3.3.2	Proteine der Bcl-2-Familie und Caspasen	75
3.3.2.1	Extrinsischer Apoptoseweg.....	75
3.3.2.2	Intrinsischer Apoptoseweg	77
3.3.3	Effektorcaspasen-Aktivierung.....	80
3.3.4	Hemmung der Caspasenaktivierung durch z-VAD-fmk	82
3.4	Wirkung von IL-21 und CpG auf B-CLL-Zellen unter protektiver Stromazellkokultur	83
3.5	Wirkung von IL-21 und CpG auf nicht-maligne B-Zellen	85
3.6	Wirkung von IL-21 und CpG auf die Zellzyklusregulation von B-CLL-Zellen	87

4.	Diskussion.....	89
4.1	Diversität des Patientenmaterials	89
4.2	Problematik der Methoden	90
4.2.1	IL-21-Rezeptordetektion	90
4.2.2	Caspasenaktivierung	91
4.3	Kritische Beurteilung der Ergebnisse unter Würdigung der Literatur.....	93
4.3.1	Unterschiedliche Reaktion ZAP-70-positiver und ZAP-70-negativer Zellen auf CpG	93
4.3.2	Wirkung von CpG auf STATs und weiterführende Signalwege.....	96
4.3.3	Wirkung von IL-21 auf B-CLL-Zellen	97
4.3.4	Wirkung von IL-21 und CpG auf B-CLL-Zellen	100
4.3.5	Wirkung von IL-21 und CpG auf B-CLL-Zellen mit Stromazellkontakt	102
4.3.6	Wirkung von IL-21 und CpG auf nicht-maligne B-Zellen.....	103
4.3.7	Regulation von Mcl-1 durch IL-21 und CpG	105
4.3.8	Wirkung von IL-21 und CpG auf die Zellzyklusregulation von B-CLL- Zellen.....	105
5.	Zusammenfassung.....	107
6.	Literaturverzeichnis	109
7.	Dank	141

Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1.1 Stadieneinteilung nach Binet und Rai.....	5
Abbildung 1.1 Intrinsischer Apoptoseweg, modifiziert nach <i>Cell Signaling</i>	12
Abbildung 1.2 Extrinsischer Apoptoseweg, modifiziert nach <i>SA Bioscience</i>	14
Abbildung 1.3 Bcl-2-Proteinfamilie, modifiziert nach <i>nature</i>	16
Abbildung 1.4 Zellzyklusregulation, modifiziert nach <i>SA Bioscience</i>	20
Abbildung 3.1 Repräsentative Darstellung eines Annexinassays	61
Abbildung 3.2 IL-21-Titrationsexperimente im Annexinassay.....	62
Abbildung 3.3 IL-21 Zeitkinetik-Experimente im Annexinassay	63
Abbildung 3.4 Koinkubation von IL-21 und CpG-Oligonukleotiden im Annexinassay.....	64
Abbildung 3.5 Differenzierung der Wirkung von CpG-Oligonukleotiden und IL-21 auf B-CLL-Zellen abhängig von ihrem ZAP-70 Status im Annexinassay	65
Abbildung 3.6 IL-21-Rezeptorexpression in der PCR (T ₀)	67
Abbildung 3.7 IL-21-Rezeptorexpression im Immunoblot (T ₀).....	68
Abbildung 3.8 IL-21-Rezeptorexpression nach Koinkubation mit CpG und IL-21 im Immunoblot.....	69
Abbildung 3.9 IL-21-Rezeptorexpression nach Koinkubation mit CpG und IL-21 in der Durchflusszytometrie.....	72
Abbildung 3.10 STAT-Expression im Immunoblot (T ₀).....	73
Abbildung 3.11 STAT-Expression nach Koinkubation mit CpG und IL-21 im Immunoblot.....	74
Abbildung 3.12 Procaspase-8-Expression im Immunoblot.....	75
Abbildung 3.13 Expression von Proteinen des instrinsischen Apoptoseweges im Immunoblot.....	77
Abbildung 3.14 Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) in der Durchflusszytometrie	79
Abbildung 3.15 Expression von Procaspase-9, Procaspase-8 und Procaspase-3 sowie Caspaseinhibitor XIAP im Immunoblot.	80
Abbildung 3.16 Caspase-3-Aktivität in der Durchflusszytometrie.....	81
Abbildung 3.17 Hemmung der Apoptose durch z-VAD-fmk in der Durchflusszytometrie	83

Abbildung 3.18 Wirkung von Stromazellkontakt auf B-CLL-Zellen unter Koinkubation von IL-21 und CpG-Oligonukleotiden im Annexinassay .84	
Abbildung 3.19 Wirkung von IL-21 und CpG auf nicht-maligne B-Lymphozyten im Annexinassay.....86	
Abbildung 3.20 Expression des Zellzyklusregulators p27 im Immunoblot.....87	

Abkürzungsverzeichnis

Apaf-1	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bak	Bcl-2 killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xl	Bcl-2 like 1
BCR	B-cell receptor
BH 1–4	Bcl-2 homology 1–4
Bid	BH3-interacting-domain death agonist
Bim	Bcl-2-interacting mediator of cell death
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCL19/21	chemokine (C-C motif) ligand 19/21
CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7
CD	cluster of differentiation
CDK	cyclin dependent kinase
cDNA	copy deoxyribonucleic acid
c-FLIP	cellular FLICE-like inhibitory protein
CpG	unmethylierte Cytosin-Phosphat-Guanin-Insel
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotential
DiOC ₆ (3)	3,3'-Dihexyloxycarbocyanin-Jodid
DISC	death induced signal complex

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure/desoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Erk	extracellular signal-regulated kinases
FACS	fluorescence activated cell sorting
FADD	fas-associated death domain
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLICE	FADD-like ICE
FS	foreward scatter
g	Gramm
Hb	Hämoglobin
HCl	Hydrogenchlorid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
IAP	inhibitor of apoptosis
ICE	interleukin-1 beta-converting enzyme
IFN α/γ	Interferon α/γ
IgG/IgE	Immunglobulin G/E
IgV _H	variabler Teil der Schwere Kette eines Immun- globulins
IL	Interleukin
Ink4	inhibitors of CDK4
Jak	Januskinase
Ki-67	Proliferationsmarker
Kip	kinase inhibitor protein
LPS	Lipopolysaccharide
Mcl-1	myeloid cell leukemia 1
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
mind.	mindestens

ml	Milliliter
mM	millimolar
mV	Millivolt
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PHA	Polyhydroxyalkanoate
phospho-Bcl-2	phosphoryliertes Bcl-2
phospho-STAT1/3/5	phosphoryliertes STAT1/3/5
p21/27/53	Protein 21/27/53
PI	Propidiumjodid
PI-9	Proteinaseinhibitor-9
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pS727/694	phosphorylierter Serinrest 727/694
Puma	p53-upregulated modulator of apoptosis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pY701/705	phosphorylierter Tyrosinrest 701/705
Rb	Retinoblastomgen
rpm	revolutions per minute
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion)
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
smac/DIABLO	second mitochondria-derived activator of caspase
sog.	sogenannt
SS	side scatter
STAT	signal transducers and activators of transcription

TAE	Tris-acetat-EDTA
tBid	truncated Bid
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	tumor growth factor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITON X-100	Octoxinol-9
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling
Tween 20/Polysorbat 20	Polyoxyethylen (20)-sorbitan-monolaurat
u.a.	unter anderem
V	Volt
VDAC	voltage dependent anion channel
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsor- ganisation)
WinMDI	Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry
XIAP	x-linked inhibitor of apoptosis
ZAP-70	zeta-chain-associated protein kinase 70
z.B.	zum Beispiel
z-VAD-fmk	carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketon

1. Einleitung

1.1 Chronisch lymphatische Leukämie

1.1.1 Epidemiologie

Die chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp (B-CLL) ist die häufigste Leukämie der westlichen Welt. In Deutschland liegt die Inzidenz derzeit bei 3:100.000 pro Jahr (Innere Medizin, 2009, 75).

Die B-CLL ist eine Erkrankung des höheren Alters, da 90 Prozent der Patienten bei der Erstdiagnose 50 Jahren oder älter sind. Dem entsprechend nimmt die Inzidenz bei älteren Menschen zu. Von 100.000 Menschen im 8. Lebensjahrzehnt erkranken pro Jahr durchschnittlich 30 (Pschyrembel, 2004, 1037; Innere Medizin, 2009, 75).

Die CLL zählt zu den Non-Hodgkin-Lymphomen. In 95 Prozent der Fälle geht die Erkrankung von B-Zellen aus (Pschyrembel, 2004, 1037).

Man grenzt die B-CLL sowohl nach der Kiel-, als auch nach der aktuellen WHO-Klassifikation von anderen Non-Hodgkin-Lymphomen ab (Pschyrembel, 2004, 1037).

1.1.2 Ätiopathogenese

Die Ätiologie der Erkrankung ist nicht vollständig geklärt, jedoch scheint eine genetische Disposition zu bestehen, da Kinder von CLL-Patienten eine dreifach erhöhte Wahrscheinlichkeit haben, später ebenfalls an einem Lymphom zu erkranken (Kompetenznetz maligne Lymphome).

Bisher sind keine spezifischen auslösenden Faktoren bekannt, jedoch tragen mutagene Stoffe wie ionisierende Strahlen, Pestizide oder Zigarrettenrauch auch im Fall der CLL zur Malignomentstehung bei (Deutsche Krebshilfe e.V., 2007).

Genotypisch ist die Erkrankung heterogen, jedoch gibt es Veränderungen im Erbgut, die häufig bei CLL-Patienten festgestellt werden können. So erwerben die Hälfte aller B-CLL-Patienten eine 13q14.3-Deletion, die mit einer verminderten Expression von miR-15 und miR-16 und einer Überexpression von Bcl-2 einhergeht (Calin GA. et al., 2002, 15525f; Cimmino A. et al., 2005, 13946). Deletionen in den Chromosomen 6, 11 und 17 – die letztere betrifft das Tumorsuppressorgen p53 – sowie Trisomie 12 treten ebenfalls vermehrt auf (Deutsche Krebshilfe e.V., 2007; Döhner H. et al., 2000, 1911; Döhner H. et al., 1995, 1581–1583).

Im Verlauf der Erkrankung nimmt die relative und absolute Zellzahl von CD5-, CD19-, CD20- und CD23-positiven Zellen zu, da der B-Zellklon aufgrund aberranter Proliferation sowie gestörten Apoptosemechanismen im Organismus akkumuliert (Zwiebel JA. et al., 1998, 46).

Eine erhöhte Apoptoseresistenz des malignen Klons wird durch verschiedene Mechanismen vermittelt. Einer davon besteht in der CD40-CD40-Ligand-Bindung zwischen B-CLL-Zellen und CD4-positiven T-Zellen, die in infiltrierte lymphatische Organe gehäuft vorkommen. Dabei kommt es in den CLL-Zellen zur Hochregulation des anti-apoptotisch wirksamen Proteins Survivin, das Effektorcaspasen-3 und -7 hemmen kann. (Granziero L. et al., 2001, 2780; Tamm I. et al., 1998, 5318)

Weitere molekulare Ursachen dieser Apoptoseresistenz können zum Teil in der häufig beschriebenen Überexpression von Bcl-2 und Mcl-1 in CLL-Zellen vermutet werden, die somit das Verhältnis von anti- und pro-apoptotischen Proteinen verschiebt (Kitada S. et al., 1998, 3381; Pepper C. et al., 2008, 3810).

Auch der Kontakt zu Stroma oder dendritischen Zellen kann die Regulation des programmierten Zelltodes beeinflussen (Lagneaux L. et al., 1999, 448).

Mittlerweile ist die Existenz sogenannter Proliferationszentren in Lymphknoten und Knochenmark akzeptiert, die für die Proliferation und Akkumulation der malignen CLL-Klone mitverantwortlich gemacht werden (Caligaris-Cappio F. et al., 2008, 4499 f.).

Diese Proliferationszentren sind in der Lage den Pool der proliferativ inaktiven Zellen des peripheren Blutes aufzufüllen und so die Erkrankung zu unterhalten. B-CLL Zellen

rezirkulieren in diese Proliferationszentren, treten in Kontakt mit T-Zellen (Ghia P. et al., 2002, 1407 ff.), dendritischen Zellen (Schmid C. et al., 1994, 448 ff.) und Stromazellen (Burger JA. et al., 1999, 3660 ff.) und erlangen z.B. über Zytokine wie IL-2 erneut proliferatives Potential durch Hochregulation kostimulatorischer Moleküle (Caligaris-Cappio F. et al., 2008, 449 f.; Decker T. et al., 2000, 560–561).

B-CLL-Zellen sind zytologisch und immunphänotypisch reifen, aktivierten B-Lymphozyten ähnlich und es lassen sich zwei Typen unterscheiden.

In Keimzentren kommt es zu Hypermutation und Immunglobulin-Klassenwechsel bei B-Lymphozyten (Kepler TB. et al., 1993, 37). B-CLL-Zellen existieren als pre-Germinal Center Zellen mit unmutierten IgV_H-Genen oder als post-Germinal Center B-CLL-Zellen mit mutierten IgV_H (Fais F. et al., 1998, 1517–1518).

Es konnte gezeigt werden, dass ZAP-70 (zeta-chain-associated protein, 70 kDa), ein Protein physiologischerweise assoziiert mit dem T-Zellrezeptor von T-Zellen, in CLL-Zellen mit unmutiertem IgV_H-Status signifikant höher exprimiert wird als bei B-CLL Zellen mit mutiertem IgV_H-Genstatus (Rassenti LZ. et al., 2004, 896 ff.).

ZAP-70 ist ein 70 kDa großes Protein, das intrazellulär an aktivierte Rezeptorproteine bindet, aktivierend phosphoryliert werden kann und so zur Signaltransduktion beiträgt. Bisher wurde es hauptsächlich in T-Zellen (Chan AC. et al., 1992, 650), aber auch in NK-Zellen (Chan AC. et al., 1992, 650; Jevremovic D. et al., 2001, 7721) und B-Zellen verschiedenen Aktivierungsstatus und bei verschiedenen B-Zell-Leukämien gefunden (Scielzo et al., 2006, 691 ff.).

ZAP-70-positive Zellen tragen meist zusätzlich das Antigen CD38 auf ihrer Zelloberfläche. CD38 spielt ebenfalls in der intrazellulären Signaltransduktion eine Rolle. Seine Aktivierung führt zum Einwandern der B-CLL-Zellen in die Lymphknoten und deren Proliferation. (Malavasi F. et al., 2011, 3473).

Rassenti et al. konnten zeigen, dass 71 Prozent der Patienten mit unmutierten schweren Antikörperkettengenen ZAP-70-positiv waren, während 83 Prozent der Träger von solchen Mutationen ZAP-70-negativ waren (Rassenti LZ. et al., 2004, 896 ff.) und meist kein CD38 auf ihrer Oberfläche exprimierten (Chiorazzi N. et al., 2005, 811; Kröber A. et al., 2002, 1413). ZAP-70 scheint somit als Surrogatmarker für den IgV_H-Genstatus fungieren zu können.

1.1.3 Klassifikation

Es existieren zwei klinisch gebräuchliche Stadieneinteilungen: Die Klassifikation nach Binet sowie die Klassifikation nach Rai.

Binet unterscheidet die Stadien A, B und C, die sich auf die Anzahl der betroffenen Lymphknotenareale, Hämoglobinwert und Thrombozytenzahl beziehen.

Rai trägt mit seinen Stadien 0 bis IV der zunehmenden Auswirkung der Lymphozytose auf verschiedene Organe (Blut, Knochenmark, Lymphknoten, Leber und Milz) Rechnung und bezieht – ähnlich wie Binet – Hämoglobin- und Thrombozytenwerte als prognostische Parameter in seine Einteilung mit ein (Pschyrembel, 2004, 1037).

Binet-Stadium	Klinische Parameter	medianes Überleben
A	< 3 befallene Areale Hb > 10 g/dl Thrombozyten > 100.000/ μ l	> 10 Jahre
B	mind. 3 befallene Areale Hb > 10 g/dl Thrombozyten > 100.000/ μ l	ca. 7 Jahre
C	mind. 3 befallene Areale Hb < 10 g/dl Thrombozyten < 100.000/ μ l	ca. 5 Jahre

Rai-Stadium	Klinische Parameter	medianes Überleben
0	Lymphozytose in Blut/ KM	> 15 Jahre
I	Lymphozytose in Blut/ KM Lymphadenopathie	ca. 9 Jahre
II	Lymphozytose in Blut/ KM Hepato- und/oder Spleno- megalie	ca. 7 Jahre
III	Lymphozytose in Blut/ KM Anämie (Hb < 11 g/dl)	ca. 5 Jahre
IV	Lymphozytose in Blut/ KM Thrombozytopenie (< 100.000/ μ l)	ca. 5 Jahre

Hb: Hämoglobin; Areale: Lymphknoten, Leber, Milz; KM: Knochenmark

Tabelle 1.1 Stadieneinteilung nach Binet und Rai, Quelle: Pschyrembel, 2004, 1037

1.1.4 Klinik

Der klinische Verlauf der CLL ist vielfältig und individuell. Im Frühstadium fehlen häufig spezifische Symptome, so dass es nicht selten zu einem Zufallsbefund bei Blutbilduntersuchungen kommt. Dabei zeigt der Laborbefund eine Leukozytose mit einem Lymphozytenanteil von meist 70 bis 95 Prozent. (Herold Innere Medizin, 2009, 76)

Auch in Knochenmarksbiopsaten können, nach histologischer Aufarbeitung, regelmäßig Veränderungen festgestellt werden. Bei der B-CLL besteht eine Knochenmarksinfiltration von in der Regel mehr als 30 Prozent (Das Rote Buch, 1997, 260; Kalil N. et al., 2000, 9).

Ursachen von Symptomen, die verstärkt in fortgeschrittenen Krankheitsstadien auftreten, sind unter anderem die massive Akkumulation von nicht funktionsfähigen B-Lymphozyten, die die Produktion anderer Zellreihen im Knochenmark verdrängen. Klinische Merkmale davon sind Blässe und Schwäche aufgrund der regelmäßig bestehenden Anämie, petechiale Blutungen durch die Thrombozytopenie sowie erhöhte Infektanfälligkeit aufgrund der resultierenden Granulozytopenie sowie einem oft bestehen-

dem Antikörpermangelsyndrom (Das Rote Buch, 1997, 261; Kompetenznetz Maligne Lymphome).

Die Akkumulation der CLL-Zellen führt häufig zu Organvergrößerungen von Milz (Splenomegalie) und Leber (Hepatomegalie) sowie zu einer lokalen bis generalisierten Lymphadenopathie (Pschyrembel, 2004, 1037).

Eine weitere Symptomgruppe, die bereits in einem frühen Stadium zu einer Therapieindikation führen kann, ist die sog. B-Symptomatik, bestehend aus Nachtschweiß, Fieber ohne Infekt sowie Gewichtsverlust von > 10% des Körpergewichts innerhalb von sechs Monaten (Kompetenznetz Maligne Lymphome).

1.1.5 Diagnostik

Zur Diagnosesicherung werden Differentialblutbild und Zytologie mit Immunphänotypisierung aus peripherem Blut und Knochenmark benötigt, um zu klären, welche Zellpopulation betroffen ist und ob sie den Reifungskriterien der CLL entsprechen (Kompetenznetz Maligne Lymphome).

1.1.6 Therapie

Das therapeutische Vorgehen bei B-CLL-Patienten ist stadienabhängig. Asymptomatische Patienten im Frühstadium werden nicht therapiert. Jedoch wird durch regelmäßige Blutbildkontrollen und klinische Untersuchungen ein mögliches Fortschreiten der Krankheit geprüft, um gegebenenfalls eine Therapie einleiten zu können. (CLL Trialists' Collaborative Group, 1999, 864, 867)

Im Fokus der Forschung steht die Prognosesicherheit für Patienten, die sich in einem frühen Krankheitsstadium befinden. Ziel ist es Patienten zu identifizieren deren Krankheit schnell voranschreiten wird und deshalb ein früher Therapiebeginn notwendig ist. Man möchte sie zuverlässig von den Patienten unterscheiden, deren Krankheitsprogress langsamer verlaufen wird und die spät oder sogar nie eine Therapie benötigen werden. (Byrd JC. et al., 2004, 164; CLL Trialists' Collaborative Group, 1999, 867)

Es konnte gezeigt werden, dass eine frühe Therapieintervention (z.B. mit dem Alkylanz Chlorambucil) nicht in jedem Fall von Vorteil ist und sogar die Wahrscheinlichkeit erhöhen kann, Sekundärmalignome zu entwickeln. (French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia, 1990, 314; Dighiero G. et al., 1998, 1508)

In fortgeschrittenen Stadien (Binet C) oder auch in den Stadien Binet A und B, wenn sie mit B-Symptomatik oder Schmerzen einhergehen (z.B. bei schmerzhafter Lymphadenopathie oder schmerzhafter Splenomegalie), besteht eine heute übliche Therapie aus Chemotherapeutika, wie Alkylanzien und Nukleosid-Analoga wie z.B. Fludarabin. Sowohl eine Fludarabin-Monotherapie als auch –in Abhängigkeit des Gesamtzustandes des Patienten– eine Kombination aus Fludarabin und Cyclophosphamid werden eingesetzt. (Yamauchi T. et al., 2001, 3583 ff.; Kompetenznetz Maligne Lymphome)

In aktuellen Studien konnte ebenso der Nutzen des monoklonalen anti-CD20-Antikörpers Rituximab in Kombination mit Chemotherapie nachgewiesen werden (Tsimberidou AM. et al., 2007, 4650, 4652 f.).

Versagt die Primärtherapie oder erleiden die Patienten Rezidive, beinhaltet die Folge-therapie zunehmend häufiger auch monoklonale Antikörpern wie Campath-1H /Alemtuzumab (anti-CD52-Antikörper) (Osterborg A. et al., 1997, 1567).

Monoklonale Antikörper werden neben den sogenannten *small-molecules inhibitors*, z.B. Tyrosinkinaseinhibitoren (Imatinib) (Mauro MJ. et al., 2001, 223) zur *targeted therapy* gezählt (Goel S. et al., 2002, 9). Bei der *targeted therapy* werden bestimmte Oberflächenmoleküle maligner Zeller spezifisch durch Antikörper erkannt und gebunden, was eine Modulation des nachgeschalteten Signalwegs zur Folge hat (Bumol TF. et al., 1983, 530 ff.). Ziel dieser Therapie ist die Proliferation maligne transformierter Zellen gezielt zu hemmen während –im Gegensatz zur „klassischen“ Chemotherapie– nicht-maligne Zellen möglichst wenig beeinträchtigt werden sollen (Zhukov NV et al., 2008, 606).

Nebenwirkungen der Chemotherapie mit Purinanaloga sind Myelosuppression und erhöhte Infektanfälligkeit aufgrund von medikamentenassoziierten Panzytopenien (Spriano M. et al., 1994, 222). In Kombinationsregimen mit Alkylanzien wie Chlorambucil wird dieser myelosuppressive Effekt durch ein zusätzliches, synergistisch wirkendes Medikament noch verstärkt (Jaksic B. et al., 1997, 2110; Morrison VA. et al., 2001, 3614).

Eine weitere Therapieoption stellt die autologe (Spaner DE. et al., 2005, 638–643) oder allogene (Schetelig J. et al., 2008, 5095ff) Stammzelltransplantation dar. Die allogene Transplantation kann potentiell eine Heilung der CLL ermöglichen, birgt aber neben dem Risiko der Abstoßung viele weitere Risiken wie z.B. Infektionskomplikationen durch die notwendige langfristige Immunsuppression (Sorrer ML. et al., 2008, 4913 f.). Vor allem für junge, therapierefraktäre Hochrisikopatienten kann diese Methode jedoch eine adäquate Therapiemöglichkeit darstellen (Sorrer ML. et al., 2008, 4913 f.).

1.1.7 Prognose

Die B-CLL ist eine genotypisch und phänotypisch sehr heterogene Erkrankung. Dementsprechend ist auch die Prognoseabschätzung diffizil.

In den letzten Jahren wurden neue Marker entdeckt, die eine genauere Einschätzung der Prognose ermöglichen.

Ein relevanter Prognosemarker bei der B-CLL ist die Proliferationsrate des malignen Klons. Es zeigte sich, dass CLL-Patienten mit hoch proliferativen Leukämiezellen einen schlechteren klinischen Verlauf aufwiesen als Patienten mit niedrig proliferativer Erkrankung (Messmer BT. et al., 2005, 759). Diese sogenannte Lymphozytenverdopplungszeit ist ein wertvoller klinischer Parameter um die Progression der Erkrankung besser einschätzen zu können. Er wird zum Beispiel bei der Entscheidung, eine medikamentöse Therapie im Binet-Stadium A oder B zu beginnen, zur Rate gezogen. Patienten mit einer Lymphozytenverdopplungszeit von weniger als sechs Monaten werden – unter Zuhilfenahme weiterer Parameter wie Mutationsstatus der Schwere-Ketten-Gene (IgV_H)– zu den Hochrisikopatienten im Bezug auf das Progressionsrisiko gezählt (Onkologie integrativ, 2006, 690; Hallek M. et al., 2008, 5450).

Die Forschung der letzten Jahre brachte weitere Erkenntnisse bezüglich der klinischen Relevanz diverser Oberflächenmarker sowohl zur weiteren Untergliederung der B-CLL als auch als mögliche Prognoseparameter. So zeigte sich z.B., dass Patienten, deren B-CLL-Zellen ZAP-70-positiv und CD38-positiv waren –nachgewiesene Surrogatmarker für einen unmutierten IgV_H Status– einen aggressiveren und schwereren Krankheitsverlauf

aufwiesen, verglichen mit Patienten, deren CLL-Zellen diese Surrogatmarker nicht aufwiesen (Hamblin TJ. et al., 1999, 1850 ff.).

Das Vorhandensein oder Fehlen dieser Marker spiegelt sich auch direkt in der mittleren Überlebenszeit wider: Patienten ohne somatische Mutationen im IgV_H Genlocus (korrelierend mit ZAP-70-positivem Status) überlebten durchschnittlich acht Jahre, während Patienten mit somatischen Mutationen im Immunglobulin Schwere-Ketten-Genlocus (korrelierend mit ZAP-70-negativem Status) im Mittel noch 25 Jahre lebten (Orchard JA. et al., 2004, 108 f.).

Zusätzlich fand sich auch ein erheblicher Unterschied in der Progression der Erkrankung: Träger somatischer Mutationen im Immunglobulin Schwere-Ketten-Genlocus zeigten einen milderen Verlauf ihrer Krankheit verglichen mit Patienten ohne somatische Mutationen, so dass auch Unterschiede in der Zeit bis zur Therapiebedürftigkeit nachgewiesen werden konnten (Kay NE. et al., 2002, 195).

Neben der Ermittlung der Lymphozytenverdopplungszeit haben sich die Bestimmung des Oberflächenmarkers CD38 sowie die Bestimmung des ZAP-70 Status in jüngster Zeit immer mehr in der klinischen Ermittlung eines Progressionsrisikos etabliert (Malavasi F. et al., 2011, 3470 ff.).

Trotz dieser neuen Erkenntnisse stellt die Prognoseabschätzung bei der B-CLL weiterhin eine Herausforderung dar.

Eine zusätzliche Möglichkeit zur Risikostratifizierung stellt die Erfassung von genetischen Veränderungen dar. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die häufigsten bei CLL-Patienten vorkommenden Deletionen mit verschiedenen Krankheitsverläufen einhergehen. So hatten Patienten mit einer alleinigen 13q14-Deletion (miR15A und miR16, Mikro-RNA) einen mittleren progressionsfreien Krankheitsverlauf von 92 Monaten und ein längeres Überleben als CLL-Patienten deren B-CLL-Zellen diese Mutation nicht aufwiesen (Juliusson G. et al., 1990, 143, 721; Döhner H. et al., 2000, 1915). Patienten mit einer 11q-Deletion benötigten im Mittel nach 13 Monaten eine Therapie, entwickelten häufiger als andere Patienten Lymphadenopathien und hatten ein kürzeres Gesamtüberleben als Patienten ohne diese Mutation (Döhner H. et al., 1997, 2519). Eine 17p-Deletion (p53) markierte die Patientengruppe mit der ungünstigsten Prognose. Patienten mit dieser Mutation zeigten das kürzeste Intervall bis zur Therapiebe-

dürftigkeit (im Mittel neun Monate), das kürzeste Gesamtüberleben (im Mittel 32 Monate) (Döhner H. et al., 2000, 1915) und ein schlechteres Ansprechen auf Purinanaloga (Döhner H. et al., 1995, 1586) und Alkylanzien (El Rouby S. et al., 1993, 3455).

Obwohl immense Fortschritte darin erzielt wurden, die chronisch lymphatische Leukämie in ihrem Verlauf zu verstehen und sie zu therapieren, ist sie bis heute eine überwiegend unheilbare Erkrankung.

1.2 Apoptose

Der Begriff Apoptose beschreibt eine der wichtigsten Formen des (physiologischen) programmierten Zelltods. Apoptose ist nötig, um alternde Zellen abzubauen und so das Gleichgewicht zwischen Zelltod und Zellerneuerung aufrechtzuerhalten. Apoptose spielt in der Embryonalentwicklung eine entscheidende Rolle, z.B. bei der Neuronalentwicklung und der Formgebung der Finger und Zehen. (Walker NI. et al., 1988, 18–54)

Entstehen während der Lymphozytopoese in Thymus und Knochenmark autoreaktive Lymphozyten, werden diese über Apoptoseinduktion eliminiert, um den Körper vor autoimmunologischen Vorgängen zu schützen (Cohen JJ., 1991, 55–85).

Im Gegensatz zur Nekrose, findet sich beim programmierten Zelltod im Rahmen der Apoptose keine Entzündungsreaktion, da sich Zellreste samt Organellen als Apoptosomen abkapseln und nicht in Kontakt mit Entzündungsmediatoren treten (Searle J. et al., 1982, 229–259).

Der Ablauf der Apoptose kann in drei verschiedene Phasen unterteilt werden: Die 1. Initiationsphase mit Aktivierung der extrinsischen Kaskade (Rezeptoraktivierung durch z.B. FAS-Ligation) oder intrinsischen Kaskade (intrazellulärer Stress, durch z.B. Hitze oder ionisierende Strahlen, mit p53-Aktivierung), die 2. Entscheidungsphase (mitochondriale Phase), die durch das Zusammenspiel verschiedener Proteine der Bcl-2-Familie (Aktivatoren, Inhibitoren, Sensitizer) den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (MOMP) bedingt, sowie durch Freisetzung von Cytochrom c

als "point of no return" gekennzeichnet ist, sowie der 3. Exekutionsphase mit Effektor-caspasenaktivierung und letztlich DNA Fragmentierung (Hengartner MO., 2000, 773). Im Ablauf der klassischen Apoptose kann eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ nachgewiesen werden, da durch die Abgabe von Cytochrom c (siehe Kapitel 1.2.1, Seite 11) die Atmungskette, die einen Protonengradienten aufrechterhält, zusammenbricht (Bedner E. et al., 1999, 185).

Im Verlauf der Apoptose kommt es ausserdem zu einer Verlagerung von Phosphatidylserin an die äußere Plasmamembran (Fadok VA. et al., 1992, 2207), wo es calciumabhängig eine spezifische Bindung mit Annexin V eingehen kann (Tait JF. et al., 1989, 7946 f).

Beide Ereignisse, der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials sowie Verlagerung von Phosphatidylserin werden zur Apoptosedetektion *in vitro* herangezogen (van Engeland M. et al., 1998, 7).

1.2.1 Intrinsischer Apoptoseweg

Die Initiatoren des intrinsischen Apoptosewegs sind, wie der Name vermuten lässt, im Zellinneren zu finden. Kommt es z.B. zu DNA-Schäden kann über das Tumorsuppressorprotein p53 Zellzyklusarrest und auch Apoptose vermittelt werden. Auch Wachstumsfaktorentzug kann über diesen Weg zur Apoptose führen. (Brunelle JK. et al., 2009, 438).

Im Zytosol und in der äußeren Mitochondrienmembran befinden sich eine Vielzahl von Proteinen, unter anderem Proteine der Bcl-2-Familie (siehe Punkt 1.2.3, Seite 15) mit pro- bzw. anti-apoptotischer Funktion. Ihr verhältnismäßiger Anteil und ihre Interaktion miteinander sind entscheidend beteiligt an Zelluntergang versus Überleben. (Brunelle JK. et al., 2009, 438f.)

Es wird angenommen, dass pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie wie Bax oder Bak in der Lage sind, nach Aktivierung durch Bcl-2-Familienmitgliedern wie z.B. tBid oder Bim, bzw. durch Einwirken von Sensitizern wie z.B. Bad oder Noxa in die äußere Mitochondrienmembran zu inserieren, und durch Oligomerisierung Poren zu bilden, oder die Öffnungswahrscheinlichkeit bereits vorhandener Poren, z.B. des *voltage de-*

pendent anion channel (VDAC) zu modulieren, so dass es zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem Zwischenmembranraum der Mitochondrien kommt. (Reed JC. et al., 1997, 773 ff.; Shimizu S. et al., 1999, 483–486; Loeffler M. et al., 2000, 19–22). Unter Freigabe von Cytochrom c bilden *Apoptosis activating factor 1* (Apaf 1) und Pro-caspase-9 mittels dATP einen Komplex, der Apoptosom genannt wird. Dieser Komplex führt zur Spaltung von Procaspase-9 in ihre aktive Form, Caspase-9. (Li P. et al., 1997, 481) Aktivierte Caspase-9 wiederum ist in der Lage, die sogenannten Effektorcaspasen-3 und -7 zu aktivieren (Li P. et al., 1997, 481; Cain K. et al., 1999, 22689), was nachfolgend zur Aktivierung der Effektorcaspase-6 führt (Hirata H. et al., 1998, 590; Slee EA. et al., 1999, 287 f.). Dies mündet in der Spaltung und dem Abbau von Zellmembranen, Zytoskelettanteilen und Kernbestandteilen (Buendia B. et al., 1999, 1749 f.).

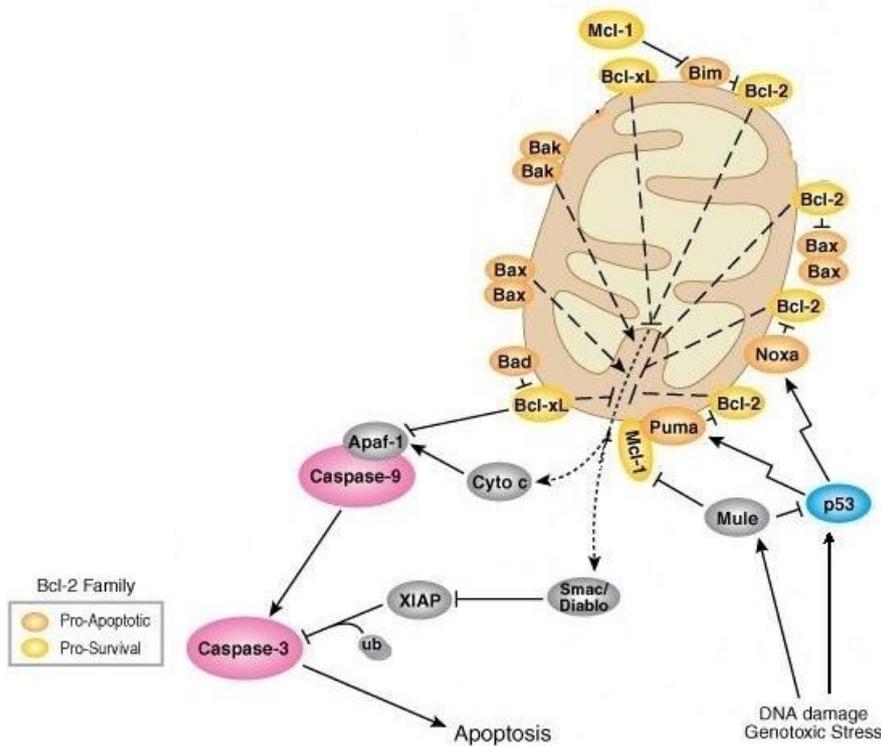


Abbildung 1.1 Intrinsischer Apoptoseweg, modifiziert nach *Cell Signaling*

(Brenner D. et al. 2009, 872; Lindsay J. et al., 2010, 533)

1.2.2 Extrinsischer Apoptoseweg

Der extrinsische Apoptoseweg wird über Rezeptoren vermittelt. Die beiden am häufigsten involvierten Rezeptoren sind Fas bzw. CD95 sowie der Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR 1). Beide werden aktiviert, wenn sie ihr Substrat, Fas-Ligand oder den Tumornekrosefaktor (TNF) binden. Dies hat die Bildung des *death induced signal complex* (DISC) zur Folge, neben Ligand und Rezeptor aus der intrazellulär gelegenen *Fas associated death domain* (FADD), einem Adaptermolekül, sowie aus Procaspase-8 bestehend. Procaspase-8 wird auf das aktivierende Signal hin oligomerisiert und mittels autokatalytischer Spaltung aktiviert. Caspase-8 vermag nun Effektorprocaspasen durch Spaltung zu aktivieren und leitet so die gemeinsame Endstrecke mit dem intrinsischen Signalweg ein. (Muzio M. et al., 1998, 2926)

Die Aktivierung von Caspase-8 kann auch über das Bcl-2-Familienmitglied Bid zur Apoptosevermittlung führen (Li H. et al., 1998, 487 f.). Dabei aktiviert tBid, durch Caspase-8 proteolytisch aus Bid/cBid entstanden, an der äußeren Mitochondrienmembran die pro-apoptotischen Bcl-2 Proteine Bax und Bak (Lovell JF. et al., 2008, 1077 ff.; Wei MC. et al., 2001, 727), die dann durch Oligomerisierung Poren formen können (Hsu YT. et al., 1997, 3668 f.), die zur Abgabe von Cytochrom c (Li H. et al., 1998, 487 f.) und Inhibitoren (SMAC) der *inhibitors of apoptosis* (IAP) führen (Wang X. et al, 2001, 2924f.).

Anti-apoptotische Proteine der Bcl-2-Familie wie z.B. Bcl-2, Bcl-xl oder Mcl-1 können tBid und/oder Bax/Bak an der Mitochondrienmembran binden und eine Aktivierung verhindern. Sensitizer wie z.B. Bad oder Noxa wiederum können die Bindung der anti-apoptotischen Bcl-2-Mitglieder beeinflussen, und so zu einer Apoptoseaktivierung beitragen (Brunelle JK. et al., 2009,438 f.; Cuconati A. et al., 2003, 2924; Kim H. et al., 2006, 1352; Mathew R. et al., 2006, 3649). Dies ermöglicht eine sensible Regulation der Apoptosevermittlung.

Die Aktivierung der sogenannten Todesrezeptoren kann aber auch zur Proliferation führen. Dafür ist c-FLIP verantwortlich, ein enzymatisch inaktives, aber strukturell der Caspase-8 sehr ähnliches Protein, weshalb es mit dieser um die Bindestelle an der FADD konkurrieren kann (Goltsev YV. et al., 1997, 19643; Wang J. et al., 2000, 158 f.).

1.2.3 Bcl-2-Proteinfamilie

Es gibt eine Vielzahl von Proteinen, die für die Apoptoseinduktion und -exekution wichtig sind.

Eine große Rolle spielen dabei die Mitglieder der Bcl-2-Familie, die mindestens 15 Mitglieder zählt. Man kann diese Familie weiter nach strukturellen und funktionellen Gesichtspunkten in drei Subgruppen unterteilen. (Adams JM. et al., 1998, 1323)

Die erste Untergruppe enthält nur anti-apoptotisch wirksame Proteine, wie z.B. Bcl-2, Bcl-xl oder Mcl-1. Alle Mitglieder dieser Gruppe zeichnen sich durch die hochkonservierten Sequenzmotive BH-1 bis BH-4 aus.

Die zweite Untergruppe wird durch Bax und Bak vertreten, die sich hinsichtlich der BH-Motive von der ersten Gruppe nur durch das Fehlen des BH-4-Teils unterscheidet.

Die dritte Untergruppe, deren Vertreter, wie die der zweiten Subfamilie, eine pro-apoptotische Wirkung ausüben, enthalten von den vier Strukturmerkmalen nur BH-3. Zu dieser Gruppe gehören u.a. Noxa, Bid und Bim. (Adams JM. et al., 1998, 1323)

Die Mitglieder der Bcl-2-Familie interagieren auf vielfältige Weise miteinander, zum Beispiel indem sie Heterodimere bilden und so gegenseitig Einfluss auf die Wirksamkeit des jeweils anderen Proteins nehmen. Dabei kann die BH-3-Domäne, die Bestandteil eines jeden Familienmitglieds ist, in die Bindungstasche, bestehend aus den übrigen BH-Komponenten der Subgruppenproteine I und II, binden und sich so ein funktionelles Dimer bilden. Die quantitative Zusammensetzung der jeweiligen pro- und anti-apoptotischen Proteine hat Einfluss darauf, ob in der Zelle Apoptose induziert wird oder nicht. (Oltvai ZN. et al., 1993, 613 f.; Sattler M. et al., 1997, 983 ff.)

Den Vertretern der zweiten Gruppe ist es ausserdem möglich Homooligomere zu bilden, die Poren in der äußeren Mitochondrienmembran formen können und darüber Proteine wie Cytochrom c (Li H. et al., 1998, 487 f.) und Inhibitoren der IAPs wie Smac/DIABLO (Wang X. et al, 2001, 2924 f.) freisetzen können. Ihre Funktion kann in Anwesenheit der anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder durch Spaltung der inaktiven Monomere und Inhibition der Oligomerbildung beeinflusst werden (Brunelle JK et al., 2009, 437 f.).

Es gibt auch sogenannte Sensitizer, die diese Interaktionen abschwächen können, indem sie die Bindung zwischen anti- und pro-apoptotischem Protein kompetitiv hemmen. Die Gruppe der Proteine, die nur die BH3-Domäne enthalten, stellen solche Modulatoren dar (Chen L. et al., 2005, 393 ff.).

Sensitizer wie Puma oder Noxa entfalten ihre pro-apoptotische Wirkung in der Hemmung von Bcl-xl oder Mcl-1, während andere Vertreter dieser Subfamilie wie Bim oder tBid Bax und Bak aktivieren können (Vaseva AV. et al., 2008, 1).

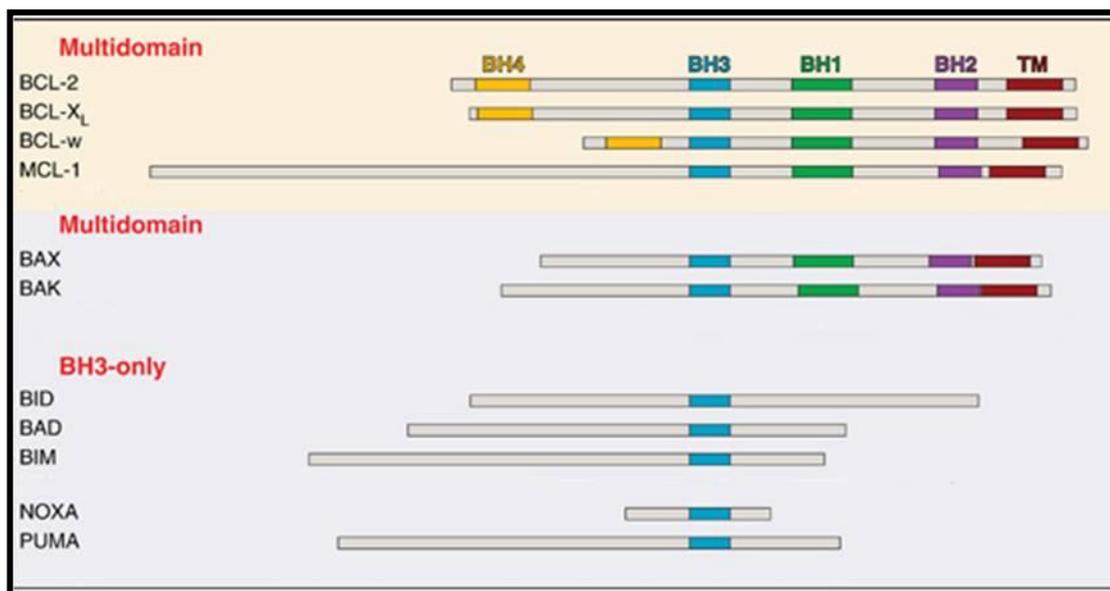


Abbildung 1.3 Bcl-2-Proteinfamilie, modifiziert nach *nature*

(Walensky LD., 2006, 1339–1350)

Mutationen in Genen beziehungsweise chromosomale Aberration, die die Bcl-2-Familie betreffen, sind nicht selten. Eine erhöhte Bcl-2 Expression, die mit einer verminderten Apoptoserate einhergeht, findet sich zum Beispiel in B-CLL-Zellen (Otake Y et al., 2007, 3072) und bei follikulären Lymphomen. Bei letztgenannten wird die Überexpression häufig durch eine Translokation t(14;18) hervorgerufen (Tsujiimoto Y. et al., 1985, 1440).

Deshalb beschäftigen sich Forscher weltweit mit Bcl-2 Proteinen als mögliche therapeutische Targets, sowohl bei soliden Tumorerkrankungen als auch besonders bei hämatologischen Neoplasien. Im Fall der CLL befinden sich zwei Bcl-2-Inhibitoren (ABT-

263 und Oblimersen) in Studien der klinischen Phase I und III mit vielversprechenden Ergebnissen bei CLL-Rezidiven (Vogler M. et al., 2008, 29–32; Roberts AW. et al., 2012, 491 ff.; Cheson BD. et al., 2007, 859–869). Angemerkt sei, das bei der B-CLL zwar in über 90% der Fälle eine Überexpression von Bcl-2 beschrieben ist, jedoch in der Regel keine Translokation t(14;18) vorliegt (Otake Y et al., 2007, 3072; Dyer MJ. et al., 1994, 3684ff.).

1.2.4 Caspasen

Effektorproteine und gemeinsame Endstrecke der meisten Apoptosewege sind die Caspasen. Es gibt mindestens 13 solcher Cysteinproteasen, die hochkonserviert in Mensch und Tier vorhanden sind. Die Caspasen liegen als Zymogene vor und müssen erst durch Abspaltung eines Propeptids aktiviert werden (Thornberry NA. et al., 1997, 479).

Alle Caspasen schneiden ihre Substrate – das können andere Caspasen oder auch Strukturproteine der Zelle sein – nach einem Aspartatrest, was im Fall der Caspasen zu deren Aktivierung führt. (Earnshaw WC. et al., 1999, 384 f., 399 f.)

1.2.5 Inhibitoren der Apoptose

Es gibt eine Reihe *inhibitors of apoptosis* (IAPs), wobei *X-chromosome-linked IAP* (XIAP) bisher am besten untersucht ist. Man wendet die dabei gewonnenen Erkenntnisse auch auf die anderen IAPs an. (Liston P. et al., 2003, 8568 ff.)

XIAP hemmt Caspase-3, -7 und -9 mit jeweils unterschiedlichen Proteindomänen. Bei den beiden Effektorcaspasen liegt ein kompetitiver Hemmmechanismus vor (Liston P. et al., 2003, 8571), während XIAP Procaspase-9 in seiner inaktiven Monomerform stabilisiert und so der aktivierenden Apoptosomkomplexbildung entgegenwirkt. Jedoch wird vermutet, dass der Inhibitor die Caspase auch hemmen kann, wenn diese an Apaf-1 gebunden ist. (Shiozaki EN. et al., 2003, 520 f., 525 f.)

IAPs können zur Ubiquitinierung und Abbau der Caspasen-3 und -7 sowie ihrer eigenen Inhibitoren Smac/DIABLO beitragen. (Suzuki Y. et al., 2001, 8664; Huang H. et al., 2000, 26662; MacFarlane M. et al., 2002, 36614)

1.2.6 z-VAD-fmk

z-VAD-fmk ist ein Pan-caspaseinhibitor, der vor allem die Caspasen-3, -7 und -8 hemmt. In genügend hoher Konzentration kann er zusätzlich auch Caspase-9 inhibieren (Ko SC. et al., 2000, 1011; Sun XM. et al., 1999, 5054).

1.3 Zellzyklus

Der Ablauf der Zellteilung ist ein aufs höchste Maß regulierter Prozeß, der sowohl Zellzahl als auch Wachstum eines Organismus kontrolliert. Dabei dienen mehrere sogenannte Checkpoints (Gaps) im Rahmen des Zellzyklus als Kontrollpunkte, um möglicherweise aufgetretene Fehlentwicklungen im Ablauf der Zellteilung nicht an nachfolgende Zellgenerationen weiterzugeben (Smith ML. et al., 1995, 1053).

Während den verschiedenen Phasen des Zellzyklus' (G_1 -, Synthese-, G_2 - und Mitosephase) werden unterschiedliche Cycline und cyclin-abhängige Kinasen exprimiert, die für die Progression in die nächste Zellzyklusphase von Bedeutung sind (Hartwell LH. et al., 1991, 977 f.).

Cycline und cyclin-abhängige Kinasen (CDK), die unter anderem Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus des Rb-Proteins haben, werden in ihrer Expression sehr sensibel reguliert. Das Ausmaß der Phosphorylierung des Rb-Proteins entscheidet über dessen Fähigkeit sich von E2F, einem mit dem Rb-Protein assoziierten Partner, zu lösen, so dass sich E2F, an die entsprechende DNA-Sequenz anlagern und als Transkriptionsfaktor zur Expression von Proteinen betragen kann, die zur weiteren Zellzyklusprogression nötig sind. (Chellappan SP. et al., 1991, 1054, 1056; Knudsen ES. et al., 1996, 8317; Hiebert SW. et al., 1992, 180 ff.)

In humanen B-Zellen scheinen die Zellzyklusregulatoren Cyclin D₃, CDK6 und p27, neben zahlreichen anderen Partnern einen wichtigen Faktor für den Eintritt in den Zyklus darzustellen (Wagner EF. et al., 1998, 1126).

Es gibt zwei Familien von Cyclin-Inhibitoren, die Ink4- und die Kip-Familie, zu der p21 und p27 gehören. P21, auch cyclin-dependent kinase inhibitor 1A oder CDKN1A genannt, sowie p27 sind Proteine, die unter anderem einen hemmenden Einfluß auf die Progression im Zellzyklus ausüben können (Harper JW. et al., 1995, 390 f.; Polyak K. et al., 1994, 61 f.). Sie können z.B. durch p53 oder TGFβ aktiviert werden und verhindern dann unter anderem über Inhibition des Cyclin E-CDK2-Komplexes den Eintritt in die Synthesephase des Zellzyklus' (Polyak K. et al., 1994, 61 f.; Polyak K. et al., 1994, 14). Wird p53 z.B. bei DNA-Schäden hochreguliert und akkumuliert in der Zelle, kommt es begleitend zur Hochregulation von p21. P21 kann einen Zellzyklusarrest an mehreren Stationen des Zyklus induzieren, damit sich die geschädigte Zelle zunächst nicht wieder teilt. So bleibt Zeit, DNA-Schäden zu beheben. Das soll verhindern, dass sich erbgutgeschädigte Zellen teilen und ihre Mutationen an Tochterzellen weitergeben. Gelingt der Zelle eine Reparatur der DNA nicht, wird in der Zelle Apoptose induziert. Dies wird unter anderem über p53 reguliert. (Garner E. et al., 2008, 277 f.)

kung unterhalten. (Meinhardt G. et al., 1999, 282; Swerdlow SH. et al., 1984, 587 ff.; Lampert IA. et al., 1999, 648)

Durch Interaktionen mit verschiedenen ortsständigen Zellen in diesen Proliferationszentren (z.B. nurse like cells, T-Zellen) können proliferativ inaktive B-CLL-Zellen dort erneut proliferativ aktiv werden (Nishio M. et al., 2005, 1015 f.). Granziero et al. zeigten, dass CLL-Zellen in Pseudofollikeln Survivin, einen *inhibitor of apoptosis* (IAP), der die Caspasen-3 und -7 hemmt (Tamm I. et al., 1998, 5316), und in hohem Maße Bcl-2 exprimierten, das die Zellen vor Apoptose zu schützen scheint. Zusätzlich konnte in diesen Zellen der Proliferationsmarker Ki-67 (Schwartz R. et al., 1986, 67 f.) nachgewiesen werden, während Zellen ausserhalb der Pseudofollikel größtenteils Survivin- und Ki-67-negativ waren. (Granziero L. et al., 2001, 2781)

Als mögliche Ursache für den G₀/G₁-Phase Arrest der B-CLL-Zellen im peripheren Blut kann eine erhöhte Expression des Cyclin E-Inhibitors p27 eine Rolle spielen, der verhindert, dass die Zellen über die frühe G₁-Phase hinaus in den weiteren Zellzyklus eintreten können. Vrhovac et al. postulierten, dass die Prognose eines CLL-Patienten umso schlechter ausfällt, je höher die Expression von p27 ist. (Vrhovac R. et al., 1998, 4696). Demler et al. stellten eine Überexpression von Cyclin D₂-mRNA in CLL-Zellen fest, das eine verstärkte mitotische Aktivität in den betreffenden Zellen, und somit eine fortlaufende Zellzyklusprogression der malignen Zellen zur Folge zu haben scheint (Delmer A. et al., 1995, 2872 f.).

Dem widersprechend zeigte eine andere Arbeitsgruppe, dass in B-CLL-Zellen die mRNA von Cyclin D₁ und D₃, nicht aber Cyclin D₂, überexprimiert vorliegt (Paul et al., 2005, 1279).

Eine unterschiedlich starke Expression aller drei Isoformen der D-Cycline konnte in unstimulierten B-CLL-Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (Wolowiec D. et al., 2001, 1299; Meyerson HJ. et al., 2006, 243 f.).

B-CLL-Zellen lassen sich hinsichtlich der Funktionalität ihrer B-Zell-Rezeptoren in zwei Subpopulationen einteilen. Die Zellen einer Gruppe scheinen weniger ausgeprägt proliferativ aktiv zu sein und zeichnen sich durch eine gestörte Signalübermittlung über den B-Zell-Rezeptor aus, während die Zellen der anderen Patientengruppe einen normal funktionierenden B-Zell-Rezeptor aufzuweisen scheint (Lankester AC. et al., 1995, 1093)

Auch das Tumorsuppressorprotein p53 weist bei verschiedenen Tumorerkrankungen Mutationen auf. Dies lässt sich auch bei B-CLL-Zellen beobachten (Döhner H. et al., 2000, 1911 f.). Mutationen führen häufig dazu, dass p53 seine Funktion nicht mehr adäquat ausführen kann. Folglich kommt es zu einer verstärkten Proliferation DNA-geschädigter Zellen, da diese nicht mehr durch Zellzyklusarrest inhibiert wird. Überdies ist aufgrund der ebenfalls wichtigen Rolle von p53 im Ablauf der Apoptose die Apoptoseinduktion solcher Zellen gestört. (Attardi LD. et al., 1996, 3694 ff.)

1.4 Interleukin-21 (IL-21)

IL-21 ist ein Zytokin, das normalerweise von TH₂-Zellen gebildet wird und, zusammen mit anderen Zytokinen wie IL-15, zur Stimulation von T- und NK-Zellen beiträgt. T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen proliferieren daraufhin und erfahren eine Aktivitätssteigerung. (Parrish-Novak J. et al., 2002, 860 f.; Li Y. et al., 2005, 2262)

In nicht-malignen B-Lymphozyten kann IL-21 Apoptose, Proliferation, Differenzierung und einen Isotypenklassenwechsel bewirken (Parrish-Novak J. et al., 2000, 60; Leonard WJ. et al., 2005, 690–693; Ettinger R. et al., 2005, 7869 f.).

Für die Wirkungsweise von IL-21 sind der Aktivierungsstatus und das aktivierende Agens ausschlaggebend (Jin H. et al., 2004, 658).

Werden murine B-Zellen über Toll-like-Rezeptoren (TLRs) aktiviert, z.B. mittels Oligonukleotide (CpG) oder Lipopolysaccharide (LPS), beides Bestandteile von Bakterien, bewirkt IL-21 eine caspaseabhängige Apoptoseinduktion über Abnahme von Bcl-2 und Bcl-xl (Mehta DS. et al., 2003, 4114) und Zunahme von Bim (Jin H. et al., 2004, 661).

Werden diese B-Zellen jedoch über ihren B-Zell-Rezeptor und über CD40-Ligation von T-Zellen aktiviert, hat IL-21 deren Proliferation zur Folge. Eine alleinige CD40-Ligand-Aktivierung reicht jedoch nicht aus, um Apoptose in B-Zellen zu verhindern. (Jin H. et al., 2004, 660 f.; Mehta DS. et al., 2003, 4112)

Ebenso verhält es sich bei der Immunglobulinproduktion. IL-21 vermag, abhängig von der Prä-Stimulation der B-Lymphozyten, die Antikörperproduktion zu modulieren. Bei zusätzlicher Stimulation von B-Zellen mit IL-4 und anti-CD40-Antikörpern kann IL-21 die

IgE- und IgG-Produktion steigern (Ozaki K. et al., 2002, 1632), während die Koinkubation mit T-Lymphozyten und dem T-Zellstimulans PHA, anstatt anti-CD40-Antikörper, eine abnehmende IgE-Produktion zur Folge hat (Wood N. et al., 2004, 137 f.).

In B-CLL-Zellen kann IL-21 Apoptose auslösen, wenn meist auch nur in geringem Ausmaß. Dieser Effekt lässt sich durch Stimulation der Zellen mit anti-CD40-Antikörper verstärken (de Toter D. et al., 2006, 3711 f.).

IL-21 wird aktuell in klinischen Studien der Phase I beim metastasierten malignen Melanom und Nierenzellkarzinom eingesetzt, da präklinische Studien die immunstimulierenden Eigenschaften des Interleukins zeigen konnten, und beide Tumorentitäten durch immunmodulatorische Therapien beeinflussbar sind. (Petrella TM. et al., 2012, 3396–3400; Thompson JA. et al., 2008, 2034; Grünwald V. et al., 2011, 123 f.)

Die Stimulation der körpereigenen Tumorabwehrreaktion wird über alle drei Zielzelltypen von IL-21 vermittelt: T-Lymphozyten (Moroz A. et al., 2004, 901 f.), natürliche Killerzellen (Wang G. et al., 2003, 9019 f.) und B-Lymphozyten (Daga A. et al., 2007, 1759). Dabei konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass von zytotoxischen T-Zellen ein Großteil dieser Reaktion in malignen Melanomen und Nierenzellkarinomen (Søndergaard H. et al., 2007, 1421 f.) und von natürlichen Killerzellen in Lungenmetastasen (maligner Melanome) und Lebermetastasen (von Nierenzell- oder Mammakarzinomen) ausgehen (Brady J. et al., 2004, 2054).

In weiteren Studien zeigte sich, dass durch IL-21 auch die vermehrte Bildung von tumorspezifischen Antikörpern gefördert wurde, während die Expression unspezifischer Immunglobuline nicht erhöht war (Nakano H. et al., 2006, 95 f.).

All diese Ergebnisse, obwohl zum Teil erst im Tierversuch bestätigt, deuten darauf hin, dass IL-21 eine neue Therapieoption bei verschiedenen Tumorentitäten darstellen könnte, die zudem spezifisch auf maligne transformierte Zellen zu wirken scheint.

Ein allgemein in der Tumorthherapie gebräuchliches Vorgehen ist der Einsatz einer Kombinationstherapie, die das Ziel hat, den Tumor gleichzeitig über unterschiedliche Mechanismen zu bekämpfen. Dazu werden entweder verschiedene Zytostatika miteinander, Zytostatika mit monoklonalen Antikörpern, Kinaseinhibitoren oder auch verschiedenen Zytokinen kombiniert. So wurden die immunsystemstimulierenden Zytoki-

ne IL-2 oder IL-15 mit IL-21 kombiniert und es zeigte sich eine potenzierte Antitumorwirkung. (He H. et al., 2006, 24; Kishida T, et al., 2003, 554–557)

In klinischen Studien der Phase II wurde neben IL-21 als Monopräparat auch die Kombination mit spezifischen monoklonalen Antikörpern untersucht. Die Wahl des monoklonalen Antikörpers richtet sich nach der Tumorentität, z.B. Rituximab bei Non-Hodgkin-Lymphomen. (Skak K. et al., 2008, 238)

IL-21 könnte als mögliches Therapeutikum insofern den anderen Zytokinen wie IL-2 oder IFN α , die ebenfalls bereits in klinischen Studien zur Tumorthapie eingesetzt werden, überlegen sein, da IL-21 nicht nur T-Zellen und NK-Zellen aktiviert, sondern, im Gegensatz zu den anderen genannten Zytokinen, gleichzeitig T_{reg}-Zellen, die den T-Zellen funktional entgegenwirken, inhibiert. Somit wird die Antitumoraktivität auf zwei Arten induziert. (Peluso I. et al., 2007, 733)

1.5 IL-21-Rezeptor

IL-21 bindet an den IL-21-Rezeptor, der aus der spezifischen IL-21R-Domäne und der γ_c -Kette besteht, die auch Teil anderer Interleukinrezeptoren ist. Der intrazelluläre Teil des IL-21-Rezeptors kann nach Aktivierung an mehreren Stellen phosphoryliert werden, was zu einer Aktivierungskaskade über JAK1 und -3 sowie STAT1 und -3 führt. Dabei gelangen phosphorylierte STATs als Dimere in den Zellkern und können an *responsive elements* binden und dann Auswirkungen auf die Transkription und Proteinexpression haben. (Konforte D. et al., 2006, 8385; Levy DE. et al., 2002, 652 ff.)

Der IL-21-Rezeptor wird von T-, NK-, B-, sowie dendritischen Zellen exprimiert. Die höchste basale Expression kann in reifen B-Zellen gefunden werden. Jedoch kann die Expressionsrate zum Beispiel durch B-Zell-Rezeptor- oder CD40-Ligand-Stimulation in B-Lymphozyten gesteigert werden. (Parrish-Novak J. et al., 2000, 60; Good KL. et al., 2006, 5239; Jin H. et al., 2004, 660)

B-CLL-Zellen bildeten mehr IL-21-Rezeptors nach CD40-Ligation (de Toter D. et al., 2006, 3710f.) oder Simulation mit CpG-Oligonukleotiden (Jahrsdörfer B. et al., 2006, 2714) verglichen mit unstimulierten Zellen.

Brenne et al., konnten zeigen dass unstimulierte ANBL-6-Zellen eine deutliche IL-21-Rezeptoroberflächenexpression aufwiesen (Brenne AK. et al., 2002, 3759). Deshalb wurden sie als Positivkontrolle bei Experimenten zur Detektion des IL-21-Rezeptors auf B-CLL Zellen verwendet.

1.6 CpG-Oligonukleotide

In eukaryotischen Zellen finden sich sogenannte CpG-Inseln (Cytosin-Phosphat-Guanin-Inseln) in der DNA meist in methylierter Form. Davon zu unterscheiden sind die bakteriellen CpG-Oligodesoxynukleotide, die unmethyliert vorliegen und eine starke immunstimulierende Wirkung besitzen. (Bird A., 1992, 5 f.; Fuxman Bass JI. et al., 2008, 926) Unmethylierte CpG-Inseln binden unter anderem an den Toll-like-Rezeptor-9, der sich intrazellulär in Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen befindet, und führen darüber im Allgemeinen zu einer Aktivierung dieser Zellen. Die entsprechenden Zellen proliferieren daraufhin und können im Organismus eine komplexe Immunantwort bewirken, die die Eindämmung der bakteriellen Erreger zum Ziel hat. (Mutwiri G. et al., 2009, 227 f.)

CpG-Oligonukleotide aktivieren sowohl in nicht-malignen B-Zellen als auch in B-CLL-Zellen die Produktion von IFN α , IL-6, sowie die Hochregulation diverser Oberflächenmarker wie CD 25 (entspricht IL-2R α), CD40, CD54, CD58, CD80 und CD86, die zur Gewebsinvasion und T-Zell-Kostimulation benötigt werden. Zudem erhöht sich die Expression des MHC I-Rezeptors, während die Anzahl an CD95 (Fas-Rezeptor) fast unverändert bleibt. (Decker T. et al., 2000, 1001 f.)

In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass CpGs in nicht-malignen B-Zellen Cyclin D₃ hochregulieren können, was eine Steigerung der Mitoserate zur Folge hat. In B-CLL-Zellen konnte durch die Koinkubation mit CpG-Oligonukleotiden in Kombination mit In-

terleukin-2 der Zellzyklusarrest überwunden werden und die Lymphomzellen in die G₁-Phase des Zellzyklus eintreten. (Decker T. et al., 2000, 560 ff.)

CLL-Zellen, die sich aktiv im Zellzyklus befinden, könnten besser für bestimmte Zytostatika zugänglich sein, da diese in der Regel in die Zellteilungsphase eingreifen und überwiegend proliferierende Zellen schädigen (Decker T. et al., 2002, 328 ff.).

In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass CLL-Zellen besonders gut auf die Stimulation mit CpG ansprechen, da sie TLR-9 stärker exprimieren als nicht-maligne B-Zellen (Grandjennette C. et al., 2007, 1279 f.).

Koinkubation von B-CLL-Zellen mit z.B. CpG-Oligonukleotiden ermöglichen ein in vitro-Modell eines proliferativ aktiven CLL-Zellpools darzustellen, was dazu beiträgt eine genauere Vorstellung der Verhältnisse in vivo für die experimentelle Forschung zu erlangen (Weiner GJ. 2009, 2; Decker T. et al., 2000, 1001 f.).

Jahrsdörfer und Mitarbeiter zeigten, dass B-CLL-Zellen, im Gegensatz zu nicht-malignen B-Zellen, nach CpG-Koinkubation nicht immer proliferativ aktiv werden. Abhängig von ihrem Mutationsstatus können CLL-Zellen nach Koinkubation mit unmethylierten CpG-Motiven Apoptoseprogramme aktivieren oder proliferieren. (Jahrsdörfer B. et al., 2005, 380)

1.7 Stroma

Stroma bezeichnet das Zwischengewebe parenchymatöser Organe. Stromazellen produzieren lösliche Faktoren, die die Parenchymzellen zum Überleben und zur Proliferation brauchen. Über eine Signalkaskade kommt es zum Beispiel zur Aktivierung des Akt-Signalweges, der über NF- κ B zur Proliferation und über Hemmung von Bad und Stabilisierung von Bcl-xl zum Zellüberleben verschiedener Zelltypen wie z.B. B-CLL-Zellen führt. (Cuní S. et al., 2004, 1393 ff., Edelmann J. et al., 2008, 1567 f.). Des Weiteren trägt die Stromazellinteraktion zur DNA Reparatur bei (Edelmann J. et al., 2008, 1568) und die Expression von Cyclin D und E (Duman-Scheel M. et al., 2002, 300), Bcl-2 (Dierks C. et al., 2007, 948) und Mcl-1 (Balakrishnan K. et al., 2009, 151) kann gesteigert werden.

In verschiedenen soliden wie hämatologischen Neoplasien wurden in diesen Signalwegen und Expressionsmustern Abweichungen entdeckt – im Falle der CLL u.a. eine Überexpression anti-apoptotischer Proteine (Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xl) (Balakrishnan K. et al, 2009, 151) beziehungsweise eine basale Aktivierung von Akt (Barragán M. et al, 2006, 1474) sowie Überexpression von NF- κ B, die zu einer verlängerten Überlebenszeit und einer erhöhten Proliferationsrate dieser Zellen führen kann (Furman RR. et al., 2000, 2202 f.).

Inhibitoren dieser Signalwege könnten eine interessante Therapieoption sein, weil sie das Überleben der B-CLL-Zellen beeinflussen können (Hegde GV. et al., 2008, 1932).

CLL-Zellen benötigen Stroma um überleben zu können. Kultiviert man CLL-Zellen ohne Stroma oder spezielle Zytokine, werden die Leukämiezellen innerhalb weniger Tage apoptotisch. (Kay NE. et al., 2007, 903; Hegde GV. et al., 2008, 1929 f.)

Die Voraussetzung für eine adäquate Rate an vitalen CLL-Zellen (erniedrigte Spontanapoptose) ist deren direkter Kontakt zu Stromazellen (Edelmann J. et al., 2008, 1567).

Da die Stromazellinteraktionen speziell für das Überleben der CLL-Zellen wichtig ist, sollte die Wirkung von IL-21 und CpG-Oligonukleotiden auf CLL-Zellen, die Kontakt zu Stromazellen haben untersucht werden, um deren Verhalten unter Bedingungen zu erforschen, die dem Milieu im menschlichen Körper nachempfunden sind.

1.8 Problemstellung

In Studien konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von IL-21 auf B-CLL-Zellen durch Kostimulation mit Substanzen wie z.B. CD40-Ligand verstärkt werden kann (de Toterò D. et al., 2006, 11).

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist ein Vergleich der Auswirkung von Interleukin-21 (IL-21) auf primäre, proliferativ inaktive B-CLL-Zellen des peripheren Blutes *in vitro* mit den Effekten einer Kombinationsbehandlung von IL-21 und CpG-Oligonukleotiden (CpG) auf diese B-CLL Zellen.

Desweiteren werden Effekte von IL-21 (+/- CpG) auf B-CLL Zellen in Kontakt mit supportiven Stromazellen untersucht.

Die Ergebnisse werden in Relation gestellt zur Wirkung von Interleukin-21 und CpG-Oligonukleotiden auf nicht-maligne B-Zellen.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Brutschrank	<i>SANYO</i> (München, Deutschland)
Cryostorage System, K Series	<i>tec-lab</i> (Königstein, Deutschland)
Elektrophoresekammer	
-Immunoblot	<i>Biometra</i> (Göttingen, Deutschland)
-PCR: Horizon® 11.14	<i>Bio-Rad Laboratories</i> (München, Deutschland)
Eppendorf-Pipetten	<i>Eppendorf AG</i> (Hamburg, Deutschland)
Flowzytometer EPICS XL	<i>Beckman Coulter</i> (Krefeld, Deutschland)
Software: System 2 Version 3	
G-25-Säule	<i>Roche</i> (Mannheim, Deutschland)
Gefrierfach	
-20° C	<i>Liebherr</i> (Ochsenhausen, Deutschland)
-86° VIP™SERIES (80° C)	<i>SANYO</i> (München, Deutschland)
Glasplatten	<i>Biometra</i> (Göttingen, Deutschland)
Hypercassette™	<i>Amersham Life Science</i> (Buckinghamshire, UK)

Hyperprocessor	<i>Amersham Life Science</i> (Buckinghamshire, UK)
Isoliergummis	<i>Biometra</i> (Göttingen, Deutschland)
Kämme (PCR, Immunoblot)	<i>Biometra</i> (Göttingen, Deutschland)
Kühlschrank (+ 4° C)	<i>Liebherr</i> (Ochsenhausen, Deutschland)
Magnetic Particle Concentrator DynaL MPC-6	<i>Dynal Biotech</i> (Oslo, Norwegen)
Mikroskop Axiovert 25	<i>Zeiss</i> (Jena, Deutschland)
Molecular Imager Gel Doc XR System	<i>Bio-Rad Laboratories</i> (München, Deutschland)
My Cycler Personal Thermal Cycler	<i>Bio-Rad Laboratories</i> (München, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	<i>Paul Marienfeld GmbH & Co. KG</i> (Lauda-Königshofen, Deutschland)
PCR-Kamera	<i>Bio-Rad Laboratories</i> (München, Deutschland)
PH-Meter, Seven easy	<i>Mettler Toledo</i> (Gießen, Deutschland)
Pipetboy	<i>INTEGRA BIOSCIENCE</i> (Fernwald, Deutschland)
Pipetten	<i>FalCon</i> (Gräfeling-Locham, Deutschland)
Power Pack P25 und P25T	<i>Biometra</i> (Göttingen, Deutschland)

Sterilbank	<i>HERAEUS</i> (Hanau, Deutschland)
Thermomixer	<i>Eppendorf AG</i> (Hamburg, Deutschland)
Transferkammer	<i>Biometra</i> (Göttingen, Deutschland)
VortexREAXTop	<i>Heidolph</i> (Schwabach, Deutschland)
Schüttler	<i>Biometra</i> (Göttingen, Deutschland)
SmartSpec Plus Spektrophotometer	<i>Bio-Rad Laboratories</i> (München, Deutschland)
Ultraviolett Strahler, 220V	<i>Benda</i> (Wiesloch, Deutschland)
Universal Microplate Reader Software: kc junior	<i>BioTek</i> (Bad Friedrichshall, Deutschland)
Waagen	
Analysewaage (Modell Kern 770)	} <i>Kern & Sohn GmbH</i> (Balingen-Frommern, Deutschland)
Präzisionswaage (Modell Kern PLJ 2100-LM)	
Wasserbad Typ 1003	<i>Gesellschaft für Labortechnik GmbH</i> (Burgwedel, Deutschland)
Zentrifugen	
- Kühleppendorffzentrifuge, Mikro 22 R	<i>Hettich</i> (Tuttlingen, Deutschland)

- Eppendorf Zentrifuge 5415D	<i>Eppendorf AG</i> (Hamburg, Deutschland)
- Megafuge	<i>HERAEUS</i> (Hanau, Deutschland)

2.2 Verbrauchsmaterial

CL-XPosure™ Film	<i>Thermo Scientific</i> (Rockford, IL, USA)
Eppendorfgefäße	<i>Eppendorf AG</i> (Hamburg, Deutschland)
FACS-Röhrchen	<i>Nunc GmbH & Co. KG</i> (Wiesbaden, Deutschland)
Gel Blotting Paper	<i>Whatman GmbH</i> (Dassel, Deutschland)
Hyperfilm™ECL™	<i>Amersham Bioscience</i> (Buckinghamshire, UK)
Kulturflaschen (250 ml)	<i>Greiner bio-one</i> (Frickenhausen, Deutschland)
Kryoröhrchen	<i>Nunc GmbH & Co. KG</i> (Wiesbaden, Deutschland)
Pipettenspitzen	<i>SARSTEDT</i> (Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland)
PVDF- Membranen	<i>Immobilon-P, Millipore</i> (Bedford, MA, USA)
6-well-Platten	} <i>Greiner bio-one</i> (Frickenhausen, Deutschland)
12-well-Platten	
24-well-Platten	
Tubes (15 ml, 50 ml)	<i>Greiner bio-one</i> (Frickenhausen, Deutschland)

2.3 Chemikalien

Absolutely RNA Miniprep Kit	<i>Stratagene</i> (La Jolla, CA, USA)
Acryl/Bis 1.69 Rotiphorese Gel 30	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Albumin Fraktion V	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
α -MEM mit Glutamax	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
AmpliTaq DNA Polymerase	<i>Applied Biosystems</i> (Foster City, CA, USA)
Antibiotic-Antimycotic	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
APS (Ammoniumpersulfat)	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
Aqua DeltaSelect	<i>DeltaSelect GmbH</i> (Dreieich, Deutschland)
Benzamidine	<i>Fluka Chemika</i> (Buchs, Schweiz)
Biocoll Separating Solution, Dichte: 1,077 g/ml	<i>Biochrom AG</i> (Berlin, Deutschland)
Bromphenolblau	<i>Fluka Chemika</i> (Buchs, Schweiz)
Dc Protein Assay Reagent A, B, S	<i>Bio-Rad Laboratories</i> (München, Deutschland)
DMSO	<i>SERVA</i> (Heidelberg, Deutschland)
dNTP-Mix mit dTTP, 10mM	<i>Applied Biosystems</i> (Foster City, CA, USA)

DTT	<i>Fluka Chemika</i> (Buchs, Schweiz)
EDTA	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
Entwicklerflüssigkeit	<i>Tetenal AG & Co. KG</i> (Norderstedt, Deutschland)
Erythrozytenlysepuffer, EasyLyse, 1 x	<i>DakoCytomation</i> (Glostrup, Dänemark)
Essigsäure	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromid	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
FCS	<i>PAA Laboratories GmbH</i> (Pasching, Österreich)
Fix & Perm Cell Permeabilization Reagents	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Gelatine	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
Glycerin	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
Glycerol	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
Glycin	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
HEPES	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)

KCl	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Ladder 100bp	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
L-Glutamin	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
MEM nicht essentielle Aminosäuren, 100 ×	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Mercaptoethanol, 100 %	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
Methanol	<i>J. T. Baker</i> (Devantes, Holland)
MgCl ₂	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Milchpulver	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
NaCl	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
NaF	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
NaH ₂ PO ₄ , pH 4,4	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Na ₂ HPO ₄ × 7H ₂ O, pH 8,8	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Na-Pyrophosphat, pH 7,0–7,5	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
NaPyruvat, 100mM	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Orthovanadate (Na ₃ VO ₄)	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)

PBS (mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	<i>Biochrom AG</i> (Berlin, Deutschland)
PBS (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
10 x PCR-Puffer (mit 15 mM MgCl ₂)	<i>Applied Biosystems</i> (Foster City, CA, USA)
Penicillin (10000 Units/ml)	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Pferdeserum	<i>PAN Biotech GmbH</i> (Aidenbach, Deutschland)
PMSF	<i>Roche</i> (Mannheim, Deutschland)
Proteaseinhibitor-Tablette	<i>Roche</i> (Mannheim, Deutschland)
Proteinstandard	<i>Bio-Rad Laboratories</i> (München, Deutschland)
RPMI 1640 Medium	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
SDS	<i>Fluka Chemika</i> (Buchs, Schweiz)
Streptomycin (1000 µg/ml)	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Sucrose (= Saccarose)	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Super Signal® West Maximum Sensitivity Substrate: Femto, Dura, Pico	} <i>Pierce Biotechnology</i> (Bonn, Deutschland)

TAE	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Temed	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Trypan Blue Stain 0,4 %	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Tween 20	<i>Fluka</i> (Buchs, Schweiz)
UltraPure RNase, DNase free water	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)

2.4 Substanzen

Annexin V, FITC-markiert	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
CpG-Oligonukleotid 5'-TsCsGsTsCsGsCsTsGsTsCsTsCsCsGsCsTsTsCsTsTsCsTsTsGsCsC	<i>Biomol GmbH</i> (Hamburg, Deutschland)
DETACHabeads CD19	<i>Dynal Biotech</i> (Oslo, Norwegen)
Dynabeads CD2, CD14, CD19	<i>Dynal Biotech</i> (Oslo, Norwegen)
DiOC ₆ (3)	<i>Molecular Probes</i> (Eugene, USA)
IL-21	<i>Biomol GmbH</i> (Hamburg, Deutschland)
Propidium Jodid, 50g/ml	<i>Sigma- Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
z-VAD-fmk	<i>BD Biosciences</i> (Heidelberg, Deutschland)

2.5 Antikörper

2.5.1 Primäre Antikörper

Bax	<i>BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)</i>
Bcl-2	<i>BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)</i>
phospho-Bcl-2	<i>Cell Signaling (Danvers, MA, USA)</i>
Bcl-xl	<i>Cell Signaling (Danvers, MA, USA)</i>
Bim	<i>BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)</i>
Caspase-3	<i>Cell Signaling (Danvers, MA, USA)</i>
Caspase-3, FITC-markiert	<i>BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)</i>
Caspase-8	<i>Cell Signaling (Danvers, MA, USA)</i>
Caspase-9	<i>Cell Signaling (Danvers, MA, USA)</i>
IL-21-Rezeptor (FAB9911P)	<i>R & D (Minneapolis, MN, USA)</i>
IL-21-Rezeptor (MAB9911)	<i>R & D (Minneapolis, MN, USA)</i>
IL-21-Rezeptor (MAB991)	<i>R & D (Minneapolis, MN, USA)</i>
IL-21-Rezeptor (14-6469)	<i>eBioscience (San Diego, CA, USA)</i>

IL-21-Rezeptor (14-6471)	<i>eBioscience</i> (San Diego, CA, USA)
IL-21-Rezeptor	<i>Abcam</i> (Cambridge, UK)
IL-21-Rezeptor	<i>Assay designs</i> (Ann Arbor, Michigan, USA)
Mcl-1	<i>Santa Cruz</i> (Santa Cruz, CA, USA)
Bid (N-19)	<i>Santa Cruz</i> (Santa Cruz, CA, USA)
p21	<i>Santa Cruz</i> (Santa Cruz, CA, USA)
p27	<i>Santa Cruz</i> (Santa Cruz, CA, USA)
phospho-STAT1 (Tyr 701) (Ser 727)	<i>upstate biotechnology</i> (Lake Placid, NY, USA) <i>Cell Signaling</i> (Danvers, MA, USA)
phospho-STAT3 (Tyr 705) (Ser 727)	<i>upstate biotechnology</i> (Lake Placid, NY, USA) <i>Cell Signaling</i> (Danvers, MA, USA)
phospho-STAT5 (Tyr 694)	<i>Cell Signaling</i> (Danvers, MA, USA)
Cyclin D ₃	<i>BD Biosciences</i> (Heidelberg, Deutschland)
XIAP	<i>BD Biosciences</i> (Heidelberg, Deutschland)
ZAP-70- Alexa Fluor® 488-markiert	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)

2.5.2 Sekundäre Antikörper

Western-Blot:

horseradish anti-mouse *GE Healthcare UK Ltd. (Buckinghamshire, UK)*

horseradish anti-rabbit *GE Healthcare UK Ltd. (Buckinghamshire, UK)*

Durchflusszytometrie:

anti-mouse, PE-markiert *BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)*

anti-mouse, FITC-markiert *BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)*

anti-rabbit, FITC-markiert *BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)*

Isotypkontrollen:

mouse, unmarkiert *Immunotech (Prag, Tschechien)*

rabbit, unmarkiert *Immunotech (Prag, Tschechien)*

anti-mouse, FITC-markiert *BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)*

2.6 Primer

IL-21-Rezeptor *euofins MWG (Ebersberg, Deutschland)*

forward: 5'-CGT GGG AGT CAG CAT GCC- 3'

reverse: 5' -TGT CGT CGG CCA TGA AGT G- 3'

2.7 Additiva, Puffer, Lösungen

Additiva: 4,6 ml Penicillin (10 U/ml) /Streptomycin (10 mg/ml)
 4,6 ml HEPES
 4,6 ml L-Glutamin
 2,77 ml nicht-essentielle Aminosäuren, 100 x
 3,2 µl Mercaptoethanol, 100%
 4,6 ml Natriumpyruvat, 100 mM
 923 µl Antibiotic-Antimycotic (10.000 U/ml Penicillin G sodium,
 10.000 µg/ml Streptomycinsulfat, 25 µg Amphotericin B as Fun-
 gizone® in 0, 85% saline)

Durchflusszytometrie

Annexinpuffer: 5 ml HEPES, 1 M, pH 7,4
 28 ml NaCl, 2,5 M
 0,18 g CaCl₂
 467 ml destilliertes Wasser

DiOC₆-working solution: 5,7 mg DiOC₆ (3)
 10 ml 100-prozentiger Ethanol
 990 ml PBS

PI-working solution: 25 mg Propidiumjodid
 5 ml DMSO
 495 ml PBS

FACS-Puffer: 2,5 g BSA
 500 ml PBS

2 ml 5 x Na-Pyrophosphat, pH 7,0–7,5

1 ml 10 x NaF, 0,5 mM

0,1 ml 100 x Benzamidin, 5 mM

0,1 ml 100 x PMSF, 0,1 mM

0,1 ml 100 x Orthovanadate, 100 mM

1 Proteaseinhibitor-Tablette

mit destilliertem Wasser auf 10 ml Gesamtvolumen auffüllen

25 x Phosphatpuffer, pH 7,0:

100 ml NaH_2PO_4 , pH 4,4 (34,5 g NaH_2PO_4 in 500 ml destilliertem Wasser) mit $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, pH 8,8 (67 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ in 500 ml destilliertem Wasser) auf pH-Wert 7,0 einstellen

10 x Laufpuffer:

288 g Glycin

60 g TRIS

2 g SDS

2 l destilliertes Wasser

Sammelgelpuffer, 0,5 M, pH 6,8:

6,05 g TRIS

0,4 g SDS

100 ml destilliertes Wasser

pH-Wert 6,8 mit HCl einstellen

Trenngelpuffer, 1,5 M, pH 8,8:

91 g TRIS

2 g SDS

500 ml destilliertes Wasser

pH-Wert 8,8 mit HCl einstellen

Transferpuffer:

0,5 l 10 x Runningpuffer

1 l Methanol

3,5 l destilliertes Wasser

PCR

TAE-Puffer: 121 g TRIS
 28,5 ml Essigsäure
 25 ml EDTA, 1 M, pH 8,0
 500 ml destilliertes Wasser

6 x Ladepuffer, pH 9,5: 300 ml Glycerin
 50 ml Bromphenolblau
 650 ml RNase und DNase freies Wasser

2.8 Gele

10-prozentiges Gel für Western-Blot

Trenngel: 3,75 ml Acryl/Bis
 2,8 ml Trenngelpuffer
 4,7 ml destilliertes Wasser
 7,5 µl Temed
 37,5µl 10 % APS (100 mg Ammoniumpersulfat in 1 ml
 destilliertem Wasser)

Sammelgel: 0,91 ml Acrl/Bis
 1,75 ml Sammelgelpuffer
 4,3 ml destilliertes Wasser
 7 µl Temed
 35 µl 10 % APS (100mg Ammoniumpersulfat in 1 ml

destilliertem Wasser)

1,5-prozentiges Gel für PCR

3 g Agarose

200 ml TAE

2.9 Zellseparation

Zellseparationen beinhalten die Möglichkeit einer negativen oder positiven Selektion. Die negative Selektion wird angewandt, wenn B-CLL-Zellen aus dem Leukozytenanteil des Blutes extrahiert werden sollen. Da CLL-Zellen in der Regel einen hohen Prozentsatz der Leukozyten im Patientenblut ausmachen, ist es praktikabler, die restlichen Leukozyten mit anti-CD2- (T-Lymphozyten und NK-Zellen) und anti-CD14- (Monozyten) Dynabeads aus dem Blut zu entfernen.

Bei gesunden Spendern bilden die B-Lymphozyten einen weitaus geringeren Teil der Leukozytenpopulation, so dass hier eine positive Selektion sinnvoller erscheint. Dafür werden die benötigten B-Zellen direkt mit anti-CD19-Dynabeads aus dem Blutzellgemisch entfernt.

2.9.1 B-CLL-Zellen

Heparinisiertes Vollblut wurde mit gleichen Mengen PBS versetzt, auf 20 ml Biocoll Separation Solution geschichtet und für 15 Minuten bei 2100 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Danach befanden sich Lymphozyten und Monozyten in der Interphase, die, mäanderförmig abgenommen, in ein weiteres Tube überführt und für fünf Minuten bei 1400 rpm mit Bremse zentrifugiert wurden. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, 10 ml Erythrozyten-Lysepuffer zugegeben, gut vermischt und für zehn Minuten bei 4° C inkubiert. Danach wurde einmal mit PBS gewaschen, der Überstand abgenommen, 20 ml Medium zugeben und resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

Daraufhin wurde eine der Zellzahl entsprechenden Menge anti-CD2-Dynabeads und anti-CD14-Dynabeads benutzt, um T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen und Monozyten aus dem Blutzellgemisch zu entfernen.

Die Konzentration der Dynabeads wurde folgendermaßen eingestellt: Auf eine Zielzelle wurden sieben Dynabeads eingesetzt, wobei $1 \mu\text{l } 4 \times 10^5$ Dynabeads entsprechen.

Somit wurde für gut 57.000 CLL-Zellen $1 \mu\text{l}$ Dynabeads eingesetzt.

Die entsprechende Menge Dynabeads wurde mit 5 ml RPMI-Medium zu dem Zellpellet in ein 15-ml-Tube gegeben und bei 4°C auf einem Rolltisch für 20 Minuten inkubiert.

Dann wurde das Tube in einen Magnetständer gesteckt, der die magnetischen Beads und die an sie gebundenen Zellen an die Wand des Tubes zog.

Der Überstand wurde nach einer Minute abgenommen, in ein frisches 15-ml-Tube überführt und erneut in den Magnetständer gestellt. Nach einer weiteren Minute wurde der Vorgang wiederholt.

Zur Reinheitsüberprüfung wurden die verbleibenden Zellen durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer Oberflächenmarker differenziert, es wurde ein CD19-Anteil von 99% angestrebt.

Danach wurden die Zellen direkt für die Versuchsansätze verwertet oder eingefroren.

Für die Tiefkühlagerung wurden die Zellen auf eine Konzentration von 2×10^8 gebracht und in 2 ml Einfriermedium, das aus hitzeinaktiviertem FCS und 10 Prozent DMSO bestand, in einem Kryoröhrchen resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in einer Einfrierbox, die von gekühltem Isopropanol umgeben war, für 24 Stunden bei -80°C und anschließend in einen Tank mit flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

Zellen, die dem Stickstofftank wieder entnommen wurden, wurden in einem Wasserbad bei 37°C eine Minute lang aufgetaut und in 20 ml RPMI-Medium resuspendiert, das vorsichtig auf 20 ml Biocoll Separation Solution in ein 50-ml-Tube pipettiert wurde. Das Gemisch wurde für 15 Minuten bei 2100 rpm ohne Bremse zentrifugiert, die Interphase abgenommen, in ein frisches Tube überführt und bei 1400 rpm für fünf Minuten mit Bremse erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in 10 ml RPMI-Medium aufgenommen und mittels einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl ermittelt.

2.9.2 Nicht-maligne B-Zellen

Die Separation nicht-maligner B-Zellen aus dem Blut gesunder Donatoren wurde mittels positiver Selektion durchgeführt. Dabei wurden anti-CD19-Dynabeads verwendet, die direkt an die B-Lymphozyten binden.

Nachdem der Überstand mit den restlichen Blutzellen verworfen worden war, wurden die an Dynabeads gebundenen CD19-positiven B-Zellen mittels DETACHabeads wieder abgelöst.

2.10 Zellkultur

CLL-Zellen und nicht-maligne B-Zellen wurden bei 37° C Grad und fünf Prozent CO₂ bei hoher Luftfeuchtigkeit in RPMI-Medium kultiviert, dem zehn Prozent fetales Kälberserum sowie Additiva beigefügt wurde.

Zellen einer humanen Myelom-Zelllinie (ANBL-6) wurden bei 37° C Grad, fünf Prozent CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit in RPMI-Medium kultiviert, dem zehn Prozent fetales Kälberserum, Additiva und IL-6 (2 ng/ml) beigefügt wurde.

Stromazellen, der Zelllinie EL08, aus embryonalen Leberzellen der Maus gewonnen, wurden in α -MEM mit Glutamax kultiviert, dem 15 Prozent FCS, fünf Prozent Pferdeserum, ein Prozent Penicillin (10 U/ml) /Streptomycin (10 mg/ml) und 10 μ M 2-Mercaptoethanol beigefügt wurde.

Zum Aussähen der EL08-Zellen für Versuche wurde diesem Medium noch 0,1 Prozent Gelatine zugegeben und ca. 5×10^3 Stromazellen in jedes well einer 24-well Platte ausplattiert und für 24 Stunden bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden, nach Abnahme des Mediums und der nicht anhaftenden Stromazellen, pro well 1×10^6 CLL-Zellen in der Konzentration 1×10^6 /ml zugegeben und weitere 24 Stunden im Brut-

schrank inkubiert. Dann wurden entweder 1 μ M CpG-Oligonukleotide, 50 ng/ml IL-21 oder die Kombination aus 50 ng/ml IL-21 und 1 μ M CpG zu den Stroma-CLL-Ansätzen gegeben und dieser Ansatz für 48 oder 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Der Anteil der Annexin-positiven CLL-Zellen wurde dann zu den gegebenen Zeitpunkten in Annexinassays gemessen.

2.11 Durchflusszytometrie

2.11.1 Prinzip

Zellsuspensionen werden im Gerät für *fluorescence activated cell sorting* (FACS) so stark beschleunigt, dass jede Zelle einzeln einen Laserstrahl durchläuft, wobei sie den Strahl ihren Eigenschaften entsprechend bricht und streut. Das Streuungsmuster wird von Detektoren erfasst und ermöglicht die Differenzierung eines Zellgemischs, z.B. Blut, anhand von spezifischer Größe und Granularität/Membranstruktur der Subpopulationen. Dies spiegelt sich in den Parametern *forward scatter* (FS) und *side scatter* (SS) wider.

Durchflusszytometrisch können Oberflächenproteine oder auch intrazellulär gelegene Proteine, die mit spezifischen Farbstoffen gekoppelt wurden, sichtbar gemacht werden.

Die Farbstoffe werden mit einem Argon-Laser bei 488 nm angeregt und emittieren Licht unterschiedlicher Wellenlängen und damit verschiedener Farben, die vom Gerät detektiert und verarbeitet werden können. Der Stoff FITC sendet zum Beispiel grünes Licht der Wellenlänge 525 nm aus, während PE- oder PI-markierte Proteine Licht von 575 nm bzw. 650 nm aussenden und somit gelblich-orange und orange-rot aufleuchten. Auf diese Weise können auch Mehrfachfärbungen durchgeführt werden, die das Vorhandensein bestimmter Zelltypen mit spezifischen Eigenschaften nahelegen.

Die Intensität des emittierten Lichts ist direkt proportional zur Menge des gebundenen Antikörpers und damit auch direkt proportional zur Menge des markierten Proteins.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software WinMDI (*Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry*) von Microsoft, Redmond, WA, USA.

2.11.2 Annexin V/PI

Je eine Million B-CLL-Zellen der Konzentration 1 Million/ml, die für 24, 48 oder 72 Stunden mit IL-21, CpG-Oligonukleotiden oder beidem inkubiert worden waren, wurden in FACS-Röhrchen gegeben, für fünf Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu dem Zellpellet wurden dann 500 µl Annexin-Puffer, 5 µl PI-working solution und 5 µl Annexin V-FITC gegeben, kurz vortext und für 15 Minuten bei 4° C Grad inkubiert. Danach wurden die Zellen am FACS-Gerät nach ihrer Fähigkeit, Annexin V-FITC und PI zu binden, unterschieden.

Das Protein Annexin bindet Ca^{2+} -abhängig an Phosphatidylserin (PS), das bei frühapoptotischen Zellen von der inneren an die äußere Membranseite der Zelle transloziert wird. Die Koppelung von Annexin an den Farbstoff FITC ermöglicht seine Detektion im FACS-Gerät.

Die Gegenfärbung mit PI hat den Zweck, spätapoptotische und nekrotische Zellen zu detektieren. Da die Zellmembran im Verlauf von Apoptose und Nekrose durchlässig wird, kann bei ihnen der Farbstoff PI an die DNS binden und sie so sichtbar machen. Bei frühapoptotischen Zellen hat dieser Vorgang noch nicht stattgefunden.

Somit können lebende Zellen als Annexin-negativ und PI-negativ, frühapoptotische Zellen als Annexin-positiv und PI-negativ und nekrotische oder spätapoptotische Zellen als Annexin-positiv und PI-positiv imponieren. Nekrotische Zellen können sich jedoch auch Annexin-negativ und PI-positiv darstellen. (van Engeland M. et al., 1998, 7; Vermes I. et al., 1995, 39,46 ff.; Clodi K: et al., 2000, 19 ff.; Asín L. et al., 2012, 1325 f.)

Im Folgenden werden die Annexin-positiven (avitalen) Zellen von den Annexin-negativen (vitalen) abgegrenzt. Dabei wird unter den Annexin-positiven Zellen nicht weiter zwischen PI-negativen und die PI-positiven Zellen unterschieden. Das ist zulässig, weil in den Experimenten der vorliegenden Arbeit der Anteil Annexin-negativer, PI-positiver (nekrotische) Zellen quantitativ irrelevant war.

2.11.3 Mitochondriales Membranpotential ($\Delta\Psi_m$)

Je 1 Million Zellen der Konzentration 1 Million/ml, die für 24, 48 oder 72 Stunden mit IL-21, CpG oder beidem inkubiert worden waren, wurden in FACS-Röhrchen überführt, 4 μ l DiOC₆ (3)-working solution zugefügt, die Röhrchen kurz gevortext und bei 37° C für 30 Minuten inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Ansätze für fünf Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden 500 μ l FACS-Puffer und 10 μ l PI-working solution zugegeben, die Röhrchen kurz gevortext und für zehn Minuten bei 4° C im Dunkeln inkubiert. Darauf folgte die sofortige Messung.

Mitochondrien besitzen ein Membranpotential, das bei der Energiegewinnung eine wichtige Rolle spielt. Normalerweise verläuft über die innere Mitochondrienmembran ein elektrischer Gradient, bei dem der Matrixraum negativ zum Zwischenmembranraum geladen ist.

Während der Apoptose wird die mitochondriale Membran porös und das mitochondriale Membranpotential wird aufgehoben. In Mitochondrien apoptotischer Zellen verbleibt deshalb weniger DiOC₆(3) als in Mitochondrien vitaler Zellen.

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die quantitative Erfassung der aufgenommenen Menge an DiOC₆(3), da es nach entsprechender Anregung grünes Licht emittiert.

(Korchak HM. et al., 1982, 1497 f.,1500; Bedner E. et al., 1999, 184 f.; Loeffler M. et al., 2000, 19–22)

2.11.4 ZAP-70

Je 500.000 aufgereinigte, unbehandelte B-CLL-Zellen in der Konzentration 1 Million/ml wurden in FACS-Röhrchen überführt, für fünf Minuten mit 1400 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit 500 μ l FACS-Puffer gewaschen. Dann wurde in jedes Röhrchen 100 μ l des Reagenz A von FIX und PERM zugegeben, die Proben gevortext und für 15 Minuten bei Raumtemperatur, im Dunkeln inkubiert.

Danach wurden je 100 µl Reagenz B von FIX und PERM sowie 2 µl eines Alexa Fluor® 488-markierten anti-ZAP-70-Antikörper oder 2 µl eines Alexa Fluor® 488-markierten Kontrollantikörpers zupipettiert und die Ansätze nach kurzem Vortexen für 30 Minuten bei 4° C inkubiert.

Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 500 µl FACS-Puffer. Dann wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und die Expression des Oberflächenproteins ZAP-70 durchflusszytometrisch ermittelt.

2.11.5 IL-21-Rezeptor

Je 200.000 B-CLL-Zellen der Konzentration 1 Million/ml, die für 24, 48 oder 72 Stunden mit IL-21, CpG-Oligonukleotiden oder beidem koinkubiert worden waren, wurden in FACS-Röhrchen überführt und mit 500 µl FACS-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, anschließend in jedes Röhrchen entweder 2 µl anti-IL-21-Rezeptor-Antikörper oder 2 µl einer Isotypkontrolle gegeben und nach kurzem Vortexen für 30 Minuten bei 4° C inkubiert.

Danach wurde ein zweites Mal mit 500 µl FACS-Puffer gewaschen, der Überstand verworfen und in jedes Röhrchen 100 µl FACS-Puffer und 10 µl eines PE-markierten Sekundärantikörpers gegeben, um den primären, unmarkierten Antikörper mit dem FACS-Gerät sichtbar zu machen. Nach kurzem Vortexen wurden die Ansätze für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgte ein dritter Waschschrift mit je 500 µl FACS-Puffer, auf den nach erneuter Resuspension in je 300 µl FACS-Puffer die Messung im FACS-Gerät folgte.

2.11.6 Caspase-3-Aktivität

Hierbei wurde ein FITC-markierter Antikörper verwendet, der nicht die 35 kDa große Proform sondern nur das aktive Heterodimer der Caspase-3 erkennt, das aus je einem 12 kDa und einem 17 kDa großen Fragment besteht.

Je 500.000 B-CLL-Zellen der Konzentration 1 Million/ml, die für 24, 48 oder 72 Stunden mit IL-21, CpG-Oligonukleotiden oder beidem koinkubiert worden waren, wurden in

FACS-Röhrchen gegeben und bei 1400 rpm fünf Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und in jedes Röhrchen 100 µl des Reagenz A von FIX und PERM zugegeben. Die Röhrchen wurden gevortext und für 15 Minuten bei Raumtemperatur, im Dunkeln inkubiert.

Auf die Inkubation folgte ein Waschschrift mit 1 ml FACS-Puffer. Danach wurden in jedes Röhrchen 100 µl Reagenz B von FIX und PERM sowie 10 µl FITC-markierter anti-Caspase-3-Antikörper bzw. als Negativkontrolle 10 µl FITC-markierter Kontrollantikörper zugegeben, die nach kurzem Vortexen für 30 Minuten bei 4° C inkubiert wurden. Es folgte ein finaler Waschschrift mit 1 ml FACS-Puffer. Nach Entfernen des Überstandes erfolgte die Aufnahme der pellets in 500 µl FACS-Puffer.

Sowohl bei der Messung des ZAP-70 Statuses, des IL-21-Rezeptors als auch bei der Erfassung der Caspase-3-Aktivität am FACS wurde eine Isotyp- bzw. Negativkontrolle erfasst. Dafür wurde ein Kontrollantikörper verwendet, der zwar markiert, aber nicht gegen das gesuchte Protein gerichtet war. Mit Hilfe dieser Kontrolle lassen sich die Zellen in ihrer durch die Färbung erworbene Farbintensität auf einen Nullwert einstellen. Nach der Messung der Probe, die mit dem Antikörper gegen das gesuchte Protein inkubiert worden war, kann der Messwert der Negativkontrolle abgezogen werden, um den „Reinwert“, also den eigentliche Gehalt des gesuchten Proteins zu erhalten.

2.12 Immunoblot

2.12.1 Prinzip

Die Methode des Western-Blots ermöglicht es, spezifisch bestimmte Proteine in Zellen nachzuweisen. Dazu werden die Zellen lysiert, der Gesamtproteingehalt jedes Zellysatzes ermittelt und äquivalente Proteinmengen auf ein Polyacrylamidgel geladen. Daran wird Gleichstrom angeschlossen, in dessen Feld die Proteine je nach molekularem Gewicht und Ladung wandern können. Kleine Proteine wandern dabei schneller als große. Die so aufgetrennten Proteinfractionen werden auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF-Membran) übertragen. Mit einem Antikörper, der spezifisch an das

gesuchte Protein bindet, und in einem zweiten Schritt mit einem sekundären Antikörper markiert, der zu einer Farbreaktion befähigt ist, kann das gesuchte Protein auf einem Film sichtbar gemacht werden. Diese Methode erlaubt auch eine quantitative Auswertung.

2.12.2 Durchführung

Zur Lyse wurden je 50 Millionen B-CLL-Zellen in der Konzentration 10 Millionen/ml entweder ohne Zusätze, als Mediumkontrolle, oder mit 1 μ molaren CpG-Oligonukleotiden, 50 ng/ml IL-21 oder der Kombination aus beidem für 48 oder 72 Stunden im Blutschrank inkubiert. Dann wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, anschließend der Überstand vollständig mit einer Pipette abgenommen, je nach Größe des pellets zwischen 50 und 100 μ l Lysepuffer zugegeben und unter wiederholtem Vortexen 20 Minuten auf Eis gelagert. Schließlich wurden die Proben für 20 Minuten bei 14000 rpm und 4° C Grad zentrifugiert, das oben befindliche Lysat abgenommen, die Proteinbestimmung durchgeführt, die Proben mit gleichen Mengen 2 x Loading-Buffer versetzt und bei 95° C Grad zehn Minuten aufgekocht.

Für die Proteinbestimmung wurde in einer 96-well-Platte eine Verdünnungsreihe mit einem Proteinstandard erstellt, wobei 5 μ l des unverdünnten Proteinstandards sowie je 5 μ l der unterschiedlichen Verdünnungen (1:1, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) aufgetragen wurden. Von den Lysaten wurden je 2,5 μ l –das entspricht einer Verdünnung von 1:1– aufgetragen und sowohl die Standardverdünnungen als auch die Lysatverdünnungen mit 25 μ l einer 1:6 Mischung aus Reagent S und Reagent A und 200 μ l Reagent B gemischt. Danach erfolgte eine zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur.

Im Anschluss daran wurde mit dem *Universal Microplate Reader* und der Software *kc junior* von *BioTek* (Bad Friedrichshall, Deutschland) die Proteinmenge der Lysate bestimmt.

Im Folgenden wurden 10-prozentige Gele gegossen, bestehend aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Die polymerisierten Gele wurden in eine mit Runningbuffer gefüllten Laufkammer eingesetzt. Die Beladung der ersten Tasche des Sammelgels erfolgte mit 15 μ l Proteinstandard, die weiteren Taschen wurden mit je 30 μ g der Lysate be-

füllt. Die entsprechende Menge in μl konnte durch die Ergebnisse aus der Proteinbestimmung errechnet werden. Anschließend wurde an die Laufkammer Gleichstrom angeschlossen, der eine Wanderung der geladenen Proteinproben im elektrischen Feld ermöglichte. Nach einer 20–30-minütigen „Einlaufphase“ bei 60V, liefen die Proben für weitere 17–19 Stunden bei 28 V weiter, bis sich die Proben vollständig voneinander getrennt hatten.

Danach wurden die im Gel unterschiedlich weit gewanderten Proteinproben auf eine PVDF-Membran übertragen, an der die Proteinlysate aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften blieben. Dazu wurde das Gel auf Whatman-Papier sowie die PVDF-Membran gelegt, von einem weiteren Whatman-Papier bedeckt und in eine Transferkassette eingespannt. Die Kassette wurde in eine mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer gestellt und für ca. 45 Minuten einem Gleichstrom von 800 mA ausgesetzt. Nun wurde die Membran, auf der sich die Proteine befanden, mit 5-prozentigem BSA bzw. 5-prozentiger Milch für 60 Minuten geblockt und anschließend mit dem jeweiligen primären Antikörper für das gesuchte Protein, der 1:2000 in 5-prozentigem BSA oder 5-prozentiger Milch gelöst war, für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Rütteltisch inkubiert. Es folgte dreimal fünfminütiges Waschen mit PBS-Tween. Danach wurde die Membran für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einem, im Verhältnis 1:10.000 in 5-prozentigem BSA oder 5-prozentiger Milch verdünnten, sekundären Antikörper auf dem Rütteltisch inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschens in PBS-Tween und einem letzten Waschschrift mit reinem PBS erfolgt die Entwicklung der Membran.

Damit der primäre Antikörper nicht unspezifisch an mehrere Proteine der Membran bindet, werden die Bindungsstellen mit BSA oder Milch geblockt. BSA wird für Antikörper verwendet, die ein phosphoryliertes Zielprotein besitzen, Milch bei allen anderen Proteinen.

Der dann zugegebene primäre Antikörper vermag nun hauptsächlich an für ihn spezifische Epitope zu binden. Antikörper, die schwach an andere Epitope gebunden sind, werden durch die folgenden Waschschriffe wieder abgelöst.

Der sekundäre Antikörper ist gegen eine Vielzahl primärer Antikörper gerichtet, da er nur spezifisch auf den Ursprungsorganismus des primären Antikörpers reagiert. An den

sekundären Antikörper ist das Enzym Merrettichperoxidase gekoppelt, das zugegebenes Luminol oxidieren kann und dann mit einem detektierbaren Lichtsignal einhergeht. Das Lichtsignal ist dabei umso stärker, je größer die Menge des gebundenen sekundären Antikörpers ist. Somit ist es direkt proportional zu der Menge des gesuchten Proteins. (Towbin H. et al., 1979, 4350–4354)

Zur Entwicklung wurden je 0,5 ml der Chemoluminiszenzsubstrate Luminol/Enhancer Solution und Stable Peroxide Solution in Pico, Dura oder Femto vermischt und mit einer Pipette mehrmals über die Membran gegeben. Danach wurde die Membran in eine Klarsichtfolie gelegt, Luftblasen, die sich eventuell noch zwischen Folie und Membran befanden entfernt und in einer Dunkelkammer Filme für unterschiedliche Zeiträume auf die Klarsichtfolie gelegt. Schließlich wurde das Signal mit einem Entwicklergerät auf dem Film sichtbar gemacht.

2.13 Semiquantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

2.13.1 Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht es, eine Vielzahl an Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz innerhalb eines DNA-Gemisches zu generieren. Dazu werden eine thermostabile DNA-Polymerase und zwei spezifische Oligonukleotid-Primer –je ein Primer für jeden DNA-Einzelstrang– die an bestimmte Abschnitte des Gens binden und als Startpunkte für die DNA-Synthese dienen, benötigt.

Die bei der PCR ablaufende Prozedur besteht aus sich wiederholenden Zyklen folgender drei Schritte:

1. Hitze-Denaturierung bei 94–98° C, bei der sich die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge aufteilt
2. Binden der Primer an die Einzelstränge bei 50–68° C
3. Elongation der Primer durch die DNA-Polymerase unter Verbrauch von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) bei 72° C

Die Menge der amplifizierten DNA-Sequenz verdoppelt sich mit jedem Zyklus, gleichsam der Formel 2^x , wobei x die Anzahl der Zyklen darstellt. So kann innerhalb weniger Stunden ein bestimmter DNA-Abschnitt millionenfach angereichert werden.

Um die Expression einer bestimmten mRNA mittels RT-PCR nachzuweisen, wird zunächst der gesamte RNA-Gehalt der Zellen isoliert. Dies kann auf verschiedenen Wegen erreicht werden. Für die hier beschriebenen Experimente ging man folgendermaßen vor:

Nach Filterung des Zelllysats wurde die RNA über eine Fasermatrix, die RNA bindet, gegeben, dann mehrmals gewaschen und schließlich durch einen Elutionspuffer von der Matrix gelöst. Durch DNase-Verdau wurde eine Kontamination durch genomische DNA verhindert.

Die isolierte RNA wurde anschließend durch das Enzym Reverse Transkriptase in DNA, die cDNA genannt wird, umgeschrieben. Für die Selektivität dieses Prozesses ist auch hier ein Primer, der spezifisch an die mRNA des zu untersuchenden Gens bindet und den Startpunkt der Synthese markiert, verantwortlich.

Informationen zum Ablauf der PCR wurden aus Saiki RK. et al., 1988, 487–491 entnommen.

2.13.2 Durchführung

2.13.2.1 RNA-Isolation mit Absolutely RNA Miniprep Kit

Zur Vorbereitung der Zellen auf die RNA-Isolation wurde jeweils eine Zellsuspension mit ca. 10 Millionen B-CLL-Zellen in ein 50-ml-Tube überführt, fünf Minuten lang bei 1400 rpm zentrifugiert, die Zellen nach Abnahme des Überstandes in der Restflüssigkeit resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurden die Zellen in einer Mikrozentrifuge wiederum fünf Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert, der Überstand mit einer Pipette komplett entfernt und das Zellpellet in ca. 500 µl Lysepuffer und 2,5 µl β-Mercaptoethanol gelöst. Bis zur RNA-Isolierung wurde dieses Gemisch bei -80°C aufbewahrt.

Zur RNA-Isolierung wurde das Zelllysats in einen mit einem Filter versehenen und in einem Auffanggefäß platzierten Prefilter Spin Cup gegeben und bei 13000 rpm in einer

Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Prefilter Spin Cup wurde anschließend verworfen, das Filtrat mit 500 µl 70-prozentigem Ethanol versetzt, gevortext und dann in einen mit einer RNA-bindenden Fasermatrix ausgestatteten Spin Cup, ebenfalls von einem Auffanggefäß umgeben, transferiert und 60 Sekunden lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Der nächste Schritt bestand darin, das Filtrat zu entfernen, die membrangebundene RNA mit 600 µl Niedrig-Salz-Puffer zu waschen und wiederum 60 Sekunden bei 13000 rpm zu zentrifugieren. Nach erneutem Verwerfen des Filtrats und nochmaliger zweiminütiger Zentrifugation bei 13000 rpm erfolgte die Zugabe der DNase-Lösung, die aus 50 µl DNase-Verdau-Puffer und 5 µl RNase-freier DNase I hergestellt wurde. Dieser Ansatz wurde 15 Minuten bei 37° C in einem CO₂-freien Inkubator aufbewahrt und dann dreimal gewaschen: zuerst mit 600 µl Hoch-Salz-Puffer, dann je einmal mit 600 µl und 300 µl Niedrig-Salz-Puffer. Dem letzten Waschschrift folgte eine Zentrifugation für zwei Minuten bei 13000 rpm, um die Fasermatrix zu trocknen. Das Auffanggefäß wurde verworfen und der Spin Cup mit Fasermatrix in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Nach Zugabe von 50 µl Elutionspuffer auf die Fasermatrix wurde der Ansatz zwei Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und dann eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Die eluierte RNA wurde bis zur cDNA-Synthese bei -80° C gelagert.

2.13.2.2 cDNA-Synthese mit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR

Nach der spektrophotometrischen Quantifizierung der isolierten RNA (Messung der optischen Dichte bei 250 nm), wurde für die cDNA-Synthese ca. 1 µg dieser RNA, 1 µl oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Konzentration 500 µg/ml) und 1 µl dNTP Mix (Konzentration 10 mM) in ein PCR-Tube auf Eis pipettiert und mit RNase-freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde dann 5 Minuten lang auf 65° C erhitzt und nachfolgend für eine Minute auf Eis gestellt. Dann wurden 2 µl 10 x First-Strand-Puffer, 4 µl MgCl₂ (Konzentration 25 mM), 2 µl DTT (Konzentration 0,1 M) und 1 µl RNaseOUT (Konzentration 40 U/ml) zugegeben, vermischt und kurz zentrifugiert. Auf eine zweiminütige Inkubation bei 42° C folgte die Zugabe von 1 µl SuperScript II RT (Konzentration 200 U/ml) und eine erneute Inkubation bei 42° C über 50 Minuten mit einer anschließenden Erhitzung auf 70° C für 15 Minuten.

Die so entstandene cDNA wurde entweder sofort für die PCR eingesetzt, oder bei -20° C gelagert.

2.13.2.3 PCR

Nach der Gewinnung der cDNA wurde erst eine PCR mit β -Aktin durchgeführt um eventuelle Schwankungen in der RNA-Menge unter den Proben auszugleichen. Dazu wurden von jeder Probe 2 μ l eingesetzt, was einer ungefähren Menge von 50 ng RNA entspricht. Ergaben sich in der PCR dann Unterschiede in der Intensität der Banden, konnten diese Mengen noch geringfügig erhöht oder verringert werden.

β -Aktin ist ein Zytoskelettprotein, das in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Da seine Produktion in B-CLL-Zellen meist nur geringfügig variiert, wird es bei Immunoblots und PCR häufig zur Ladungskontrolle herangezogen.

Von jeder cDNA-Probe wurden ca. 2 μ l in 0,2 ml-Eppendorf-Falcons überführt und mit RNase- und DNase-freiem Wasser auf 10 μ l aufgefüllt. Zusätzlich wurde in jeden Eppendorf-Falcon 10 μ l einer Mischung zugegeben, die folgendermaßen zusammengesetzt war: je 0,4 μ l forward und reverse Primer (20 μ M), 2 μ l 10 x Puffer (+MgCl₂), 3,2 μ l dNTP-Mix, 3,6 μ l RNase- und DNase-freies Wasser und 0,4 μ l AmliTaq Polymerase. Anschließend wurden die Proben kurz gevortext, 30 Sekunden lang zentrifugiert und in das PCR-Gerät gestellt, in dem sie die gewünschte Anzahl an Zyklen der cDNA-Vermehrung durchliefen.

Nach einer zweiminütigen Aktivierung des Enzyms bei 96° C gefolgt von einer vierminütigen Denaturierung bei 92° C begann die zyklische Abfolge von einminütiger Denaturierung bei 94° C, einminütigem Annealing bei 56° C für β -Aktin und 60° C für den IL-21-Rezeptor und zweiminütiger Elongation bei 72° C. Nach vielfacher Wiederholung der Zyklenabfolge durchliefen die Proben eine finale Erwärmung auf 72° C für acht Minuten.

Für β -Aktin wurden 24 Zyklen durchlaufen und für den IL-21-Rezeptor 29.

Die Proben wurden auf ein 1,5-prozentiges Gel aufgetragen. Dazu wurden 3 g Agarose in 200 ml TAE aufgelöst, kurz aufgeköcht und dann 5 Minuten lang, während das Gel

etwas abkühlte, gerührt, um Bläschen zu entfernen. Zum Schluß wurden 2 µl Ethidiumbromid zugegeben, die noch flüssige Gelsubstanz in eine Form gefüllt und ein Plastikamm eingesteckt, um Platz für die später zu befüllenden Taschen zu schaffen. Das feste Gel wurde in die Laufkammer gelegt, die mit TAE gefüllt war und jede Tasche mit ca. 10 µl der Proben, zu denen vorher je 4 µl 6 x Ladepuffer gegeben worden waren, beladen. Die erste Tasche wurde mit 10µl des Standards 100bp-ladder befüllt.

Die DNA-Proben wanderten bei 100 V 30 Minuten lang im elektrischen Feld. Danach wurde das Gel aus der Kammer genommen und unter UV-Licht die fluoreszierenden Proben sichtbar gemacht.

Die Proben waren durch Ethidiumbromid, das in die DNA interkalierte und unter UV-Licht rot fluoresziert, sichtbar geworden.

Die Ergebnisse wurden mit dem Programm *Quantity one* (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) ausgewertet.

2.14 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung wurden gepaarte und ungepaarte t-Tests herangezogen. P-Werte < 0,05 wurden als signifikant, p-Werte < 0,01 wurden als hochsignifikant bezeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 Wirkung von IL-21 und CpG auf B-CLL-Zellen

Im Rahmen der Experimente der vorliegenden Arbeit wurden zuerst Titrationsversuche mit IL-21 durchgeführt, sowie unterschiedliche Inkubationszeiträume untersucht, um die Wirkung von IL-21 auf CLL-Zellen näher zu charakterisieren.

Dazu wurden jeweils 1×10^6 B-CLL-Zellen in der Konzentration 1×10^6 /ml mit steigenden Konzentrationen (1ng/ml, 10ng/ml, 25ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml) rekombinantes, humanes IL-21 in 24-well-Platten koinkubiert. Diese Ansätze wurden sowohl mit als auch ohne Koinkubation mit CpG-Oligonukleotiden in einer Konzentration von $1 \mu\text{mol/l}$ durchgeführt. Als Kontrollen wurden zusätzlich je 1×10^6 CLL-Zellen untersucht, die weder mit IL-21 noch CpG-Oligonukleotiden koinkubiert wurden (Mediumkontrolle). Diese Ansätze wurden jeweils für 24, 48 oder 72 Stunden im Brutschrank inkubiert und anschließend mit Annexin V und PI gefärbt. Im Durchflusszytometer (FACS-Gerät) wurde dann der Anteil der Annexin-positiven Zellen an der Gesamtzahl der Zellen gemessen.

Die Konzentrationen für IL-21 wurden analog Jahrsdörfer B. et al., 2006, 2715, und Brenne AT. et al., 2002, 3758 f. gewählt, die Konzentration der CpG-Oligonukleotide analog Decker T. et al., 2000, 559.

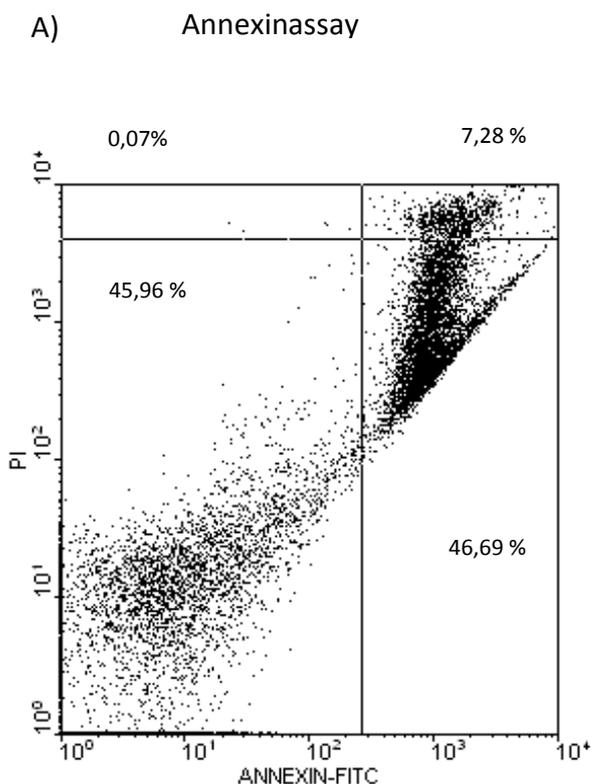


Abbildung 3.1 Repräsentative Darstellung eines Annexinassays

Messung der Annexin V- und PI-Aufnahme von B-CLL-Zellen nach 48h in Mediumkultur alleine. Die y-Achse stellt die Intensität der PI-Aufnahme, die x-Achse das Ausmaß der Annexin V-Bindung dar. Im rechten oberen Bereich liegen die Annexin-positiven, PI-positiven (spätapoptotischen/nekrotischen) Zellen, im rechten unteren Quadranten die Annexin-positiven, PI-negativen (frühapoptotischen) Zellen. Im linken unteren Quadranten sind die Annexin-negativen, PI-negativen (vitalen) Zellen zu detektieren. Annexin-negative, PI-positive (nekrotische) Zellen finden sich im linken oberen Bereich. Jedem Bereich ist sein prozentualer Anteil an Zellen von der Gesamtpopulation zugeordnet.

Abbildung 3.1 zeigt, dass auch nach alleiniger 48-stündiger Kultur in Medium ein erheblicher Teil der CLL-Zellen apoptotisch werden kann (Annexin-positiv). Der Anteil der sog. Spontanapoptose ist unter den Zellen verschiedener CLL-Patienten sehr variabel. Annexin-negative, PI-positive B-CLL-Zellen wurden in den Experimenten der vorliegenden Arbeit nur in sehr geringem Ausmaß detektiert.

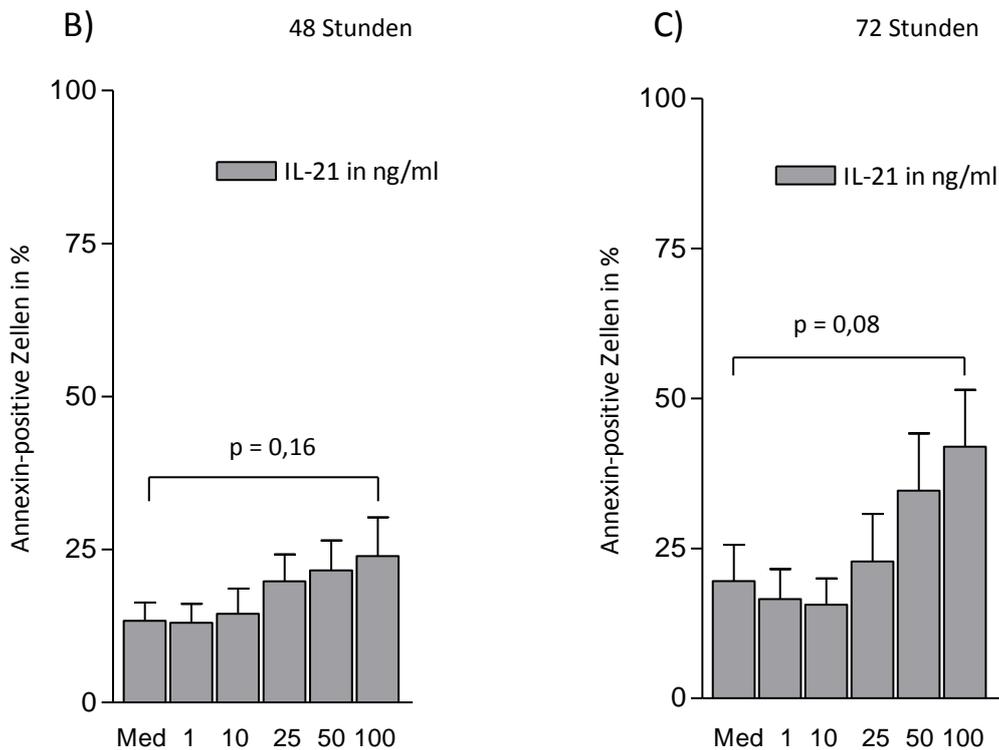


Abbildung 3.2 IL-21-Titrationsexperimente im Annexinassay

Messung der Annexin-positiven B-CLL-Zellen nach Inkubation mit IL-21.

Auf der y-Achse ist der Prozentsatz Annexin-positiver B-CLL Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt (48h + 72h) dargestellt. Auf der x-Achse sind steigende Konzentrationen von IL-21 in ng/ml aufgetragen, wobei die erste Probe die Mediumkontrolle (Med) darstellt.

Angegeben ist der Prozentsatz an Annexin-positiven Zellen + SEM von B-Zellen 6 verschiedener B-CLL Patienten. Ungepaarte t-Tests wurden durchgeführt um Unterschiede zwischen der Mediumkontrolle und mit IL-21 behandelten Zellen zu beurteilen.

Wie aus Abbildung 3.2 und ersichtlich ist, steigt der Prozentsatz der Annexin-positiven Zellen bei zunehmender Konzentration von IL-21. Jedoch ist die Apoptoserate bei keiner Konzentration von IL-21 statistisch signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Mediumkontrolle. Verhältnismäßig nimmt der Anteil an Annexin-positiven B-CLL-Zellen am stärksten in Konzentrationen von 25 ng/ml bzw. 50 ng/ml IL-21, verglichen mit der Mediumkontrolle zu. Eine toxische Wirkung für höhere Konzentrationen von IL-21 (50 und 100 ng/ml) wurden in den durchgeführten Annexinassays zu den jeweils beobachteten Zeiträumen (24h, 48h, 72h) nicht detektiert, da diese keine nekrosetypischen Ergebnisse in Form von Annexin-negativen, PI-positiven Zellen zeigten.

Des Weiteren zeigte sich eine Zunahme der Annexin-positiven B-CLL-Zellen im Sinne einer Apoptoseinduktion bei zunehmender Inkubationsdauer mit IL-21.

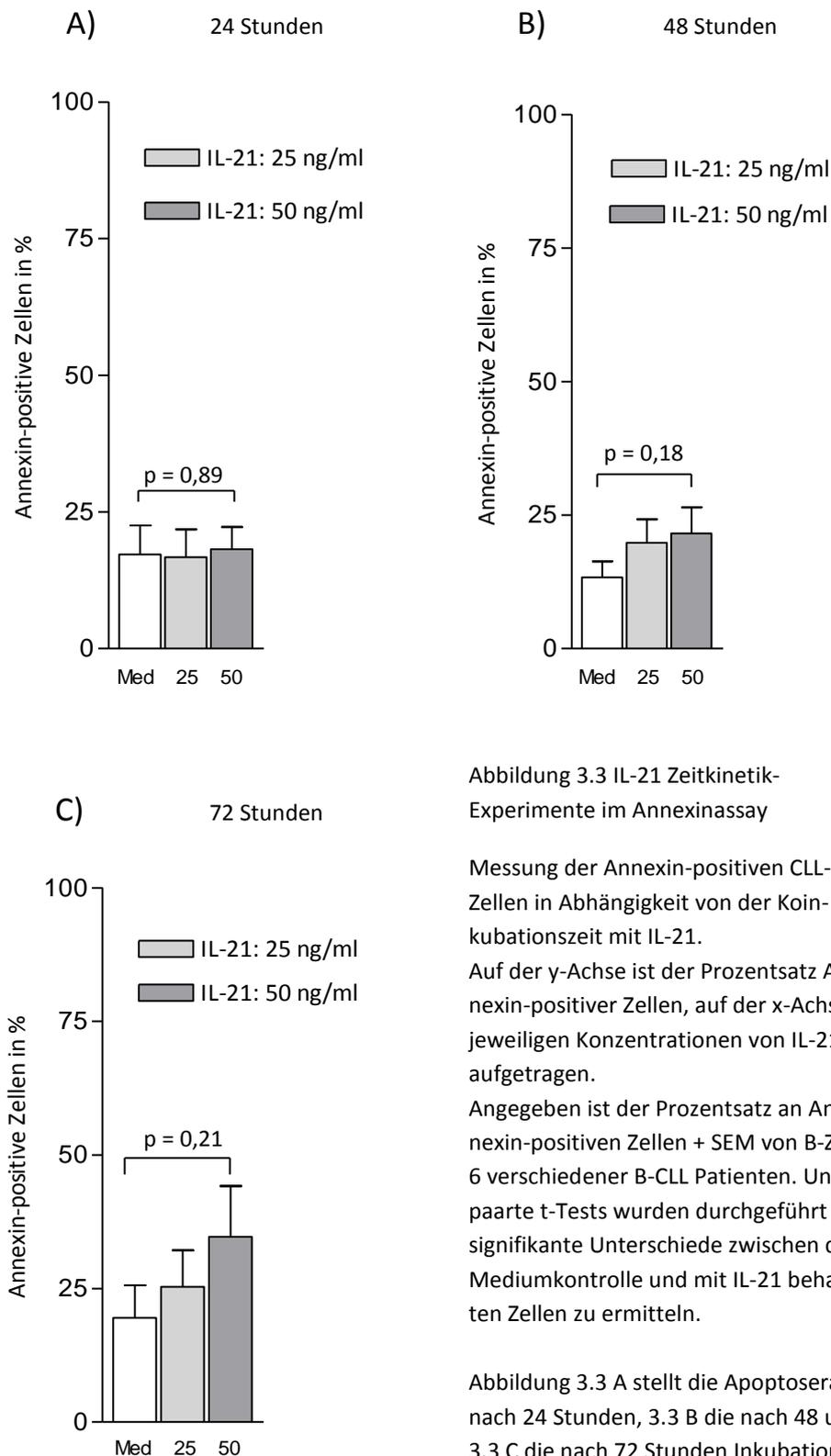


Abbildung 3.3 IL-21 Zeitkinetik-Experimente im Annexinassay

Messung der Annexin-positiven CLL-Zellen in Abhängigkeit von der Koinkubationszeit mit IL-21.

Auf der y-Achse ist der Prozentsatz Annexin-positiver Zellen, auf der x-Achse die jeweiligen Konzentrationen von IL-21 aufgetragen.

Angegeben ist der Prozentsatz an Annexin-positiven Zellen + SEM von B-Zellen 6 verschiedener B-CLL Patienten. Ungepaarte t-Tests wurden durchgeführt um signifikante Unterschiede zwischen der Mediumkontrolle und mit IL-21 behandelten Zellen zu ermitteln.

Abbildung 3.3 A stellt die Apoptoserate nach 24 Stunden, 3.3 B die nach 48 und 3.3 C die nach 72 Stunden Inkubation mit IL-21 dar.

Abbildung 3.3 A zeigt, dass in B-CLL-Zellen nach Koinkubation mit IL-21 in den angegebenen Konzentrationen für 24 Stunden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Apoptoserate sichtbar sind, während die apoptotische Wirkung von IL-21 nach 48 Stunden abhängig von der eingesetzten Konzentration des Zytokins deutlicher zunimmt. Dieser Effekt ist nach 72 Stunden Koinkubation noch deutlicher ausgeprägt, jedoch nicht statistisch signifikant im Vergleich zur Mediumkontrolle.

Längere Inkubationszeiten wurden nicht gewählt, da die Spontanapoptoserate der kultivierten B-CLL-Zellen zu späteren Zeitpunkten stark zunimmt (Kalvelyté A. et al., 1994, 350).

In weiteren Versuchen wurde die Apoptoseinduktion in B-CLL-Zellen nach alleiniger Inkubation mit IL-21 mit einer Koinkubation von IL-21 und CpG- Oligonukleotiden verglichen.

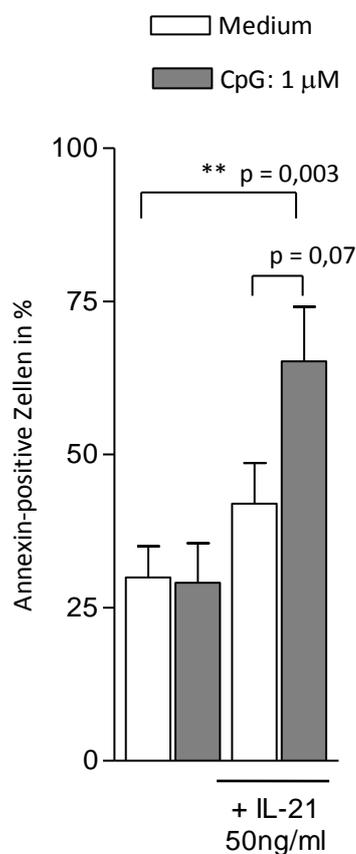


Abbildung 3.4 Koinkubation von IL-21 und CpG- Oligonukleotiden im Annexinassay

Vergleich der Wirkung von jeweils IL-21 und CpG alleine, sowie IL-21 zusammen mit CpG nach 72 Stunden Inkubationszeit.

Dargestellt ist der Anteil der Annexin-positiven B-CLL-Zellen (y-Achse) nach Inkubation in Medium alleine, zusammen mit CpG oder IL-21 alleine, oder in Kombination mit IL-21 und CpG in den angegebenen Konzentrationen (IL-21 50 ng/ml, CpG 1 µM) (x-Achse).

Die Graphik repräsentiert Werte von 13 verschiedenen CLL-Patienten, jeweils als statistischer Mittelwert + Standardabweichung des Mittelwerts.

Es wurden gepaarte und ungepaarte t-Tests durchgeführt.

Die Apoptoseinduktion durch CpG und IL-21 in Kombination ist hoch signifikant im Vergleich zur Mediumkontrolle ($p=0,003$). Die Steigerung der Apoptoserate durch zusätzliche Inkubation mit CpG-Oligonukleotiden im Vergleich zu IL-21 alleine ist nicht signifikant ($p=0,07$).

Abbildung 3.4 zeigt, dass die Kombination von IL-21 und CpG-Oligonukleotiden die Apoptoseinduktion, gemessen im Annexin V Assay, in B-CLL-Zellen signifikant erhöht. Der pro-apoptotische Effekt von CpG in Kombination mit IL-21 ist sowohl nach 48 Stunden als auch nach 72 Stunden Inkubation signifikant höher ausgeprägt, im Vergleich zur Mediumkontrolle und auch deutlich, jedoch nicht signifikant, verglichen mit der alleinigen Koinkubation mit IL-21. Dabei sind die Effekte von IL-21 + CpG nach 72 Stunden Inkubation ausgeprägter als nach 48 Stunden.

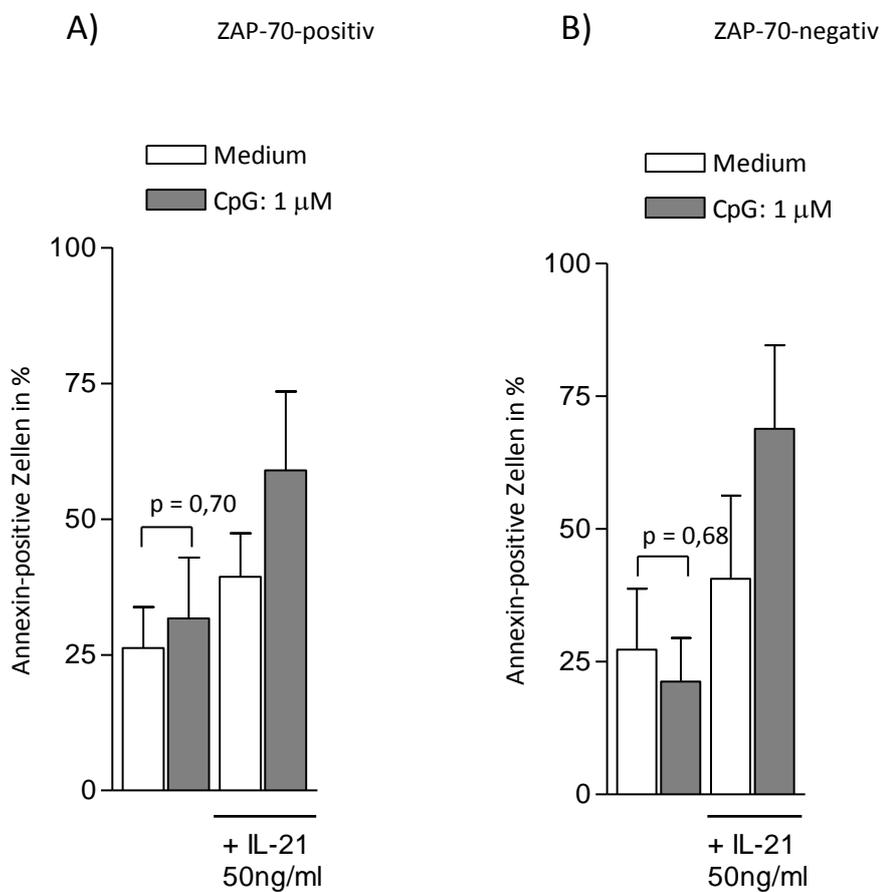


Abbildung 3.5 Differenzierung der Wirkung von CpG-Oligonukleotiden und IL-21 auf B-CLL-Zellen abhängig von ihrem ZAP-70 Status im Annexinassay

Auf der y-Achse ist der prozentuale Anteil der Annexin-positiven Zellen an der Gesamtpopulation angegeben, auf der x-Achse ist neben der Mediumkontrolle, die Koinkubation mit 1 µM CpG, 50 ng/ml IL-21 oder beiden Substanzen (CpG+IL-21) in den jeweiligen Konzentrationen für 72 Stunden dargestellt. In beide Grafiken gehen Werte von je fünf Patienten ein, aufgetragen als statistisches Mittel + Standardabweichung vom statistischen Mittelwert. Zur statistischen Brechnung wurden ungepaarte t-Tests durchgeführt.

Teilt man die CLL-Zellen nach ihrem ZAP-70 Status ein (siehe Kapitel 2.11.4, Seite 50), ist erkennbar, dass B-CLL-Zellen mit positivem ZAP-70 Status tendenziell pro-apoptotisch auf CpG reagieren, während bei ZAP-70-negativen Zellen häufig eine anti-apoptotischer Wirkung ersichtlich ist, wobei keine Signifikanz im Vergleich zur Medikationkontrolle besteht. Dieses Ergebnis zeigt, dass CpG-Oligonukleotide auch als Einzelsubstanz Effekte in CLL-Zellen induzieren kann, wie schon Jahrsdörfer et al. zeigten (Jahrsdörfer B. et al., 2005, 380).

Hingegen gibt es zwischen ZAP-70-positiven und ZAP-70-negativen B-CLL-Zellen keinen ausgeprägten Unterschied in der Reaktionsweise auf IL-21 alleine und der Kombination aus IL-21 und CpG-Oligonukleotiden.

3.2 Wirkung von IL-21 und CpG auf die IL-21-Rezeptorexpression

Die mRNA-Quantifizierung der IL-21-Rezeptortranskription wurde in der PCR, die intrazelluläre Messung der Rezeptorexpression mittels Western-Blot detektiert und die Erfassung des Prozentsatzes von B-CLL-Zellen, die den IL-21-Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen, erfolgte per Durchflusszytometrie.

3.2.1 PCR

Um eine Abschätzung der Transkription des Genes, das für den IL-21-Rezeptor kodiert auf mRNA Ebene in B-CLL Zellen zu erhalten, wurden PCR Experimente (siehe Kapitel 2.13, ab Seite 55) durchgeführt. Dazu wurden je 1×10^7 unbehandelte B-CLL-Zellen von 10 verschiedenen Patienten verwendet.

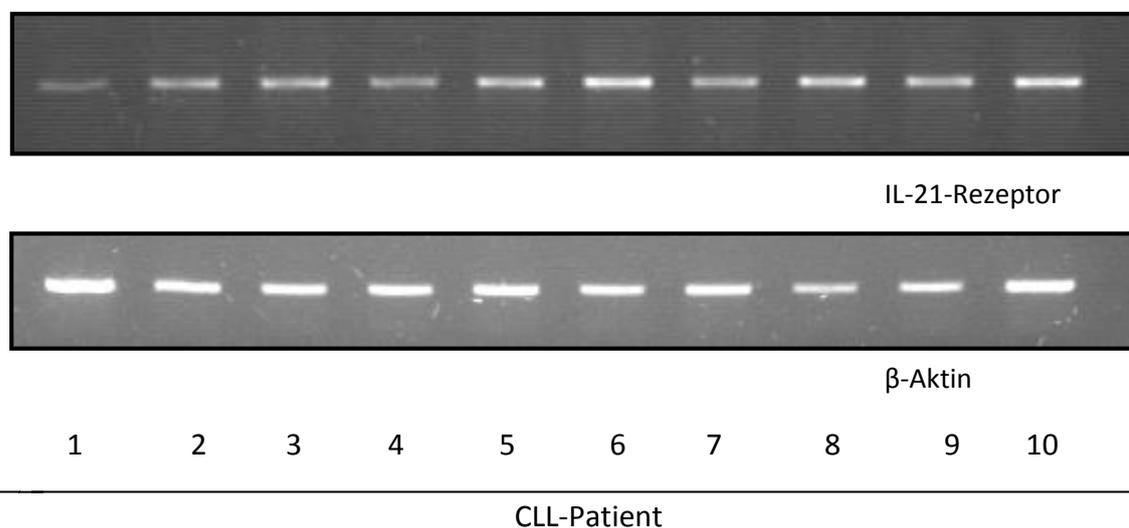


Abbildung 3.6 IL-21-Rezeptorexpression in der PCR (T_0)

Quantifizierung der IL-21-Rezeptor-mRNA von zehn verschiedenen B-CLL-Patienten zum Zeitpunkt null, ohne vorangegangene Stimulation der Zellen. β -Aktin dient der Ladungskontrolle.

Die Ergebnisse zeigen, dass CLL-Zellen den DNA-Abschnitt, der für den IL-21-Rezeptor kodiert, ohne Vorstimulation in unterschiedlichem Ausmaß transkribieren (Abbildung 3.6).

3.2.2 Western-Blot

Des Weiteren wurde die Expression des IL-21-Rezeptors auf Proteinebene mittels Western-Blot untersucht. Dazu wurden Proben unstimulierter B-CLL-Zellen zum Zeitpunkt null (T_0) auf 10-prozentige Agarosegele aufgetragen. Verglichen mit den PCR-Daten konnte auch im Western-Blot eine unterschiedlich starke Expression der 60 kDa großen, für den Rezeptor spezifische, IL-21R-Domäne nachgewiesen werden.

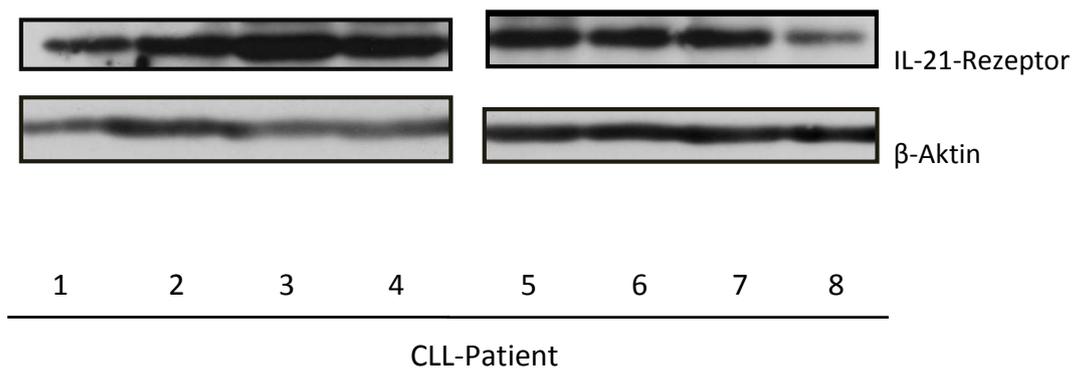


Abbildung 3.7 IL-21-Rezeptorexpression im Immunoblot (T_0)

Detektion des IL-21-Rezeptors (IL-21R, 60 kDa) im Western-Blot von acht verschiedenen CLL-Patienten zum Zeitpunkt null, ohne vorangegangene Stimulation der Zellen. Darunter ist β -Aktin als Ladungskontrolle aufgetragen.

Aus Abbildung 3.7 geht hervor, dass der IL-21-Rezeptor in unstimulierten B-CLL-Zellen verschiedener Patienten unterschiedlich stark exprimiert wird. Da B-CLL-Zellen von gleichen Patienten für die PCR- und Immunoblot-Experimente verwendet wurden, scheint in den vorliegenden Versuchen die IL-21-Rezeptor Transkription positiv mit der IL-21 Rezeptorexpression zu korrelieren.

Im Anschluss daran wurde die Expression des IL-21-Rezeptors auf Proteinebene bei vorbehandelten B-CLL-Zellen untersucht. Dazu wurden je 5×10^7 Zellen mit $1 \mu\text{M}$ CpG, 50 ng/ml IL-21 oder der Kombination aus beiden Substanzen sowie einer Mediumkontrolle für 48 Stunden bei 37°C inkubiert, danach die Zellen lysiert und eine Western-Blot Analyse durchgeführt.

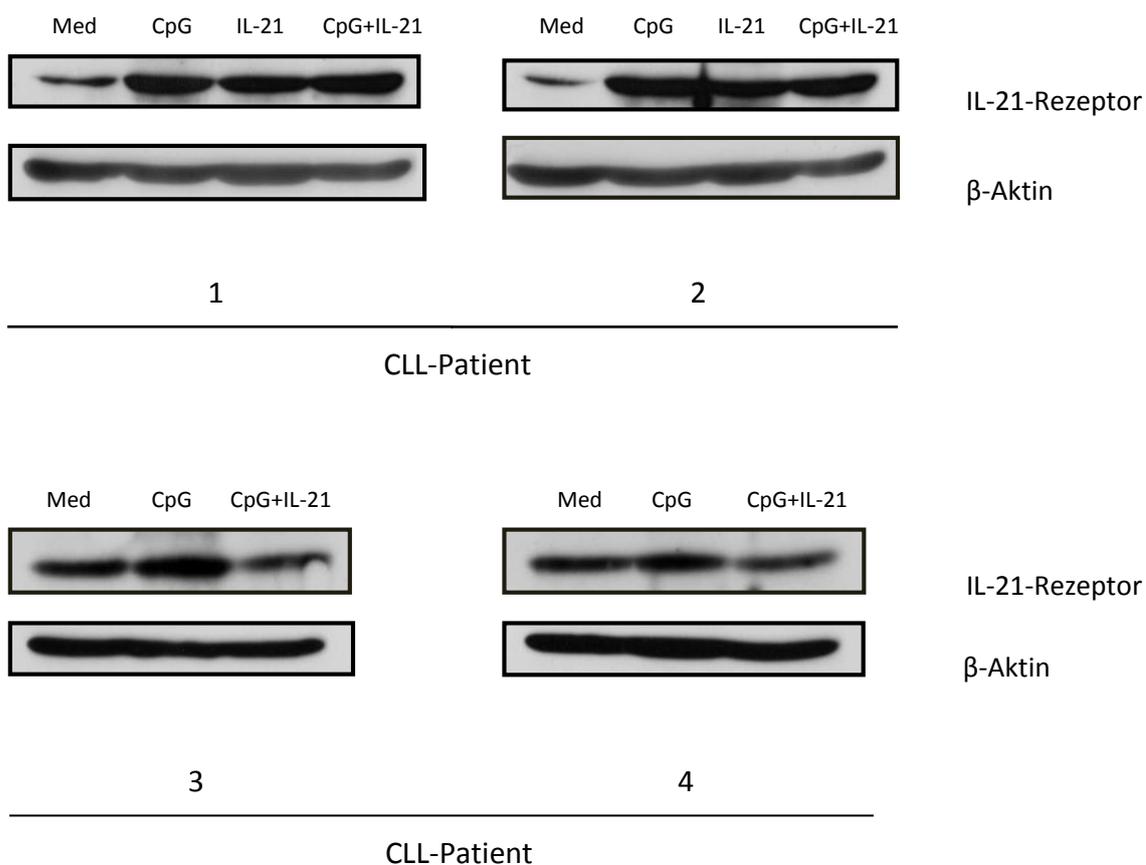


Abbildung 3.8 IL-21-Rezeptorexpression nach Koinkubation mit CpG und IL-21 im Immunoblot

Detektion des IL-21-Rezeptors von vier untersuchten CLL-Patienten, nach 48 Stunden Koinkubation mit $1 \mu\text{M}$ CpG, bei den ersten beidem Patienten 50 ng/ml IL-21(IL-21) alleine oder der Kombination von beiden Substanzen (CpG+IL-21). Als Vergleich wurde als erste Probe eine Mediumkontrolle (Med) aufgetragen. Darunter jeweils β -Aktin als Ladungskontrolle.

Bei Patient 1 und 2 bewirkten IL-21, CpG und die Kombination aus beiden Substanzen eine ähnlich starke Hochregulation der Rezeptorexpression, im Vergleich zur Mediumkontrolle. Bei den Patienten 3 und 4 ist die Rezeptorexpression lediglich nach alleiniger Inkubation mit CpG-Oligonukleotiden gering erhöht, jedoch ist kein ausgeprägter Unterschied in der Regulation im Vergleich zur Mediumkontrolle erkennbar. Eine Abhän-

gigkeit der unterschiedlichen Expressionsmuster von dem ZAP-70 Status der B-CLL-Zellen ließ sich nicht nachweisen.

3.2.3 Durchflusszytometrie

Um die Oberflächenexpression des IL-21-Rezeptors weiter zu untersuchen, wurden zusätzliche Experimente mit Oberflächenfärbungen und anschließender FACS-Analyse durchgeführt.

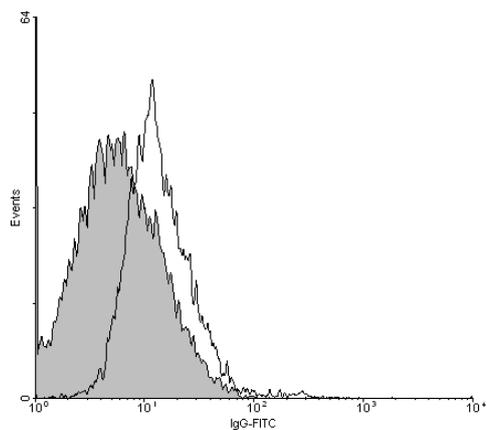
Dazu wurde der anti-IL-21-Antikörper aus den Immunoblot-Versuchen (siehe Kapitel 2.5.1, Seite 38) benutzt und zusätzlich mit PE-markiert.

Je 5×10^5 B-CLL-Zellen wurden mit 50 ng/ml IL-21, 1 μ M CpG oder einer Kombination aus beiden Substanzen für 48 Stunden oder 72 Stunden koinkubiert. Dann wurde die Oberflächenexpression des Rezeptors per Durchflusszytometrie untersucht.

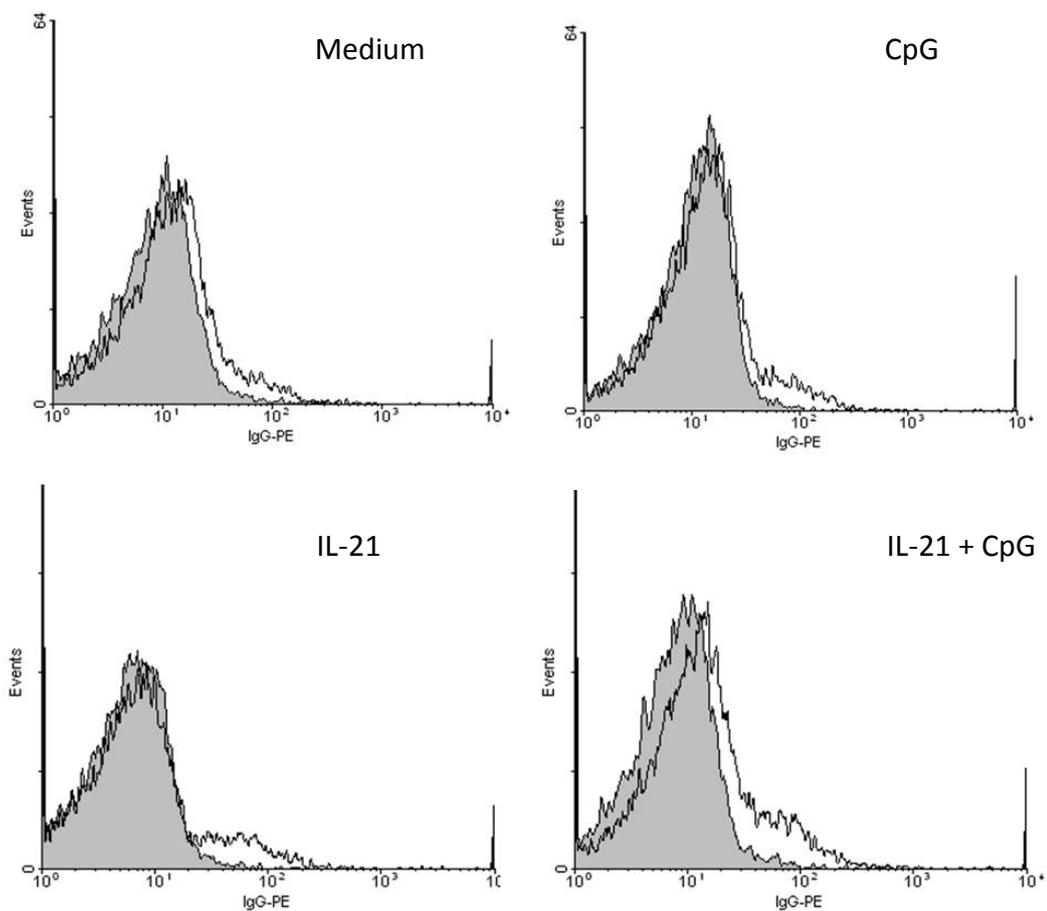
Laut Brenne et al. exprimieren unstimulierte Zellen der humanen Myelom-Zelllinie ANBL-6 den IL-21-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche (Brenne AK. et al., 2002, 3759).

Deswegen wurden ANBL-6-Zellen im folgenden Experiment als Positivkontrolle verwendet.

A) ANBL-6



B) CLL-Patient 1



C) CLL-Patient 2

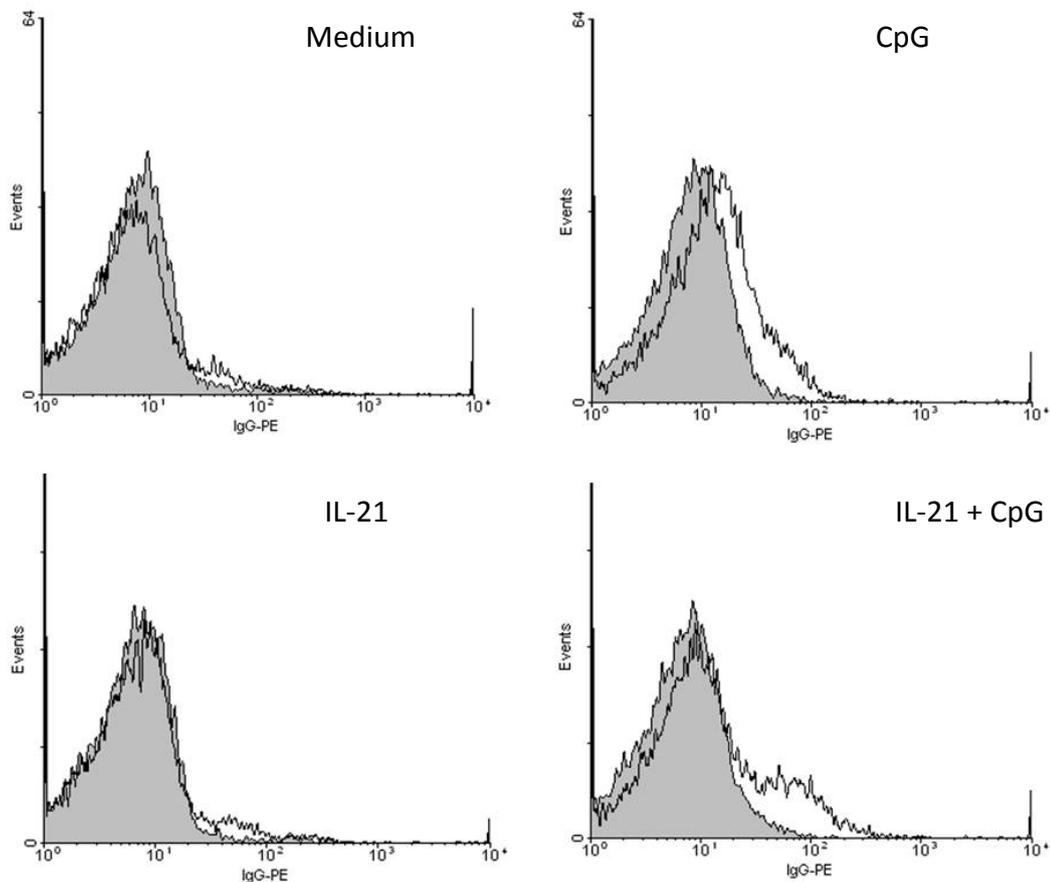


Abbildung 3.9 IL-21-Rezeptorexpression nach Koinkubation mit CpG und IL-21 in der Durchflusszytometrie.

Repräsentative Darstellung der Detektion der IL-21-Rezeptor-Oberflächenexpression an Zellen zweier verschiedener CLL-Patienten von insgesamt sechs untersuchten Patienten in der Durchflusszytometrie nach 48-stündiger Inkubation in Medium alleine, zusammen mit 1 μ M CpG, 50 ng/ml IL-21 oder der Kombination aus 1 μ M CpG und 50 ng/ml IL-21. Dargestellt ist die Zellzahl (y-Achse), als Funktion der Intensität des Farbsignals (x-Achse), angegeben als Zehnerpotenzen. Die grau unterlegte Fläche stellt die Isotypkontrolle dar.

Als Positivkontrolle dienten unstimulierte Zellen der Zelllinie ANBL-6 (Abb. 3.9 A).

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche legen nahe, dass die "basale" Expression des IL-21-Rezeptors auf der Plasmamembran verschiedener B-CLL Patientenzellen unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Nach Stimulation mit CpG, IL-21 oder der Kombination aus beiden Substanzen zeigt sich zudem eine individuell deutlich heterogene Wirkung auf die Rezeptorexpression.

3.3 Einfluss von IL-21 und CpG auf die intrazellulären Signalwege

3.3.1 Signal transducers and activators of transcription (STATs)

Die zellulären Downstream-Effekte von IL-21, sowohl in B-CLL-Zellen (deToto D. et al., 2005, 3711 f.), als auch in T-Lymphozyten (Bennett F. et al., 2003, 716) und NK-Zellen (Strengell M. et al., 2002, 3602), werden über STATs vermittelt. Ihre Aktivierung führt in B-CLL-Zellen unter anderem zu caspaseabhängiger Apoptose (deToto D. et al., 2005, 3711 f.)

STAT-Aktivierung kann in Leukozyten auch über *suppressor of cytokine signaling* (SOCS) (Starr R. et al., 1997, 918 ff.) moduliert werden (Dalpke AH. et al., 2001, 7084 ff.), die wiederum von CpG-Oligonukleotiden stimuliert werden können.

Liang et al. zeigten, dass durch CpG-Oligonukleotide ein STAT-abhängiger Signalweg in B-CLL-Zellen aktiviert werden kann (Liang X. et al., 2010, 5045 ff.).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Phosphorylierungsstatus der STATs un- behandelter B-CLL-Zellen zum Zeitpunkt null untersucht.

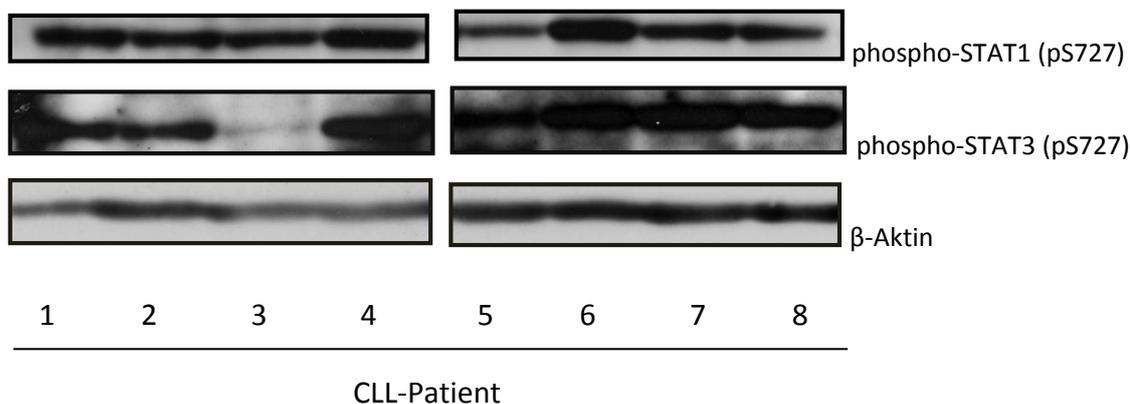


Abbildung 3.10 STAT-Expression im Immunoblot (T_0)

Darstellung einer Immunoblotanalyse des Serinphosphorylierungsstatus von STAT1 (92 kDa) und STAT3 (89 kDa) an Position S727 von acht CLL-Patienten zum Zeitpunkt null, ohne vorherige Stimulation. Als Ladungskontrolle dient β -Aktin.

Abbildung 3.10 zeigt, dass die Serinphosphorylierung von STAT1 und STAT3 zum Zeitpunkt null bei allen Patienten in unterschiedlicher Ausprägung vorhanden ist.

Im Folgenden wurden die Serin- als auch die Tyrosinphosphorylierung der STAT1, 3 und 5 Proteine an je 5×10^7 CLL-Zellen untersucht, die 48 Stunden mit $1 \mu\text{M}$ CpG, 50 ng/ml IL-21, oder der Kombination aus beiden Substanzen inkubiert worden waren, verglichen mit der Mediumkontrolle.

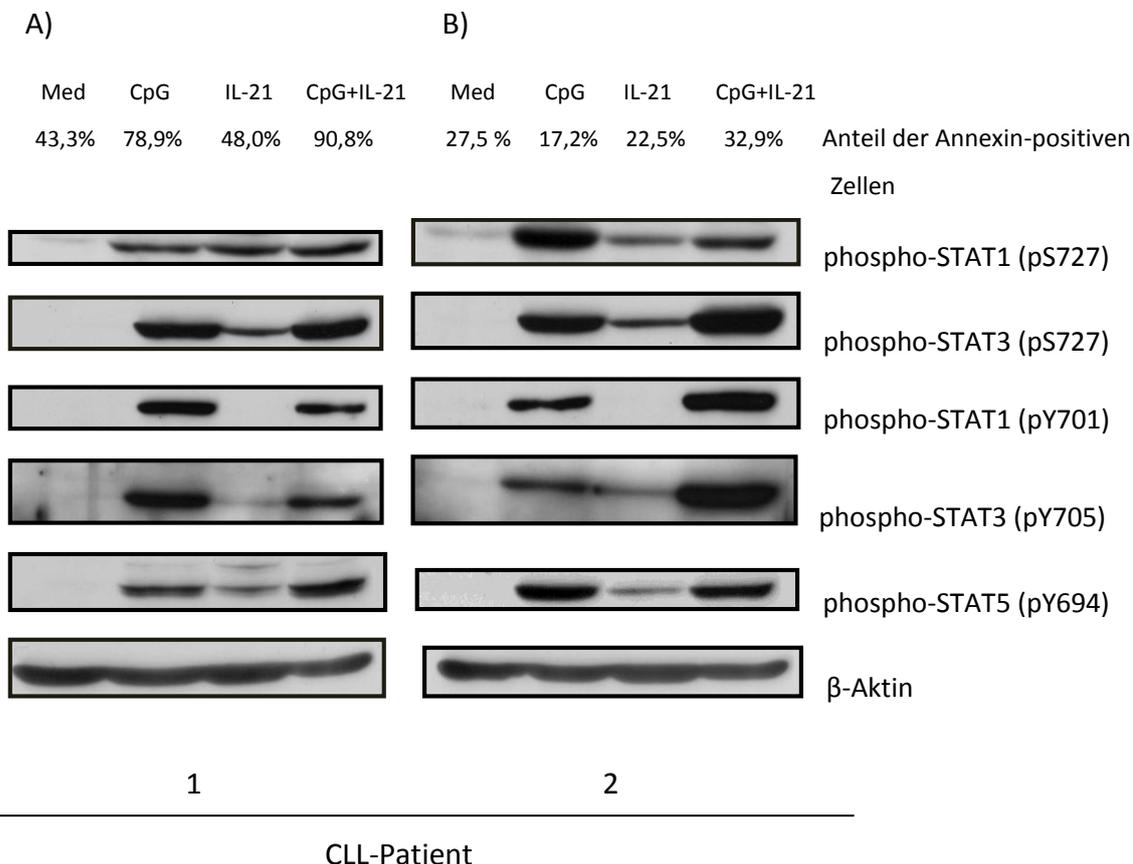


Abbildung 3.11 STAT-Expression nach Koinkubation mit CpG und IL-21 im Immunoblot

Repräsentative Darstellung des Phosphorylierungsstatus im Immunoblot von STAT1 (92 kDa), STAT3 (89 kDa) und STAT5 (90 kDa) an Serin (pS727)- und Tyrosinresten (pY701, pY705, pY694) nach 48-stündiger Kultur in Medium (Med), $1 \mu\text{M}$ CpG, 50 ng/ml IL-21 oder der Kombination aus $1 \mu\text{M}$ CpG und 50 ng/ml IL-21 von zwei der insgesamt sechs untersuchten Patienten. Als Ladungskontrolle diente β -Aktin.

Die Ergebnisse korrelierend durchgeführter Annexinassays sind als Prozentsatz Annexin-positiver Zellen an der Gesamtpopulation angegeben.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen legen nahe, dass die Proteine STAT1, STAT3 und STAT5 in B-CLL-Zellen nach 48 Stunden in Kultur nicht oder nur schwach in phosphorylierter Form vorliegen. Im Vergleich zu den T_0 -Werten nimmt die Phosphorylierung der STATs in den Mediumkontrollen– vielleicht aufgrund fehlender Stimulation– ab.

Die Inkubation mit CpG, alleine oder in Kombination mit IL-21, bewirkte eine deutliche Hochregulation der phosphorylierten Form aller drei STAT-Proteine, was auf eine gesteigerte Signaltransduktion hindeuten könnte. Dabei tritt die Phosphorylierung aller untersuchten STAT-Proteine sowohl bei anti-als auch bei pro-apoptotischer Wirkung der CpG-Oligonukleotide auf. Interessanterweise zeigt die Inkubation mit IL-21 alleine einen vergleichsweise geringen, im Fall der Tyrosinphosphorylierung von STAT1 keine Zunahme der Phosphorylierung.

3.3.2 Proteine der Bcl-2-Familie und Caspasen

Um die an der Wirkungsvermittlung von Interleukin-21 (IL-21) und CpG-Oligonukleotiden beteiligten Proteine zu erfassen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression verschiedener pro- und anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie mittels Western-Blot untersucht. Ziel war es, herauszufinden, welche Proteine durch die Koinkubation von IL-21 und CpG in ihrer Expression verändert werden und somit an der Apoptoseinduktion beteiligt sein könnten.

3.3.2.1 Extrinsischer Apoptoseweg

Die folgende repräsentativ dargestellte Western-Blot-Analyse zeigt die Expression von Procaspase-8 eines B-CLL-Patienten.

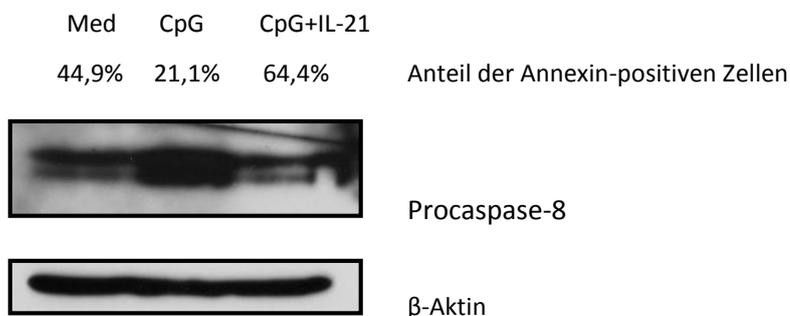


Abbildung 3.12 Procaspase-8-Expression im Immunoblot

Detektion von Procaspase-8 (55 kDa) im Immunoblot, durchgeführt an B-Zellen eines von insgesamt neun untersuchten CLL-Patienten. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis nach 48 Stunden Inkubation in Medium (Med) alleine, zusammen mit 1 μ M CpG, oder mit 1 μ M CpG und 50 ng/ml IL-21 in Kombination. Als Ladungskontrolle dient β -Aktin.

Darüber ist der Anteil der Annexin-positiven Zellen aus korrelierenden Annexinassays angegeben.

Die Abbildung 3.12 zeigt eine Zunahme der Procaspase unter anti-apoptotischer Wirkung von CpG-Oligonukleotiden (Anteil der Annexin-positiven Zellen 21,1% im Vergleich zu 44,9% in der Mediumkontrolle). Nach Koinkubation mit IL-21 und CpG nimmt die Proform der Caspase im Vergleich zur Mediumkontrolle geringfügig ab, als Hinweis auf eine Spaltung der inaktiven Proform in die aktive Form. Dieses Ergebnis korreliert auch mit einer höheren Apoptoserate im Vergleich zur Mediumkontrolle (64,4% vs. 44,9%).

Nur in einigen Fällen konnte das aktive Spaltprodukt der Caspase-8 detektiert werden. Bei allen untersuchten Proben zeigte sich jedoch eine positive Korrelation zwischen zunehmender Apoptoserate und Procaspase-8-cleavage. Somit kann eine Beteiligung des extrinsischen pathways am Apoptosegeschehen, unter Beteiligung von Caspase-8 angenommen werden.

3.3.2.2 Intrinsischer Apoptoseweg

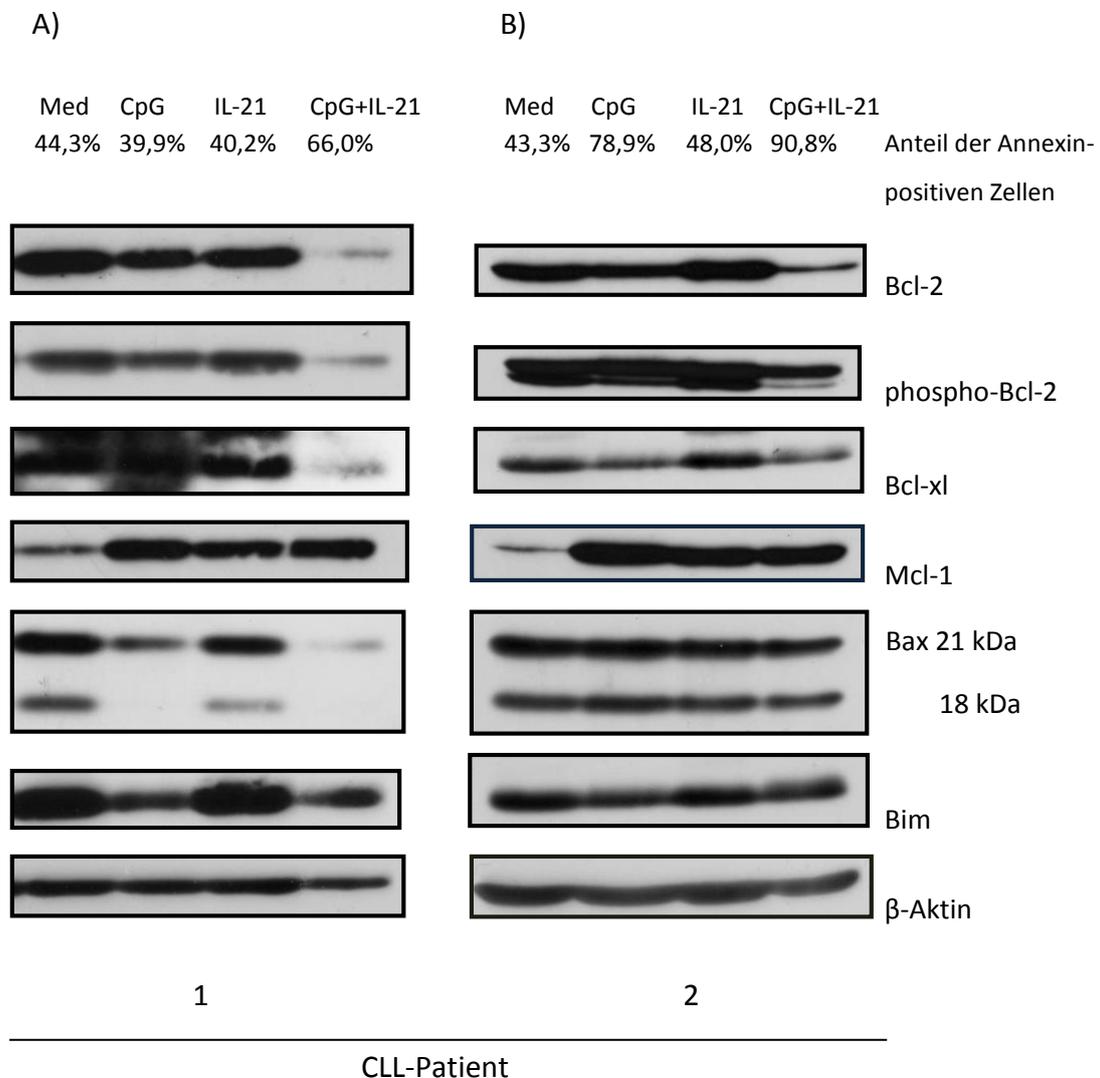


Abbildung 3.13 Expression von Proteinen des intrinsischen Apoptoseweges im Immunoblot

Repräsentative Darstellung der Expression von Bcl-2 (26 kDa), phospho-Bcl-2 (28 kDa), Bcl-xl (30 kDa), Mcl-1 (40 kDa), Bax (21/18 kDa) und Bim (23 kDa) im Immunoblot an B-Zellen von zwei, der insgesamt zehn, untersuchten CLL-Patienten nach 48-stündiger Inkubation in Medium (Med) alleine, Koinkubation mit 1 μ M CpG oder 50 ng/ml IL-21, sowie der Kombination aus beiden Substanzen (CpG+IL-21). β -Aktin diente als Ladungskontrolle.

Der Anteil an Annexin-positiven B-CLL-Zellen an der Gesamtpopulation, aus korrelierend durchgeführten Annexinassays, ist angegeben.

In den repräsentativ dargestellten Immunoblots (Abbildung 3.13) zeigt sich, dass die anti-apoptotischen Bcl-2-Familienproteine (phospho)-Bcl-2 und Bcl-xl durch die Kom-

bination von IL-21 und CpG vermindert exprimiert werden, während deren Expression bei Koinkubation mit IL-21 oder CpG alleine annähernd dem Mediumwert gleicht. Dagegen wird Mcl-1, ein weiteres anti-apoptotisches Protein der Bcl-2-Familie, sowohl durch die Kombination von IL-21 und CpG, als auch durch beide Einzelsubstanzen im Vergleich zur Mediumkontrolle verstärkt exprimiert.

Für die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bim zeigte sich, verglichen mit der Mediumkontrolle, eine unveränderte Expression nach Koinkubation mit IL-21 alleine (repräsentativ dargestellt in Abbildung 3.13, Patient 1 und 2).

Eine verminderte Expression beider Proteine konnte nach Koinkubation mit CpG alleine und CpG in Kombination mit IL-21 bei Patient 1 festgestellt werden, jedoch nicht bei Patient 2.

Der Anteil der Annexin-positiven Zellen aus korrelierend durchgeführten Annexinassays zeigte nach Koinkubation der CLL-Zellen mit IL-21 alleine keine deutliche Zunahme im Vergleich zur Mediumkontrolle bei Spontanapoptoseraten von über 40%. Dies erklärt die ausbleibende Hochregulation von Bim und Bax.

Die Annexinassays ergaben bei den Proben des ersten Patienten gering anti-apoptotisches Verhalten auf Koinkubation mit CpG-Oligonukleotiden (Anteil Annexin-positiver Zellen 39,9% gegenüber 44,3% in der Mediumkontrolle) bei geringerer Expression von Bim und Bax im Vergleich zur Mediumkontrolle, während die Proben des zweiten dargestellten Patienten pro-apoptotisch auf die Oligonukleotide, jedoch ohne erkennbare Regulation von Bim und Bax reagierten (Anteil Annexin-positiver Zellen nach Inkubation mit CpG-Oligonukleotiden 78,9% gegenüber 43,3% in der Mediumkontrolle).

Die Koinkubation von IL-21 und CpG-Oligonukleotiden zeigt trotz Apoptoseinduktion keine vermehrte Expression der pro-apoptotischen Proteine Bim und Bax in B-CLL-Zellen verglichen mit unbehandelten Zellen.

Als Korrelat einer Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs mit Cytochrom c-Freisetzung durch Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran wurde die Abnahme des mitochondrialen Membranpotential $\Delta\Psi_m$ bestimmt. Dazu wurden je 1×10^6 CLL-Zellen für 48 oder 72 Stunden mit $1 \mu\text{M}$ CpG, 50 ng/ml IL-21 oder beiden

Substanzen koinkubiert und anschließend wie oben angegeben (siehe 2.11.3, Seite 50) gefärbt.

Mitochondriales Membranpotential ($\Delta\Psi_m$)

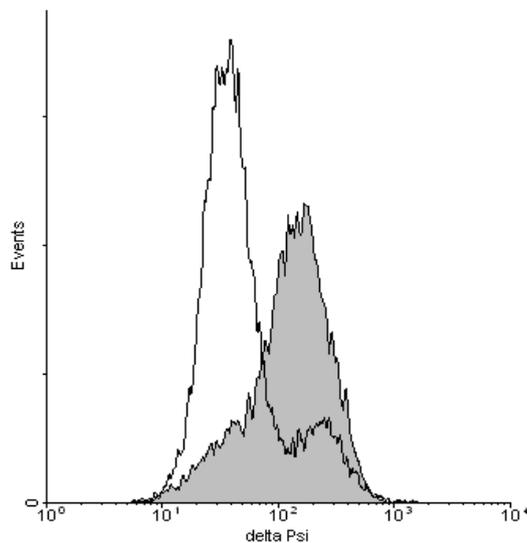


Abbildung 3.14 Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) in der Durchflusszytometrie

Die Grafik zeigt repräsentativ die Messung von $\Delta\Psi_m$ an B-Zellen eines von vier untersuchten CLL-Patienten, nach 72 Stunden Koinkubation mit 50ng/ml IL-21 und 1 μ M CpG. Dargestellt ist die Zellzahl (y-Achse) als Funktion der Intensität des Farbsignals (x-Achse). Die grau unterlegte Fläche stellt die Mediumkontrolle dar, die weiß unterlegte Fläche die behandelten Zellen.

Mit dieser Färbung konnte im FACS-Gerät eine deutliche Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials bei Apoptoseinduktion durch Koinkubation der B-CLL-Zellen mit IL-21 und CpG-Oligonukleotiden nachgewiesen werden. Vergleicht man die oben aufgeführte Darstellung mit Abbildung 3.4 (Seite 64) wird deutlich, dass proportional zur prozentualen Zunahme der apoptotischen Zellen im Annexinassay (78,5% Annexin-positive Zellen nach 72-stündiger Koinkubation mit IL-21 und CpG gegenüber 11,9% in der Mediumkontrolle) das mitochondriale Membranpotential abnimmt. In beiden Fällen kann nach 72 Stunden ein stärkerer Effekt beobachtet werden als nach 48 Stunden.

3.3.3 Effektorcaspasen-Aktivierung

Die gemeinsame Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen Apoptosewegs besteht in der Aktivierung von Effektorcaspasen, wie Caspase-3.

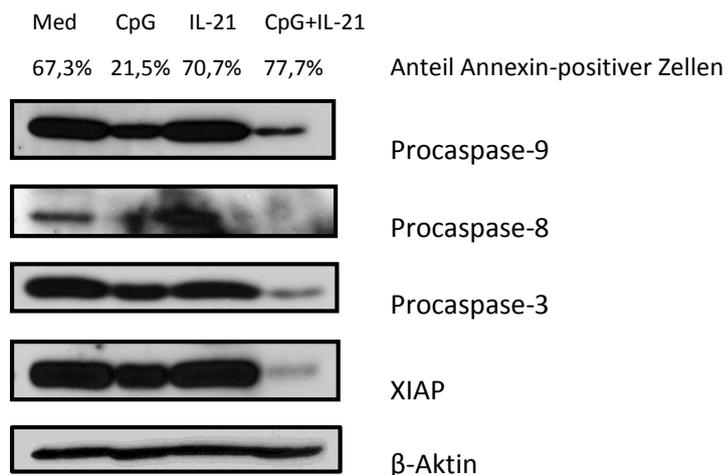


Abbildung 3.15 Expression von Procaspase-9, Procaspase-8 und Procaspase-3 sowie Caspaseinhibitor XIAP im Immunoblot.

Repräsentative Darstellung von Immunoblotanalysen der Expression von Procaspase-9 (47 kDa), Procaspase-8 (55 kDa), Procaspase-3 (35 kDa) und XIAP (57 kDa) an B-Zellen eines CLL-Patienten von insgesamt zehn untersuchten CLL-Patienten nach 48-stündiger Koinkubation mit 1 μ M CpG, 50 ng/ml IL-21 oder der Kombination aus beiden Substanzen (CpG+IL-21). Zum Vergleich wurde die Mediumkontrolle (Med) aufgetragen. β -Aktin dient der Ladungskontrolle.

Der Anteil an Annexin-positiven Zellen an der Gesamtpopulation wurde in korrelierenden Annexinassay ermittelt.

Nach Inkubation mit IL-21 und CpG-Oligonukleotiden zeigen sich eine Zunahme der Annexin-positiven Zellen sowie eine verminderte Expression der Proform aller drei Caspasen, verglichen mit der Mediumkontrolle. Da die Procaspasen inaktive Formen sind, weist eine Abnahme dieser Proform auf eine Abspaltung der Prodomäne und Aktivierung der Caspase hin.

Begleitend zur Caspase-3-cleavage kam es zu einer Herabregulation des Caspaseinhibitors XIAP bei Koinkubation von B-CLL-Zellen mit IL-21 und CpG.

Neben der Untersuchung im Immunoblot erfolgte eine Caspase-3-Aktivitätsmessung auch durchflusszytometrisch.

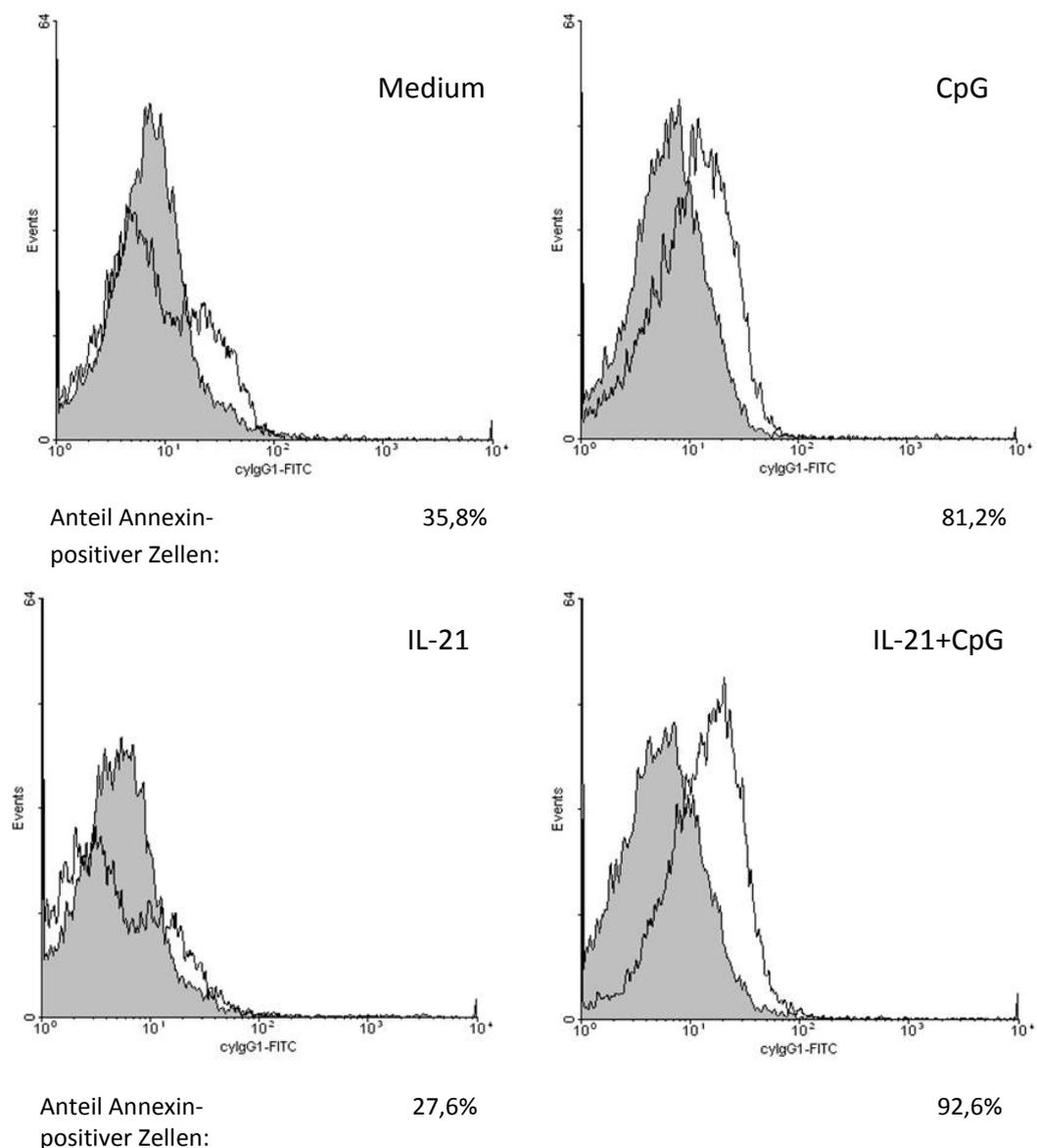


Abbildung 3.16 Caspase-3-Aktivität in der Durchflusszytometrie

Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses der durchflusszytometrischer Messung der Caspase-3-Aktivität an B-Zellen von einem der insgesamt zehn untersuchten CLL-Patienten.

Die Zellen wurden jeweils für 48 Stunden in Medium oder mit 1 μ M CpG, 50 ng/ml IL-21 oder beidem in Kombination koinkubiert. Dargestellt ist die Zellzahl (y-Achse) als Funktion der Intensität des Farbsignals (x-Achse). Die grau unterlegte Fläche stellt die Negativkontrolle dar, die weiß unterlegte Fläche die Zellen, die mit dem markierten anti-Caspase-3-Antikörper gefärbt wurden. Darunter ist der Anteil der Annexin-positiven Zellen in der Gesamtpopulation angegeben.

Es lässt sich deutlich eine positive Korrelation zwischen der Zunahme an Annexin-positiven Zellen nach Inkubation der B-CLL-Zellen mit CpG oder der Kombination aus IL-21 und CpG-Oligonukleotiden und der Caspase-3-Aktivierung erkennen.

Anzumerken ist, dass sich nicht bei allen untersuchten Patienten eine so deutlich positive Korrelation zwischen Annexin-positiver Zellpopulation und Caspase-3-Aktivität nachweisen ließ, was dem bekannt ausgeprägt heterogenen Verhalten von B-CLL Zellen unterschiedlicher CLL Patienten zuzuschreiben ist.

3.3.4 Hemmung der Caspasenaktivierung durch z-VAD-fmk

Um den Zusammenhang zwischen Caspasenaktivierung und Apoptosevermittlung näher zu untersuchen, wurden zusätzlich Versuche mit Pan-Caspaseinhibitoren durchgeführt.

Dazu wurden je 1×10^6 CLL-Zellen mit 100 μM Pan-Caspaseinhibitor z-VAD-fmk (Schantz N. et al., 1999, 3513) vorinkubiert. Zusätzlich wurden die B-CLL-Zellen entweder mit 50 ng/ml IL-21 oder 1 μM CpG alleine oder in Kombination für 48 und 72 Stunden koinkubiert. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne z-VAD-fmk, inkubiert für die entsprechenden Zeiträume. Anschließend erfolgt die Messung der Apoptoserate mittels Annexinassay.

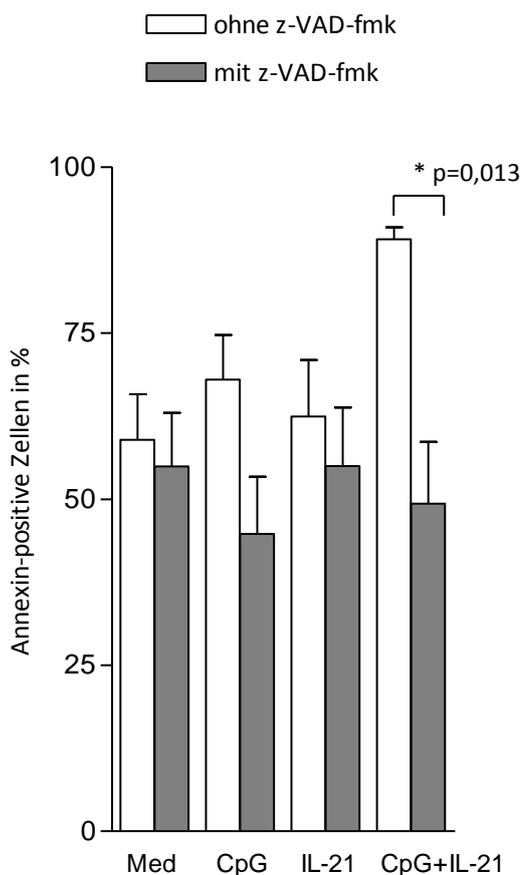


Abbildung 3.17 Hemmung der Apoptose durch z-VAD-fmk in der Durchflusszytometrie

Auf der y-Achse ist die Rate der Annexin-positiven Zellen in Prozent angegeben, auf der x-Achse sind die Substanzen aufgetragen, mit denen die Zellen kokubiert wurden. Neben einer Mediumkontrolle (Med) wurden Zellen untersucht, die für 72 Stunden mit 1 μ M CpG, 50 ng/ml IL-21 oder beiden Substanzen (CpG+IL-21) kokubiert worden waren. In die Graphik gehen Messungen von B-CLL-Zellen sechs verschiedener CLL-Patienten ein. Es sind die Mittelwerte + Standardabweichung vom statistischen Mittelwert angegeben. Es wurden gepaarte t-Tests durchgeführt.

z-VAD-fmk vermag in B-CLL-Zellen, die mit IL-21 und CpG kokubiert wurden die Apoptoserate signifikant zu senken ($p=0,013$).

Abbildung 3.17 zeigt, dass z-VAD-fmk imstande ist, die durch IL-21 und CpG vermittelte Apoptoseinduktion zu inhibieren, ersichtlich an einem Rückgang der Annexin-positiven Zellen im Annexinassay auf Werte, die unter der Spontanapoptoserate liegen. Dieser Effekt ist auch nach alleiniger Kokubation der CLL-Zellen mit CpG-Oligonukleotiden und z-VAD-fmk nachweisbar. Dies verdeutlicht, dass die Apoptose, die durch CpG-Oligonukleotide alleine und in Kombination mit IL-21 ausgelöst wird, zumindest teilweise caspaseabhängig ist. Dem gegenüber konnte die Spontanapoptoserate und der durch IL-21 alleine induzierte Zelltod durch z-VAD-fmk kaum gesenkt werden.

3.4 Wirkung von IL-21 und CpG auf B-CLL-Zellen unter protektiver Stromazellkultur

Analog zu den oben beschriebenen Ansätzen wurden B-CLL-Zellen zusätzlich auf Stromazellen inkubiert, um den Effekt von IL-21 und CpG-Oligonukleotiden unter pro-

tektivem Stromasupport zu untersuchen. Stromazellen können durch Bildung verschiedener Faktoren der Spontanapoptose der CLL-Zellen in Kultur entgegenwirken (Edelmann J. et al., 2008, 1567; Cuní S. et al., 2004, 1393 ff.).

Nach 24-stündiger Koinkubation von B-CLL-Zellen mit protektivem Stroma wurden entweder 1 μ M CpG, 50 ng/ml IL-21 oder die Kombination aus beidem zu den Stroma-CLL-Ansätzen gegeben und dieser Ansatz für 48 oder 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Der Anteil der Annexin-positiven CLL-Zellen wurde dann zu den angegebenen Zeitpunkten in Annexinassays gemessen

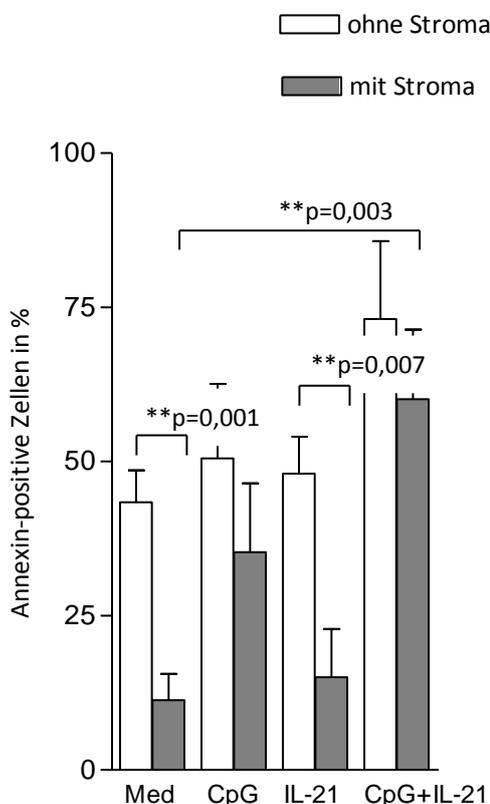


Abbildung 3.18 Wirkung von Stromazellkontakt auf B-CLL-Zellen unter Koinkubation von IL-21 und CpG-Oligonukleotiden im Annexinassay

Detektion der Annexin V-positiven CLL-Zellen mit und ohne Kontakt zur unterstützenden Stroma. Auf der y-Achse ist der Prozentsatz der Annexin-positiven Zellen an der Zellgesamtheit aufgetragen, auf der x-Achse die Substanzen, mit denen die B-CLL-Zellen 72 Stunden koinkubiert wurden: Medium (Med), 1 μ M CpG, 50 ng/ml IL-21 oder 1 μ M CpG und 50 ng/ml IL-21.

In die Grafik gehen Daten von fünf Patienten ein. Die Werte entsprechen dem statistischen Mittelwert + Standardabweichung vom Mittelwert. Es wurden gepaarte und ungepaarte t-Tests durchgeführt.

Die Abnahme der Annexin-positiven Zellen in Mediumkultur ($p=0,001$) und nach Inkubation mit IL-21 ($p=0,007$) durch Stromasupport ist hochsignifikant.

Durch Koinkubation mit IL-21 und CpG in Kombination nimmt der Anteil an Annexin-positiven CLL-Zellen auch unter Stromazellkontakt hochsignifikant zu ($p=0,003$).

Unterstützender Stromazellkontakt hat auf CLL-Zellen erwartungsgemäß eine protektive Wirkung (Abbildung 3.18). B-CLL-Zellen mit Kontakt zu Stroma weisen im Annexinassay eine hochsignifikant niedrigere Spontanapoptoserate, verglichen mit Zellen ohne Stromasupport, auf ($p=0,001$). Dieser Effekt ist auch nach alleiniger Inkubation

der CLL-Zellen mit IL-21 ersichtlich (Senkung der Apoptoserate ist hochsignifikant, $p=0,007$).

Jedoch wird aus Abbildung 3.18 auch deutlich, dass die Kombination von IL-21 und CpG die Apoptoserate der Leukämiezellen steigert – sowohl für B-CLL-Zellen unter Stromasupport als auch für B-CLL-Zellen ohne Stromasupport. Der Anteil an Annexin-positiven Zellen nimmt nach Kombination beider Substanzen verglichen mit der Mediumkontrolle in hochsignifikantem Ausmaß zu ($p=0,003$).

Da Stromazellkontakt die Verhältnisse *in vivo* modellhaft darstellen soll, sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die pro-apoptische Wirkung von CpG-Oligonukleotiden und IL-21 auch auf B-CLL-Zellen *in vivo* vorhanden sein könnte. Somit wäre die Kombination dieser beiden Substanzen als mögliche Therapieoption bei CLL-Patienten vorstellbar.

3.5 Wirkung von IL-21 und CpG auf nicht-maligne B-Zellen

Mit aufgereinigten B-Zellen gesunder Spender wurden korrelierende Versuche zu Abbildung 3.4 (Seite 64) durchgeführt. Die aus Vollblut separierten B-Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^6 /ml für 48 und 72 Stunden mit $1 \mu\text{M}$ CpG, 25 ng/ml oder 50 ng/ml IL-21 oder der Kombination aus $1 \mu\text{M}$ CpG und 25 bzw. 50 ng/ml IL-21 inkubiert und anschließend mit Annexin V und PI gefärbt.

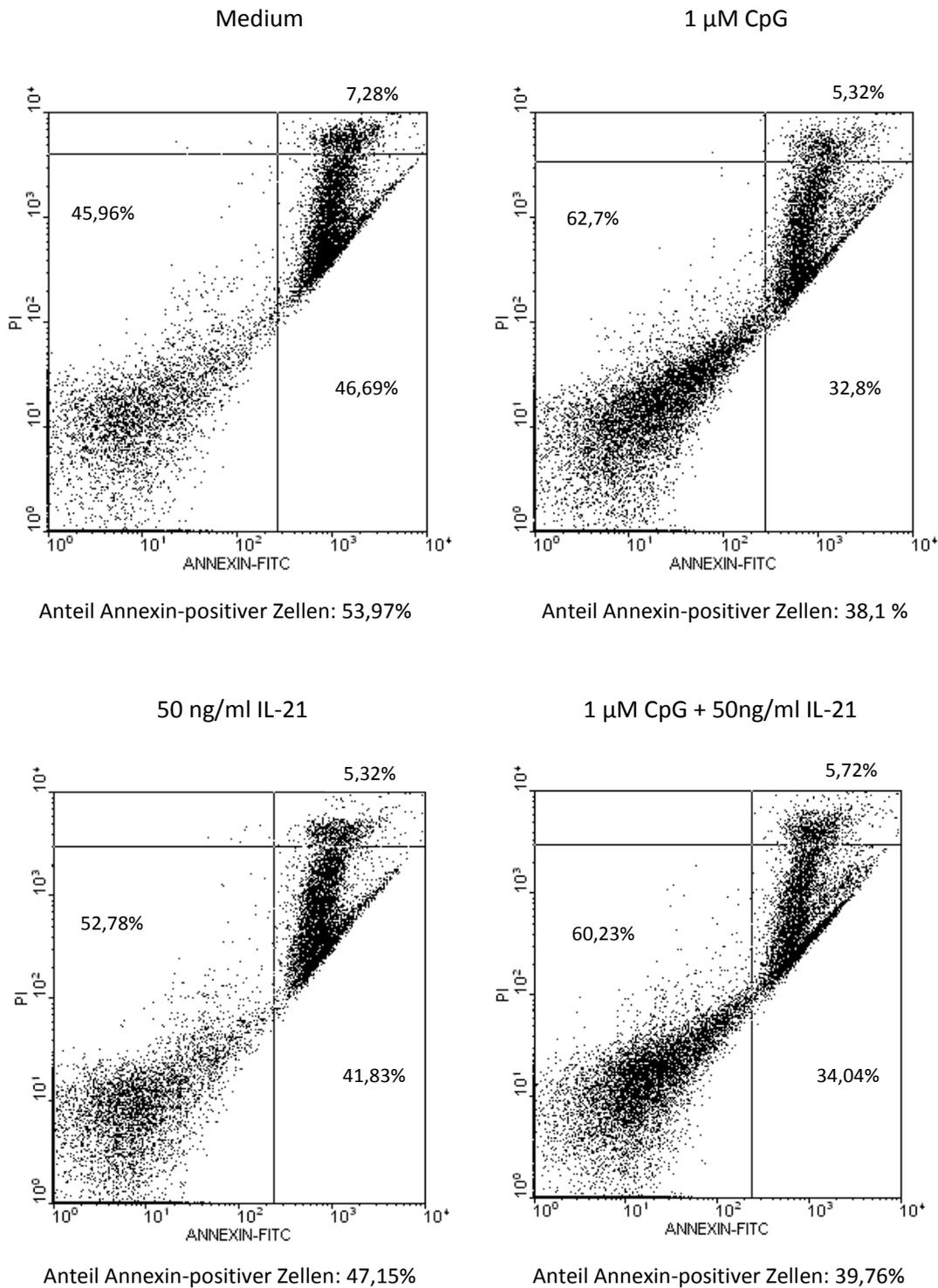


Abbildung 3.19 Wirkung von IL-21 und CpG auf nicht-maligne B-Lymphozyten im Annexinassay

Die Grafik zeigt ein repräsentatives Ergebnis eines Annexinassays von peripheren, aufgereinigten B-Lymphozyte eines gesunden Spenders nach 72 Stunden Inkubation in Medium alleine, zusammen mit 1 µM CpG, 50 ng/ml IL-21 oder 1 µM CpG und 50 ng/ml IL-21.

Die y-Achse stellt die Intensität der PI-Aufnahme dar, die x-Achse das Ausmaß der Annexin V-Bindung.

Der prozentuale Anteil an B-Zellen in den einzelnen Feldern und der Anteil Annexin-positiver Zellen an der Gesamtpopulation ist angegeben. Insgesamt wurden B-Zellen vier verschiedener gesunder Spender analysiert.

Sowohl IL-21 als auch CpG-Oligonukleotide alleine haben auf B-Zellen keine proapoptotische Wirkung, gemessen anhand der Zunahme der Annexin-positiven B-Zellen. Im Gegensatz zu B-CLL-Zellen, bewirkt auch die Kombination beider Substanzen in den durchgeführten Experimenten keine nachweisbare Zunahme der Annexin-positiven Zellen im Annexinassay. Im Gegenteil, B-Zellen zeigen einen höheren Anteil an vitalen Zellen nach Behandlung mit der Substanzkombination als nach ausschließlicher Kultur in Medium.

3.6 Wirkung von IL-21 und CpG auf die Zellzyklusregulation von B-CLL-Zellen

Ergänzend wurde die Regulation der Zellzyklusproteine p21, p27 und Cyclin D₃ im Western-Blot untersucht.

Dazu wurden dieselben Patientenproben benutzt, die auch zur Detektion der Bcl-2-Familienproteine verwendet wurden.

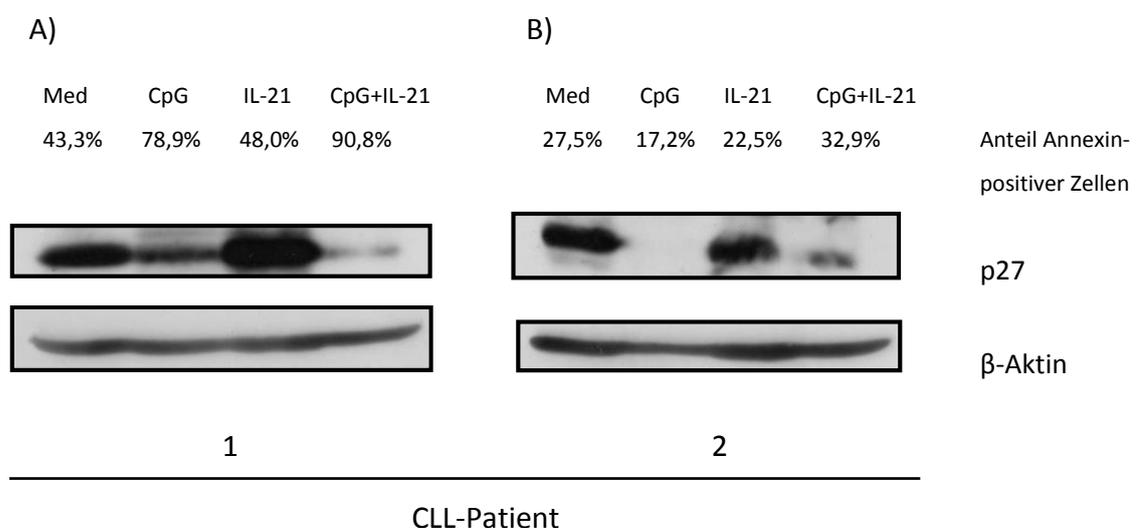


Abbildung 3.20 Expression des Zellzyklusregulators p27 im Immunoblot

Repräsentativer Immunoblot der p27-Expression (27 kDa) in B-CLL-Zellen von zwei der vier untersuchten CLL-Patienten. Die Zellen wurden 48 Stunden mit 1 μ M CpG, 50 ng/ml IL-21 oder der Kombination aus beiden Substanzen (CpG+IL-21) koinkubiert. Als Vergleich wurde die Mediumkontrolle (Med) aufgetragen. β -Aktin diente der Ladungskontrolle.

Die Ergebnisse korrelierend durchgeführter Annexinassays sind als Prozentsatz Annexin-positiver Zellen an der Gesamtpopulation angegeben.

Gezeigt werden zwei repräsentative Patienten, die unterschiedlich auf eine CpG-Stimulation hinsichtlich des Apoptoseverhaltens reagieren.

Bei allen untersuchten Patienten zeigte sich eine starke Abnahme in der Proteinexpression von p27 nach Stimulation mit CpG –sowohl als Einzelsubstanz– als auch in Kombination mit IL-21. Schon Decker et al. konnten in B-CLL-Zellen durch Koinkubation mit CpG-Oligonukleotiden eine verminderte Expression des Zellzyklusinhibitors p27 nachweisen (Decker T. et al., 2002, 329). Eine Abnahme der Expression von p27 durch IL-21 wurde bisher nur in Makrophagen beschrieben. (Rückert R. et al., 2008, 490). Jedoch war das Ausmaß der Abnahme von p27 bei einem Teil der Patienten nach alleiniger Gabe von CpG-Oligonukleotiden stärker, während bei dem anderen Teil die Kombination aus CpG und IL-21 eine stärkere Abnahme hervorrief. Diese unterschiedliche Reaktionsweise zeigte keinen Zusammenhang mit dem Verhalten der Zellen auf die Einzelsubstanz CpG im Hinblick auf die ermittelte Apoptoserate im Annexinassay/ZAP-70-Status.

Die Expression des Zellzyklusmodulators p21 konnte auf Proteinebene bei keinem der vier untersuchten Patienten detektiert werden.

Cyclin D₃ konnte nur bei zwei von vier Patienten nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch keine bedeutsame Regulation nach Behandlung der Zellen mit IL-21 und CpG.

4. Diskussion

4.1 Diversität des Patientenmaterials

B-CLL-Zellen weisen bei zunehmender Kulturdauer *in vitro* einen deutlichen Anstieg der Spontanapoptose auf. Dabei kann der Prozentsatz der apoptotischen Zellen individuell sehr unterschiedlich ausfallen.

Die Ursache hierfür kann unter anderem auf fehlende Interaktionen mit ortsständigen T-Zellen (fehlende Zytokininteraktionen), oder einem Mangel an Rezeptorligandinteraktionen zurückgeführt werden, die innerhalb des natürlichen Milieus vorhanden sind.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl exogene Zytokinzufuhr von IL-4 (Willimott S. et al., 2007, 724), IL-6 (Moreno A. et al., 2001, 246), IL-8 (Francia di Celle P. et al., 1996, 4384), IL-13 (Chaouchi N. et al., 1996, 1024 ff.) oder eine Stimulation der B-CLL-Zellen durch aktivierte T-Zellen, anti-CD40-Antikörpern (Granziero L. et al., 2001, 2780) oder anti-BCR (B-Zellrezeptor)-Antikörpern (Deglesne PA. et al., 2006, 7159) das Überleben der B-CLL Zellen *in vitro* verlängern kann.

Interessanterweise befinden sich Antikörper gegen IL-6, IL-8 oder anderen Stimulatoren von B-CLL-Zellen derzeit in präklinischer oder klinischer Erprobung (Kay NE. et al., 2002, 208 f.).

In der vorliegenden Arbeit zeigten B-CLL-Zellen von fünf der insgesamt 31 untersuchten Patienten nach 48 Stunden in Kultur eine spontane Apoptoserate von 92 Prozent oder mehr, so dass der apoptoseinduzierende Effekt von IL-21 oder der Kombination von IL-21 und CpG nicht sinnvoll studiert werden konnte. Diese Patienten wurden von weiteren Versuchen ausgeschlossen.

Es ist bekannt, dass die chronisch lymphatische Leukämie bezüglich genetischer Veränderungen eine heterogene Erkrankung darstellt, weshalb auch das Ansprechen auf Therapeutika stark variieren kann.

Dies wirkt sich auch auf Ergebnisse von in vitro Versuchen aus. Fünf von 26 Patienten in der vorliegenden Arbeit reagierten auf die Kombination aus CpG-Oligonukleotiden und Interleukin-21 **anti**-apoptotisch, wobei bei diesen Patienten das Oligonukleotid alleine schon eine starke anti-apoptotische Wirkung aufwies. Bei zwei dieser fünf Patienten zeigte auch IL-21 als Einzelsubstanz in geringem Maße **anti**-apoptotische Effekte. Bei den übrigen 21 Patienten konnte durch IL-21 und dessen Kombination mit CpG in unterschiedlich starkem Ausmaß eine **pro**-apoptotische Wirkung hervorgerufen werden.

Die Beobachtung, dass IL-21 nicht in allen B-CLL-Zellen Apoptose hervorruft, machten auch Gowda und Mitarbeiter. Bei ihren Untersuchungen sprachen ein Viertel der untersuchten Patienten nicht auf IL-21 an (Gowda A. et al., 2008, 4726).

4.2 Problematik der Methoden

4.2.1 IL-21-Rezeptordetektion

Entgegen den Ergebnissen von Jahrsdörfer et al. und Gowda et al. konnte bei den in dieser Arbeit untersuchten B-CLL-Zellen nach Stimulation mit CpG-Oligonukleotiden nur in einigen Fällen eine meist geringe Zunahme der Expression des IL-21-Rezeptors detektiert werden (siehe Abbildung 3.8, Seite 69). (Jahrsdörfer B. et al., 2006, 2714; Gowda A. et al., 2008, 4724 f.)

Im Verlauf der Versuche wurden sieben (!) verschiedene Antikörper, die gegen den IL-21-Rezeptor gerichtet waren, getestet. Mit Farbstoff markierte Antikörper für durchflusszytometrische Analysen als auch unmarkierte für Immunoblotversuche und, mit nachträglicher PE-Markierung, auch für FACS-Analysen benutzbare Antikörper wurden verwendet.

Gründe für die Testung verschiedener Antikörper waren entweder eine fehlende Nachweisbarkeit des IL-21-Rezeptors, in unstimulierten und stimulierten Zellen, so-

wohl in der Durchflusszytometrie als auch in Western-Blot-Experimenten, oder eine fehlende Verifizierung der FACS-Ergebnisse im Immunoblot. Auch Reproduktionsprobleme mit B-CLL-Zellen verschiedener Patienten spielten eine Rolle.

Schließlich stellte sich ein getesteter Antikörper als funktionstüchtig für die Versuche der vorliegenden Arbeit heraus. Er zeigte reproduzierbare Ergebnisse in durchflusszytometrischen Messungen und Immunoblot-Experimenten. Zudem detektierte er IL-21-Rezeptoren in der Positivkontrolle der humanen Myelomzelllinie ANBL-6 (Brenne AT. et al., 2002, 3759).

Des Weiteren zeigte sich eine Korrelation der PCR-Ergebnisse mit den Befunden im Western-Blot, in denen Proben derselben Patienten aufgetragen wurden. Allerdings offenbarten FACS-Analysen auch, dass die Detektion des IL-21-Rezeptors hauptsächlich auf apoptotischen Zellen gelang, die aufgrund des höheren *side scatters* und eines geringeren *forward scatters* von den lebenden Zellen differenziert werden konnten.

Die Tatsache, dass der IL-21-Rezeptor auch bei der Zelllinie ANBL-6 auf allen zugrunde gegangenen Zellen und nur zu einem Teil auf den lebenden zu detektieren war, ließ wiederum Zweifel an der Funktionsfähigkeit des Antikörpers aufkommen. Hingegen könnte man vermuten, dass der Antikörper – obwohl vom Hersteller anders deklariert – besser an den intrazellulären Teil des Rezeptors bindet, an den er nur bei avitalen Zellen durch eine poröse Zellmembran gelangen kann.

4.2.2 Caspasenaktivierung

Bei der Analyse der Caspasenbeteiligung an der Apoptosevermittlung durch IL-21 und CpG-Oligonukleotide, zeigte sich ebenfalls Heterogenität zwischen verschiedenen B-CLL Patientensamples.

(Pro-)Caspase-8 war in mehreren B-CLL Patientensamples nicht detektierbar.

Nichtsdestotrotz konnte bei einigen Patienten eine Abnahme der Proform bzw. die Zunahme der aktiven Form von Caspase-8 nach der kombinierten Koinkubation von CpG-Oligonukleotiden und IL-21, im Gegensatz zu CpG als Einzelsubstanz nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.12, Seite 75). Diese Ergebnisse sind vereinbar mit den Versu-

chen von de Toter und Mitarbeitern, die CLL-Zellen mit CD40-Ligation stimulierten, anschließend mit IL-21 behandelten und dabei das Intermediärprodukt der Caspase-8 nachweisen konnten (de Toter D. et al., 2006, 3713).

Effektorcaspase-3 konnte in Western-Blot-Versuchen (siehe Abbildung 3.15, Seite 80) in ihrer Proform stets nachgewiesen werden, zeigte aber nach Koinkubation der CLL-Zellen mit IL-21 oder IL-21 und CpG, häufig nur eine geringfügige Abnahme, was nicht in vollständigem Einklang mit den bisher veröffentlichten Daten stehen würde (de Toter D. et al., 2006, 3713).

Durchflusszytometrisch ließ sich eine Aktivitätszunahme der Caspase-3 durch IL-21 und CpG (siehe Abbildung 3.16, Seite 81) nicht immer nachweisen. Deshalb wurde auf einen indirekten Nachweis zurückgegriffen, der in Inhibition der Caspaseaktivierung bestand und die Beteiligung der Proteasenfamilie klären sollte. Mit dieser Methode ließ sich durch z-VAD-fmk eine umfassende Hemmung der durch IL-21 und CpG-Oligonukleotide ausgelösten Apoptose nachweisen (siehe Abbildung 3.17, Seite 83). Da der Inhibitor die Caspasen-3,-7,-8 und -9 hemmt (Gregoli PA. et al., 1999, 137; King D. et al., 1998, 1553; Sun XM. et al., 1999, 5505), kann sowohl eine extrinsische als auch eine intrinsische Apoptoseinduktion bzw. eine Kombination aus beiden durch Bid-Interaktionen vermutet werden.

Die Veränderung der quantitativen Zusammensetzung der Proteine in der mitochondrialen Membran durch IL-21 und der Kombination von IL-21 und CpG-Oligonukleotide lässt auf eine Bax/Bak-induzierte, Cytochrom c-vermittelte Aktivierung der Caspasen-9 und -3 schließen, die schließlich zum Zelltod führen. Jedoch konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob der von de Toter et al. formulierte Weg über Caspase-8-Aktivierung mit anschließender Spaltung von Bid zu tBid, ebenfalls eine Rolle spielt (de Toter D. et al., 2006, 3713). Dabei sei auch auf die fehlende Detektierbarkeit von Bid und tBid in der vorliegenden Arbeit hingewiesen, die sich wohl auf einen unzureichend funktionellen Antikörper zurückführen lässt.

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass neben der klassischen caspase-abhängigen Apoptosevermittlung auch caspaseunabhängige Wege existieren, zum Beispiel über AIF (Susin SA. et al., 1999, 442 ff.) oder ENDO G (Li LY. et al., 2001, 96 ff.), sowie durch Induktion von Nekrose, die unter anderem auch durch Hochregulation von Bax ausgelöst werden kann (Xiang J. et al., 1996, 14560 ff.).

4.3 Kritische Beurteilung der Ergebnisse unter Würdigung der Literatur

4.3.1 Unterschiedliche Reaktion ZAP-70-positiver und ZAP-70-negativer Zellen auf CpG

Die Ermittlung des ZAP-70 Status ist in die Praxis viel einfacher durchzuführen und somit in der klinischen Routine besser handhabbar als z.B. die Detektion des IgV_H-Mutationsstatus‘.

Es ist bekannt, dass ZAP-70-negative und ZAP-70-positive Patienten eine unterschiedliche Prognose hinsichtlich der Krankheitsdauer bis zur Therapiebedürftigkeit und der Gesamtüberlebensdauer aufweisen (Damle RN. et al., 1999, 1843; Rassenti LZ. et al., 2004, 896 ff.). Da ZAP-70-positive Patienten einen aggressiveren Krankheitsverlauf erleben, ist es interessant und auch von klinischer Bedeutung, dass sie auf CpG-Oligonukleotide mit einer höheren Apoptoserate als ZAP-70-negative Patienten reagieren (siehe Abbildung 3.5, Seite 65).

Schon Jahrsdörfer et al. konnten zeigen, dass B-CLL-Zellen sowohl anti- als auch pro-apoptotisch auf CpG reagieren können. In ihrer Arbeit beschreiben die Autoren, dass das unterschiedliche Verhalten mit verschiedenen Mutationsmustern der CLL-Zellen korreliert, da Zellen, die isoliert eine 13q14- Deletion aufwiesen, signifikant häufiger pro-apoptotisch reagierten, während CLL-Zellen mit weiteren Mutationen sowohl anti- als auch pro-apoptotisches Verhalten auf CpG-Oligonukleotide zeigten. (Jahrsdörfer B. et al., 2005, 380)

Ein Grund für dieses Verhalten könnte die Korrelation der Deletion 13q14 mit einer erhöhten Expression des pro-apoptotischen Bcl-2-Familie Proteins Bak sein (Kitada S. et al., 1998, 3384 f.).

Darüber hinaus scheint die unterschiedliche Reaktionsweise auf CpG-Oligonukleotide darauf hinzudeuten, dass ZAP-70-negative und ZAP-70-positive Patienten möglicherweise von unterschiedlichen Therapievarianten profitieren könnten, um ein optimales Behandlungsergebnis zu erzielen.

Da ZAP-70-positive B-CLL-Zellen auf CpG-Oligonukleotide als Einzelsubstanz –zum Teil in erheblichem Ausmaß– pro-apoptotisch reagieren, könnten sie von einer Therapie

profitieren, die den durch CpG ausgelösten Signalweg durch Kombinationspräparate noch verstärkt.

Dazu ist es unbedingt erforderlich die molekularen Vorgänge in der Zelle besser zu verstehen, um dort gezielt medikamentös eingreifen zu können.

In der Arbeit von Meyer zum Büschenfelde et al. konnte gezeigt werden, dass die Expression von ZAP-70 mit einer verstärkten Rekrutierung von PKC β II in lipid rafts einhergeht. Durch die damit verbundene Aktivierung von PKC β II wird die Phosphorylierung von Bcl-2 und Bim an der mitochondrialen Membran begünstigt, was eine verstärkte Sequestrierung von Bim(EL) durch Bcl-2, als auch eine verstärkte proteasomale Degradierung von Bim zur Folge hat. Die Unterschiede im Aktivierungsmuster von PKC β II in ZAP-70-positiven und ZAP-70-negativen B-CLL-Zellen verschaffen den ZAP-70-positiven Zellen somit einen "Apoptoseschutz", durch Verlagerung des Gleichgewichtes innerhalb der Bcl-2-Proteinfamilie in Richtung der anti-apoptotischen Proteine, verglichen mit ZAP-70-negativen B-CLL-Zellen. (zum Büschenfelde CM. et al., 2010, 143–148).

Jahrsdörfer und Mitarbeiter beschrieben, dass durch CpG-Oligonukleotide die Bildung von Granzym B in CLL-Zellen begünstigt wird und durch zusätzliche Koinkubation mit IL-21 sogar noch verstärkt werden kann.

Granzym B ist ein Protein, das während der Apoptoseinduktion von CD8-positiven T-Zellen produziert wird und zur Spaltung von Procaspasen in deren aktive Form beiträgt (Jahrsdörfer B. et al., 2006, 2715; Pardo J. et al., 2008, 572–575).

Dies erklärt einen möglichen Mechanismus, der zur Apoptoseinduktion durch die alleinige Gabe von CpG-Oligonukleotiden in B-CLL-Zellen führen kann. Nichtsdestotrotz bleibt zu klären, warum dieser Vorgang nur in einem Teil der Zellen zur Apoptose führt.

Granzym B-produzierende Zellen exprimieren Oberflächenmoleküle, wie z.B. Proteinaseinhibitor-9 (PI-9), die sie vor ihrem apoptosevermittelnden Produkt schützen. Obwohl B-CLL-Zellen zum Teil auch PI-9 exprimieren, waren sie laut Godal et al. trotzdem nicht resistent gegen die Apoptoseinduktion durch zytotoxische T-Zellen. Im Hinblick auf den Schutz vor eigenem Granzym B könnte ein Unterschied zwischen ZAP-70-positiven und ZAP-70-negativen Patienten bestehen. Eventuell ist der Schutzmechanismus ZAP-70-negativer Zellen wirkungsvoller, so dass sie gegen Granzym B in gerin-

gen Mengen (bei alleiniger Inkubation mit CpG-Oligonukleotiden) resistent sind, während größere Mengen, gebildet durch Koinkubation mit IL-21 und CpG, diese Resistenz durchbrechen könnten. (Godal R. et al., 2006, 3209 f.)

Neben Differenzen im Apoptoseverhalten sind für beide B-CLL-Subpopulationen auch Unterschiede bezüglich der Proliferationsrate bekannt (Damle RN. et al., 2007, 3353 f.).

ZAP-70-exprimierende B-CLL-Zellen weisen einen höheren Proliferationsindex auf als ZAP-70-negative Zellen, da sie durch Expression von CCR7 besser in der Lage sind, in Lymphknoten einzuwandern, wo sie auf T-Zellen treffen, die sie aktivieren können (Richardson SJ. et al., 2006, 3585, 3587 f.). Zudem reagieren ZAP-70-positive Zellen auf T-Zell-vermittelte Proliferationssignale (CCL19 und CCL21) in erhöhtem Ausmaß als ZAP-70-negative Zellen (Richardson SJ. et al., 2006, 3587 f.).

Dem entsprechend stellten Damle et al., eine starke positive Korrelation des Oberflächenmarkers CD38 mit der Expression von ZAP-70 sowie Ki-67, einem Zellzyklusmarker, in B-CLL-Zellen fest (Damle RN. et al., 2007, 3353, 3356).

Vor diesem Hintergrund scheint der pro-apoptotische Effekt von CpG auf ZAP-70-positive Zellen noch wichtiger zu sein.

Jedoch wurde in den Experimenten der vorliegenden Arbeit zwischen ZAP-70-positiven und -negativen Zellen kein Unterschied in der Regulation von p27 durch CpG-Oligonukleotide festgestellt (siehe Abbildung 3.20, Seite 87). In allen untersuchten Patientensamples wurde p27 durch Koinkubation mit dem bakteriellen Oligonukleotid, alleine oder in Kombination mit IL-21, supprimiert.

In nicht-malignen B-Zellen konnte gezeigt werden, dass durch B-Zell-Rezeptorligation, zum Beispiel mittels anti-IgM-Antikörper (Szielzo C. et al., 2006, 693) oder CpG-Oligonukleotide (Bekeredjian-Ding I. et al., 2008, 8271) die ZAP-70-Expression dieser Zellen hochreguliert werden kann.

In B-CLL-Zellen bewirkt die Stimulation mit anti-IgM-Antikörpern bei ZAP-70-positiven Patienten eine prolongierte Aktivierung der Kinasen Erk und Akt und darüber vermehrte Proliferation im Vergleich zu ZAP-70-negativen Zellen (Chen L. et al., 2002, 4612; Gobessi S. et al., 2007, 2037).

Im Gegensatz zum heterogenen Verhalten der Leukämiezellen auf CpG-Oligonukleotide erwies sich die Reaktionsweise auf CpG in Verbindung mit IL-21 als einheitlich. In den durchgeführten Experimenten war, verglichen mit Interleukin-21 alleine, durchweg eine deutlich ausgeprägtere Apoptoseinduktion zu beobachten.

4.3.2 Wirkung von CpG auf STATs und weiterführende Signalwege

CpG-Oligonukleotide begünstigen in normalen B-Lymphozyten die Tyrosinphosphorylierung von STAT1 und in geringerem Ausmaß auch von STAT3 (He B. et al., 2004, 4486). In dendritischen Vorläuferzellen bewirken CpG-Oligonukleotide die Serinphosphorylierung von STAT1 (Takauji R. et al, 2002, 1015).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CpG-Oligonukleotide eine verstärkende Auswirkung auf die Phosphorylierung der Serin- und Tyrosinreste von STAT1 und -3 sowie der Tyrosinphosphorylierung von STAT5 in B-CLL-Zellen haben (siehe Abbildung 3.11, Seite 74). Dieser Effekt ist sowohl bei anti-apoptotischer als auch bei pro-apoptotischer Wirkung der CpGs zu erkennen, was dafür sprechen könnte, dass dieselben STATs sowohl anti- als auch pro-apoptotische Signale vermitteln können.

In Experimenten der vorliegenden Arbeit bewirkten CpG-Oligonukleotide in B-CLL-Zellen, in denen die anti-apoptotische Wirkung dominiert, über die Phosphorylierung von STATs (siehe Abbildung 3.11, Seite 74) zu einer Abnahme der Expression von Bax und Bim (siehe Abbildung 3.13 A, Seite 77), während eine pro-apoptotische Wirkung der CpG-Oligonukleotide über die Phosphorylierung derselben Stellen der STAT-Proteine, verglichen mit der Mediumkontrolle, zu einer unveränderten Expression von Bax und Bim (siehe Abbildung 3.13 B, Seite 77), sowie zur Aktivierung von Caspase-3 führt (siehe Abbildung 3.16, Seite 81).

Jahrsdörfer und Mitarbeiter konnten eine Beteiligung von Caspase-8 an der durch CpG-Oligonukleotide ausgelösten Apoptose zeigen, was eine zusätzliche Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges vermuten lässt (Jahrsdörfer B. et al., 2005, 383 f.).

In den Experimenten zur vorliegenden Arbeit konnte cleavage von Procaspase-8 nach Koinkubation von IL-21 und CpG-Oligonukleotiden in Kombination detektiert

werden (siehe Abbildung 3.15, Seite 80). Die Regulation durch Oligonukleotide alleine war in den durchgeführten Experimenten uneinheitlich.

In weiteren Experimenten an B-CLL-Zellen zeigte sich, dass sowohl anti- als auch pro-apoptotisches Verhalten nach einer CpG-Stimulation über die Aktivierung des Akt- und Erk-Signalweges vermittelt wurden. Allerdings war sie im Falle einer anti-apoptotischen Reaktion ausgeprägter und länger andauernd (Longo PG. et al., 2007, 112 ff.).

Akt vermag CLL-Zellen vor medikamentös als auch strahlungsinduzierter Apoptose zu bewahren (Jones DT. et al., 2003, 3714–2717).

Effekte von CpG-Oligonukleotiden auf B-CLL Zellen zeigen sich ausserdem in einer Herabregulation des CDK-Inhibitors p27 und in einer Zunahme von Cyclin D₃ (Longo PG. et al., 2007, 114 f.; Decker T. et al., 2002, 329).

Die Expression von Zellzyklusproteinen wurde ebenfalls in dieser Arbeit untersucht. Es zeigte sich eine Abnahme von p27 nach Koinkubation mit CpG-Oligonukleotiden in allen untersuchten Proben (siehe Abbildung 3.19, Seite 86).

Eine stärkere Suppression von p27 in ZAP-70-positiven Patientenproben, wie von Longo et al. beschrieben wurde, konnte in den Versuchen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden (Longo PG. et al., 2007, 112 f.).

Da der Fokus dieser Arbeit auf die Apoptoseinduktion durch die Kombination von CpG-Oligonukleotiden und IL-21 ausgerichtet war, wurden nur einige Ergebnisse der Arbeit von Longo et al. in Versuchen nachvollzogen, während die intrazellulären Vorgänge während Ablauf der durch CpG induzierten Apoptose über die Regulation von Bax und Bim deutlicher beleuchtet werden konnten (siehe Abbildung 3.13, Seite 77).

4.3.3 Wirkung von IL-21 auf B-CLL-Zellen

Interleukin-21 führt in B-CLL-Zellen dosis- und zeitabhängig zu einer Zunahme an Annexin-positiven (avitalen) Zellen (siehe Abbildung 3.2, Seite 62 und 3.3, Seite 63).

Die 48-stündige Inkubation von B-CLL-Zellen zusammen mit IL-21 führt zur Zunahme des Phosphorylierung an Tyrosinresten der STAT-Proteine -3 und -5 als auch, in ver-

mehrter Intensität, an den Serinresten von STAT1 und -3 (siehe Abbildung 3.11, Seite 74).

Auch andere Arbeitsgruppen konnten die Tyrosinphosphorylierung von STAT1, STAT3 und STAT5 durch IL-21 an unstimulierten (Gowda A. et al., 2008, 4727; deToto D. et al., 2006, 3711) und mit CD40-Ligand stimulierten (deToto D. et al., 2006, 3711; deToto D. et al., 2008, 521) B-CLL-Zellen nachweisen.

Jedoch wurde nicht die Serinphosphorylierung an den STAT-Proteinen 1 und 3 nach Stimulierung untersucht, die, bei bestehender Tyrosinphosphorylierung, deren Signalwirkung verstärkt (Frank DA., 1999, 434).

Ein weiterer Unterschied zwischen den bisherigen Untersuchungen und dieser Arbeit bezüglich der STAT-Aktivierung in CLL-Zellen ist die Dauer des Signals, das durch die Phosphorylierung von Aminosäureresten generiert wird.

In Arbeiten von de Toto und Mitarbeiter sowie Gowda et al. wurde die Aktivierung der STATs und Inkubation mit IL-21 für maximal 24 Stunden durchgeführt. Nach 24-stündiger Stimulation mit IL-21 war die Tyrosinphosphorylierung von STAT5 verglichen mit 10-minütiger Inkubation mit dem Interleukin deutlich rückläufig (deToto D. et al., 2006, 3711; deToto D. et al., 2008, 521; Gowda A. et al., 2008, 4727).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach einer zweitägigen Stimulation mit IL-21 (und CpG-Oligonukleotiden) ein Signal über die STATs vermittelt wird, während in der Mediumkontrolle meist keine Phosphorylierung der STATs nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 3.11, Seite 74).

Im Gegensatz dazu war eine Serinphosphorylierung von STAT1 und -3 in allen samples unstimulierter B-CLL-Zellen zum Zeitpunkt null nachweisbar (siehe Abbildung 3.10, Seite 73).

In humanen B-Zellen (Konforte D. et al., 2006, 8384), Myelomzellen (Brenne AT. et al., 2002, 3759) und B-CLL-Zellen (Gowda A. et al., 2008, 4727) ruft IL-21 die Tyrosinphosphorylierung von STAT3 über aktivierte Januskinasen hervor, in nicht-malignen B-Zellen und B-CLL-Zellen zusätzlich auch die Aktivierung von STAT1 (Konforte D. et al., 2006, 8384; deToto D. et al., 2008). Der Unterschied zwischen Myelomzellen und B-Lymphozyten, in denen IL-21 anti-apoptotische Wirkung hat, und CLL-Zellen, in denen das Zytokin pro-apoptotische Wirkung zeigt, ist die zusätzliche Tyrosinphosphorylierung von STAT5 in B-CLL-Zellen (siehe Abbildung 3.11, Seite 734).

Durch diese dritte Phosphorylierung könnte ein Signal generiert werden, das die differente Wirkung von IL-21 in B-CLL-Zellen ausmacht.

Mit dieser Annahme im Widerspruch steht die Veröffentlichung von de Toter et al., die die Signalwege von anti-apoptotischem IL-15 und pro-apoptotischem IL-21 in B-CLL-Zellen untersuchte und eine deutlichere Zunahme von phospho-STAT5 in IL-15-stimulierten Zellen, verglichen mit Zellen, die mit IL-21 koinkubiert worden waren, beschrieb (de Toter D. et al, 2008, 519 ff.).

Des Weiteren muss beachtet werden, dass die Tyrosinphosphorylierung von STAT3 in Myelom-Zellen anti-apoptotische Wirkung zu haben scheint, während sie in Jurkat-Zellen – einer Zelllinie, die aus einer humanen T-Zell-Leukämie generiert wurde – zur Apoptoseinduktion unerlässlich ist (Skov S. et al., 1998, 3568 ff.).

Auch die Tyrosinphosphorylierung von STAT1 kann sowohl anti- als auch pro-apoptotische Effekte auslösen. So führt IL-6 in Kolonkarzinom-Zelllinien über STAT1-Tyrosinphosphorylierung zur Zunahme der Expression von Bcl-xl, einem anti-apoptotischen Bcl-2-Familie Protein (Yuan H. et al., 2004, 2248 f.). Dagegen wirkt INF γ ebenfalls über STAT1-Tyrosinphosphorylierung in einer anderen humanen Kolonkarzinom-Zelllinie durch Fas-Hochregulation pro-apoptotisch (Xu X. et al., 1998, 2834 f.).

Diese Ergebnisse weisen auf eine zusätzliche Kodierung im Signalweg der STATs hin, die festlegt, wann eine Zelle pro-apoptotisch reagiert und wann nicht.

Im weiteren Verlauf der Apoptoseinduktion führt IL-21 laut Gowda et al. zur Hochregulation von Bim. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit (siehe Abbildung 3.13, Seite 77) nicht belegt werden. Dort zeigte sich lediglich eine Stabilisierung von Bim, was wohl auch auf die nur mäßige Apoptoseauslösung durch IL-21 als Einzelsubstanz zurückzuführen ist. Auch in den Versuchen von Gowda et al. konnte nur eine Zunahme der Bim-Expression in B-CLL-Zellen detektiert werden, die auf IL-21 mit einer Zunahme der Apoptoserate von mehr als 20 Prozent reagierten. Des Weiteren wurde für jene Versuche, die die Signalwege von IL-21 betrafen, ein spezielles Kulturmedium verwendet, das unter Umständen Einfluss auf die Proteinexpression der Zelle haben kann, da es die Apoptoserate von unbehandelten Zellen herabsetzt (Gowda A. et al., 2008, 4724, 4727).

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit zeigten B-CLL-Zellen in Western-Blot-Analysen nach alleiniger Inkubation mit dem Zytokin (IL-21) nur gering pro-apopto-

tisches Verhalten und exprimierten das pro-apoptotische Protein Bim ähnlich ausgeprägt wie Zellen der Mediumkontrolle (siehe Abbildung 3.13, Seite 77). Ein vergleichbares Expressionsmuster ließ sich auch für Bax feststellen (siehe Abbildung 3.13, Seite 77).

IL-21 alleine vermochte die untersuchten anti-apoptotischen Vertreter der Bcl-2-Familie Bcl-2 und Bcl-xl, mit Ausnahme von Mcl-1, in ihrer Regulation oder in ihrem Phosphorylierungsstatus nicht zu verändern (siehe Abbildung 3.13, Seite 77). In diesem Zusammenhang lies sich keine Aktivierung der Caspasen-3, -8 und -9 nachweisen (siehe Abbildung 3.15, Seite 80).

Die Erfassung der aktiven Form von Caspase-8 und Caspase-3, sowie die aktivierende Spaltung von Bid in t-Bid, konnten von de Toterio und Mitarbeitern durch IL-21 nur bei vorstimulierten B-CLL-Zellen nachgewiesen werden. B-CLL-Zellen, die nicht mit CD40-Ligand-exprimierenden Zellen in Kontakt waren, zeigten keine Bid-Aktivierung. Eine Veränderung der Expression von Bax, Bcl-2 und Bcl-xl konnte anhand dieser Versuche ebenfalls nicht gezeigt werden (de Toterio D. et al., 2006, 3713).

4.3.4 Wirkung von IL-21 und CpG auf B-CLL-Zellen

Die Zuordnung des Phosphorylierungsstatus verschiedener STAT Proteine zur Regulation von Bcl-2-Familienproteinen gestaltet sich schwierig, da die Tyrosinphosphorylierung derselben STATs divergente Effekte hervorrufen kann. Diesbezüglich besteht eine Abhängigkeit vom Zelltyp oder dem Agens, das die Phosphorylierung auslöst (Frank DA., 1999, 436).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Serin- und Tyrosinphosphorylierung der STAT Proteine durch CpG-Oligonukleotide und der Kombination aus IL-21 und CpGs stark zunimmt (siehe Abbildung 3.11, Seite 74), scheinbar unabhängig von der Auswirkung des Oligonukleotids allein auf die Apoptose.

Frank et al. konnten zeigen, dass nahezu 100% der dort untersuchten unstimulierten B-CLL-Zellen eine STAT1- und STAT3-Phosphorylierung von Serin 727 aufweisen

(Frank DA. et al., 1997, 3142 f.). Das konnte in den oben beschriebenen Versuchen (siehe Abbildung 3.10, Seite 73) bestätigt werden.

Die Arbeitsgruppe um Frank postulierte, dass die Serinphosphorylierung von STATs die Wirkung der Tyrosinphosphorylierung verstärke (Frank DA., 1999, 434).

Diese Tatsache, zusammen mit dem Ergebnis, dass CpG-Oligonukleotide die Serinphosphorylierung von STAT1 und STAT3 verstärken, (die durch IL-21 nur gering ausgeprägt ist), könnte eine Erklärung für die synergistische Wirkung von CpG-Oligonukleotiden und IL-21 in den untersuchten B-CLL-Zellen in dieser Arbeit sein.

Letztendlich kann man anhand der Ergebnisse aus den durchgeführten Experimenten dieser Arbeit argumentieren, dass die STAT-Aktivierung in CLL-Zellen, die mit CpG-Oligonukleotiden und IL-21 behandelt wurden, zu einer Herabregulation von anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie (phospho)-Bcl-2 und Bcl-xl (siehe Abbildung 3.13, Seite 77) sowie XIAP (siehe Abbildung 3.15, Seite 80) führt, wobei das Verhältnis von pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie zugunsten der pro-apoptotischen verschoben wird. Dies könnte über eine Bax/Bak Aktivierung/Oligomerisierung, mit nachfolgender Permeabilisierung der mitochondrialen Membran sowie Cytochrom c Freisetzung aus den Mitochondrien, zu einer Aktivierung von Effektorcaspasen (siehe Abbildung 3.15, Seite 80) und somit zum Zelltod führen. Durch die Beteiligung von Caspase-8 besteht jedoch auch die Möglichkeit einer Aktivierung des extrinsischen pathways mit sekundärer Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs. Die Beteiligung des intrinsischen pathways ist in so fern wahrscheinlich, als ein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 3.14, Seite 79), und dies durch Pancaspaseinhibitoren hemmbar war (siehe Abbildung 3.17, Seite 83).

Bei der großen Mehrheit der untersuchten Patienten erwies sich die Kombination von IL-21 und CpG als potenter Apoptoseinduktor. Ungeachtet dieser Tatsache bleibt das exakte molekulare Zusammenspiel der beiden Substanzen unklar.

Ein weiterer Mechanismus, durch den CpG-Oligonukleotide den pro-apoptotischen Effekt des Interleukins verstärken könnten, wäre die Hochregulation des IL-21-Rezeptors, was von Jahrsdörfer und Mitarbeiter sowie von Gowda et al. beschrieben wurde (Jahrsdörfer B. et al., 2006, 2714; Gowda A. et al., 2008, 4726).

In den hier beschriebenen Experimenten konnte dies jedoch nur bei einigen Patientenproben und meist auch nur eine geringe Regulation gezeigt werden (siehe Abbildungen 3.8, Seite 69 und 3.9, Seite 72).

Eine weitere Möglichkeit könnte die Auslösung zweier gegenläufiger Signale in der CLL-Zelle sein. CpG-Oligonukleotide und (in geringerem Ausmaß) auch IL-21 führten in allen untersuchten Proben zu einer Hochregulation des anti-apoptotischen Bcl-2-Familie Proteins Mcl-1 (siehe Abbildung 3.13, Seite 77). Die alleinige Inkubation mit IL-21 seinerseits hat eine konstante Bim- und Bax-Expression zur Folge (siehe Abbildung 3.13, Seite 77). Diese gegensätzliche Proteinregulation könnte für die Zelle bei Kombination beider Substanzen (hohe Expression von Mcl-1, bei gleichzeitiger Stabilisierung von Bax/Bim) ein Signal zur Apoptoseinduktion darstellen.

Die von Jahrsdörfer et al. postulierte Produktion von Granzym B durch B-CLL-Zellen nach Koinkubation mit CpG-Oligonukleotiden, die durch Kombination mit Interleukin-21 noch verstärkt werden kann und die ihrerseits zur Aktivierung von Caspasen führt, könnte ebenfalls einen Teil zur Apoptoseinduktion beitragen (Jahrsdörfer B. et al., 2006, 2715 f.; Srinivasula SM. et al., 1996, 27101–27104; Chinnaiyan AM et al., 1996, 897 ff.)

Jedoch ist noch nicht eindeutig geklärt, wie unterschiedliche intrazelluläre Signale, die durch CpG-Oligonukleotide hervorgerufen werden, reguliert werden. Die Oligonukleotide verstärken die pro-apoptotische Wirkung von IL-21 in B-CLL-Zellen durch verminderte Expression von anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder, während CpG-Oligonukleotide alleine ihre Wirkung auf die Zellviabilität durch Regulation von u.a. Bim und Bax und nicht Bcl-2 und Bcl-xl ausüben. (siehe Abbildung 3.13, Seite 77)

4.3.5 Wirkung von IL-21 und CpG auf B-CLL-Zellen mit Stromazellkontakt

B-CLL-Zellen, die auf unterstützender Stroma koinkubiert wurden, zeigten verglichen mit den Ergebnissen entsprechender Versuche ohne Stroma eine deutliche Abnahme der Apoptoserate, sowohl in der Mediumkontrolle (Spontanapoptose) als auch bei gleichzeitiger Kultur mit IL-21. Ähnlich den Ergebnissen ohne Stromazellkontakt, bewirkt IL-21 alleine in B-CLL-Zellen mit Stromasupport allenfalls eine geringe Apoptose-

induktion während die Kombination aus dem Zytokin und dem Oligonukleotid die Apoptoserate im Vergleich zur Kultur in Medium stark steigern kann (siehe Abbildung 3.18, Seite 84).

Da die Koinkubation mit Stroma das Verhalten der CLL-Zellen *in vivo* modellhaft darstellen soll, ist aus den durchgeführten Versuchen abzuleiten, dass die Wirkung von IL-21 und der Kombination aus IL-21 und CpG unter „Stromaschutz“-Bedingungen (*in vivo*) mit der Wirkung der Substanzen ohne Stromasupport vergleichbar ist.

Im Hinblick auf die Koinkubation von CpG-Oligonukleotiden mit B-CLL-Zellen auf Stromasupport ist hervorzuheben, dass die Wirkung dieser Kombination in der vorliegenden Arbeit exklusive pro-apoptotisch war – auch, wenn das Oligonukleotid auf CLL-Zellen, die keinen Kontakt zu Stromazellen hatten, anti-apoptotische Wirkung ausübte (siehe Abbildung 3.18, Seite 84).

Für sich allein betrachtet, führen CpG-Oligonukleotide und Stromazellen jeweils zu einer Aktivierung des NF- κ B-Wegs und somit zur Zunahme der proliferativen Aktivität in CLL-Zellen (Decker T. et al., 2002, 328 f., Cuní S. et al., 2004, 1393 ff.; He B. et al., 2004, 4484).

4.3.6 Wirkung von IL-21 und CpG auf nicht-maligne B-Zellen

Die Wirkung von IL-21, CpG und deren Kombination ruft eine geringe anti-apoptotische Reaktion in nicht-malignen B-Zellen hervor. CpG-Oligonukleotide verursachen diesen Effekt etwas ausgeprägter als IL-21 allein. Die Kombination beider Substanzen vermag das Ausmaß der Wirkung der Oligonukleotide alleine nicht wesentlich zu verstärken (siehe Abbildung 3.19, Seite 86). Somit scheint die Wirkung von IL-21 und CpG-Oligonukleotiden *in vitro* nur B-CLL-Zellen und nicht gesunde B-Lymphozyten zu betreffen.

Yi et al. zeigten, dass unter anderem die Hochregulation von Bcl-xl für den anti-apoptotischen Effekt der CpG-Oligonukleotide verantwortlich ist (Yi AK. et al., 1998, 5901 ff.).

Obwohl Experimente am Mausmodell belegten, dass IL-21 und IL-21 zusammen mit CpG-Oligonukleotiden in nicht-malignen B-Zellen eine pro-apoptotische Wirkung ent-

falten (Mehta DS. et al., 2003, 4115; Ozaki K. et al., 2004, 5365), konnten ähnliche Versuche mit humanen B-Zellen diese Ergebnisse nicht bestätigen. Die anti-apoptotische Wirkung von IL-21 auf humane B-Zellen konnte für die in vitro Kultur von sechs Tagen gesichert werden (Konforte D. et al., 2006, 8384).

Humane B-Zellen, die mit CpG vorstimuliert wurden, zeigten eine höhere Überlebensrate als unstimulierte Zellen, während die Kombination mit IL-21 die Proliferation der Zellen, im Gegensatz zu ausschließlicher CpG-Stimulation, senkte (Nagumo H. et al., 2009, 58, 61).

Jahrsdörfer und Mitarbeiter wiesen nach, dass humane, nicht-maligne B-Zellen in der Lage sind, Granzym B zu produzieren, wenn sie mit IL-21 in Kontakt kommen. Dies kann durch zusätzliche Zugabe von CpG noch verstärkt werden. Jedoch fanden keine korrelierenden Annexinassays statt, so dass keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob in diesen Zellen, ähnlich den CLL-Zellen, durch Granzym B ebenfalls Apoptose induziert werden kann. (Jahrsdörfer B. et al., 2006, 2718)

Des Weiteren wurden ähnliche Versuche mit anti-CD40-Antikörpern, anstatt mit CpG-Oligonukleotiden, und IL-21 an humanen B-Lymphozyten durchgeführt. Beide Substanzen in Kombination führten zur Proliferation und Differenzierung der B-Zellen. (Ettinger R. et al., 2005, 7870 ff.; Good KL. et al., 2006, 5238)

Da IL-21 auch auf Myelom-Zellen eine anti-apoptotische Wirkung ausübt (Brenne AT. et al., 2002, 3759), stellt sich die Frage nach dem Unterschied in der Signaltransduktion zwischen nicht-malignen B-Lymphozyten und verschiedenen malignen Entitäten.

Möglicherweise könnte der unterschiedlich lange anhaltende Phosphorylierungsstatus der STATs Auswirkung auf die Regulation pro- und anti-apoptotischer Proteine haben und somit entscheiden, ob die Zelle überlebt oder Apoptose induziert wird. Jedoch ist weiterhin unklar, wie diese Unterschiede in der Aktivierung der STATs kodiert und reguliert werden.

4.3.7 Regulation von Mcl-1 durch IL-21 und CpG

In allen untersuchten Patientenproben war eine deutliche Zunahme des anti-apoptischen Proteins Mcl-1 durch CpG, IL-21 und der Kombination beider Substanzen nachweisbar (siehe Abbildung 3.13, Seite 77). B-CLL-Zellen, die mit CpG – alleine oder in Kombination mit IL-21 – inkubiert worden waren, zeigten eine vergleichbar hohe Expression, während bei alleiniger Inkubation mit IL-21 zum Teil nur eine geringe Zunahme der Expression von Mcl-1 zu detektieren war.

Es ist bekannt, dass CLL-Zellen eine höhere basale Mcl-1-Expression aufweisen als nicht-maligne B-Zellen (Kitada s. et al., 1998, 3381 f.).

Mcl-1 wird als anti-apoptisches Mitglied der Bcl-2-Familie bei CLL-Zellen als Prognosefaktor herangezogen. Eine hohe Expression von Mcl-1, unmutierter IgV_H- Status, sowie CD38-Expression sind verbunden mit einer geringeren Ansprechrate auf Fludarabin und einem verkürzten Gesamtüberleben (Pepper C. et al., 2008, 3810 f.).

Es ist bemerkenswert, dass es durch die Kombination von IL-21 und CpG nicht zu einer Herabregulation von Mcl-1 kommt. Diese Beobachtung passt zu der Annahme, dass die Kombination aus IL-21 und CpG die Apoptoseinduktion durch das Aufeinandertreffen gegensätzlicher Stimuli hervorruft. Dabei wird Mcl-1 aufgrund der Koinkubation mit CpG trotz Zugabe von IL-21 exprimiert, während IL-21 zu einer Stabilisierung von Bim und Bax führt. Trotz erhöhter Sequestrierung von Bak durch eine hohe Expression von Mcl-1, könnte Bim die Aktivierung und Oligomerisierung von Bax, mit nachfolgender Permeabilisierung der mitochondrialen Membran zur Folge haben. Dies wird unterstützt durch eine verminderte Expression von Bcl-xl, mit damit verbundener verminderter Sequestrierung von Bax.

4.3.8 Wirkung von IL-21 und CpG auf die Zellzyklusregulation von B-CLL-Zellen

Die deutliche Abnahme des Zellzyklusregulators p27 durch CpG-Oligonukleotide oder CpG und IL-21 in Kombination, verglichen mit der Mediumkontrolle, war in allen unter-

suchten Patienten zu beobachten (siehe Abbildung 3.20, Seite 87). Tatsächlich wurde gezeigt, dass B-CLL-Zellen in Kultur mit CpG-Oligonukleotiden in signifikantem Ausmaß in den Zellzyklus eintreten, was durch zusätzliche Koinkubation mit Interleukin-2 noch verstärkt werden kann (Decker T. et al., 2002, 328 f.).

IL-21 führte in der Kombination mit CpG-Oligonukleotiden in der Hälfte der untersuchten samples zu einer weiteren Herabregulation von p27, im Vergleich zur Inkubation mit dem Oligonukleotid alleine (siehe Abbildung 3.20, Seite 87). Die Wirkungsweise der Oligonukleotide auf die Regulation von p27 wird durch IL-21 somit nicht grundsätzlich verändert.

Der Wiedereintritt in den Zellzyklus könnte ein besseres Ansprechen auf „klassische“ Chemotherapeutika bedeuten, da diese vor allem auf sich teilende Zellen wirken.

Jedoch konnte in B-CLL-Zellen eines Patienten (Abbildung 3.20 A, Seite 87) eine vermehrte Expression von p27 nach alleiniger Inkubation mit IL-21 festgestellt werden. Fagerli et al. zeigten dieses Verhalten auch an humanen Myelom-Zellen, die auf IL-21 jedoch anti-apoptotisch reagierten (Fagerli U-M. et al., 2011, 3200, 3204 f.).

Ein Großteil der B-CLL-Zellen des peripheren Blutes befindet sich in einem proliferativ inaktiven Zustand (G₀-Phase-Arrest) (Vrhovac R. et al., 1998, 4694; Meinhardt G. et al., 1999, 282). Es existiert jedoch ein Pool an proliferativ aktiven, sich teilenden Zellen *in vivo*, der für die Krankheitsprogression mitverantwortlich gemacht wird (Caligaris-Cappio F. et al., 2008, 4490–4500). Diesen Pool proliferativ aktiver Zellen gilt es durch neue Therapieansätze zu hemmen. Substanzen wie Rapamycin (Decker T. et al., 2003, 280) und Roscovitin (Hahntow IN. et al., 2004, 748 f.) erwiesen sich hierbei bereits in *in vitro* Untersuchungen als wirksam und wurden auch in klinischen Studien bereits eingesetzt (Decker T. et al., 2008, 223 ff.).

5. Zusammenfassung

Die chronisch lymphatische Leukämie stellt die häufigste Leukämie der westlichen Welt dar. Die malignen Zellen zeichnen sich sowohl durch eine verminderte Apoptose-rate als auch durch die Fähigkeit zur Proliferation aus. Diese findet vornehmlich in Proliferationszentren in Lymphknoten und Knochenmark statt. Trotz verschiedenster Therapieansätze ist die CLL meist nicht heilbar.

Ziel dieser Arbeit war es die Auswirkung zweier Substanzen auf die Apoptose in B-CLL-Zellen zu untersuchen und dabei aktivierte intrazelluläre Signalwege aufzuzeigen.

Interleukin-21 kann in B-CLL-Zellen in unterschiedlichem Ausmaß Apoptose auslösen. Untersucht wurde, ob dieser Effekt durch CpG-Oligonukleotidmotive bakteriellen Ursprungs, ähnlich der Kombinationswirkung von IL-2 und CpGs, verstärkt werden kann.

Es zeigte sich, dass IL-21 als Einzelsubstanz dosisabhängig über eine geringe Tyrosin- und Serinphosphorylierung von STAT1, -3 und -5 die Expression der pro-apoptischen Proteine Bim und Bax stabilisieren kann.

In Kombination mit CpG-Oligonukleotiden verstärken sich die Tyrosin- und Serinphosphorylierungen derselben STATs und führen zu einer Herabregulation der anti-apoptisch wirkenden Bcl-2-Familienmitglieder (phospho)-Bcl-2 und Bcl-xl. Es kommt zu einer Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges, wobei auch eine Beteiligung des extrinsisch vermittelten Weges festgestellt werden konnte. Der Zelluntergang kann mit dem Pan-Caspaseninhibitor z-VAD-fmk signifikant gehemmt werden.

Die Intensität der Apoptoseauslösung von CpG-Oligonukleotiden kombiniert mit IL-21 ist, im Gegensatz zur Wirkung des Interleukins alleine, signifikant im Vergleich zur Mediumkontrolle.

Zusätzlich zeigte sich, dass CpG-Oligonukleotide in B-CLL-Zellen, abhängig von ihrem ZAP-70 Status, sowohl anti- als auch pro-apoptisches Verhalten hervorrufen können.

Die verminderte Expression von Bim und Bax war bei anti-apoptotischen Effekten, die Stabilisierung derselben Proteine bei pro-apoptotischer Wirkung der Oligonukleotide zu detektieren.

Die Kombination aus IL-21 und CpG löst jedoch ungeachtet des ZAP-70 Status' signifikant Apoptose aus.

Die gleichen Versuchsansätze auf Stromazellen bewirken eine deutliche Senkung der Apoptoserate aller B-CLL-Zellen, unabhängig von den mit ihnen koinkubierten Substanzen. Jedoch zeigte sich auch hier ein starker Anstieg der Apoptose nach Koinkubation der Zellen mit IL-21 und CpG-Oligonukleotiden.

Diese Ergebnisse deuten auf die Möglichkeit hin, die Wirkung der pro-apoptotischen Substanz IL-21, die sich schon in klinischer Erprobung befindet, durch Koinkubation mit CpG-Oligonukleotiden zu verstärken und so eventuell zukünftig eine weitere Therapieoptimierung bzw. ein erweitertes therapeutisches Spektrum bei dieser nach wie vor meist unheilbaren Erkrankung zu erreichen.

6. Literaturverzeichnis

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 281 (1998): 1322–1326.

Asín L, Ibarra MR, Tres A, Goya GF Controlled cell death by magnetic hyperthermia: effects of exposure time, field amplitude, and nanoparticle concentration. *Pharm Res*. 5 (2012):1319–1327.

Attardi LD, Lowe SW, Brugarolas J, Jacks T. Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis. *EMBO J*. 15 (1996): 3693–3701.

Balakrishnan K, Burger JA, Wierda WG, Gandhi V. AT-101 induces apoptosis in CLL B cells and overcomes stromal cell-mediated Mcl-1 induction and drug resistance. *Blood*. 113 (2009): 149–153.

Barragán M, de Frias M, Iglesias-Serret D, Campàs C, Castaño E, Santidrián AF, Coll-Mulet L, Cosialls AM, Domingo A, Pons G, Gil J. Regulation of Akt/PKB by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and -independent pathways in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: role of protein kinase C{beta}. *J Leukoc Biol*. 80 (2006): 1473–1479.

Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry*. 35 (1999): 181–195.

Bekeredjian-Ding I, Doster A, Schiller M, Heyder P, Lorenz HM, Schraven B, Bommhardt U, Heeg K. TLR9-activating DNA up-regulates ZAP70 via sustained PKB induction in IgM⁺ B cells. *J Immunol.* 181 (2008): 8267–8277.

Bennett F, Luxenberg D, Ling V, Wang IM, Marquette K, Lowe D, Khan N, Veldman G, Jacobs KA, Valge-Archer VE, Collins M, Carreno BM. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol.* 170 (2003): 711–718.

Bird A. The essentials of DNA methylation. *Cell.* 70 (1992): 5–8.

Bogner C, Schneller F, Hipp S, Ringshausen I, Peschel C, Decker T. Cycling B-CLL cells are highly susceptible to inhibition of the proteasome: involvement of p27, early D-type cyclins, Bax, and caspase-dependent and -independent pathways. *Exp Hematol.* 31 (2003): 218–225.

Brady J, Hayakawa Y, Smyth MJ, Nutt SL. IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *J Immunol.* 172 (2004): 2048–2058.

Brenne AT, Ro TB, Waage A, Sundan A, Borset M, Hjorth-Hansen H. Interleukin-21 is a growth and survival factor for human myeloma cells. *Blood.* 99 (2002): 3756–3762.

Brenner D, Mak TW. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol.* 21 (2009): 871–877.

Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci.* 122 (2009): 437–441.

Buendia B, Santa-Maria A, Courvalin JC. Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci.* 112 (1999): 1743–1753.

Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*. 94 (1999): 3658–3667.

Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. (2004): 163–183.

Cain K, Brown DG, Langlais C, Cohen GM. Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem*. 274 (1999): 22686–22692.

Caligaris-Cappio F, Ghia P. Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? *J Clin Oncol*. 26 (2008): 4497–4503.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99 (2002): 15524–15529.

Cell Signal, www.cellsignal.com, Stand: 1.4.09

Abbildung 1.1: <http://www.cellsignal.com/pathways/apoptosis-signaling.jsp>

Chaouchi N, Wallon C, Goujard C, Tertian G, Rudent A, Caput D, Ferrera P, Minty A, Vazquez A, Delfraissy JF. Interleukin-13 inhibits interleukin-2-induced proliferation and protects chronic lymphocytic leukemia B cells from in vitro apoptosis. *Blood*. 87 (1996): 1022–1029.

Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell*. 71 (1992): 649–662.

Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*. 65 (1991): 1053–1061.

Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, Kipps TJ. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 100 (2002): 4609–4614.

Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DC. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*. 17 (2005): 393–403.

Chen TY, Chi KH, Wang JS, Chien CL, Lin WW. Reactive oxygen species are involved in FasL-induced caspase-independent cell death and inflammatory responses. *Free Radic Biol Med*. 46 (2009): 643–655.

Cheson BD. Oblimersen for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Ther Clin Risk Manag*. 3 (2007): 855–870.

Chinnaiyan AM, Hanna WL, Orth K, Duan H, Poirier GG, Froelich CJ, Dixit VM. Cytotoxic T-cell-derived granzyme B activates the apoptotic protease ICE-LAP3. *Curr Biol*. 6 (1996): 897–899.

Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 352 (2005): 804–815.

Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, Chinnadurai G, Lutz RJ. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J*. 14 (1995): 5589–5596.

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM.

miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102 (2005):13944–13949.

CLL Trialists' Collaborative Group. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials. *J Natl Cancer Inst.* 91 (1999): 861–868.

Clodi K, Kliche KO, Zhao S, Weidner D, Schenk T, Consoli U, Jiang S, Snell V, Andreeff M. Cell-surface exposure of phosphatidylserine correlates with the stage of fludarabine-induced apoptosis in chronic lymphatic leukemia and expression of apoptosis-regulating genes. *Cytometry* 40 (2000): 19–25.

Cohen JJ. Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol.* 50 (1991): 55–85.

Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene.* 299 (2002): 35–55.

Cuconati A, Mukherjee C, Perez D, White E. DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes Dev.* 17 (2003): 2922–2932.

Cuní S, Pérez-Aciego P, Pérez-Chacón G, Vargas JA, Sánchez A, Martín-Saavedra FM, Ballester S, García-Marco J, Jordá J, Durántez A. A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia.* 18 (2004): 1391–1400.

Daga A, Orengo AM, Gangemi RM, Marubbi D, Perera M, Comes A, Ferrini S, Corte G. Glioma immunotherapy by IL-21 gene-modified cells or by recombinant IL-21 involves antibody responses. *Int J Cancer.* 121 (2007): 1756–1763.

Dalpke AH, Opper S, Zimmermann S, Heeg K. Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs. *J Immunol.* 166 (2001): 7082–7089.

Damle RN, Temburni S, Calissano C, Yancopoulos S, Banapour T, Sison C, Allen SL, Rai KR, Chiorazzi N. CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood.* 110 (2007): 3352–3359.

Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 94 (1999): 1840–1847.

Decker T, Hipp S, Ringshausen I, Bogner C, Oelsner M, Schneller F, Peschel C. Rapamycin-induced G1 arrest in cycling B-CLL cells is associated with reduced expression of cyclin D3, cyclin E, cyclin A, and survivin. *Blood.* 101 (2003): 278–285.

Decker T, Sandherr M, Goetze K, Oelsner M, Ringshausen I, Peschel C. A pilot trial of the mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitor RAD001 in patients with advanced B-CLL. *Ann Hematol.* 88 (2009): 221–227.

Decker T, Schneller F, Hipp S, Miething C, Jahn T, Duyster J, Peschel C. Cell cycle progression of chronic lymphocytic leukemia cells is controlled by cyclin D2, cyclin D3, cyclin-dependent kinase (cdk) 4 and the cdk inhibitor p27. *Leukemia.* 16 (2002): 327–334.

Decker T, Schneller F, Kronschnabl M, Dechow T, Lipford GB, Wagner H, Peschel C. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype. *Exp Hematol.* 28 (2000): 558–568.

Decker T, Schneller F, Kronschnabl M, Dechow T, Lipford GB, Wagner H, Peschel C. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors

on B-CLL cells: costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype. *Exp Hematol.* 28 (2000): 558–568.

Decker T, Schneller F, Sparwasser T, Tretter T, Lipford GB, Wagner H, Peschel C. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 95 (2000): 999–1006.

Deglesne PA, Chevallier N, Letestu R, Baran-Marszak F, Beitar T, Salanoubat C, Sanhes L, Nataf J, Roger C, Varin-Blank N, Ajchenbaum-Cymbalista F. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res.* 66 (2006): 7158–7166.

Delmer A, Ajchenbaum-Cymbalista F, Tang R, Ramond S, Faussat AM, Marie JP, Zittoun R. Overexpression of cyclin D2 in chronic B-cell malignancies. *Blood.* 85 (1995): 2870–2876.

Deutsche Krebshilfe e.V. www.krebshilfe.de, Stand: 11/07

de Toter D, Meazza R, Capaia M, Fabbi M, Azzarone B, Balleari E, Gobbi M, Cutrona G, Ferrarini M, Ferrini S. The opposite effects of IL-15 and IL-21 on CLL B cells correlate with differential activation of the JAK/STAT and ERK1/2 pathways. *Blood.* 111 (2008): 517–524.

de Toter D, Meazza R, Zupo S, Cutrona G, Matis S, Colombo M, Balleari E, Pierri I, Fabbi M, Capaia M, Azzarone B, Gobbi M, Ferrarini M, Ferrini S. Interleukin-21 receptor (IL-21R) is up-regulated by CD40 triggering and mediates proapoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 107 (2006): 3708–3715.

Dierks C, Grbic J, Zirlik K, Beigi R, Englund NP, Guo GR, Veelken H, Engelhardt M, Mertelsmann R, Kelleher JF, Schultz P, Warmuth M. Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nat Med.* 13 (2007): 944–951.

Dighiero G, Maloum K, Desablens B, Cazin B, Navarro M, Leblay R, Leporrier M, Jaubert J, Lepeu G, Dreyfus B, Binet JL, Travade P. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 338 (1998): 1506–1514.

Döhner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood.* 85 (1995): 1580–1589.

Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, Fischer K, Hunstein W, Lichter P. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood.* 89 (1997): 2516–2522.

Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 343 (2000): 1910–1916.

Duman-Scheel M, Weng L, Xin S, Du W. Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature.* 417 (2002): 299–304.

Dyer MJ, Zani VJ, Lu WZ, O'Byrne A, Mould S, Chapman R, Heward JM, Kayano H, Jadayel D, Matutes E, et al. BCL2 translocations in leukemias of mature B cells. *Blood.* 83 (1994): 3682–3688.

Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 68 (1999): 383–424.

Edelmann J, Klein-Hitpass L, Carpinteiro A, Führer A, Sellmann L, Stilgenbauer S, Dührsen U, Dürig J. Bone marrow fibroblasts induce expression of PI3K/NF-kappaB pathway genes and a pro-angiogenic phenotype in CLL cells. *Leuk Res.* 32 (2008): 1565–1572.

El Rouby S, Thomas A, Costin D, Rosenberg CR, Potmesil M, Silber R, Newcomb EW. p53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression. *Blood*. 82 (1993): 3452–3459.

van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*. 31 (1998): 1–9.

Ettinger R, Sims GP, Fairhurst AM, Robbins R, da Silva YS, Spolski R, Leonard WJ, Lipsky PE. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J Immunol*. 175 (2005): 7867–7879.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*. 148 (1992): 2207–2216.

Fagerli UM, Ullrich K, Stühmer T, Holien T, Köchert K, Holt RU, Bruland O, Chatterjee M, Nogai H, Lenz G, Shaughnessy JD Jr, Mathas S, Sundan A, Bargou RC, Dörken B, Børset M, Janz M. Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) is a prominent target gene of the transcriptional response to cytokines in multiple myeloma and supports the growth of myeloma cells. *Oncogene*. 28 (2011): 3198–3206.

Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai K, Rassenti LZ, Kipps TJ, Dighiero G, Schroeder HW Jr, Ferrarini M, Chiorazzi N. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest*. 102 (1998): 1515–1525.

Finke J, Chronische lymphatische Leukämie, in „Das Rote Buch“, Berger DP, Engelhardt R, Mertelsmann R, Henß H, Behringer D, ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg/Lech, 1997, 259–266.

Francia di Celle P, Mariani S, Riera L, Stacchini A, Reato G, Foa R. Interleukin-8 induces the accumulation of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells by prolonging survival in an autocrine fashion. *Blood*. 87 (1996): 4382–4389.

Frank DA. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of cancer. *Mol Med*. 5 (1999): 432–456.

Frank DA, Mahajan S, Ritz J. B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues. *J Clin Invest*. 100 (1997): 3140–3148.

French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. Effects of chlorambucil and therapeutic decision in initial forms of chronic lymphocytic leukemia (stage A): results of a randomized clinical trial on 612 patients. *Blood*. 75 (1990): 1414–1421.

Fung TK1, Siu WY, Yam CH, Lau A, Poon RY. Cyclin F is degraded during G2-M by mechanisms fundamentally different from other cyclins. *J Biol Chem*. 277 (2002): 35140–35149.

Furman RR, Asgary Z, Mascarenhas JO, Liou HC, Schattner EJ. Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol*. 164 (2000): 2200–2206.

Fuxman Bass JI, Gabelloni ML, Alvarez ME, Vermeulen ME, Russo DM, Zorreguieta A, Geffner JR, Trevani AS, Characterization of bacterial DNA binding to human neutrophil surface. *Lab Invest*. 88 (2008): 926–937.

Garner E, Raj K. Protective mechanisms of p53-p21-pRb proteins against DNA damage-induced cell death. *Cell Cycle*. 7 (2008): 277–282.

Ghia P, Strota G, Granziero L, Geuna M, Guida G, Sallusto F, Ruffing N, Montagna L, Piccoli P, Chilosi M, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol*. 32 (2002): 1403–1413.

Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, Sica S, Leone G, Efremov DG. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood*. 109 (2007): 2032–2039.

Godal R, Keilholz U, Uharek L, Letsch A, Asemissen AM, Busse A, Na IK, Thiel E, Scheibenbogen C. Lymphomas are sensitive to perforin-dependent cytotoxic pathways despite expression of PI-9 and overexpression of bcl-2. *Blood*. 107 (2006): 3205–3211.

Goel S, Mani S, Perez-Soler R. Tyrosine kinase inhibitors: a clinical perspective. *Curr Oncol Rep*. 4 (2002): 9–19.

Goltsev YV, Kovalenko AV, Arnold E, Varfolomeev EE, Brodianskii VM, Wallach D. CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *J Biol Chem*. 272 (1997): 19641–19644.

Good KL, Bryant VL, Tangye SG. Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21. *J Immunol*. 177 (2006): 5236–5247.

Gowda A, Roda J, Hussain SR, Ramanunni A, Joshi T, Schmidt S, Zhang X, Lehman A, Jarjoura D, Carson WE, Kindsvogel W, Cheney C, Caligiuri MA, Tridandapani S, Muthusamy N, Byrd JC. IL-21 mediates apoptosis through up-regulation of the BH3 family member BIM and enhances both direct and antibody-dependent cellular cytotoxicity in primary chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Blood*. 111 (2008): 4723–4730.

Grandjennette C, Kennel A, Faure GC, Béné MC, Feugier P. Expression of functional toll-like receptors by B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*. 92 (2007): 1279–1281.

Granziero L, Ghia P, Circosta P, Gottardi D, Strola G, Geuna M, Montagna L, Piccoli P, Chilosi M, Caligaris-Cappio F. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 97 (2001): 2777–2783.

Gregoli PA, Bondurant MC. Function of caspases in regulating apoptosis caused by erythropoietin deprivation in erythroid progenitors. *J Cell Physiol*. 178 (1999): 133–143.

Grünwald V, Desar IM, Haanen J, Fiedler W, Mouritzen U, Olsen MW, van Herpen CM. A phase I study of recombinant human interleukin-21 (rIL-21) in combination with sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma (RCC). *Acta Oncol*. 1 (2011): 121–126.

Hahntow IN, Schneller F, Oelsner M, Weick K, Ringshausen I, Fend F, Peschel C, Decker T. Cyclin-dependent kinase inhibitor Roscovitine induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*. 18 (2004): 747–755.

Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 94 (1999): 1848–1854.

Hallek M, Chronische Lymphozytenleukämie, in „Onkologie intergativ: Konventionelle und komplementäre Therapie“, Pfeifer B, Preiß J, Unger C, Elsevier-Verlag, München, 2006, 1. Auflage, 687–696.

Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ; International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 111 (2008): 5446–5456.

Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell*. 6 (1995): 387–400.

Hartwell LH. Twenty-five years of cell cycle genetics. *Genetics*. 4 (1991): 975–980.

He B, Qiao X, Cerutti A. CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. *J Immunol*. 173 (2004): 4479–4491.

He H, Wisner P, Yang G, Hu HM, Haley D, Miller W, O'Hara A, Alvord WG, Clegg CH, Fox BA, Urba WJ, Walker EB. Combined IL-21 and low-dose IL-2 therapy induces anti-tumor immunity and long-term curative effects in a murine melanoma tumor model. *J Transl Med*. 4 (2006): 24.

Hegde GV, Peterson KJ, Emanuel K, Mittal AK, Joshi AD, Dickinson JD, Kollessery GJ, Bociak RG, Bierman P, Vose JM, Weisenburger DD, Joshi SS. Hedgehog-induced survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in a stromal cell microenvironment: a potential new therapeutic target. *Mol Cancer Res*. 6 (2008): 1928–1936.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407 (2000): 770–776.

Herold G. Chronische lymphatische Leukämie in "Innere Medizin", Herold G., Köln, 2009, 75–77.

Hiebert SW, Chellappan SP, Horowitz JM, Nevins JR. The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev.* 6 (1992): 177–185.

Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, Yonehara S, Sawai H, Okazaki T, Yamamoto K, Sasada M. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med.* 187 (1998): 587–600.

Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94 (1997): 3668–3672.

Huang H, Joazeiro CA, Bonfoco E, Kamada S, Leverson JD, Hunter T. The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro mon-oubiquitination of caspases 3 and 7. *J Biol Chem.* 275 (2000): 26661–26664.

Jahrsdörfer B, Blackwell SE, Wooldridge JE, Huang J, Andreski MW, Jacobus LS, Taylor CM, Weiner GJ. B-chronic lymphocytic leukemia cells and other B cells can produce granzyme B and gain cytotoxic potential after interleukin-21-based activation. *Blood.* 108 (2006): 2712–2719.

Jahrsdörfer B, Wooldridge JE, Blackwell SE, Taylor CM, Griffith TS, Link BK, Weiner GJ. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides induce apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia cells. *J Leukoc Biol.* 77 (2005): 378–387.

Jaksic B, Brugiattelli M, Krc I, Losonczy H, Holowiecki J, Planinc-Peraica A, Kusec R, Morabito F, Iacopino P, Lutz D. High dose chlorambucil versus Binet's modified cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone regimen in the treatment of patients with advanced B-cell chronic lymphocytic leukemia. Results of an international multicenter randomized trial. International Society for Chemo-Immunotherapy, Vienna. *Cancer.* 79 (1997): 2107–2114.

Jin H, Carrio R, Yu A, Malek TR. Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis. *J Immunol.* 173 (2004): 657–665.

Jones DT, Ganeshaguru K, Anderson RJ, Jackson TR, Bruckdorfer KR, Low SY, Palmqvist L, Prentice HG, Hoffbrand AV, Mehta AB, Wickremasinghe RG. Albumin activates the AKT signaling pathway and protects B-chronic lymphocytic leukemia cells from chlorambucil- and radiation-induced apoptosis. *Blood.* 101 (2003): 3174–3180.

Juliusson G, Gahrton G. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Pathogenetic and clinical implications. *Cancer Genet Cytogenet.* 45(1990): 143–160.

Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, Parker AC, Castoldi GL, Guneo A, Knuutila S, Elonen E, Gahrton G. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med* 323 (1990): 720–724.

Jung JY, Kim WJ. Involvement of mitochondrial- and Fas-mediated dual mechanism in CoCl₂-induced apoptosis of rat PC12 cells. *Neurosci Lett.* 371 (2004): 85–90.

Kalil N, Cheson BD. Management of chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs Aging.* 16 (2000): 9–27.

Kalvelyté A, Pabrézaité L. Phenomena of spontaneous proliferation, differentiation, and apoptosis in primary culture of leukemic lymphocytes. *Exp Cell Res.* 2 (1994): 344–352.

Kataoka T, Budd RC, Holler N, Thome M, Martinon F, Irmeler M, Burns K, Hahne M, Kennedy N, Kovacsovics M, Tschopp J. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF- κ B and Erk signaling pathways. *Curr Biol.* 10 (2000): 640–648.

Kay NE, Hamblin TJ, Jelinek DF, Dewald GW, Byrd JC, Farag S, Lucas M, Lin T. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* (2002): 193–213.

Kay NE, Shanafelt TD, Strege AK, Lee YK, Bone ND, Raza A. Bone biopsy derived marrow stromal elements rescue chronic lymphocytic leukemia B-cells from spontaneous and drug induced cell death and facilitates an "angiogenic switch". *Leuk Res.* 31 (2007): 899–906.

Kepler TB, Perelson AS. Somatic hypermutation in B cells: an optimal control treatment. *J Theor Biol.* 164 (1993): 37–64.

Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol.* 8 (2006):1348–1358.

King D, Pringle JH, Hutchinson M, Cohen GM. Processing/activation of caspases, -3 and -7 and -8 but not caspase-2, in the induction of apoptosis in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia.* 12 (1998): 1553–1560.

Kishida T, Asada H, Itokawa Y, Cui FD, Shin-Ya M, Gojo S, Yasutomi K, Ueda Y, Yamagishi H, Imanishi J, Mazda O. Interleukin (IL)-21 and IL-15 genetic transfer synergistically augments therapeutic antitumor immunity and promotes regression of metastatic lymphoma. *Mol Ther.* 8 (2003): 552–558.

Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, Wang HG, Zhang X, Bullrich F, Croce CM, Rai K, Hines J, Reed JC. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood.* 91 (1998): 3379–3389.

Knudsen ES, Wang JY. Differential regulation of retinoblastoma protein function by specific Cdk phosphorylation sites. *J Biol Chem.* 271 (1996): 8313–8320.

Ko SC, Johnson VL, Chow SC. Functional characterization of Jurkat T cells rescued from CD95/Fas-induced apoptosis through the inhibition of caspases. *Biochem Biophys Res Commun.* 270 (2000): 1009–1015.

Kompetenznetz Maligne Lymphome, www.lymphome.de, Stand: 1.2.09

Konforte D, Paige CJ. Identification of cellular intermediates and molecular pathways induced by IL-21 in human B cells. *J Immunol.* 177 (2006): 8381–8392.

Korchak HM, Rich AM, Wilkenfeld C, Rutherford LE, Weissmann G. A carbocyanine dye, DiOC6(3), acts as a mitochondrial probe in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 108 (1982): 1495–1501.

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

Lagneaux L, Delforge A, De Bruyn C, Bernier M, Bron D. Adhesion to bone marrow stroma inhibits apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma.* 35 (1999): 445–453.

Lampert IA, Wotherspoon A, Van Noorden S, Hasserjian RP. High expression of CD23 in the proliferation centers of chronic lymphocytic leukemia in lymph nodes and spleen. *Hum Pathol.* 30 (1999): 648–654.

Lankester AC, van Schijndel GM, van der Schoot CE, van Oers MH, van Noesel CJ, van Lier RA. Antigen receptor nonresponsiveness in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 86 (1995): 1090–1097.

Leonard WJ, Spolski R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol.* 5 (2005): 688–698.

Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3 (2002): 651–662.

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 94 (1998): 491–501.

Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 412 (2001): 95–99.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 91 (1997): 479–489.

Li Y, Bleakley M, Yee C. IL-21 influences the frequency, phenotype, and affinity of the antigen-specific CD8 T cell response. *J Immunol.* 175 (2005): 2261–2269.

Liang X, Moseman EA, Farrar MA, Bachanova V, Weisdorf DJ, Blazar BR, Chen W. Toll-like receptor 9 signaling by CpG-B oligodeoxynucleotides induces an apoptotic pathway in human chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 115 (2010): 5041–5052.

Lindsay J, Esposti MD, Gilmore AP. Bcl-2 proteins and mitochondria--specificity in membrane targeting for death. *Biochim Biophys Acta.* 1813 (2011): 532–539

Liston P, Fong WG, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene.* 22 (2003): 8568–8580.

Loeffler M, Kroemer G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res.* 256 (2000): 19–26.

Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Petlickovski A, Pelosi M, Chiusolo P, Sica S, Leone G, Efremov DG. The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia*. 21 (2007): 110–120.

Lovell JF, Billen LP, Bindner S, Shamas-Din A, Fradin C, Leber B, Andrews DW. Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell*. 135 (2008): 1074–1084.

MacFarlane M, Merrison W, Bratton SB, Cohen GM. Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J Biol Chem*. 277 (2002): 36611–36616.

Malavasi F, Deaglio S, Damle R, Cutrona G, Ferrarini M, Chiorazzi N. CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood*. 108 (2011): 3470–3478.

Mathew R, White E. FLIPping the balance between apoptosis and proliferation in thyroid cancer. *Clin Cancer Res*. 12 (2006): 3648–3651.

Mauro MJ, Druker BJ. STI571: a gene product-targeted therapy for leukemia. *Curr Oncol Rep*. 3 (2001): 223–227.

Meinhardt G, Wendtner CM, Hallek M. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signaling pathways regulating cell growth and survival. *J Mol Med (Berl)*. 2 (1999): 282–293.

Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, Murphy EJ, Koduru P, Ferrarini M, Zupo S, Cutrona G, Damle RN, Wasil T, Rai KR, Hellerstein MK, Chiorazzi N. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest*. 115 (2005): 755–764.

Mehta DS, Wurster AL, Whitters MJ, Young DA, Collins M, Grusby MJ. IL-21 induces the apoptosis of resting and activated primary B cells. *J Immunol.* 170 (2003): 4111–4118.

Meyerson HJ, MacLennan G, Husel W, Cocco A, Tse W, Lazarus HM, Kaplan D. D cyclins in CD5+ B-cell lymphoproliferative disorders: cyclin D1 and cyclin D2 identify diagnostic groups and cyclin D1 correlates with ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol.* 125 (2006): 241–250.

Moreno A, Villar ML, Cámara C, Luque R, Cespón C, González-Porqué P, Roy G, López-Jiménez J, Bootello A, Santiago ER. Interleukin-6 dimers produced by endothelial cells inhibit apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* 97 (2001): 242–249.

Moroz A, Eppolito C, Li Q, Tao J, Clegg CH, Shrikant PA. IL-21 enhances and sustains CD8+ T cell responses to achieve durable tumor immunity: comparative evaluation of IL-2, IL-15, and IL-21. *J Immunol.*, 173 (2004): 900–909.

Morrison VA, Rai KR, Peterson BL, Kolitz JE, Elias L, Appelbaum FR, Hines JD, Shepherd L, Martell RE, Larson RA, Schiffer CA. Impact of therapy With chlorambucil, fludarabine, or fludarabine plus chlorambucil on infections in patients with chronic lymphocytic leukemia: Intergroup Study Cancer and Leukemia Group B 9011. *J Clin Oncol.* 19 (2001): 3611–3621.

Mutwiri G, van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk LA Approaches to enhancing immune responses stimulated by CpG oligodeoxynucleotides. *Adv Drug Deliv Rev.* 3 (2009): 226-232.

Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem.* 273 (1998): 2926–2930.

Nagumo H, Abe J, Kano H, Taki S, Yamazaki K, Yamazaki T, Kobayashi N, Koike K, Sugane K, Saito H, Agematsu K. Distinct response in maintenance of human naive and

memory B cells via IL-21 receptor and TCL1/Akt pathways. *Cell Immunol.* 256 (2009): 56–63.

Nakano H, Kishida T, Asada H, Shin-Ya M, Shinomiya T, Imanishi J, Shimada T, Nakai S, Takeuchi M, Hisa Y, Mazda O. Interleukin-21 triggers both cellular and humoral immune responses leading to therapeutic antitumor effects against head and neck squamous cell carcinoma. *J Gene Med.* 8 (2006): 90–99.

Nature, www.nature.com, Stand: 1.4.09

Abbildung 1.3:

http://www.nature.com/cdd/journal/v13/n8/fig_tab/4401992f2.html#figure-title

Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Nurse-like cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1 α . *Blood.* 3 (2005): 1012–1020.

Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 74 (1993): 609–619.

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

Osterborg A, Dyer MJ, Bunjes D, Pangalis GA, Bastion Y, Catovsky D, Mellstedt H. Phase II multicenter study of human CD52 antibody in previously treated chronic lymphocytic leukemia. European Study Group of CAMPATH-1H Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol.* 15 (1997): 1567–1574.

Otake Y, Soundararajan S, Sengupta TK, Kio EA, Smith JC, Pineda-Roman M, Stuart RK, Spicer EK, Fernandes DJ. Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA. *Blood.* 109 (2007): 3069–3075.

Ozaki K, Kikly K, Michalovich D, Young PR, Leonard WJ. Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97 (2000): 11439–11444.

Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, Kim HP, Wang G, Qi CF, Hwu P, Shaffer DJ, Akilesh S, Roopenian DC, Morse HC 3rd, Lipsky PE, Leonard WJ. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol*. 173 (2004): 5361–5371.

Ozaki K, Spolski R, Feng CG, Qi CF, Cheng J, Sher A, Morse HC 3rd, Liu C, Schwartzberg PL, Leonard WJ. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science*. 298 (2002): 1630–1634.

Pardo J, Wallich R, Martin P, Urban C, Rong vaux A, Flavell RA, Müllbacher A, Borner C, Simon MM. Granzyme B-induced cell death exerted by ex vivo CTL: discriminating requirements for cell death and some of its signs. *Cell Death Differ*. 15 (2008): 567–579.

Park Y, Lee SW, Sung YC. Cutting Edge: CpG DNA inhibits dendritic cell apoptosis by up-regulating cellular inhibitor of apoptosis proteins through the phosphatidylinositol-3-OH kinase pathway. *J Immunol*. 168 (2002): 5–8.

Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, Johnston J, Madden K, Xu W, West J, Schrader S, Burkhead S, Heipel M, Brandt C, Kuijper JL, Kramer J, Conklin D, Presnell SR, Berry J, Shiota F, Bort S, Hambly K, Mudri S, Clegg C, Moore M, Grant FJ, Lofton-Day C, Gilbert T, Rayond F, Ching A, Yao L, Smith D, Webster P, Whitmore T, Maurer M, Kaushansky K, Holly RD, Foster D. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature*. 408 (2000): 57–63.

Parrish-Novak J, Foster DC, Holly RD, Clegg CH. Interleukin-21 and the IL-21 receptor: novel effectors of NK and T cell responses. *J Leukoc Biol*. 72 (2002): 856–863.

Paul JT, Henson ES, Mai S, Mushinski FJ, Cheang M, Gibson SB, Johnston JB. Cyclin D expression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 46 (2005): 1275–1285.

Peluso I, Fantini MC, Fina D, Caruso R, Boirivant M, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G. IL-21 counteracts the regulatory T cell-mediated suppression of human CD4+ T lymphocytes. *J Immunol*. 178 (2007): 732–739.

Pepper C, Lin TT, Pratt G, Hewamana S, Brennan P, Hiller L, Hills R, Ward R, Starczynski J, Austen B, Hooper L, Stankovic T, Fegan C. Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood*. 112 (2008): 3807–3817.

Petrella TM, Tozer R, Belanger K, Savage KJ, Wong R, Smylie M, Kamel-Reid S, Tron V, Chen BE, Hunder NN, Hagerman L, Walsh W, Eisenhauer EA. Interleukin-21 has activity in patients with metastatic melanoma: 3 a phase II study. *J Clin Oncol*. 27 (2012): 3396–3401.

Pirnia F, Schneider E, Betticher DC, Borner MM. Mitomycin C induces apoptosis and caspase-8 and -9 processing through a caspase-3 and Fas-independent pathway. *Cell Death Differ*. 9 (2002): 905–914.

Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev*. 8 (1994): 9–22.

Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massagué J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*. 78 (1994): 59–66.

Leukämie in „Psyhyrembel, Klinisches Wörterbuch“, Dörner T, Feldkamp J, Kunze J, Pfitzman R, Radke M, Schönberger B, Springer M, Straube E, Straube W, de Gruyter Verlag, Berlin, 2004, 260. Auflage, 1034–1037.

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

Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature.* 387 (1997): 773–776.

Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, Alexander HD, Carey BS, Farrugia J, Gardiner A, Mould S, Oscier D, Copplestone JA, Prentice AG. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood.* 107 (2006): 3584–3592.

Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, Wierda WG, Kipps TJ, Khaw SL, Carney DA, He SZ, Huang DC, Xiong H, Cui Y, Busman TA, McKeegan EM, Krivoshik AP, Enschede SH, Humerickhouse R. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J Clin Oncol.* 5 (2012): 488–496.

Rückert R, Bulfone-Paus S, Brandt K. Interleukin-21 stimulates antigen uptake, protease activity, survival and induction of CD4+ T cell proliferation by murine macrophages. *Clin Exp Immunol.* 3: 487–495.

SA Bioscience, www.sabioscience.com, Stand 1.4.09

Abbildung 1.2:

http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=Cellular_Apoptosis_Pathway

Abbildung 1.4:

http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=Cyclins_Cell_Cycle_Regulation

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239 (1988): 487–491.

Sattler M, Liang H, Nettlesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*. 275 (1997): 983–986.

Schetelig J, van Biezen A, Brand R, Caballero D, Martino R, Itala M, García-Marco JA, Volin L, Schmitz N, Schwerdtfeger R, Ganser A, Onida F, Mohr B, Stilgenbauer S, Bornhäuser M, de Witte T, Dreger P. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia with 17p deletion: a retrospective European Group for Blood and Marrow Transplantation analysis. *J Clin Oncol*. 26 (2008): 5094–5100.

Schmid C, Isaacson PG. Proliferation centres in B-cell malignant lymphoma, lymphocytic (B-CLL): an immunophenotypic study. *Histopathology*. 24 (1994): 445–451.

Schrantz N, Blanchard DA, Auffredou MT, Sharma S, Leca G, Vazquez A. Role of caspases and possible involvement of retinoblastoma protein during TGFbeta-mediated apoptosis of human B lymphocytes. *Oncogene*. 18 (1999): 3511–3519.

Schwartz R, Gerdes J, Niehus J, Jaeschke L, Stein H. Determination of the growth fraction in cell suspensions by flow cytometry using the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol Methods*. 90 (1986): 65–70.

Scielzo C, Camporeale A, Geuna M, Alessio M, Poggi A, Zocchi MR, Chilosi M, Caligaris-Cappio F, Ghia P. ZAP-70 is expressed by normal and malignant human B-cell subsets of different maturational stage. *Leukemia*. 20 (2006): 689–695.

Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu*. 17 (1982): 229–259.

Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*. 399 (1999): 483–487.

Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R, Shi Y. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell*. 11 (2003): 519–527.

Skak K, Kragh M, Hausmann D, Smyth MJ, Sivakumar PV. Interleukin 21: combination strategies for cancer therapy. *Nat Rev*. 7 (2008): 231–240.

Skov S, Nielsen M, Bregenholt S, Odum N, Claesson MH. Activation of Stat-3 is involved in the induction of apoptosis after ligation of major histocompatibility complex class I molecules on human Jurkat T cells. *Blood*. 91 (1998): 3566–3573.

Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*. 144 (1999): 281–292.

Smith ML, Chen IT, Zhan Q, O'Connor PM, Fornace AJ Jr. Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene*. 10 (1995): 1053–1059.

Søndergaard H, Frederiksen KS, Thygesen P, Galsgaard ED, Skak K, Kristjansen PE, Odum N, Kragh M. Interleukin 21 therapy increases the density of tumor infiltrating CD8+ T cells and inhibits the growth of syngeneic tumors. *Cancer Immunol Immunother*. 56 (2007): 1417–1428.

Sorrer ML, Storer BE, Sandmaier BM, Maris M, Shizuru J, Maziarz R, Agura E, Chauncey TR, Pulsipher MA, McSweeney PA, Wade JC, Bruno B, Langston A, Radich J, Niederwieser D, Blume KG, Storb R, Maloney DG. Five-year follow-up of patients with advanced chronic lymphocytic leukemia treated with allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *J Clin Oncol*. 26 (2008): 4912–4920.

Spaner DE, Hammond C, Mena J, Foden C, Deabreu A. A phase I/II trial of oxidized autologous tumor vaccines during the "watch and wait" phase of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol Immunother.* 54 (2005): 635–646.

Spriano M, Clavio M, Carrara P, Canepa L, Miglino M, Pierri I, Celesti L, Rossi E, Vimercati R, Bruni R, et al. Fludarabine in untreated and previously treated B-CLL patients: a report on efficacy and toxicity. *Haematologica.* 79 (1994): 218–224.

Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Zangrilli J, Robertson N, Armstrong RC, Wang L, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES. The Ced-3/interleukin 1beta converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2alpha are substrates for the apoptotic mediator CPP32. *J Biol Chem.* 271(1996): 27099–27106.

Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling. *Nature.* 387 (1997): 917–921.

Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Döhner H; German CLL Study Group (GCLLSG). Chronic lymphocytic leukemia. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia.* 16 (2002): 993–1007.

Strengell M, Sareneva T, Foster D, Julkunen I, Matikainen S. IL-21 up-regulates the expression of genes associated with innate immunity and Th1 response. *J Immunol.* 169 (2002): 3600–3605.

Sun XM, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf BB, Green DR, Cohen GM. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 274 (1999): 5053–5060.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP,

Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 397 (1999): 441–446.

Sutheesophon K, Nishimura N, Kobayashi Y, Furukawa Y, Kawano M, Itoh K, Kano Y, Ishii H, Furukawa Y. Involvement of the tumor necrosis factor (TNF)/TNF receptor system in leukemic cell apoptosis induced by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228). *J Cell Physiol*. 203 (2005): 387–397.

Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98 (2001): 8662–8667.

Swerdlow SH, Murray LJ, Habeshaw JA, Stansfeld AG. Lymphocytic lymphoma/B-chronic lymphocytic leukaemia--an immunohistopathological study of peripheral B lymphocyte neoplasia. *Br J Cancer*. 5 (1984): 587–599.

Tait JF, Gibson D, Fujikawa K. Phospholipid binding properties of human placental anti-coagulant protein-I, a member of the lipocortin family. *J Biol Chem*. 264 (1989): 7944–7949.

Takauji R, Iho S, Takatsuka H, Yamamoto S, Takahashi T, Kitagawa H, Iwazaki H, Iida R, Yokochi T, Matsuki T. CpG-DNA-induced IFN- α production involves p38 MAPK-dependent STAT1 phosphorylation in human plasmacytoid dendritic cell precursors. *J Leukoc Biol*. 72 (2002): 1011–1019.

Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res*. 58 (1998): 5315–5320.

Tenderenda M. A study on the prognostic value of cyclins D1 and E expression levels in resectable gastric cancer and on some correlations between cyclins expression, histo-clinical parameters and selected protein products of cell-cycle regulatory genes. *J Exp Clin Cancer Res.* 24 (2005): 405–414.

Thompson JA, Curti BD, Redman BG, Bhatia S, Weber JS, Agarwala SS, Sievers EL, Hughes SD, DeVries TA, Hausman DF. Phase I study of recombinant interleukin-21 in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 26 (2008): 2034–2039.

Thornberry NA. The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull.* 53 (1997): 478–490.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76 (1979): 4350–4354.

Tsimberidou AM, Wen S, O'Brien S, McLaughlin P, Wierda WG, Ferrajoli A, Faderl S, Manning J, Lerner S, Mai CV, Rodriguez AM, Hess M, Do KA, Freireich EJ, Kantarjian HM, Medeiros LJ, Keating MJ. Assessment of chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma by absolute lymphocyte counts in 2,126 patients: 20 years of experience at the University of Texas M.D. Anderson Cancer Center. *J Clin Oncol.* 25(2007): 4648–4656.

Vaseva AV, Moll UM. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta.* 5 (2009): 414–420.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 184 (1995): 39–51.

Vogler M, Butterworth M, Majid A, Walewska RJ, Sun XM, Dyer MJ, Cohen GM. Concurrent upregulation of BCL-XL and BCL2A1 induces ~1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 18 (2009): 4403–4413.

Vrhovac R, Delmer A, Tang R, Marie JP, Zittoun R, Ajchenbaum-Cymbalista F. Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood*. 91 (1998): 4694–4700.

Walensky LD. BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death Differ*. 13 (2006): 1339-1350.

Walker NI, Harmon BV, Gobé GC, Kerr JF. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol*. 13 (1988): 18–54.

Wagner EF, Hleb M, Hanna N, Sharma S. A pivotal role of cyclin D3 and cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in the regulation of IL-2-, IL-4-, or IL-10-mediated human B cell proliferation. *J Immunol*. 161 (1998): 1123–1131.

Wang G, Tschoi M, Spolski R, Lou Y, Ozaki K, Feng C, Kim G, Leonard WJ, Hwu P. In vivo antitumor activity of interleukin 21 mediated by natural killer cells. *Cancer Res*. 63 (2003): 9016–9022.

Wang M, Tan LP, Dijkstra MK, van Lom K, Robertus JL, Harms G, Blokzijl T, Kooistra K, van T'Veer MB, Rosati S, Visser L, Jongen-Lavrencic M, Kluin PM, van den Berg A. miRNA analysis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: proliferation centres characterized by low miR-150 and high BIC/miR-155 expression. *J Pathol*. 215 (2008): 13–20.

Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 15 (2001): 2922–2933.

Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 292 (2001): 727–730.

Weiner GJ. CpG oligodeoxynucleotide-based therapy of lymphoid malignancies. *Adv Drug Deliv Rev*. 3 (2009): 263–267.

Willimott S, Baou M, Naresh K, Wagner SD. CD154 induces a switch in pro-survival Bcl-2 family members in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 138 (2007): 721–732.

Wood N, Bourque K, Donaldson DD, Collins M, Vercelli D, Goldman SJ, Kasaian MT. IL-21 effects on human IgE production in response to IL-4 or IL-13. *Cell Immunol*. 231 (2004): 133–145.

Wolowiec D, Ciszak L, Kosmaczewska A, Bocko D, Teodorowska R, Frydecka I, Kuliczowski K. Cell cycle regulatory proteins and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 8 (2001): 1296–1304.

Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93 (1996): 14559–14563.

Xu X, Fu XY, Plate J, Chong AS. IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res*. 58 (1998): 2832–2837.

Yamauchi T, Nowak BJ, Keating MJ, Plunkett W. DNA repair initiated in chronic lymphocytic leukemia lymphocytes by 4-hydroperoxycyclophosphamide is inhibited by fludarabine and clofarabine. *Clin Cancer Res*. 7 (2001): 3580–3589.

Yi AK, Chang M, Peckham DW, Krieg AM, Ashman RF. CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J Immunol.* 160 (1998): 5898–5906.

Yuan H, Liddle FJ, Mahajan S, Frank DA. IL-6-induced survival of colorectal carcinoma cells is inhibited by butyrate through down-regulation of the IL-6 receptor. *Carcinogenesis.* 25 (2004): 2247–2255.

Zhang H, Rosenberg S, Coffey FJ, He YW, Manser T, Hardy RR, Zhang J. A role for cFLIP in B cell proliferation and stress MAPK regulation. *J Immunol.* 182 (2009): 207–215.

Zhukov NV, Tjulandin SA. Targeted therapy in the treatment of solid tumors: practice contradicts theory. *Biochemistry (Mosc).* 73 (2008): 605–618.

zum Büschenfelde CM, Wagner M, Lutzny G, Oelsner M, Feuerstacke Y, Decker T, Bogner C, Peschel C, Ringshausen I. Recruitment of PKC- β 1 to lipid rafts mediates apoptosis-resistance in chronic lymphocytic leukemia expressing ZAP-70. *Leukemia.* 24 (2010): 141–152.

Zwiebel JA, Cheson BD. Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognostic factors. *Semin Oncol.* 25 (1998): 42–59.

7. Dank

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2008 bis April 2009 unter der Leitung von Prof. Dr. med. Christian Peschel, PD Dr. med. Ingo Ringshausen und Dr. med. Christian Bogner durchgeführt.

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. Christian Peschel, der mir die Möglichkeit gab, in seinen gut ausgestatteten Laborräumen ein interessantes Thema zu bearbeiten.

Ich danke Dr. med. Christian Bogner und PD Dr. med. Ingo Ringshausen, die mir mit ihrem Rat und einer kritischen Beurteilung meiner Ergebnisse stets weiterhalfen.

Besonders bedanken möchte ich mich außerdem bei Madlen Oelsner, Michaela Wagner und Gloria Lutzny, die mir bei allen Problemen hilfreich, freundlich und bemüht zur Seite standen.

Einen herzlichen Dank auch an die Doktoranden Viola Biberacher und Benedikt Lampl, deren Tipps und unkomplizierte Art eine bereichernde und angenehme Arbeitsatmosphäre schufen.

Für die freundschaftliche Zusammenarbeit danke ich auch den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Frau PD Dr. med. Götze, Herrn PD Dr. med. Meyer zum Büschenfelde, Herrn Prof. Dr. med. Keller und Herrn PD Dr. phil. Robert Oostendorp, insbesondere Yvonne Feuerstacke, Sabine Stritzke und Katharina Lind.