



Technische Universität München

Fakultät für Medizin

Der Einfluss von Therapie und zytogenetischen Veränderungen auf die
Interaktion mit dem Tumormikroenvironment bei Patienten mit
chronisch lymphatischer Leukämie

Krischan Oliver Braitsch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung eines Doktors der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Ingo Ringshausen
2. Prof. Dr. Florian Bassermann

Die Dissertation wurde am 24.01.2023 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.07.2023
angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	7
1.1	Die chronisch lymphatische Leukämie	7
1.2	Therapie der CLL	8
1.3	Das Tumormikroenvironment (TME)	9
1.4	Das Tumormikroenvironment in der CLL	9
1.5	Klonale Evolution	10
2	Fragestellung	12
2.1	Hypothese	12
3	Material	13
3.1	Allgemeines Material	13
3.2	Puffer & Anätze	16
3.3	qPCR Primer	17
4	Methoden	18
4.1	Zellkultur	18
4.1.1	Gewinnung primärer CLL-Zellen von Patienten	18
4.1.2	Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer und Tryptanblau	19
4.1.3	Einfrier- und Auftauvorgang	19
4.1.4	Kultivieren von Zellen	20
4.1.5	Erstellung eines Co-Kultur Systems	20
4.1.6	Ernten von EL08-1D2	21
4.1.7	Zytostatische Behandlung der CLL-Zellen in Co-Kultur	22
4.2	Durchflusszytometrie	23
4.2.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	23
4.2.2	Annexin V und PI Färbung	25
4.3	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	26
4.3.1	Prinzip der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion	26
4.3.2	RNA-Extraktion	26
4.3.3	Reverse Transkription	27
4.3.4	qPCR	27
4.4	Statistik	28
4.5	Experimenteller Aufbau	28
5	Ergebnisse	29

5.1	Patientencharakteristika.....	29
5.2	Subgruppen	29
5.3	Titration zytostatischer Substanzen	31
5.3.1	Wirkung der Zytostatika auf EL08-1D2-Zellen.....	32
5.4	Apoptose der CLL-Zellen nach Co-Kultur und Therapie	33
5.5	Chemosensitivität der CLL-Zellen im Verlauf der Erkrankung	35
5.5.1	Chemosensitivität im zeitlichen Verlauf der Erkrankung	36
5.5.2	Auswirkung von Vortherapie auf die Chemosensitivität	40
5.5.3	Darstellung einzelner Patienten mit zeitlichem Verlauf	42
5.5.4	Einfluss des Risikoprofils auf die Chemosensitivität	46
5.6	Interaktion von EL08-1D2 und CLL-Zellen nach Co-Kultur	47
5.7	Korrelation von Chemosensitivität und Aktivierung des TME.....	51
5.7.1	Korrelation bei behandelten und therapie-naiven Patienten.....	52
5.7.2	Korrelation bei Hochrisiko-Patienten	54
6	Diskussion	56
7	Zusammenfassung	65
8	Ausblick	66
9	Dank.....	66
10	Referenzen	67

Abkürzungen

α -SMA = Alpha smooth muscle actin / Alpha-actin-2

AKT = Proteinkinase B

APRIL = A proliferation-inducing ligand (CD256)

BAFF = B cell activating factor

BCR = B-Zell Receptors

BCL 2 = B-cell lymphoma 2

BCL-XL = B-cell lymphoma-extra large

BSA = Bovines Serumalbumin

°C = Temperatur in Grad nach Celsius

ca. = Circa

CAF = Tumorassoziierte Fibroblasten

CaCl₂ = Calciumchlorid

CCL3 = C-C motif ligand 3

CCL4 = C-C motif ligand 4

CD = Cluster of differentiation

cDNA = Copy deoxyribonucleic acid

CLL = Chronisch lymphatische Leukämie

CO₂ = Kohlenstoffdioxid

CXCL12 = CXC-Motiv-Chemokin 12

CXCL16 = CXC-Motiv-Chemokin 16

d = Tag

DNA = Desoxyribonukleinsäure

DMSO = Dimethylsulfoxid

Del = Deletion

DTT = Dithiothreitol

EDTA = Ethylendiamintetraacetat

EMDR = Environment-mediated drug resistance

ERK = Extracellular-signal regulated kinases

Ex-vivo = außerhalb des Lebendigen

g = Gramm

G-CSF = Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor

GM-CSF = Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor

h = Stunde
l = Liter
IL-6 = Interleukin 6
FACS = fluorescence-activated cell sorting
FBS = Fetal bovine serum
FCS = Fetal calf serum
FITC = Fluoresceinisothiocyanat
FISH = Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FS = Forward scatter
H₂O = Wasser
HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
IGHV= Immunoglobulin heavy chain variable region
KO = Knockout
M = Molar
MIP-3a = Macrophage Inflammatory Protein-3
MSC = Mesenchymale Stromazellen
NaCl = Natriumchlorid
NCBI = National Center for Biotechnology Information
NGS = Next generation sequencing
NLC = Nurse-like cells
NF- κ B = Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NFKBIZ= Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor,
zeta
Ns = Nicht signifikant
PI = Propidiumiodid
PBS = Phosphat-gepufferte Salzlösung
PKC- β II = Protein Kinase C Beta II
PS = Phosphatidylserin
qPCR = quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion
RNA = Ribonukleinsäure
RPM = Umdrehungen pro Minute
SA = Spontane Apoptose
SDF-1 α = Stromal cell-derived factor 1
siRNA = small interfering RNA

SS = side scatter

Rpl13a = Ribosomal Protein L13a

TME = Tumormikroenvironment

WT = Wildtyp

1 Einführung

1.1 Die chronisch lymphatische Leukämie

Die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) ist eine reife B-Zell Neoplasie und gilt als häufigste Leukämie Form bei Erwachsenen im mitteleuropäischen Raum. Die Erkrankung verläuft klinisch sehr heterogen und das mediane Erkrankungsalter liegt bei ca. 70 Jahren (Dores et al., 2007). Damit ist das Erkrankungsalter der CLL deutlich über dem mittleren Erkrankungsalter von sonstigen Krebserkrankungen in der Gesellschaft (RKI, 2019). Die Prognose der Erkrankung ist in Anbetracht des hohen medianen Erkrankungsalters relativ gut, das 5-Jahres Überleben ist historisch bei über 70%. Da die Erkrankung meistens erst im höheren Alter auftritt und eine durchschnittliche Lebenserwartung von über 10 Jahren hat, liegt das krankheitsbedingte Sterbealter statistisch gesehen auf dem Niveau der durchschnittlichen Lebenserwartung. Häufig wird die CLL aufgrund einer Lymphozytose im Labor zufällig entdeckt, sie kann aber auch durch eine generalisierte Lymphadenopathie, Infektanfälligkeit oder B-Symptomatik auffallen. Die Erkrankung ist über eine Expansion reifer, monoklonaler, CD5+ B-Zellen im Blut definiert. Um die Diagnose stellen zu können, muss durchflusszytometrisch das Vorhandensein von mindestens 5000 klonaler B-Zellen pro Mikroliter im peripheren Blut über 3 Monate nachgewiesen werden. Im Ausstrich sind reife, kleine Lymphozyten unter dem Mikroskop sichtbar. Die malignen Zellen zeigen per Definition eine Koexpression des T-Zell Antigens CD5 sowie der B-Zell Antigene CD19, CD23 und CD20 (Hallek et al., 2018). Die Monoklonalität wird über die Leichtkettenrestriktion Kappa oder Lambda gezeigt. Klinisch wird die Erkrankung nach Binet (Binet et al., 1981) oder Rai (Rai et al., 1975) eingeteilt. Für die beiden Klassifikationen sind lediglich ein Blutbild sowie eine klinische Untersuchung mit Erhebung des Befallsmusters der Lymphknotenstationen notwendig. Es konnten zahlreiche molekular- und zytogenetische Aberrationen identifiziert werden, die teilweise auch Einzug in die klinische Routinediagnostik fanden (CLL-IPI-working-group, 2016; Hallek et al., 2018). So haben Patienten mit einer Deletion des kurzen Armes von Chromosom 17 (del17p) oder einer *TP53*-Mutation eine deutlich schlechtere Prognose. Durch Genomsequenzierung konnten weitere relevante Mutationen in der CLL identifiziert werden (Puente et al., 2011; Wang et al., 2011). Obwohl viele dieser genetischen

Veränderungen derzeit keinen direkten Einfluss auf die Therapiefindung für den einzelnen Patienten haben, verhalfen diese Erkenntnisse die Biologie der CLL besser zu verstehen und die Prognose dieser heterogenen Erkrankung besser einschätzen zu können (Döhner et al., 2000). Eine besondere Rolle in der CLL nimmt das sogenannte Tumormikromilieu oder -mikroenvironment (TME) ein, mit dem CLL-Zellen in stetiger Kommunikation stehen. Durch die Interaktion erlangen die entarteten Zellen Wachstums-, Überlebens- und Proliferationssignale sowie einen Schutz vor zytotoxischer Therapie (Burger & Gribben, 2014; Burger et al., 2000; Pedersen et al., 2002).

1.2 Therapie der CLL

Die CLL wird heutzutage nach der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation als indolente oder niedrig-maligne B-Zell Neoplasie bezeichnet. Die Indikation einer Behandlung hängt von der Aktivität der Erkrankung ab, welche sich in der Binet Klassifikation widerspiegelt. Für Patienten im Stadium Binet C besteht eine Therapieindikation. Es kann auch in früheren Stadien bei Erfüllung bestimmter Kriterien zur Behandlungsindikation kommen. Dazu zählen eine zunehmende Zytopenie, eine symptomatische Splenomegalie, therapierefraktäre Autoimmunphänomene oder ausgeprägte B-Symptomatik (Hallek et al., 2018). Generell gilt die Erkrankung trotz einer Zunahme an zugelassenen Medikamenten, mit Ausnahme einer allogenen Stammzelltransplantation, als unheilbar. Die Therapieoptionen sind vielfältig und es gibt Mono- und Kombinationstherapien. Zum Einsatz kommen monoklonale Antikörper gegen CD20, wie Rituximab (Hallek et al., 2010) oder Obinutuzumab (Goede et al., 2014) und spezifische Inhibitoren, die in den B-Zell-Rezeptor Signalweg eingreifen. Hier ist vorrangig Ibrutinib, ein Tyrosinkinase-Inhibitor, der die Bruton-Tyrosinkinase (BTK) hemmt, zu nennen (Burger et al., 2015). Eine weitere wichtige Therapieform ist der B-cell lymphoma 2 (BCL2)-Inhibitor Venetoclax (Fischer et al., 2019; Seymour et al., 2018). Durch die Entwicklung dieser neuen Medikamente wurde die konventionelle Chemotherapie sowohl in der Erst- als auch in der Zweitlinie immer mehr durch spezifische Inhibitoren verdrängt (Seymour et al., 2018; Shanafelt et al., 2019; Woyach et al., 2018). Die genaue Sequenz der Therapiemodalitäten ist im ständigen Wandel und kann den aktuellen Leitlinien

entnommen werden. Als einzig kurative Option gilt weiterhin allein die allogene Stammzelltransplantation.

1.3 Das Tumormikroenvironment (TME)

Das TME bezeichnet einen Komplex nicht maligner Zellen, welcher Tumorzellen umgibt. Es besteht aus verschiedenen zellulären Komponenten, einer extrazellulären Matrix und Metaboliten. Zu den zellulären Verbänden gehören unter anderem Endothelzellen, Muskelzellen, Nervenzellen, Mastzellen, Adipozyten, Makrophagen, Zellen des peripheren Blutes sowie Fibroblasten (Balkwill et al., 2012; Hanahan & Weinberg, 2011). Letztere spielen eine wichtige Rolle und eine Subpopulation der Fibroblasten werden als tumorassoziierte Fibroblasten (CAFs) bezeichnet. Das TME trägt wesentlich zur Tumorgenese bei und kann sogar Einfluss auf das Therapieansprechen verschiedener Tumorentitäten haben. So konnte gezeigt werden, dass CAFs bei Mamma- und Pankreaskarzinomen die Invasion, Tumorprogression, Proliferation und Angiogenese begünstigen (Erez et al., 2010). Bereits in der viel zitierten Übersichtsarbeit „The Hallmarks of Cancer“ von Hanahan et. al aus dem Jahr 2000 wurde die Rolle des TME diskutiert (Hanahan & Weinberg, 2000) und in die Erweiterung „Hallmarks of Cancer: The Next Generation“ aus dem Jahr 2011 aufgenommen (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.4 Das Tumormikroenvironment in der CLL

Maligne B-Zellen der CLL stehen in einer ständigen Interaktion mit dem umliegenden TME, wodurch CLL-Zellen verschiedene Botenstoffe erhalten und somit einen Vorteil in Proliferation und Überleben erlangen (Burger et al., 2000; Pedersen et al., 2002). Es handelt sich allerdings nicht nur um eine einseitige Kommunikation, in der CLL-Zellen extrinsische Signale und Metaboliten erhalten, sondern um eine bidirektionale Kommunikation zwischen dem TME und den Tumorzellen der CLL (Ding et al., 2009). Primäre CLL-Zellen können nach Abnahme vom Patienten aus dem peripheren Blut gewonnen werden und ex-vivo in Anwesenheit von Stromazellen für lange Zeit Kultur gehalten werden, gehen jedoch in Monokultur nach nur kurzer Zeit in Apoptose (Burger et al., 2000; Ding et al., 2009; Pedersen et al., 2002). Eine stromale Zelllinie ist EL08-

1D2. Die Zelllinie wurde 2002 von Oostendorp et. al beschrieben (Oostendorp, 2002) und die Zellen sind in der Lage hämatopoetische Stammzellen sowie Progenitorzellen, aber auch maligne primäre B-CLL-Zellen ex-vivo in einem Co-Kultursystem zu unterhalten. Der anti-apoptotische Effekt der CLL-Zellen durch Kontakt mit EL08-1D2-Zellen wird zum Teil durch Sekretion inflammatorischer Zytokine durch das TME vermittelt. So werden nach Kontakt mit primären CLL-Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten verschiedene Signalmoleküle, unter anderem Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1 α), Interleukin 6 (IL6), Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF) oder CXC-Motiv-Chemokin 16 (CXCL16) sekretiert, wodurch die CLL-Zellen teilweise vor der spontanen Apoptose (SA) geschützt werden können. Zudem unterziehen sich die Stromazellen nach Kontakt mit CLL-Zellen ähnlichen morphologischen Veränderungen, wie in CAFs beschrieben. EL08-1D2-Zellen exprimieren nach Kontakt mit den malignen CLL-Zellen Alpha-Actin-2 (α -SMA) und bilden Stressfasern, was als inflammatorische Antwort gewertet wird. Über die morphologischen Veränderungen hinaus, induziert der Kontakt mit CLL-Zellen eine Vielzahl pro-inflammatorischer Gene in Stromazellen. Eine Transkriptom-Analyse dieser Stromazellen zeigte eine ähnliche Gensignatur, wie die von CAFs aus Mäusen mit Mamma- bzw. Pankreaskarzinomen. Unter den am stärksten hochregulierten Genen in den EL08-1D2-Zellen waren *IL6* und *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta (NFKBIZ)* (Lutzny et al., 2013). Es findet also eine bidirektionale Interaktion zwischen den CLL-Zellen und den Stromazellen statt, die für das Überleben der Tumorzellen unabdingbar ist.

1.5 Klonale Evolution

Der klinische Verlauf einer CLL kann über mehrere Jahre gehen. Sollte es zu einem Rückfall nach Therapie kommen, ist die Erkrankung in jedem Rezidiv schwieriger zu behandeln. Bei Krankheitsprogression wird nach einem oft initialem „watch & wait“ Konzept eine Immunchemotherapie eingeleitet. Im Falle eines Rezidivs ist die Erkrankung oft aggressiver als im initialen Stadium. Ein Erklärungsansatz hierfür ist die klonale Evolution (Abb. 1). Durch Chemotherapie können Klone mit potenteren Treibermutationen oder einer Resistenz gegenüber der Therapie selektioniert werden, expandieren und somit zu einer aggressiveren Erkrankung im Rezidiv führen (Landau et al., 2013). Dies wird als klonale Evolution bezeichnet. So können Patienten mit initial

unauffälliger Molekular- und Zytogenetik im Verlauf einen Zugewinn von Treibermutationen wie *TP53*- oder *RAS* Mutationen erlangen. Ein Großteil der behandelten CLL-Patienten scheint diesen Vorgang zu durchlaufen (Landau et al., 2015). Es konnte gezeigt werden, dass durch die klonale Evolution auch eine Resistenz gegenüber verschiedene Therapeutika entstehen kann (Ahn et al., 2017) und sich somit auf das Überleben der Patienten auswirkt (Nadeu et al., 2016).

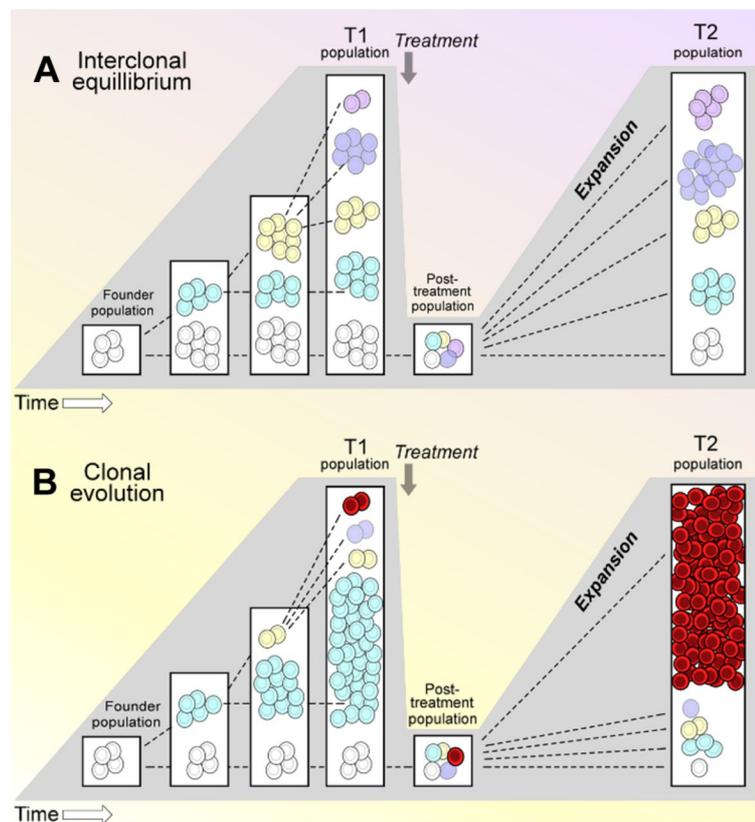


Abb. 1: Klonale Evolution. Schematische Darstellung der klonalen Evolution. A: nach Behandlung tritt keine klonale Expansion auf. B: Selektion eines bestimmten Klons mit konsekutiver Expansion, im Sinne einer klonalen Evolution. T1 = Zeitpunkt 1; T2= Zeitpunkt 2. Adaptiert von Wu, C.J. *Blood* 2012 (Wu, 2012).

2 Fragestellung

Durch die breitere Verfügbarkeit von Sequenzierungstechniken der neueren Generation (NGS) ergab sich ein komplexes Bild der genetischen Vielfalt bei Patienten mit einer CLL. Es konnten verschiedene Aberrationen identifiziert werden, die sich auf das Ansprechen und Gesamtüberleben dieser Patienten auswirken und potenziell als therapeutische Angriffspunkte dienen können. Zudem lieferte der Mechanismus der klonalen Evolution ein Erklärungsansatz für die Zunahme der Aggressivität der CLL im zeitlichen Verlauf, insbesondere bei Patienten, die bereits eine Chemotherapie erhalten haben. Erkenntnisse über die Interaktion von CLL-Zellen mit dem TME konnten weiter zu dem Verständnis anti-apoptotischer Mechanismen und Resistenzentwicklung gegenüber Therapie beitragen. Durch reziproke Interaktion zwischen der Tumorzelle und dem TME können Therapieresistenzen vermittelt oder gegenüber bereits eingesetzten Medikamenten entwickelt werden. Dieser Effekt wird als „environment-mediated drug resistance“ (EMDR) bezeichnet.

Das Projekt sollte (1) zuerst ein Modell etablieren, in dem primäre CLL-Zellen von Patienten kultiviert und ex-vivo mit verschiedenen zytostatischen Medikamenten behandelt werden können. (2) Im zweiten Schritt war die Frage, ob klinische und zytogenetische Faktoren sowie vorangegangene Therapien einen Einfluss auf die Sensibilität der CLL-Zellen gegenüber einer zytotoxischen Behandlung in dem Co-Kultur System haben. Zudem sollte untersucht werden, ob vorherige Therapien oder klinische Risikofaktoren die EMDR beeinflussen. (3) Letztlich sollten Zellen des TME, in diesem Projekt die Zelllinie EL08-1D2, nach Kontakt mit primären Tumorzellen untersucht werden, um zu prüfen, ob die klinischen Charakteristika der Patienten einen Einfluss auf die Aktivierung des TME haben.

2.1 Hypothese

Die Hypothese war, dass eine stärkere EMDR durch die Aktivierung des Stromas – hier als Induktion von *IL6* und *NFKBIZ* – vermittelt wird und zur Abnahme der Chemosensitivität von primären CLL-Zellen im Verlauf führt. Demnach sollten höhere Level an *IL6* und *NFKBIZ* mRNA mit einem schlechteren Ansprechen auf die eingesetzten Therapien in unserem ex-vivo Co-Kultur Modell korrelieren.

3 Material

3.1 Allgemeines Material

AEB-071	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Absaugpumpe	Schütt Labortechnik GmbH (Göttingen, D)
Annexin-V-FITC	Caltag Laboratories/Invitrogen (Carlsbad, USA)
Annexin-V-Puffer	BD Pharmingen (Franklin Lakes, USA)
Aqua dest	Delta Pharma GmbH (Pfullingen, D)
Bendamustin	Medac (Wedel, D)
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Brutschrank	Thermo Fisher (Schwerte, D)
BSA	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Cycler	Bio Rad (München, D)
Cycloheximid	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
DMSO	SERVA (Heidelberg, Deutschland)
DMEM	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Durchflusszytometer	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, D)
Dynabeads® (CD2, CD14, CD19)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
dNTP-Mix	Applied Biosystems (Foster City, USA)
DTT	Applied Biosystems (Foster City, USA)
EDTA	(Sigma-Aldrich; Steinheim, D)
Einfrierbox „Mr. Frosty™“	Thermo Fisher (Schwerte, D)
Enzastaurin	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Eppendorf-Pipetten	(Eppendorf; Hamburg, D)
Eppendorf-Tube 1,5 ml	(Eppendorf; Hamburg, D)

Erythrozytenlysepuffer: EasyLyse (1x)	DakoCytomation (Glostrup, DK)
Ethanol 96%	Merck (Darmstadt, D)
FACS-Röhrchen	Nunc GmbH & Co.KG (Wiesbaden, D)
FCS	PAA (Pasching, A)
Ficoll: Biocoll Separating Solution	Biochrom AG (Berlin, D)
Fludarabin	Teva (Ulm, D)
FlowJo	Tree Star, Inc.
Gefrierschrank -20°C	Liebherr (Ochsenhausen, D)
Gelatine	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Handschuhe	Semperit Technische Produkte GmbH (Wien, A)
Heparin 5000 I.E.	Roche Pharma AG (Grenzach-Wyhlen, D)
HEPES	Thermo Fisher (Schwerte, D)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kühlschrank 4°C	Liebherr (Ochsenhausen, D)
Kryoröhrchen 2 ml	CORNING (New York, USA)
Magnetständer Dynal MPC®-6	Thermo Fisher (Schwerte, D)
Mercaptoethanol, 100 % Deutschland)	Sigma-Aldrich (Steinheim,
MEM α , GlutaMAX	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Microsoft Office for Mac 2016	Microsoft
Milchpulver	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Mikroskop- Axiovert 25	Zeiss (Jena, D)
Minishaker MS1	IKA-Werke GmbH & Co KG. (Staufen, D)
NaCl	Roth (Karlsruhe, D)
NanoDrop®	Thermo Fisher (Schwerte, D)

Neubauer-Zählkammer (Friedrichsdorf, D)	LO – Laboroptik GmbH
PBS 1x	Biochrom AG (Berlin, D)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Pipetboy	Integra Bioscience (Fernwald, D)
Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	BD Falcon (Heidelberg, D)
Pipettenspitzen	SARSTEDT (Nümbrecht- Rommelsdorf, D)
Prism 9	GraphPad Prism
Primer Paare	Eurofins (Ebersberg, D)
Primer-BLAST	NCBI
Propidium-Jodid	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
QIASHREDDER	Qiagen (Hilden, D)
RNA Protect	Qiagen (Hilden, D)
RNeasy Kit	Qiagen (Hilden, D)
RPMI-1640-Medium	GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)
ROX™ Dye	Thermo Fisher (Schwerte, D)
Software SYSTEM II for EPICS Version 3.0	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, D)
Sterilbank HERASafe	Heraeus (Hanau, D)
Stickstofftank: K-Series	Taylor-Wharton Germany GmbH (Husum, D)
SYBR® Green	Thermo Fisher (Schwerte, D)
Temed	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trypsin 10x	GIBCO/Invitrogen (Karlsruhe, D)
Trypan Blau	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Vincristin	Teva (Ulm, D)
VIP SERIES -86°C	SANYO (München, D)

Wasserbad	GFL (Burgwedel, D)
Zentrifuge Megafuge	HERAEUS (Hanau, D)
Zellkulturplatten (6-, 24-Well)	TPP (Trasadingen, CH)

3.2 Puffer & Anätze

PI-Staining Solution:

- 495 ml PBS
- 25 mg PI

Annexin V Puffer:

- 5 ml HEPES
- 28 ml NaCl
- 0,18 g CaCl₂
- 467 ml destilliertes Wasser

FACS-Puffer:

- 500 ml PBS verdünnt mit Aqua dest. (1:10)
- 2,5g 1% BSA

Zellkultur Medium:

- 75 ml FCS
- 25 ml FBS
- 500 ml MEM α , GlutaMA Medium
- 5 ml 1:100 Penicillin/Streptomycin
- 10 μ M β -Mercaptoethanol

Mastermix: Reverse Transkription

- 4 µl 5x Buffer
- 0,5 µl RNase Inhibitor
- 2 µl dNTPs
- 1 µl DTT
- 0,5 µl Reverse Transkriptase

Mastermix: qPCR

- 12,5 µl SYBR® Green
- 0,5 µl ROX™ Dye
- 0,25 µl Forward Primer (100 µM)
- 0,25 µl Reverse Primer (100 µM)
- 6,5 µl H₂O

3.3 qPCR Primer

Rpl13a 5'→3'

Forward: CCCTCCACCCTATGACAAGA

Reverse: TTCTCCTCCAGAGTGGCTGT

IL6 5'→3'

Forward: TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC

Reverse: GTECTCCAGAAGACCAGAGG

NFKBIZ 5'→3'

Forward: TCTCACTTCGTGACATCACC

Reverse: GGTTGGTATTTCTGAGGTGGAG

Rpl13a wurde als Housekeeping Gen verwendet (Renström et al., 2009). Alle Primer wurden mit dem Primer-BLAST Programm des National Center for Biotechnology Information (NCBI) geprüft.

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Gewinnung primärer CLL-Zellen von Patienten

Patienten mit einer CLL, die in unserer Klinik beziehungsweise am Universitätsklinikum Essen behandelt wurden, willigten ein, im Rahmen eines Ambulanzbesuches, während der routinemäßigen Blutabnahme ca. 20 ml peripheres Blut zur Verfügung zu stellen. Das Vollblut wurde mit Heparin versetzt, mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) ca. 1:2 verdünnt und vorsichtig auf 15 ml Ficoll® pipettiert, ohne das Blut und den Ficoll® zu vermischen. Danach wurden mittels Dichtezentrifugation über den Gradienten die mononukleären Zellen isoliert. Das 50 ml Tube wurde ohne Bremse für 20 Minuten (min) bei 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Danach wurde die Interphase mit den Zellen abgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein neues Tube überführt, mit PBS gewaschen und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde mit Erythrozytenlysepuffer bei 4 °C für 10 min inkubiert und danach erneut mit PBS gewaschen. Zur Aufreinigung der B-CLL-Zellen wurden Dynabeads® mit anti-CD2 und anti-CD14 eingesetzt. Die Dynabeads® wurden auf eine Zielkonzentration von ca. 4 Beads pro Zelle gebracht. Diese wurden mit PBS im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Beads wurden in die Zellsuspension gegeben und für 20 min auf einem Rolltisch bei 4°C inkubiert. Danach wurden die an Beads gebundenen Zellen ca. 2 min in einem Magnetständer inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Vorgang noch zweimal wiederholt, ohne neue Beads hinzuzufügen. Die gewonnenen Zellen wurden auf eine Zielkonzentration von ca. 1×10^8 gebracht und mit Einfriermedium versetzt. Das Einfriermedium wurde vorher aus fetalem Kalbsserum (FCS) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen aliquotiert und in Einfrierboxen, welche mit Isopropanol vorgekühlt waren, verstaut. Diese Boxen wurden für einige Tage bei -80 °C gehalten, wonach die Kryoröhrchen dann in den flüssigen Stickstofftank bei -196 °C zur Lagerung überführt wurden. Für die Probensammlung und die Analyse lagen jeweils Ethikvoten vor (TUM: 1894/07; Essen: 10-4380 und 04-2459).

4.1.2 Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer und Tryptanblau

Das komplette Zellpellet wurde in einer definierten, abhängig von der Größe des Zellpellets, Menge an Zellmedium aufgenommen und resuspendiert. Hiervon wurde eine definierte Menge, z.B. 25 µl, abgenommen und 1:1 mit Tryptanblau vermengt. Von dem Gemisch werden 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Nun können die vitalen Zellen, die sich bei intakter Membran nicht anfärben, lichtmikroskopisch ausgezählt werden. Die Gesamtzellmenge N wird durch folgende Formel bestimmt:

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

N: Gesamtzellzahl; n: gezählte Zellen in allen vier Quadranten; 10: Kammerfaktor
D: Verdünnung; V: Gesamtvolumen der Zellsuspension.

4.1.3 Einfrier- und Auftauvorgang

Sowohl die primären CLL-Zellen als auch EL08-1D2-Zellen können nach der Aufreinigung und nach dem Zählen aliquotiert und bis zur Durchführung des Experiments im Stickstofftank verwahrt werden. Die gewünschte Zellmenge wurde im Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryotube überführt und in eine vorgekühlte Einfrierbox mit Isopropanol über einige Tage bei -80° gelagert und schließlich in den Stickstofftank überführt. Sobald die Zellen benötigt wurden, wurde das Kryotube in ein auf 37°C vorgewärmtes Wasserbad kurz geschwenkt, bis sich aus dem gefrorenen Pellet kleine Eisschollen bildeten. Das Pellet wurde rasch in ca. 10 ml, auf 37 °C erwärmtes Zellmedium überführt. Zur Elimination von DMSO aus dem Einfriermedium, wurde das Medium einmal abzentrifugiert und das Pellet erneut resuspendiert. Die Zellen wurden über einen Ficoll®-Gradienten geschichtet und 20 min mit 2000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Die Zellen wurden aus der Interphase abgenommen und in neues Medium überführt.

4.1.4 Kultivieren von Zellen

Sowohl EL08-1D2 als auch CLL-Zellen können bei 37 °C und 5% Kohlenstoffdioxid (CO₂) im Brutschrank kultiviert werden. Das Zellkulturmedium wurde regelmäßig frisch filtriert zubereitet. Für jedes Experiment wurde nur Medium aus einem Ansatz verwendet. Vor der Kultivierung von EL08-1D2-Zellen wurden Petrischalen mit 0,1% Gelatine für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die mit Gelatine bedeckten Petrischalen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend wurden die EL08-1D2-Zellen mit Medium hinein pipettiert und inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt, wobei die EL08-1D2 bereits adhärent waren. Die EL08-1D2-Zellen wurden ca. alle drei Tage gesplittet. Hierbei wurde beachtet, dass für die Experimente Zellen derselben Passage verwendet wurden. Das Medium wurde vorsichtig abgesaugt, ohne den Zellrasen mechanisch zu verletzen. Die Zellen wurden einmal mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1,5 ml 1% Trypsin für 2 min im Brutschrank inkubiert. Sobald sich der Zellrasen gelöst hatte, wurden die EL08-1D2-Zellen in Medium aufgenommen und 5 min mit 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml Zellmedium resuspendiert. Bei Bedarf konnten so EL08-1D2-Zellen expandiert werden.

4.1.5 Erstellung eines Co-Kultur Systems

Um primäre CLL-Zellen ex-vivo zu kultivieren, kann ein Co-Kultur System mit verschiedenen Stromalen Zellen etabliert werden. Dadurch können CLL-Zellen und ihre Interaktion mit den Stromazellen untersucht werden. In unseren Experimenten wurden adhärente EL08-1D2-Zellen verwendet. Die EL08-1D2-Zellen wurden in einer Petrischale in Kultur gehalten, anschließend wurden CLL-Zellen in der Konzentration 1×10^6 Zellen pro ml Medium hinzugegeben. Hierdurch konnten CLL-Zellen für mehrere Tage kultiviert werden. Parallel wurden 1×10^6 CLL-Zellen pro ml Medium in eine Petrischale ohne EL08-1D2-Zellen inkubiert. Diese gingen fast vollständig in SA (Abb. 2). Die CLL-Zellen wurden nach 96 h in Co-Kultur mittels Durchflusszytometrie nach Färbung mit Annexin V und Propidiumiodid (PI) hinsichtlich ihrer Viabilität analysiert. Die EL08-1D2-Zellen wurden nach 96 h gesammelt, mittels CD19-Dynabeads von den restlichen CLL-Zellen getrennt, lysiert und bei -80°C in RNAProtect Medium asserviert. In Abb. 2 wurden CLL-Zellen von einem Patienten

gewonnen, aufgeteilt und in verschiedene Kryotubes überführt. In zwei verschiedenen Experimenten wurden jeweils drei Kryotubes desselben Patienten aufgetaut und in Co-Kultur mit EL08-1D2-Zellen oder in Zellmedium alleine für 96 h inkubiert. Ohne Co-Kultur (Medium alleine) waren fast alle CLL-Zellen in SA, während in Co-Kultur mit EL08-1D2 nur knapp 20% apoptotisch waren. Zwischen den beiden Experimenten zeigte sich kein Unterschied. Daher stellt sich die entwickelte Methodik als robustes Co-Kultur System dar, welches reproduzierbare Ergebnisse liefern kann.

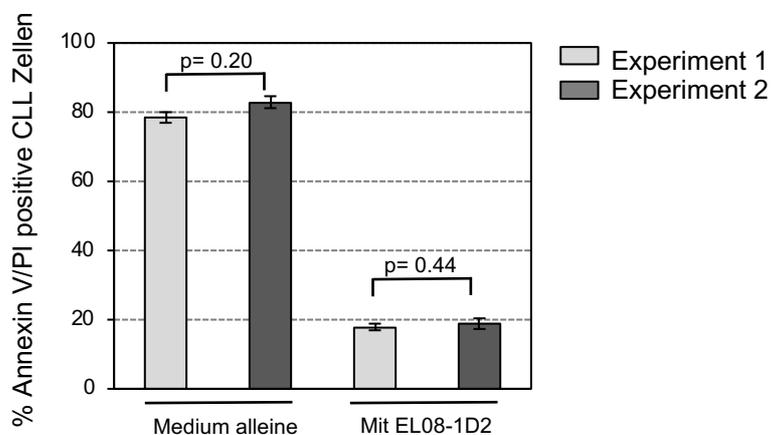


Abb. 2: Protektiver Effekt von EL08-1D2 in Co-Kultur. Triplets einer Probe eines CLL-Patienten wurden in zwei verschiedenen Experimenten für jeweils 96 h in Medium alleine oder mit EL08-1D2-Zellen kultiviert. Nach Färbung mit Annexin V und PI wurden die CLL-Zellen analysiert.

4.1.6 Ernten von EL08-1D2

In einer 10 cm Petrischale wurden EL08-1D2-Zellen in Co-Kultur mit CLL-Zellen für 96 h inkubiert. Der Überstand mit den CLL-Zellen wurde abgenommen. Die adhärenenten EL08-1D2-Zellen wurden mit Trypsin lysiert, mit Medium gewaschen und in ein 15 ml Tube überführt. Zur Entfernung restlicher CLL-Zellen wurden in jedes Tube 15 µl Dynabeads® CD19 pan B gegeben. Vorher wurden die Dynabeads® zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Die EL08-1D2/Dynabeads®-Suspension wurde für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Rolltisch inkubiert. Danach wurden die Dynabeads® mit

einem Magneten (Magnetständer Dynal MPC®) entfernt. Das aufgereinigte EL08-1D2-Pellet wurde mit PBS gewaschen, abzentrifugiert und zur Stabilisierung der Ribonukleinsäure (RNA) in 300µl RNAprotect resuspendiert. Diese Suspension wurde bei -80° gelagert.

4.1.7 Zytostatische Behandlung der CLL-Zellen in Co-Kultur

Der protektive anti-apoptotische Effekt von CLL-Zellen in Co-Kultur mit Stromazellen kann durch Behandlung mit verschiedenen Zytostatika überwunden werden. Hierzu wurden in 24-Well Platten je 1 Million CLL-Zellen pro ml Medium auf EL08-1D2-Zellen kultiviert. Für die letzten 48 h wurde eine zytotoxische Therapie hinzugegeben. Folgende Therapeutika wurden in unseren Experimenten verwendet:

Fludarabin:

Fludarabin ist ein Purin-Analogon, welches zytotoxische Effekte besitzt. Durch das Einbauen in die Desoxyribonukleinsäure (DNA) als Purin-Analogon und der daraus folgenden Apoptose, entfaltet Fludarabin seine zytotoxische Wirkung. Zudem hemmt Fludarabin die DNA-Synthese. Die häufigsten Nebenwirkungen im Menschen sind Myelotoxizität und Immunsuppression. Fludarabin wird als Kombinationstherapie in der Behandlung der CLL sowie in diversen Konditionierungen vor allogener Stammzelltransplantation eingesetzt. Seltener kommt es in der Zweitlinie in der Behandlung von akuten Leukämien zum Einsatz.

Bendamustin:

Bendamustin ist ein Alkylanz und zählt zu den N-lost-Derivaten. Durch das alkylieren von DNA bzw. RNA können Quervernetzungen oder Mutationen entstehen, wodurch Bendamustin seine zytotoxische Wirkung entfaltet. Bendamustin wird häufig in Kombination mit einem CD20-Antikörper, z.B. Rituximab oder Obinutuzumab, zur Therapie von B-Zell-Neoplasien eingesetzt. Die häufigsten Nebenwirkungen sind eine Myelosuppression sowie das Auftreten eines Hautexanthems.

Vincristin:

Vincristin ist ein Vincaalkaloid, welches an Mikrotubuli bindet und somit als Mitosehemmer wirkt. Vincristin wird in einer Vielzahl von Kombinationen bei malignen

B-Zell-Erkrankungen eingesetzt. Eine klassische Nebenwirkung ist die Neurotoxizität, welche sich bei Patienten oft als Polyneuropathie äußert.

Enzastaurin und Sotrastaurin (AEB-071):

Enzastaurin und Sotrastaurin sind Serin/Threonin Kinase-Inhibitoren, welche relativ selektiv Protein Kinase C Beta (PKC- β) inhibieren, jedoch auch in den Phosphoinositide-3 Kinase/AKT Signalweg eingreifen und somit antitumorale Effekte entfalten (Faul et al., 2003). Beide sind als orale Applikation verfügbar. Beide Medikamente zeigten in-vivo Aktivität in einem präklinischen Mausmodell (Park et al., 2020). Sotrastaurin wurde uns unter dem Kürzel AEB zur Verfügung gestellt und wird fortan als AEB bezeichnet. Eine Phase III Studie, in der Enzastaurin als 3-jährige Erhaltungstherapie in Patienten mit einem diffus großzelligem B-Zell-Lymphom gegeben wurde, konnte keinen Vorteil hinsichtlich des erkrankungsfreien Überlebens zeigen (Crump et al., 2016).

4.2 Durchflusszytometrie

4.2.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse von Zellen in einer Zellsuspension hinsichtlich Struktur, Größe, Granularität oder auch mit Hilfe verschiedener Fluorochromen. Zellen können nach Markierung mit verschiedenen Fluorochromen sortiert werden, was geläufig teilweise als FACS (fluorescence-activated cell sorting) bezeichnet wird. Die Technologie kann verwendet werden, um Proteine an der Zelloberfläche oder intrazelluläre Proteine nach Markierung mit einem Fluorochrom zu detektieren. Dies wird als Durchflusszytometrie bezeichnet. Die Zellen werden im Durchflusszytometer so stark beschleunigt, dass Zellen der Zellsuspension einzeln einen Laser passieren. Das Licht des Laserstrahles wird an der Zelle je nach Größe, Oberfläche und Granularität dieser gebrochen, die Streustrahlung wird detektiert und hieraus Eigenschaften der Zelle abgelesen. Dies wird dann in den Parametern forward scatter (FS) und side scatter (SS) dargestellt. Der FS ist hierbei das Maß für die Größe der Zelle und der SS bildet die Lichtstreuung in einem 90° Winkel ab und gibt somit

Aufschluss über die Granularität der Zelle. Um gezielte Proteine an der Zelloberfläche oder intrazellulär zu analysieren, kommen bestimmte, an Antikörper gebundene Farbstoffe, sogenannte Fluorochrome zum Einsatz. Diese emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge, nachdem sie mit einem Argon-Laser bei 488 nm angeregt werden. Beispielsweise sendet das Fluorochrom FITCS grünes Licht mit einer Wellenlänge von 525 nm aus, während PI-markierte Proteine im orange-roten Bereich von 650 nm emittieren. Die Kombination mehrerer Farbstoffe, die Licht einer unterschiedlichen Wellenlänge emittieren, ist möglich und erlaubt eine genauere Charakterisierung von Subpopulationen. Durch Messung der Intensität des Signals kann auf die Menge des markierten Proteins geschlossen werden. Die Durchflusszytometrie ist weiterhin Goldstandard in der Leukämiediagnostik.

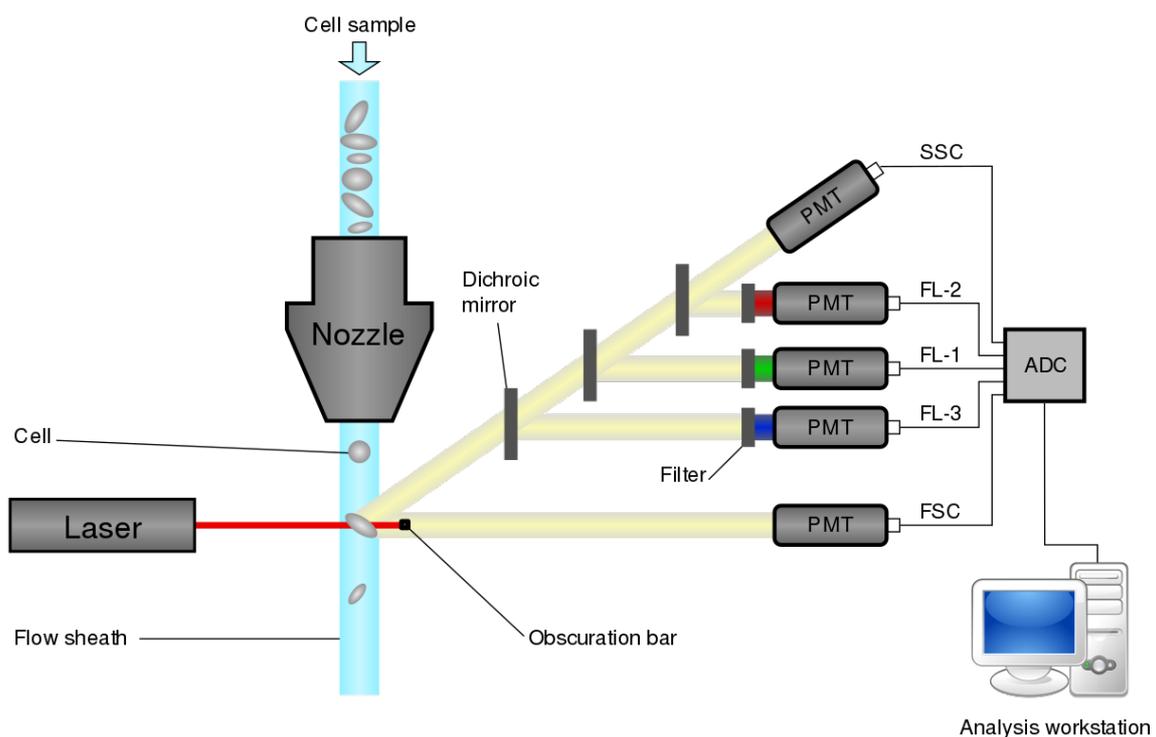


Abb. 3: Durchflusszytometrie. Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers. PMT=photomultiplier tubes; FSC=forward scatter; SSC=side scatter; FL-1 bis FL-3: Kanäle. Adaptiert von O'Neill K et al., *PLoS Comput Biol.* 2013 (O'Neill et al., 2013)

4.2.2 Annexin V und PI Färbung

Um den Effekt verschiedener zytotoxischer Substanzen auf CLL-Zellen in Co-Kultur zu messen, erfolgte nach 48 h Behandlung eine Färbung mit Annexin V (Demchenko, 2013; van Engeland et al., 1998) und PI (Suzuki et al., 1997). Annexin V ist ein Protein, das Phospholipide bindet und eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin (PS) hat. PS ist auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran lokalisiert. Während der Apoptose kommt es zu einer Translokation von PS an die Außenseite der Plasmamembran (Clodi et al., 2000). PI ist ein Farbstoff, der die Viabilität von Zellen in der Durchflusszytometrie beurteilen lässt. PI bindet an DNA, kann aber von Zellen mit intakter Plasmamembran nicht aufgenommen werden. CLL-Zellen wurden nach Co-Kultur mit EL08-1D2-Zellen abgenommen, in ein FACS Röhrchen gegeben und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet mit einem Mix aus 500 µl Annexin V Puffer, 5 µl PI und 5µl Annexin V-FITC resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis erfolgte die Messung am Durchflusszytometer (Abb. 4).

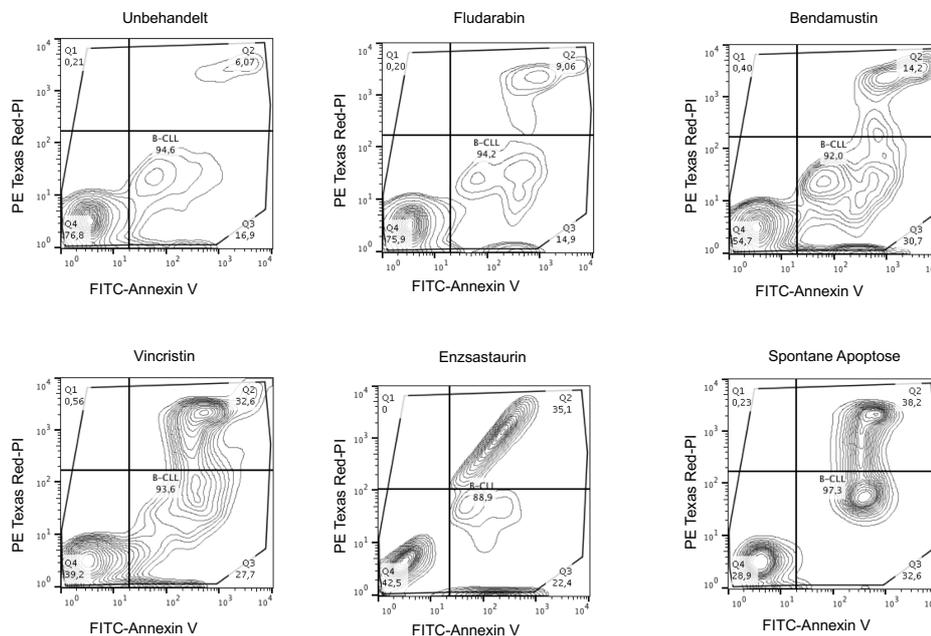


Abb. 4: Durchflusszytometrie von CLL-Proben nach Co-Kultur. CLL-Zellen eines Patienten (HH-64) werden nach Co-Kultur und Behandlung mit verschiedenen Zytostatika mit Annexin V/PI gefärbt. Auf der y-Achse wird PI, auf der X-Achse FITC-Annexin V aufgezeigt.

Es zeigen sich durch diese Färbung vitale Zellen als Annexin V/PI-negativ (Abb. 4, Q4), Zellen in früher Apoptose Annexin V-positiv/PI-negativ (Q3) und Zellen in der späten Apoptose als doppelt-positiv (Q2). Für die Auswertungen wurden sowohl Annexin V-positiv/PI-negativ als auch doppelt-positiv Zellen als apoptotisch gewertet.

4.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

4.3.1 Prinzip der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR und dient zur Quantifizierung der amplifizierten DNA. Durch Detektion von Fluoreszenz werden in Echtzeit innerhalb eines PCR-Zyklus, in dem DNA-Amplifikation und Detektion geschehen, die Menge der amplifizierten DNA gemessen (Wong & Medrano, 2005). Ein qPCR-Lauf besteht aus mehreren Zyklen (ca. 40 Zyklen), wobei die Intensität des Fluoreszenzsignals mit jedem Zyklus zunimmt. Für die Fluoreszenz wird ein Farbstoff verwendet (z.B. SYBR® Green), welcher DNA bindet (Zipper et al., 2004). Der Farbstoff hat eine geringe Hintergrundfluoreszenz, welche nach Bindung an doppelsträngige DNA zunimmt. Somit korreliert die Zunahme des Fluoreszenzsignals proportional mit der Zunahme der untersuchten DNA-Sequenz.

4.3.2 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem Qiagen RNeasy® Kit. Das in dem Puffer RNAlprotect bei -80 °C aufbewahrte Zell-Lysat wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Lyse der Zellen erfolgt auf Eis mit 350 µl Lyse-Puffer (RLT-Puffer), in dem das Pellet suspendiert wird. Das Lysat wurde auf eine QIAshredder® Säule zum Homogenisieren gegeben und für 2 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Eluat wurde mit 350 µl 70% Ethanol bei Raumtemperatur vermischt. Das Gesamtvolumen (700 µl) wurde auf eine neue Säule gegeben und für 15 s mit 8000 g

zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und 700 µl Waschpuffer (RW1) wurden auf die Säule gegeben. Die Säule wurde erneut für 15 s bei 8000 g zentrifugiert, das Eluat verworfen und 500 µl Waschpuffer (RPE) auf die Säule gegeben. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Die Säule wurde in ein neues Auffangtube gestellt und die Membran für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und getrocknet. Zum Schluss wurden 30-50 µl Ribonukleasen-freies Wasser auf die Membran pipettiert und die Säule in ein neues Tube gestellt. Nach Zentrifugation für 1 min bei 8000 g enthielt das Eluat die extrahierte RNA.

4.3.3 Reverse Transkription

Mittels einer reversen Transkriptase kann die Transkription von RNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgen. Hierzu wird erst der RNA Gehalt nach erfolgter RNA Extraktion mittels NanoDrop® photospektrometrisch gemessen. Eine definierte Menge an RNA wurde mit Wasser (H₂O) verdünnt um auf ein Finalvolumen von 11 µl zu kommen. Zu der verdünnten RNA wurden 1 µl Oligo(dT-) gegeben und im Cycler bei 65 °C für 10 min denaturiert. Anschließend wurden 4 µl Puffer, 0,5 µl RNase Inhibitor, 2 µl Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP) und 1 µl Dithiothreitol (DTT) sowie 0,5 µl Reverse Transkriptase addiert, so dass ein Gesamtvolumen von 20 µl entstand. Der Mix wurde für 30 min bei 50 °C und für 5 min bei 85 °C in dem Cycler inkubiert. Danach konnte die cDNA stabil bei -20 C° gelagert werden.

4.3.4 qPCR

Die cDNA wurde im Verhältnis 1:5 mit H₂O verdünnt. In eine 96-Well Platte kamen pro Well 5 µl der verdünnten cDNA. Es wurden für jede Probe Triplets pipettiert und am Ende ein Mittelwert genommen. Zudem wurde für jedes Experiment eine Negativkontrolle, ohne cDNA aber mit Primern, zusätzlich analysiert. Für jeden gewünschten Primer wurde ein Mastermix aus 12,5 µl SYBR® Green, 0,5 µl ROX®, 6,5 µl H₂O sowie je 0,25 µl forward und reverse Primer erstellt. Von dem Mastermix wurden 20 µl in jedes Well gegeben. Das finale Volumen in jedem Well waren 25 µl. Die Platte wurde mittels Folie versiegelt, für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Mittels der StepOne Software wurde ein Template vorbereitet, in dem die Gene sowie das

Housekeeping Gen als endogene Kontrolle eingegeben werden. Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode berechnet (Wong & Medrano, 2005).

4.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der GraphPad Prism Software (Version 9.2.0). Zum Vergleich von Messungen zwischen zwei verschiedenen Zeitpunkten wurde ein t-Test durchgeführt. Bei mehreren Zeitpunkten wurde ein ANOVA Test durchgeführt. Die Korrelation wurde mittels linearer Regression analysiert. Die klinischen Daten wurden uns aus dem Uniklinikum Essen zur Verfügung gestellt.

4.5 Experimenteller Aufbau

Jedes Set an Proben eines Patienten wurde in einem Experiment und somit mit möglichst identischen Bedingungen bearbeitet. Alle verfügbaren Zellen wurden nach dem Auftauen gezählt und in Co-Kultur mit EL08-1D2-Zellen gegeben. Dabei wurden auf eine 24-Well Platte (7 Wells pro Probe) je 1 Million CLL-Zellen gegeben und 10 Millionen Zellen auf eine 10 cm Platte. Die Zellen wurden für insgesamt 96 h in Co-Kultur mit den EL08-1D2-Zellen gehalten und die CLL-Zellen in den 24-Well Platten für die letzten 48 h mit den jeweiligen Medikamenten (Abb. 4) behandelt. Zur Bestimmung des zytotoxischen Effektes der Medikamente erfolgte 48 h nach der Behandlung die durchflusszytometrische Analyse der Zellen in Apoptose durch Annexin V/PI Färbung. Die EL08-1D2-Zellen aus der 10 cm Platte wurden lysiert und zur Dekontamination von B-CLL-Zellen mit CD19+ Dynabeads aufgereinigt. Anschließend erfolgte die RNA-Extraktion und Analyse mittels qPCR, um die Veränderung von *IL6* und *NFKBIZ* in den EL08-1D2-Zellen mit und ohne Kontakt zur jeweiligen CLL-Probe zu messen und somit die CLL/Stroma-Interaktion zu modellieren.

5 Ergebnisse

5.1 Patientencharakteristika

Es standen Proben von $n = 24$ Patienten mit einer CLL zur Verfügung, von denen an mindestens zwei Zeitpunkten viable CLL-Zellen asserviert wurden. Insgesamt waren $n = 69$ Proben gesammelt worden, wovon $n = 4$ Proben nach dem Auftauen nicht mehr vital waren, so dass $n = 65$ für die Experimente zur Verfügung standen. Von den $n = 24$ Patienten wurden in dem Beobachtungszeitraum $n = 19$ (79%) therapiert und $n = 5$ (21%) wurden abwartend beobachtet. Die Abstände zwischen den Entnahmezeitpunkten der jeweiligen Proben sind in Abschnitt 5.5 in Tabelle 2 aufgeführt. Die meisten Patienten [$n=19$ (79%)] befanden sich bei Erstdiagnose im Stadium A nach Binet. Das mediane Alter bei Erstdiagnose lag bei 56,7 (41-73) Jahren und die Verteilung der Geschlechter war ausgeglichen. Bei den Patienten lag bei Erstdiagnose eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und *TP53* Mutationsanalyse vor. Es konnte in $n = 14$ (58%) eine *del13q14* detektiert werden; in $n = 5$ (21%) konnte eine *del17p* bzw. eine *TP53*-Mutation, in $n = 4$ (17%) eine Trisomie 12; in $n = 5$ (21%) eine *del11q22*, und in $n = 1$ (4%) eine Trisomie 19. Bei $n = 1$ (4%) wurden keine Alterationen detektiert und bei $n = 6$ (25%) lag mehr als eine Aberration vor. Bei $n = 8$ Patienten (33%) lag bei Erstdiagnose ein unmutierter „immunoglobulin heavy chain variable region“ (IGHV)-Status und bei $n = 16$ (67%) ein mutierter IGHV-Status vor. Zusammengefasst finden sich die Patientencharakteristika in Tabelle 1.

5.2 Subgruppen

Die prognostische Relevanz zytogenetischer Risikofaktoren sind für die CLL seit Jahren bekannt (Döhner et al., 2000). Um zu unterscheiden, ob sich klinisch etablierte Faktoren auf die CLL-Stroma Interaktion in unserem Modell auswirken, wurden die zur Verfügung stehenden Proben wie folgt unterteilt: unbehandelt vs. behandelt und Hochrisiko vs. Intermediär- und Niedrigrisiko. Hierbei wurden Patienten mit einer *TP53*-Mutation bzw. *del17p* oder einer *del11q* der Hochrisiko-Gruppe, Patienten mit einer *del13q* der Niedrigrisiko-Gruppe und die übrigen mit z.B. Trisomie 12, Trisomie 19 oder keinen Aberrationen der intermediären Risikogruppe zugeordnet (Houldsworth et al., 2014).

Patientencharakteristika

Anzahl der Patienten

n=24

Anzahl der Proben

n=69

Alter, in Jahren

56,7 (41-73)

Geschlecht

männlich

n=13 (60%)

weiblich

n=11 (40%)

Binet Stadium bei ED

A

n=19 (79%)

B

n=3 (13%)

C

n=2 (8%)

Zytogenetik

del13q14

n=14 (58%)

TP53 Mutation / del17p

n=5 (21%)

del11q22

n=5 (21%)

Trisomie 12

n=4 (17%)

≥ 1 Veränderung

n=6 (25%)

IGHV-Status

mutiert

n=16 (57%)

unmutiert

n=8 (33%)

Behandlung im Verlauf

(Immun-)chemotherapie

19 (79%)

watch & wait

5 (21%)

Tab. 1: Patientencharakteristika. n=24 Patienten mit n=69 Proben, die für die Analyse zur Verfügung standen. ED=Erstdiagnose; del=Deletion. IGHV=Immunoglobulin heavy chain variable region.

Obwohl es sich in dieser Arbeit um eine relativ kleine Kohorte von n = 24 Patienten handelt, spiegelt die Häufigkeit der relevanten zytogenetischen Aberrationen die aus der Literatur bekannten Inzidenzen gut wider.

5.3 Titration zytostatischer Substanzen

Für die Co-Kultur-Experimente wurden fünf zytostatische Substanzen gewählt, mit denen CLL-Zellen in Co-Kultur behandelt werden können. Die Dosis wurde für alle nachfolgenden Experimente definiert, um die Effekte der Behandlung mit dem jeweiligen Medikament vergleichen und eine mögliche Resistenzentwicklung beurteilen zu können. Fludarabin, Vincristin, Bendamustin wurden als klassische Zytostatika in der Therapie von malignen B-Zell-Erkrankungen ausgewählt. Zudem wurden die Zellen mit den PKC- β -Inhibitoren Enzastaurin und AEB (=Sotrastaurin) behandelt. Zur Dosisfindung wurden jeweils CLL-Zellen von n = 5 Patienten für 96 h in Co-Kultur mit EL08-1D2-Zellen gegeben und für die letzten 48 h mit den jeweiligen Substanzen in unterschiedlicher Dosierung behandelt (Abb. 4).

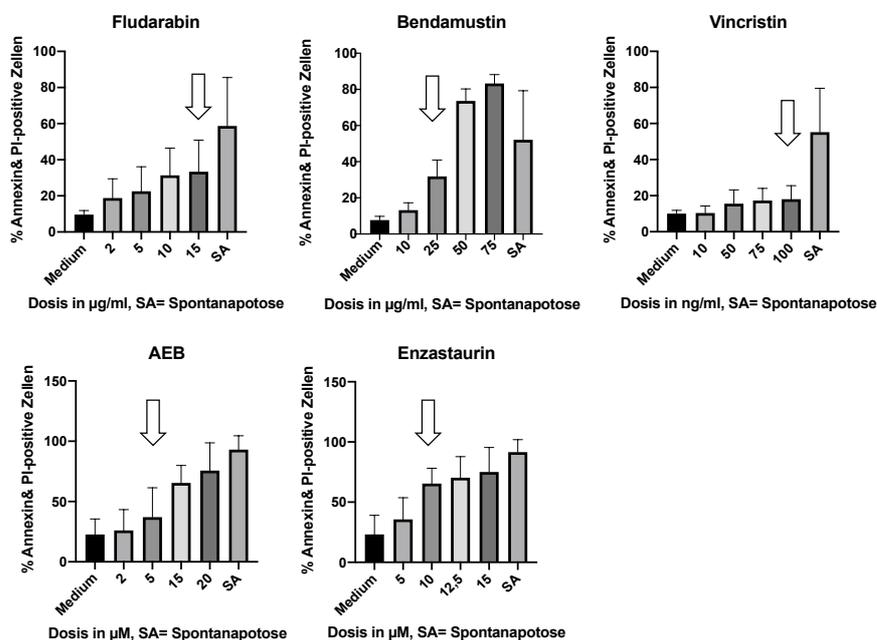


Abb. 4: Dosisfindung durch Titration. CLL-Zellen von n=5 Patienten wurden in Co-Kultur mit EL08-1D2-Zellen für 48 h mit Fludarabin, Bendamustin, Vincristin, AEB oder Enzastaurin behandelt. Eine Probe ohne Behandlung (Medium) sowie eine Probe ohne Stromazellen (SA) sowie die aufsteigenden Dosierungen für die jeweilige Substanz sind abgebildet. Die gewählte Zieldosis ist mit dem Pfeil markiert: Fludarabin 15 $\mu\text{g/ml}$; Bendamustin 25 $\mu\text{g/ml}$; Vincristin 100 ng/ml ; Enzastaurin 10 $\mu\text{M/ml}$; AEB 10 $\mu\text{M/ml}$.

Die mit dem Pfeil markierten Dosierungen wurden für die nachfolgenden Experimente gewählt, für Fludarabin 15µg/ml; Bendamustin 25µg/ml, Vincristin 100ng/ml und Enzastaurin 10µM/ml. Für AEB wurde die zwischen 5 µM und 15 µM liegende Dosis von 10 µM gewählt. Die Dosierungen, bei der etwa die Hälfte der Zellen apoptotisch waren, wurden für alle nachfolgenden Experimente gewählt, um eine Vergleichbarkeit im Falle einer Resistenzentwicklung zu gewährleisten.

5.3.1 Wirkung der Zytostatika auf EL08-1D2-Zellen

Die Behandlung der CLL-Zellen in Co-Kultur mit den ausgewählten Zytostatika sollte ein Modell darstellen, um einen Vergleich des Ansprechens auf die angegebenen Substanzen im Krankheitsverlauf der n = 24 Patienten zu untersuchen. Um einen relevanten zytotoxischen Effekt der gewählten Dosis für die jeweiligen Chemotherapeutika auf die EL08-1D2-Zellen auszuschließen, wurden EL08-1D2 in Monokultur mit derselben Dosis für 48 h behandelt. Nach 48 h erfolgte mittels Durchflusszytometrie die Messung der PI-positiven, apoptotischen EL08-1D2-Zellen. Cycloheximid mit 100 µg/ml wurde als Positivkontrolle gewählt. Die Behandlung mit den entsprechenden Substanzen zeigte keinen relevanten Effekt auf die EL08-1D2-Zellen, sodass die Effekte der Zytostatika für die weiteren Experimente auf die CLL-Zellen bezogen werden konnten (Abb. 5).

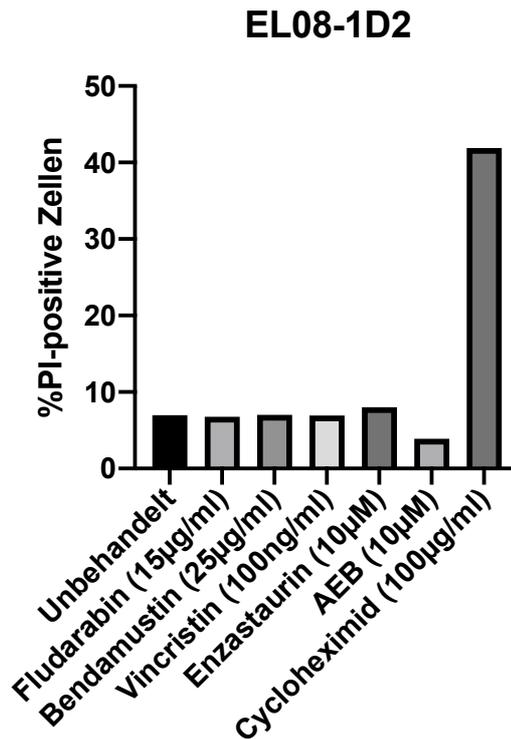


Abb. 5: Kein zytotoxischer Effekt auf EL08-1D2-Zellen. EL08-1D2-Zellen wurden nach 48 h Behandlung mit den angegebenen Substanzen mit PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Cycloheximid diente als Positivkontrolle.

5.4 Apoptose der CLL-Zellen nach Co-Kultur und Therapie

Durch ein Co-Kultur-System mit Stromazellen, hier die Zelllinie EL08-1D2, können Zellen von CLL-Patienten für lange Zeit ex-vivo kultiviert werden. Trotzdem gelang es in unserem Modell den protektiven, anti-apoptotischen Effekt der CLL-Zellen durch Behandlung mit zytostatischen Substanzen zu überwinden. Um Unterschiede in der EMDR beurteilen zu können, wurde die Dosis der zytostatischen Substanzen titriert, um etwa die Hälfte der Zellen in Apoptose zu bringen. Primäre CLL-Zellen von n = 24 Patienten mit n = 65 Proben wurden jeweils für insgesamt 96 h mit EL08-1D2-Zellen kultiviert. Nach 48 h wurden die Zellen mit Fludarabin, Bendamustin, Vincristin oder den spezifischen PKC- β Inhibitoren Enzastaurin oder AEB behandelt. Nach Behandlung wurden die Zellen mit Annexin V und PI gefärbt und auf ihre Viabilität analysiert. Zur besseren Bestimmung des tatsächlichen Effektes der jeweiligen Substanz, wurden pro Patientenprobe jeweils dieselbe Menge an Zellen einmal in Co-

Kultur ohne Hinzugabe des Medikaments (Medium + EL08-1D2) sowie einmal ohne EL08-1D2-Zellen (SA) kultiviert (Abb. 6).

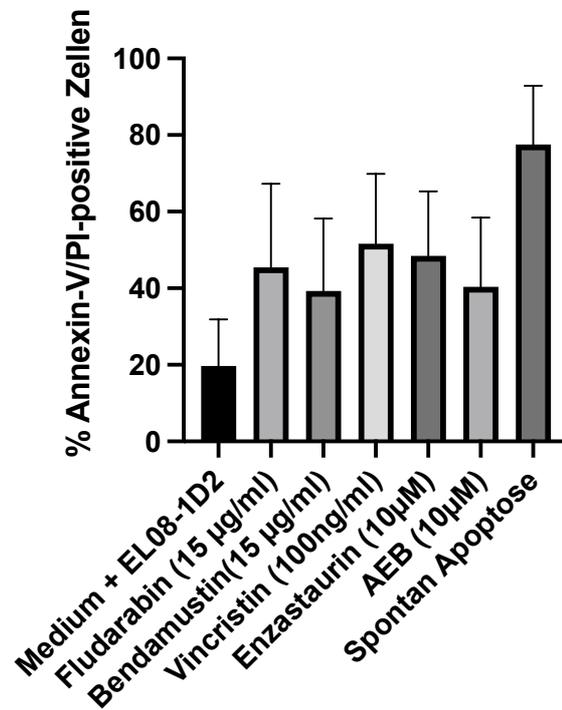


Abb. 6: Effekt der Zytostatika auf alle Patientenproben. CLL-Zellen der n = 65 Proben wurden je für 96 h in Co-Kultur mit EL08-1D2-Zellen, oder in Monokultur gehalten. Nach 48 h erfolgter Behandlung erfolgte die Messung der Annexin V/PI-positiven Zellen.

Nach 96 h Co-Kultur ohne Behandlung (Abb.6, Medium + EL08-1D2) zeigten sich im Median 16,6% [3,1-50,9] der CLL-Zellen Annexin V/PI-positiv und wurden somit als apoptotisch gewertet. CLL-Zellen in Monokultur waren hingegen nach demselben Zeitraum bereits zu 79,3 % [98,8-29,6] in SA. Aus der Differenz lässt sich der protektive Effekt durch die Stromazellen abschätzen. Im Median blieben 62,7% der CLL-Zellen durch die Co-Kultur viabel. Dieser Effekt konnte teilweise durch Behandlung der verschiedenen Substanzen überwunden werden. Nach 48 h Behandlung mit den Substanzen Fludarabin waren 44,4% [8-89,3]; durch Bendamustin 37,6% [7,2-81,8]; mit Vincristin 51,0% [19,7-90]; durch Enzastaurin 50,9% [7,5-84,2] und AEB 40,5% [6,8-83,1] der CLL-Zellen in Apoptose. Durch das Co-Kultur-Modell konnten wir den protektiven Effekt der EL08-1D2-Zellen zeigen und das Ansprechen der CLL-Zellen auf verschiedene Chemotherapeutika und PKC-β-Inhibitoren untersuchen. Zudem

konnten wir hier die in Kapitel 5.3. titrierten Dosierungen validieren, in dem sich insgesamt ein moderater Effekt der Substanzen auf die CLL-Zellen zeigte und eine Vergleichbarkeit gut ermöglicht.

5.5 Chemosensitivität der CLL-Zellen im Verlauf der Erkrankung

Aus dem klinischen Alltag ist bekannt, dass insbesondere bei vielen hämatologischen Neoplasien ein schlechteres Ansprechen auf Chemotherapie im Krankheitsverlauf nach vorheriger Behandlung zu erwarten ist. Um in unserem Modell zu untersuchen, wie sich das Ansprechen auf die verschiedenen Substanzen im zeitlichen Verlauf eines Patienten auswirkt, wurden zunächst die $n = 65$ Proben der Patienten an den verschiedenen Zeitpunkten T1-T4 verglichen. Wie in Tabelle 1 beschrieben, waren pro Patienten mindestens zwei Proben verschiedener Zeitpunkte verfügbar. Um den Effekt der Substanzen auf die CLL-Zellen besser darzustellen, wurde hier das Delta (Δ) der Zellen in Apoptose berechnet. Da, wie in Abb. 6 gezeigt, im Mittel 16,6% der CLL-Zellen in Co-Kultur ohne zusätzliche Behandlung in Apoptose gingen, dieser Wert aber für jede Probe unterschiedlich war, wurde das Δ folgendermaßen berechnet, um die Vergleichbarkeit des Ansprechens auf die Substanzen selbst beziehen zu können:

Der prozentuelle Anteil der Annexin V/PI-positiven CLL-Zellen nach Behandlung mit dem jeweiligen Zytostatikum minus den Annexin V/PI-positiven CLL-Zellen in EL08-1D2 Co-Kultur ohne Behandlung. Beispielsweise gilt für den Patienten AH59 und die Behandlung mit Fludarabin dann für Zeitpunkt T1:

$$T1 \text{ (AH59): } \Delta \text{ Fludarabin} = 44,0\% - 9,1\% = 34,9\%$$

Sollte dadurch keine Differenz oder ein negativer Wert in der Differenz ergeben, wurde dieser mit 0% berechnet, da hier kein zusätzlicher zytotoxischer Effekt durch Behandlung mit der Substanz gemessen wurde. Die CLL-Zellen waren in diesem Fall refraktär auf die Behandlung mit dem Zytostatikum. Für unsere Kohorte waren für die Zeitpunkte T1-T4 die folgende Anzahl an Proben vorhanden: T1 mit $n = 24$ Proben, T2 mit $n = 24$ Proben, T3 mit $n = 14$ Proben und T4 mit $n = 3$ Proben. Die Pseudonyme der Patienten sowie die zeitlichen Abstände zwischen den verschiedenen Proben in Monaten sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Patienten ID	ED/T1, m	T1/T2, m	T2/T3, m	T3/T4, m
AH-59	0	13	26	
KW-36	17	33	26	19
DC-50	22	6		
MW-56	1	40		
vAR-41	9	41		
BWR-48	87	20	20	
PL-53	7	14	47	
VA-41	35	5		
HH-43	20	43	26	
HV-64	0	12	42	
HE-60	19	30		
LFJ-52	3	35		
HW-35	0	22	65	
KK-56	0	27	3	
WKJ-57	6	16		
PB-53	21	8		
SR-41	0	85		
WB-55	35	9	6	
OJ-28	186	28	11	
BW-37	4	15	6	
KR-52	15	7		
MW-63	26	54	28	
KH-53	86	27	3	2
GC-35	72	32	20	33

Tab. 2: Zeitliche Abstände zwischen T1-T4 aller Proben. Pseudonymisierte Patienten mit zeitlichem Abstand zwischen Erstdiagnose (ED) und Zeitpunkt 1 (T1); T1 und T2; T2 und T3 sowie T4 und T4 in Monaten (m) der jeweiligen Probengewinnung.

5.5.1 Chemosensitivität im zeitlichen Verlauf der Erkrankung

Um zu untersuchen, ob in unserer Kohorte die Proben von vorthera­pierten CLL-Patienten schlechter auf die Substanzen ex-vivo ansprechen als die Proben unbehandelter Patienten, wurden die Effekte der jeweiligen zytostatischen Substanzen über den Zeitraum T1-T4 betrachtet. In Abb. 9, A sind alle mit Fludarabin behandelten CLL-Proben aufgezeigt. Hier ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Zeitpunkten erkennen (T1/T2 $p=0,74$, T2/T3 $p=0,32$, T3/T4 $p=0,85$; Abb. 9, A), wobei für T4 nur $n = 3$ Proben vorhanden waren. Zu den Zeitpunkten T1-T4 zeigten

sich nach Behandlung mit Fludarabin jeweils zu T1 = 27,4% der CLL-Zellen in Apoptose, an T2 = 25,0%, an T3 = 24,1% und an T4 = 36,0% - wobei nur n = 3 Patientenproben zu T4 vorhanden waren. Nach Unterteilung der Patienten, ließ sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied für unbehandelte (T1/T2 $p=0,41$, T2/T3 $p=0,80$; Abb. 9, B) oder behandelte (T1/T2 $p=0,22$, T2/T3 $p=0,18$, T3/T4 $p=0,42$; Abb. 9, C) zwischen den jeweiligen Zeitpunkten beobachten. Es ließ sich aber der Trend vernehmen, dass die Proben der vorbehandelten Patienten im Verlauf der Erkrankung weniger sensitiv gegenüber der Chemotherapie waren.

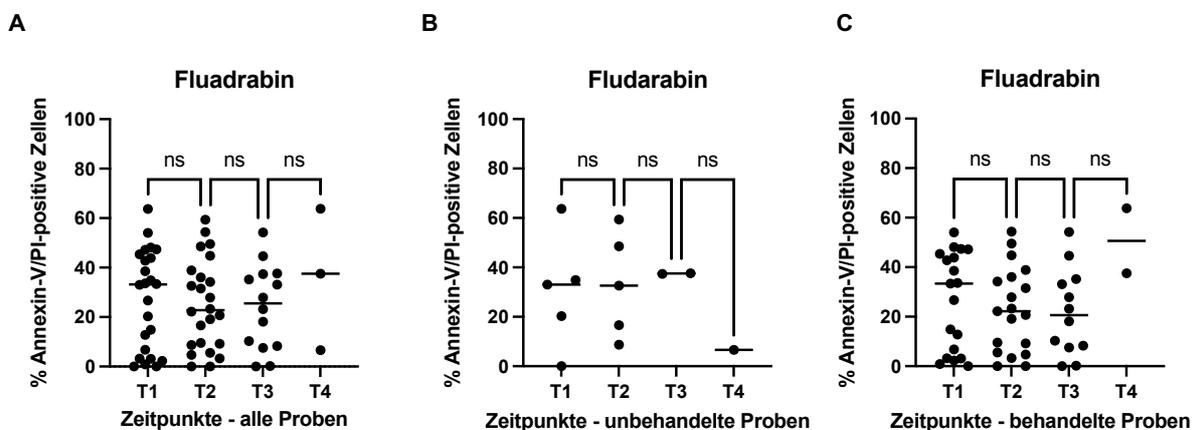


Abb. 9. Ansprechen auf Fludarabin im zeitlichen Verlauf. A: Alle Patientenproben, die nach 48 h Co-Kultur mit EL08-1D2-Zellen mit 15 $\mu\text{g/ml}$ Fludarabin behandelt wurden; T1/T2 $p=0,74$, T2/T3 $p=0,32$, T3/T4 $p=0,85$. B: Proben unbehandelter Patienten; T1/T2 $p=0,41$, T2/T3 $p=0,80$ mit n=5 (T1), n=5 (T2), n=2 (T3) n=1 (T4). C: Proben behandelter Patienten; T1/T2 $p=0,22$, T2/T3 $p=0,18$, T3/T4 $p=0,42$ mit n=19 (T1), n=19 (T2), n=12 (T3), n=2 (T4). Die Zeitpunkte wurden mit gepaartem t-Test verglichen; ns = nicht signifikant.

Für Bendamustin in der Dosis von 25 $\mu\text{g/ml}$ zeigte sich ebenfalls keine signifikante Veränderung der Sensitivität der CLL-Zellen im zeitlichen Verlauf der erfassten Zeitpunkte (T1/T2 $p=0,36$, T2/T3 $p=0,97$, T3/T4 $p=0,68$; Abb. 10, A). Hier waren nach ex-vivo Behandlung im Durchschnitt bei T1 = 21,2%, bei T2 = 18,7%, bei T3 = 19,5% und bei T4 = 21,3% der Zellen Annexin V/PI-positiv. Wie für Fludarabin, ließ sich nach Unterteilung der Subgruppen in unbehandelte (T1/T2 $p=0,36$, T2/T3 $p=0,20$; Abb. 10, B) und behandelte (T1/T2 $p=0,76$, T2/T3 $p=0,10$, T3/T4 $p=0,88$; Abb. 10, C) Patienten kein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten T1-T4 messen.

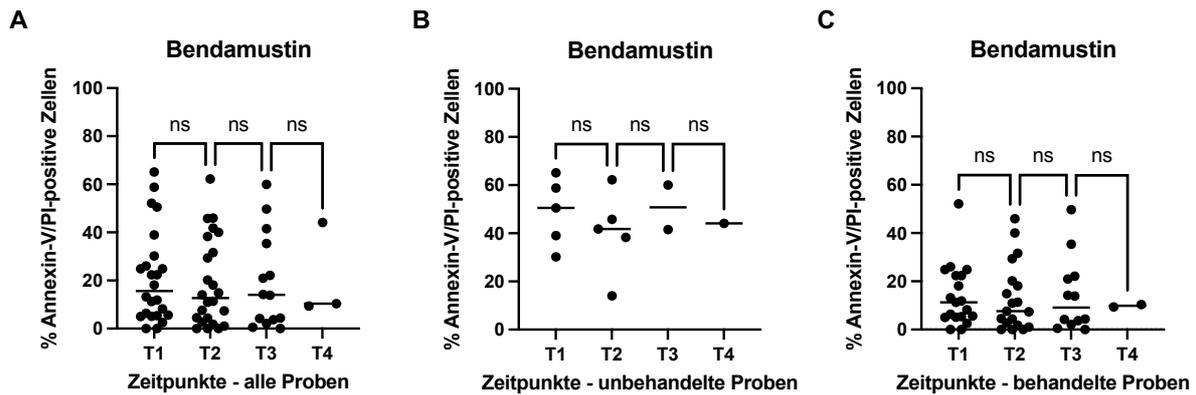


Abb. 10 Ansprechen auf Bendamustin im zeitlichen Verlauf. A: Alle Patientenproben, die nach 48 h Co-Kultur mit EL08-1D2-Zellen mit 25 µg/ml Bendamustin behandelt wurden. T1/T2 $p=0,36$, T2/T3 $p=0,97$, T3/T4 $p=0,68$. B: Proben unbehandelter Patienten; T1/T2 $p=0,36$, T2/T3 $p=0,20$ mit $n=5$ (T1), $n=5$ (T2), $n=2$ (T3) $n=1$ (T4). C: Proben behandelter Patienten; T1/T2 $p=0,76$, T2/T3 $p=0,10$, T3/T4 $p=0,88$ mit $n=19$ (T1), $n=19$ (T2), $n=12$ (T3), $n=2$ (T4). Die Zeitpunkte wurden mit gepaartem t-Test verglichen; ns = nicht signifikant.

In Abb. 11 ist die Aufteilung in die Untergruppen für die mit Vincristin behandelten CLL-Zellen dargestellt. Alle $n = 65$ Proben betrachtet, zeigten sich nach Behandlung mit 100 ng/ml Vincristin bei T1 = 33,6%, bei T2 = 31,8%, bei T3 = 29,0% und bei T4 = 37,6% der Zellen in Apoptose, ohne signifikanten Unterschied zwischen den Zeitpunkten (T1/T2 $p=0,36$, T2/T3 $p=0,97$, T3/T4 $p=0,68$; Abb. 11, A). Wie für die anderen Zytostatika zeigte sich für unbehandelte (T1/T2 $p=0,36$, T2/T3 $p=0,20$; Abb. 11, B) und behandelte Proben (T1/T2 $p=0,76$, T2/T3 $p=0,10$, T3/T4 $p=0,88$; Abb. 11, C) ebenfalls kein signifikanter Unterschied.

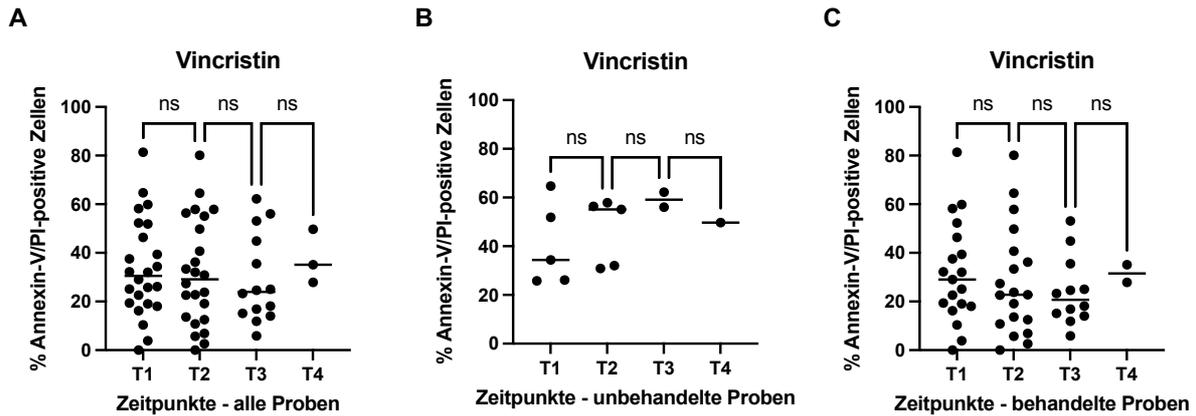


Abb. 11 Ansprechen auf Vincristin im zeitlichen Verlauf. A: Alle Patientenproben, die nach 48 h Co-Kultur mit EL08-1D2-Zellen mit 100 ng/ml Vincristin behandelt wurden. T1/T2 $p=0,39$, T2/T3 $p=0,60$, T3/T4 $p=0,60$. B: Proben unbehandelter Patienten; T1/T2 $p=0,25$, T2/T3 $p=0,56$ mit $n=5$ (T1), $n=5$ (T2), $n=2$ (T3) $n=1$ (T4). C: Proben behandelter Patienten; T1/T2 $p=0,09$, T2/T3 $p=0,54$, T3/T4 $p=0,09$ mit $n=19$ (T1), $n=19$ (T2), $n=12$ (T3), $n=2$ (T4). Die Zeitpunkte wurden mit gepaartem t-Test verglichen; ns = nicht signifikant.

Auch für die beiden PKC- β -Inhibitoren Enzastaurin und AEB war das Ansprechen der CLL-Zellen auf die jeweilige Substanz zwischen den Zeitpunkten T1-T4 nicht signifikant verändert. Nach Behandlung mit Enzastaurin in einer Dosis von 10 μM waren bei T1 = 30,0%, bei T2 = 26,5%, bei T3 = 31,4% und bei T4 = 24,6% der Zellen apoptotisch (T1/T2 $p=0,32$, T2/T3 $p=0,16$, T3/T4 $p=0,69$; Abb. 12, A). Die Behandlung mit 10 μM AEB zeigte bei T1 = 19,6%, bei T2 = 19,7%, bei T3 = 23,7% und bei T4 = 25,8% der CLL-Zellen in Apoptose (T1/T2 $p=0,97$, T2/T3 $p=0,50$, T3/T4 $p=0,99$; Abb. 12, D). Wie bei den klassischen Zytostatika ergab die Unterteilung in CLL-Proben vorbehandelter und nicht vortherapierter Patienten auch keinen signifikanten Unterschied im zeitlichen Verlauf (Abb. 12 B, C und E, F).

Zusammenfassend konnten wir in unserer Kohorte im Co-Kultur-Modell mit EL08-1D2-Zellen keinen relevanten Unterschied der Sensitivität von CLL-Zellen gegenüber der zytotoxischen Therapie im beobachteten Zeitraum der verschiedenen Patienten sehen.

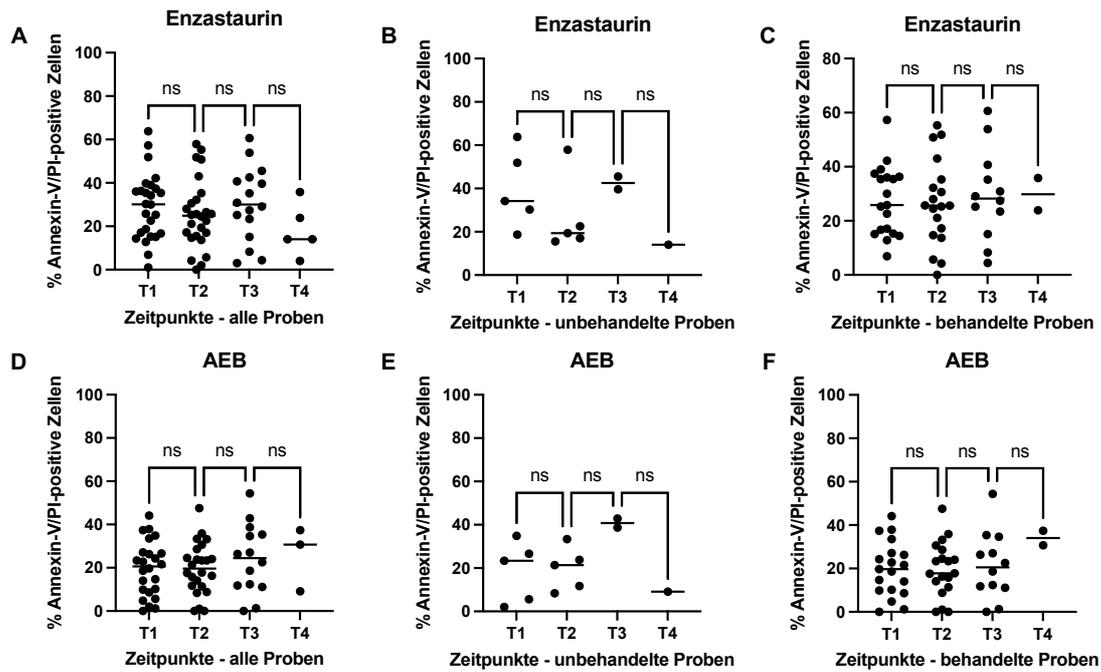


Abb. 12: Ansprechen auf die PKC- β -Inhibitoren Enzastaurin und AEB. A-C: CLL-Zellen nach 48 h Behandlung in Co-Kultur mit EL08-1D2-Zellen mit 10 μ M Enzastaurin bei allen Proben. T1/T2 $p=0,32$, T2/T3 $p=0,16$, T3/T4 $p=0,69$ (A), den nicht-vortherapierten Patientenproben. T1/T2 $p=0,27$, T2/T3 $p=0,28$ (B) und den vorbehandelten Patientenproben. T1/T2 $p=0,81$, T2/T3 $p=0,68$, T3/T4 $p=0,53$ (C). D-F: CLL-Zellen nach 48 h Behandlung in Co-Kultur mit EL08-1D2-Zellen mit 10 μ M AEB bei allen Proben. T1/T2 $p=0,97$, T2/T3 $p=0,50$, T3/T4 $p=0,99$ (A), den nicht-vortherapierten Patientenproben T1/T2 $p=0,89$, T2/T3 $p=0,11$ (B) und den vorbehandelten Patientenproben T1/T2 $p=0,97$, T2/T3 $p=0,96$, T3/T4 $p=0,16$ (C). Die Zeitpunkte wurden mit gepaartem t-Test verglichen; ns = nicht signifikant.

5.5.2 Auswirkung von Vortherapie auf die Chemosensitivität

Wie in Abb. 9-12 gezeigt, ließ sich in unserer Kohorte kein relevanter Unterschied der Sensitivität von CLL-Zellen auf die verschiedenen Substanzen im beobachteten Zeitraum messen. Allerdings fiel auf, dass CLL-Zellen von nicht-vortherapierten Patienten besser auf die ex-vivo Therapie angesprochen haben als CLL-Zellen vortherapierter Patienten. Die apoptotischen CLL-Zellen an den Zeitpunkten T1-T4 wurden zwischen diesen beiden Gruppen verglichen, um zu untersuchen, ob Zellen vortherapierter Patienten schlechter auf die ex-vivo Behandlung im Co-Kultur-System ansprechen, als Zellen therapienaiver Patienten. In Abb. 13 sind die Vergleiche zu jedem Zeitpunkt nach Behandlung mit den klassischen Zytostatika dargestellt und in Abb. 14 nach Behandlung mit den PKC- β -Inhibitoren. Zu den Zeitpunkten T1, T2 und

T3 wurde ein signifikant geringeres Ansprechen auf die Therapie mit 25 µg/ml Bendamustin in CLL-Zellen vorbehandelter Patienten gesehen, im Vergleich zu CLL-Zellen von therapienaiven Patienten (Abb. 13, B). Zeitpunkt T4 wurde nicht statistisch verglichen, da hier insgesamt nur n = 3 Proben verfügbar waren.

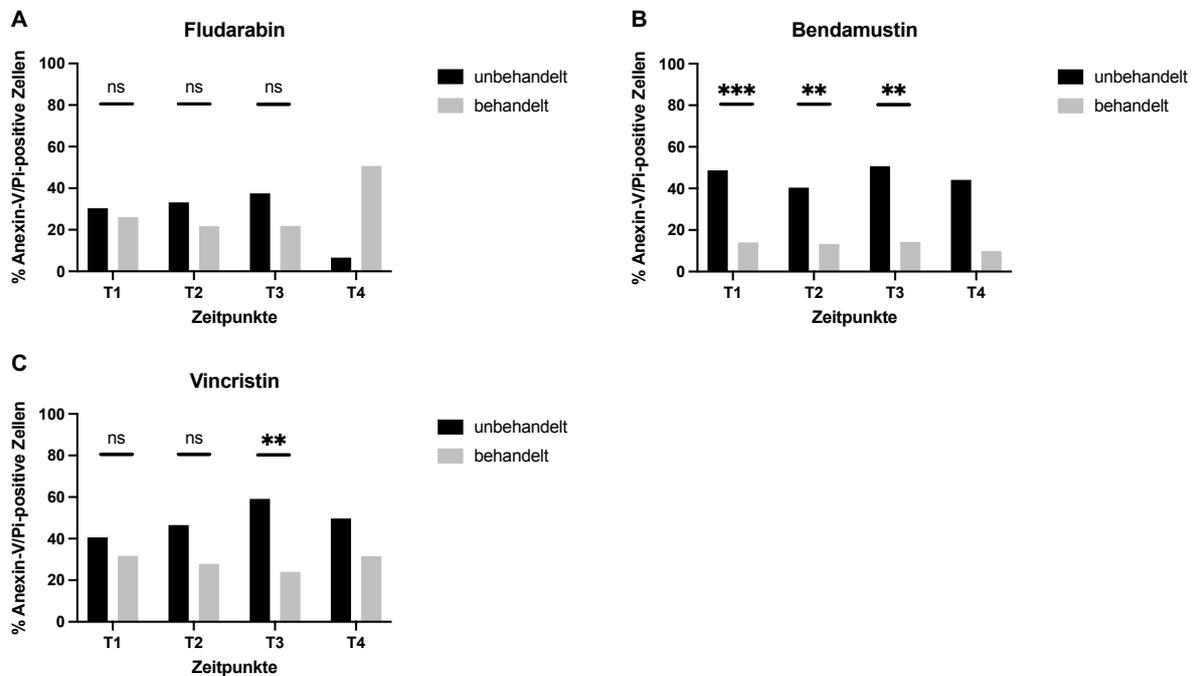


Abb. 13. Chemosensitivität von behandelten und unbehandelten Patientenproben.

CLL-Zellen in Co-Kultur mit EL08-1D2-Zellen nach 48 h Behandlung mit Fludarabin (A), Bendamustin (B) oder Vincristin (C). Zeitpunkte T1-T4 von unbehandelten (schwarze Balken) und behandelten (graue Balken) wurden jeweils verglichen. ns=nicht signifikant; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Im direkten Vergleich der jeweiligen aufeinanderfolgenden Zeitpunkte T1-T4 zeigten sich im Mittel (unbehandelt / behandelt): T1 = 48,7%/14,0% ($p < 0,001$); T2 = 40,4%/13,3% ($p < 0,01$); T3 = 50,7%/14,3% ($p < 0,01$) und T4 = 44,1%/9,9% der Zellen in Apoptose. Interessanterweise konnte dieser Effekt für Fludarabin (Abb. 13, A) nur geringer ausgeprägt beobachtet werden, ohne das Erreichen einer statistischen Signifikanz. Einen Trend sahen wir trotzdem, demnach vorbehandelte Patienten schlechter auf die ex-vivo Therapie mit Fludarabin angesprochen haben. Nach Behandlung mit 100 ng/ml Vincristin konnte nur bei dem Zeitpunkt T3 ein signifikanter Unterschied beobachtet werden (Abb. 13, C), allerdings war für die restlichen Zeitpunkte auch ein Trend zu sehen. Durch Therapie der CLL-Zellen mit den beiden PKC- β -Inhibitoren Enzastaurin und AEB konnte ebenfalls ein Trend gesehen werden,

dass Patienten nach Vortherapie schlechter ansprechen. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich jedoch zu keinem Zeitpunkt (Abb. 14).

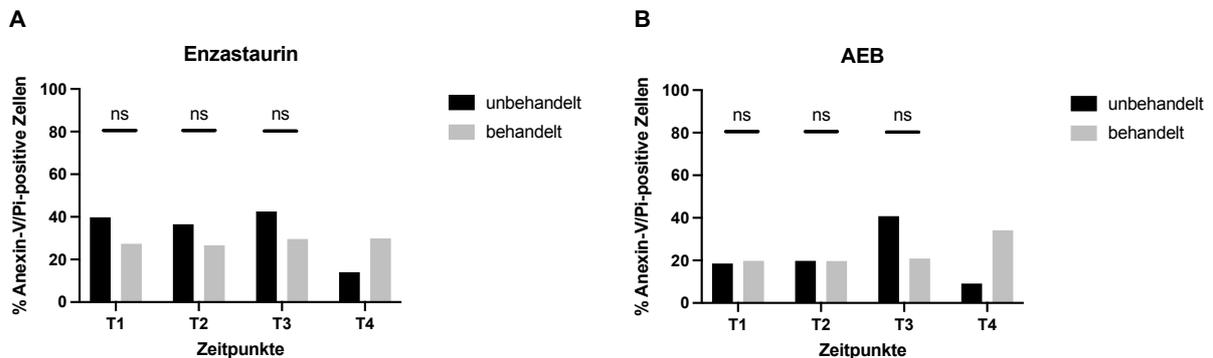


Abb. 14. PKC- β -Inhibitoren, Vergleich behandelter vs. unbehandelter Proben.

CLL-Zellen in Co-Kultur mit EL08-1D2-Zellen nach 48 h Behandlung mit Enzastaurin (A) oder AEB (B). Die Mittelwerte aus Abb. 12 werden angezeigt. Zeitpunkte T1-T4 von unbehandelten (schwarze Balken) und behandelten (graue Balken) werden jeweils verglichen. ns=nicht signifikant.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die ex-vivo Behandlung von CLL-Zellen in Co-Kultur mit EL08-1D2-Zellen mit den 5 verschiedenen Substanzen bei CLL-Zellen therapienaiver Patienten zum Teil besser wirkte, als bei Proben von vortherapierten Patienten. Dieser Effekt war besonders ausgeprägt für die Behandlung mit 25 μ g/ml Bendamustin und 100 ng/ml Vincristin.

5.5.3 Darstellung einzelner Patienten mit zeitlichem Verlauf

Im vorherigen Abschnitt konnten wir ein schlechteres Ansprechen bei CLL-Zellen von vortherapierten Patienten nach ex-vivo Behandlung sehen. Allerdings wurden die CLL-Proben aller Patienten zusammen analysiert und in Subgruppen eingeteilt. Da es sich um Primärmaterial mit CLL-Zellen individueller Patienten handelt, wurden in diesem Abschnitt die Patienten jeweils einzeln betrachtet, in dem das Ansprechen auf die klassischen Zytostatika Fludarabin, Bendamustin und Vincristin an den jeweiligen Zeitpunkten aufgetragen wurde. Es wurden hier nur die klassischen Chemotherapeutika dargestellt, da hier der größte Unterschied zu sehen war. In Abb. 15 sind die n = 5 therapienaiven Patienten mit n = 14 erfassten Zeitpunkten dargestellt.

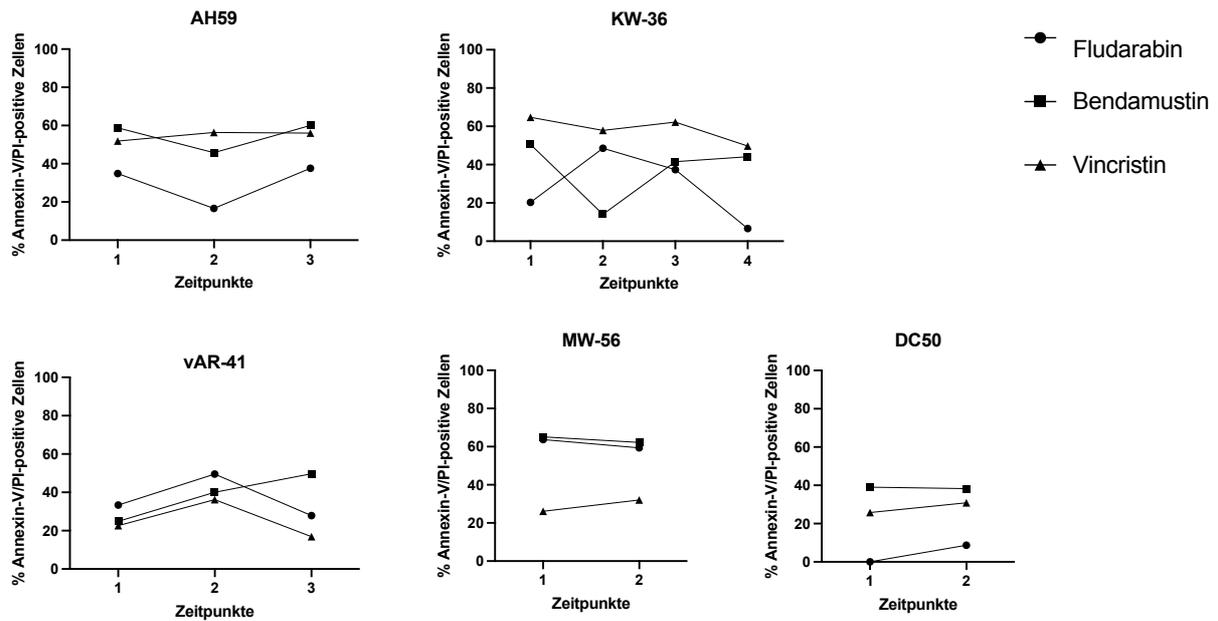


Abb. 15: Proben von therapienaiven CLL-Patienten. Nach 48 h Behandlung in Co-Kultur mit EL08-1D2-Zellen mit Substanzen Fludarabin (15 µg/ml), Bendamustin (25 µg/ml) oder Vincristin (100 ng/ml). Die Zeitpunkte 1-4 stehen für die jeweiligen Erfassungsdaten der Proben (Tab. 2).

Insgesamt waren Proben von n = 19 CLL-Patienten vorhanden, die eine Therapie für ihre Erkrankung erhalten hatten (Abb. 16). Bei n = 3 Patienten (KR-52; VA-41; BW-37) fiel der Therapiebeginn mit dem letzten Zeitpunkt der Probenentnahme zusammen. Von den restlichen n = 16 Patienten wurde bei n = 11 eine Abnahme der Annexin V/PI-positiven Zellen nach dem Therapiebeginn beobachtet (Abb. 16).

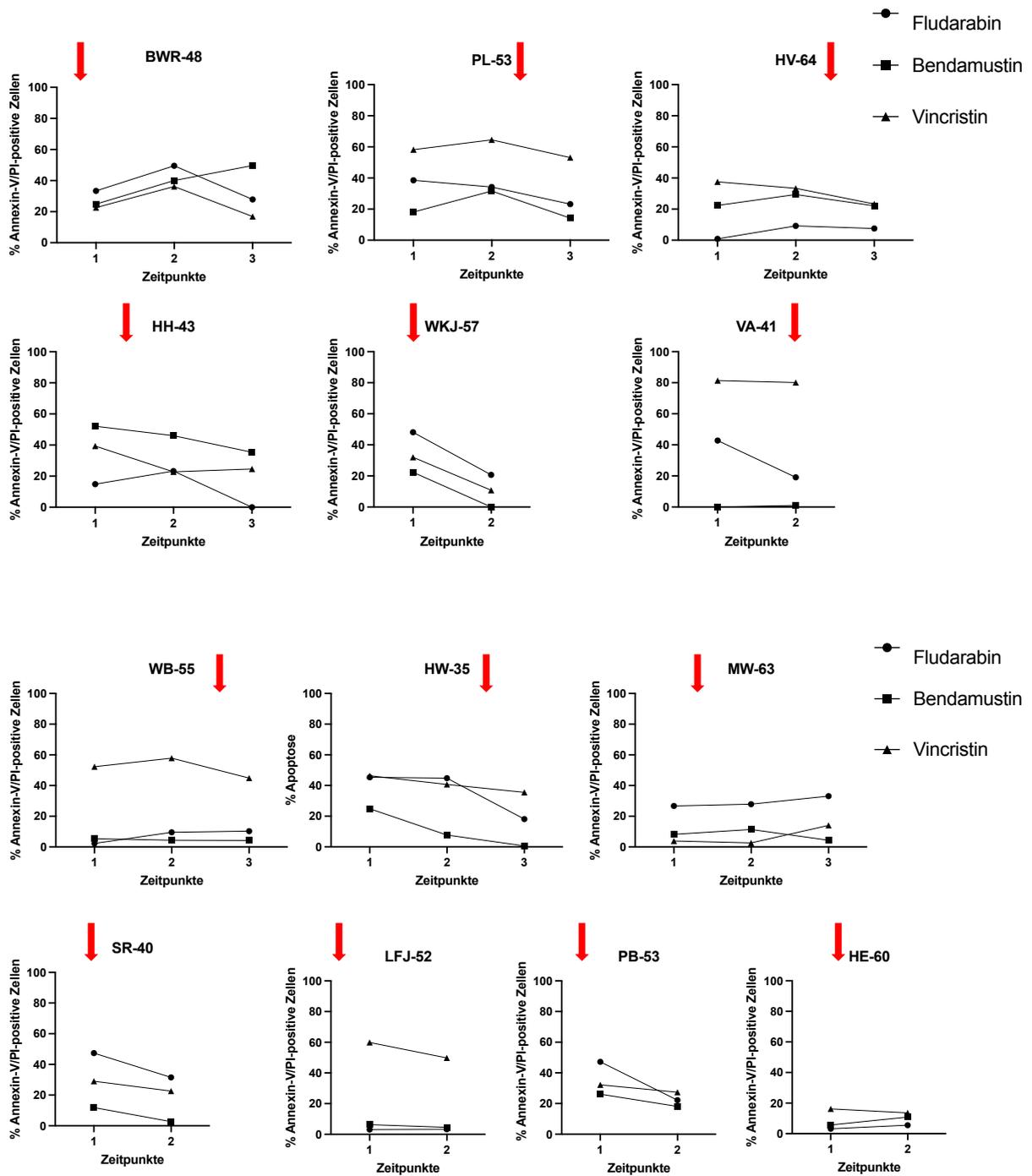


Abb. 16 (Fortführung auf der nächsten Seite)

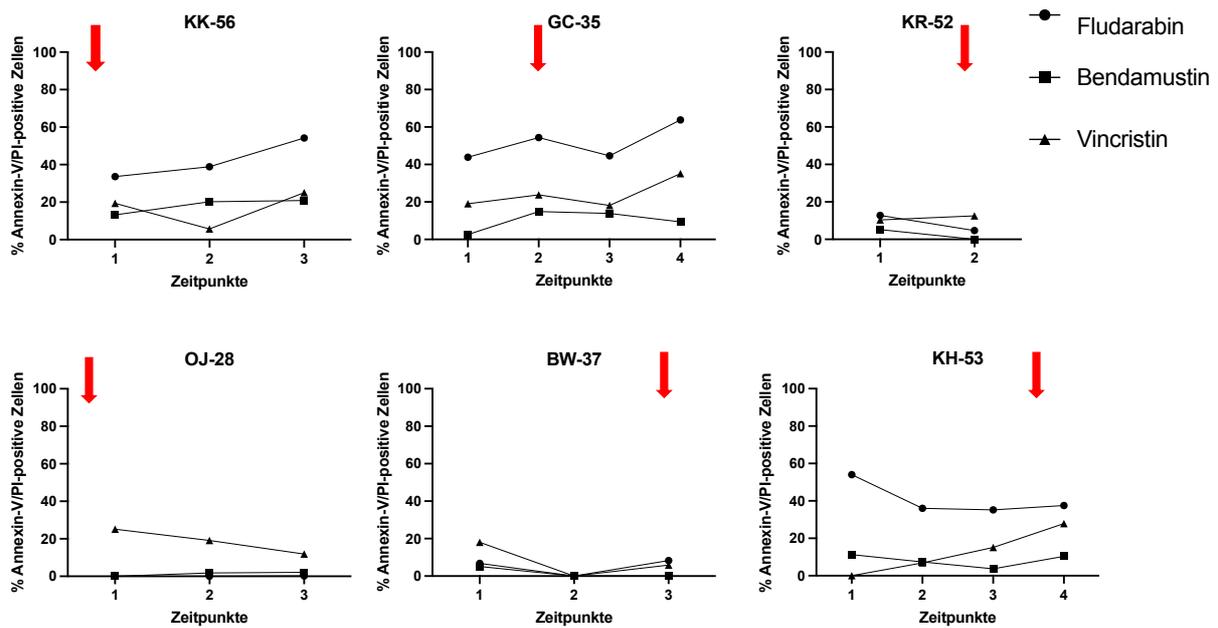


Abb. 16. Proben von vorbehandelten CLL-Patienten. Nach 48 h Behandlung in Co-Kultur mit EL08-1D2-Zellen mit Substanzen Fludarabin (15 µg/ml), Bendamustin (25 µg/ml) oder Vincristin (100 ng/ml). Die Zeitpunkte 1-4 stehen für die jeweiligen Erfassungsdaten der Proben (Tab. 2). Der rote Pfeil zeigt den Zeitpunkt der ersten CLL-Behandlung des Patienten an.

Um zu untersuchen, inwiefern der Beginn der CLL-Therapie einen direkten Einfluss auf die Sensitivität der CLL-Zellen in unserem Co-Kultur-Modell hatte, wurde der Mittelwert aus den apoptotischen CLL-Zellen für jeden Zeitpunkt nach Behandlung mit den drei Substanzen Fludarabin, Vincristin und Bendamustin ermittelt. Hierdurch definierten wir einen Parameter, der alle drei zytostatischen Substanzen beinhaltet und das Ansprechen auf Chemotherapie einer CLL-Probe zu einem Zeitpunkt beschreibt (Abb. 17). Bei Patienten, die bereits vor der ersten Probenerfassung eine CLL-Therapie erhalten hatten (n = 7), wurde der Unterschied vom ersten zum letzten Zeitpunkt gewählt. Direkt nach Therapiebeginn (Abb. 16, roter Pfeil), sahen wir in unserem Modell in n = 11 von n = 16 Patienten eine Abnahme der apoptotischen CLL-Zellen nach Behandlung mit Bendamustin, Vincristin und Fludarabin. Wie oben beschrieben wurde hier der Mittelwert aus den Annexin V/PI-positiven Zellen für die 3 Substanzen abgebildet (Abb. 17).

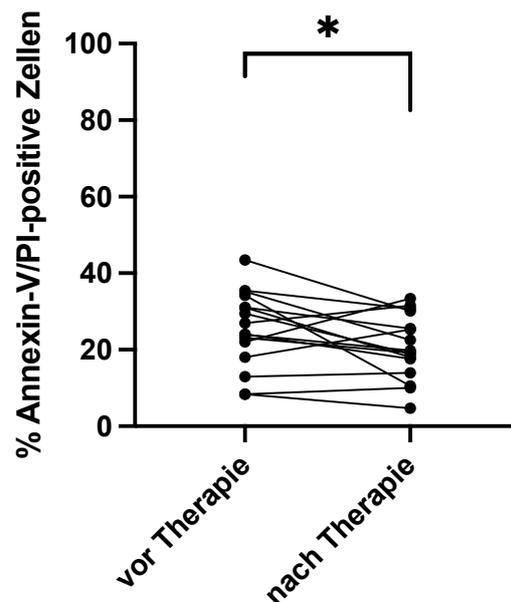


Abb. 17: Chemosensitivität vor und nach Therapiebeginn des Patienten. Bei n=16 Patienten, die eine Therapie erhalten hatten (n=7) oder zwischen zwei Probenerfassungen mit der CLL-Therapie begonnen hatten (n=9), wurde das Ansprechen der CLL-Zellen in Co-Kultur mit EL08-1D2 auf Fludarabin, Bendamustin und Vincristin (als Mittelwert) vor und nach CLL-Therapie des Patienten verglichen. * $p=0.048$.

Zusammenfassend sahen wir, dass CLL-Zellen von vortherafierten Patienten in unserem Modell direkt nach Therapiebeginn weniger sensitiv gegenüber einer Chemotherapie in unserer Co-Kultur waren, im Sinne einer Resistenzentwicklung auf die Therapie mit klassischen Chemotherapeutika und einer verstärkten EMDR.

5.5.4 Einfluss des Risikoprofils auf die Chemosensitivität

Bei n = 9 Patienten unserer Kohorte mit viablen Proben lag entweder eine del17p, eine TP53-Mutation oder eine del11q vor. Diese Patienten wurden analog der Literatur der Hochrisiko-Gruppe zugeordnet. Da wir jeweils nur die Zytogenetik von der Erstdiagnose zur Verfügung hatten, entschieden wir uns hier keinen Vergleich zwischen den verschiedenen Zeitpunkten vorzunehmen. In Abb. 18 wurden die Proben der n = 9 Patienten mit Hochrisiko-Zytogenetik mit den Proben der restlichen n = 15 Patienten hinsichtlich des Ansprechens auf die 5 verschiedenen Therapeutika verglichen. Nach Therapie mit Fludarabin ($p=0,048$); Bendamustin ($p<0,001$) und

Enzastaurin ($p=0,048$) zeigte sich eine geringere Sensitivität von CLL-Zellen der Hochrisikopatienten. Für Vincristin ($p=0,253$) und AEB ($p=0,335$) zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 18). Proben von Patienten mit zytogenetischen Aberrationen, die ein schlechteres Outcome vorhersagen, sprachen somit in unserem Modell auch schlechter auf die Therapie im Co-Kultur-System an.

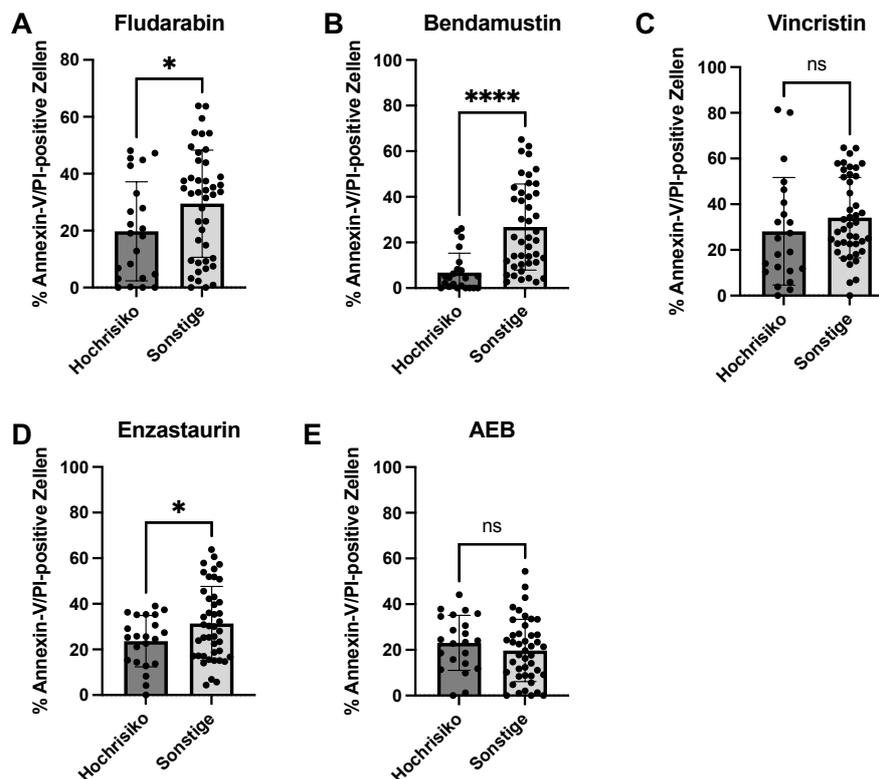


Abb. 18: Einfluss des Risikoprofils auf das Ansprechen. Bei $n=9$ Patienten lag eine Hochrisiko-Konstellation vor, bei $n=15$ eine niedrige- oder intermediäre Risikokonstellation (Sonstige). Für jedes Medikament wurden alle Annexin V/PI-positiven CLL-Zellen der zwei Gruppen nach 48 h Behandlung in Co-Kultur mit EL08-1D2-Zellen aufgetragen. ns=nicht signifikant; *Fludarabin $p=0,048$; ****Bendamustin $p<0,001$; *Enzastaurin $p=0,048$.

5.6 Interaktion von EL08-1D2 und CLL-Zellen nach Co-Kultur

Der Apoptose-Defekt von CLL-Zellen ist unter anderem durch die Kommunikation mit dem umliegenden TME bedingt. Dieser Effekt kann durch das simple Experiment gezeigt werden, in dem CLL-Zellen ex-vivo durch ein Co-Kultursystem am Leben erhalten werden können und in Monokultur nach kurzer Zeit in Apoptose gehen (Abb. 6). In unserem Modell dienten EL08-1D2-Zellen als Stromazellen des TME. Nach

Kontakt mit CLL-Zellen kam es zu einer Veränderung der Gensignatur der Stromazellen (Lutzny et al., 2013). In dieser Arbeit konnte in einer Transkriptom-Analyse von EL08-1D2-Zellen nach Co-Kultur mit CLL-Zellen gezeigt werden, dass durch den Kontakt mit Tumorzellen 474 Gene hoch- und 347 Gene herunterreguliert wurden. Zwei der Gene, die in den Stromazellen mit am stärksten hochreguliert wurden, waren *IL6* und *NFKBIZ*. Bei dieser bidirektionalen Interaktion handelt es sich wahrscheinlich um einen dynamischen Prozess mit vielen Einflussfaktoren. Wir wollten die Hypothese prüfen, ob sich klinisch relevante Faktoren wie vorherige Therapie, zytogenetische Aberrationen oder klonale Evolution auch auf die Interaktion zwischen CLL und dem TME auswirken. Hierzu wurde die quantitative mRNA-Induktion von *IL6* und *NFKBIZ* in EL08-1D2 nach CLL-Kontakt zu jedem verfügbaren Zeitpunkt einer Patientenprobe gemessen. Für die nachfolgende Auswertungen waren nur n = 22 der n = 24 Patienten verfügbar. In Abb. 19 ist die relative mRNA-Induktion von *IL6* (Abb. 19, A) und *NFKBIZ* (Abb. 19, B) aller Proben über die verfügbaren Zeiträume T1-T4 dargestellt. Für die Zeitpunkte T3 und T4 standen nur jeweils n = 12 (T3) und n = 2 (T4) Proben zur Verfügung.

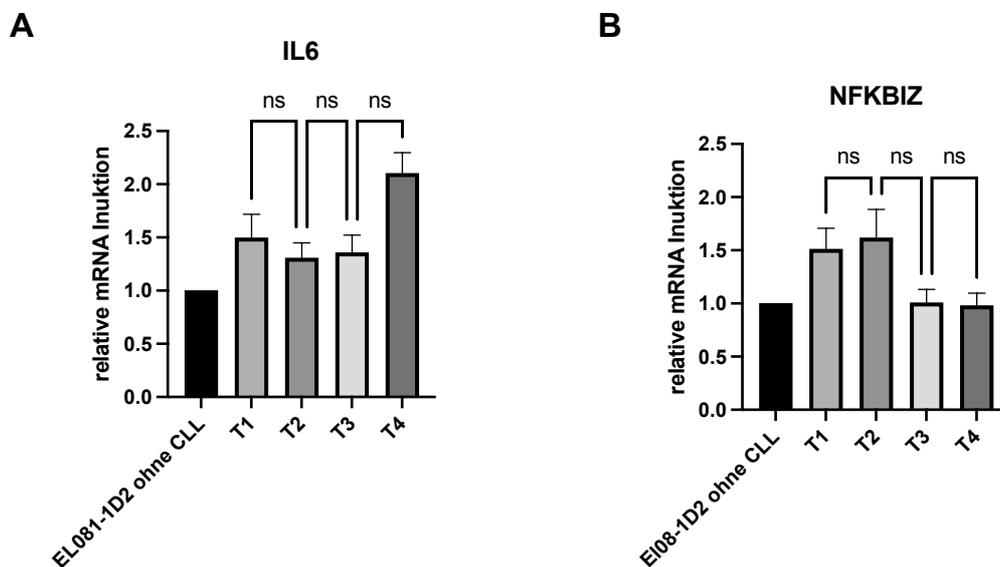


Abb. 19. *IL6* und *NFKBIZ* Induktion in EL08-1D2-Zellen nach Co-Kultur mit CLL-Zellen. Die relative mRNA-Induktion von *IL6* (A) bzw. *NFKBIZ* (B) nach 96 h Co-Kultur alleine oder mit CLL-Proben. Insgesamt waren bei den Zeitpunkten T1 = 22; T2 = 22, T3 = 12 und T4 = 2 Proben verfügbar. ns=nicht signifikant.

Die *IL6*-Expression war im Mittel zu Zeitpunkt T1 = 1,5-fach (0,28 - 5,11), T2 = 1,31-fach (0,42 - 2,92); T3 = 1,36-fach (0,58 - 2,39) und zu T4 = 2,1-fach (1,92 - 2,30)

gegenüber der Expression in monokultivierten EL08-1D2-Zellen erhöht. Für die Expression von *NFKBIZ* zeigte sich ebenfalls eine Veränderung der mRNA-Level zu den jeweiligen Zeitpunkten T1 = 1,51-fach (0,42-3,97); T2 = 1,62-fach (0,47-4,83); T3 = 1,01-fach (0,48-1,77) und T4 = 0,98-fach (0,86-1,10; p=0,99). Nach 96 h Co-Kultur mit CLL-Zellen zeigte sich in diesem Experiment also eine vermehrte Expression beider Gene in den EL08-1D2-Zellen, bis auf *NFKBIZ* zu den Zeitpunkten T3 und T4. Im Vergleich der mRNA-Induktion zwischen den verschiedenen Zeitpunkten T1-T4 zeigte sich für beide Gene kein signifikanter Unterschied. Auch nach Aufteilung der CLL Proben in die definierten Subgruppen (Abb. 20), zeigte sich keine signifikante Veränderung zwischen den verschiedenen Zeitpunkten. Der Vergleich der *IL6*-Expression in EL08-1D2-Zellen nach Kontakt mit CLL-Zellen von therapienaiven und vortherapierten Patienten ergab keine signifikanten Unterschiede (Abb. 20, A und B). Ebenfalls zeigte die Expression von *NFKBIZ* in EL08-1D2-Zellen nach Kontakt mit den CLL-Zellen beider Subgruppen keinen signifikanten Unterschied im zeitlichen Verlauf (Abb. 20, C und D).

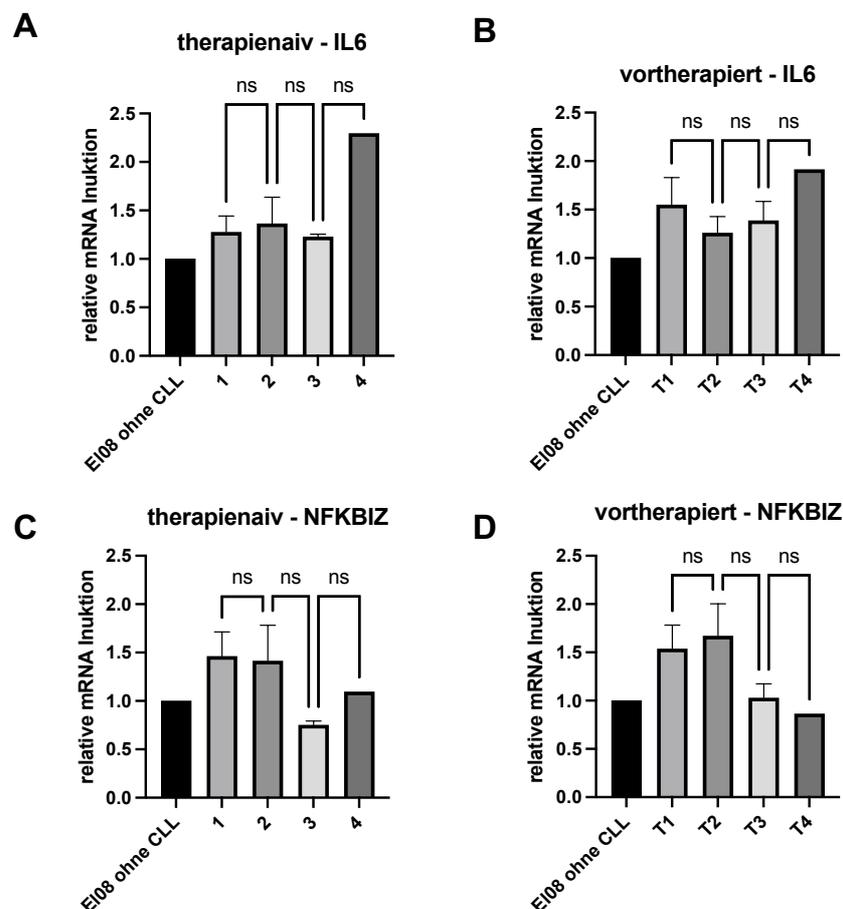


Abb. 20. Induktion von *IL6* und *NFKBIZ* nach Kontakt mit therapienaiven und vortherapierten Patienten. Die relative mRNA-Induktion in EL08-1D2-Zellen von *IL6* (A, B) bzw. *NFKBIZ* (C, D) nach 96h Co-Kultur alleine oder mit CLL-Zellen von Patienten. ns=nicht signifikant.

Es wurde untersucht, ob Patienten mit Hochrisiko-Konstellation im Verlauf eine Veränderung der CLL-TME-Interaktion zeigten (Abb. 21). CLL-Patienten mit *TP53*-Mutation, del11q, del17p wurden der Hochrisiko-Gruppe zugeordnet und es erfolgte die Unterteilung in CLL-Proben von Patienten mit einem hohen Risiko und Proben von Patienten mit niedrigem oder intermediärem Risiko (Abb. 21). Es wurden insgesamt n = 9 Patienten mit n = 21 viablen Proben der Hochrisiko-Gruppe zugeordnet und n = 13 Patienten mit n = 36 Proben der niedrig bzw. intermediären Risikogruppe. Dabei wurden zum Zeitpunkt T4 in der Hochrisiko-Gruppe keine Proben erfasst, weshalb hier nur T1-T3 abgebildet sind. Der vermutete Effekt, dass zytogenetische Aberrationen zu einer messbaren Veränderung der CLL-TME-Interaktion im Verlauf der Erkrankung führen, konnte hier nicht gezeigt werden. Es zeigte sich für die Gene *IL6* und *NFKBIZ* nach Kontakt mit sequentiellen CLL-Proben keine relevante Änderung der mRNA-Induktion (Abb. 21).

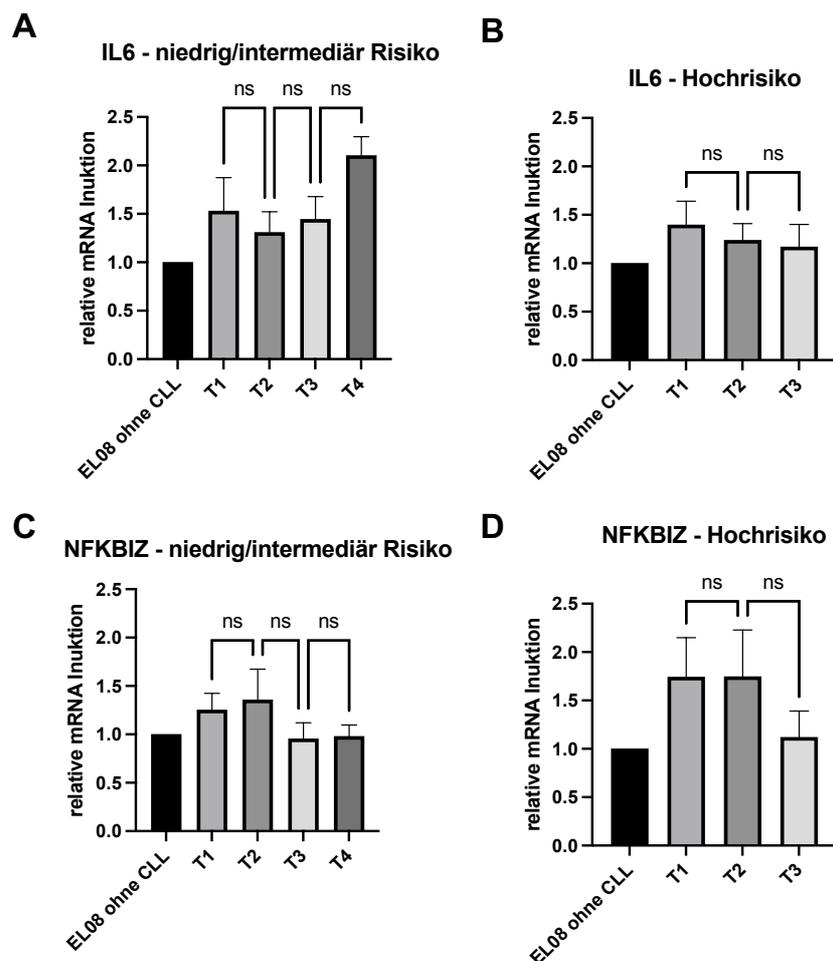


Abb. 21. Induktion von *IL6* und *NFKBIZ* nach Kontakt mit Patienten mit hohem und niedrig/intermediärem Risiko. Die relative mRNA-Induktion in EL08-1D2-Zellen von *IL6* (A, B) bzw. *NFKBIZ* (C, D) nach 96 h Co-Kultur alleine oder mit CLL-Zellen von Patienten. ns=nicht signifikant.

Zusammenfassend sahen wir in allen Subgruppen einen ähnlichen Effekt. Nach Co-Kultur mit CLL-Zellen von den Patienten unserer Kohorte, zeigte sich in den EL08-1D2-Zellen eine mRNA-Induktion von *IL6* und *NFKBIZ*. Es zeigte sich kein relevanter Unterschied in sequentiellen Patientenproben. Auch bei CLL-Zellen von Patienten, die bereits eine Therapie erhalten hatten oder der Hochrisiko-Gruppe zugeordnet wurden, zeigte sich im Verlauf der Erkrankung keine relevante Veränderung der Geninduktion von *IL6* oder *NFKBIZ* in EL08-1D2-Zellen als Ausdruck der Tumorzell-bedingten Aktivierung von Stromazellen.

5.7 Korrelation von Chemosensitivität und Aktivierung des TME

CLL-Zellen von Patienten, die bereits eine Therapie der CLL erhalten haben, sprachen in unseren Experimenten schlechter auf die Behandlung mit den zytostatischen Substanzen Bendamustin und Vincristin an, als die CLL-Zellen von therapienaiven Patienten. Die Resistenz gegenüber Zytostatika wird unter anderem durch Signale aus dem umliegenden TME vermittelt, was als EMDR beschrieben wird. In unserem vereinfachten Modell sollte die verstärkte Aktivierung von Stromazellen durch CLL-Kontakt als Parameter für die EMDR angesehen werden. Analog zu der Chemosensitivität zwischen den verschiedenen Zeitpunkten, sahen wir keinen signifikanten Unterschied der Genexpression von *IL6* und *NFKBIZ* im beobachteten Zeitraum T1-T4. Zur besseren Auswertung wurden bisher die Patienten jeweils in Subgruppen eingeteilt und zusammen betrachtet. Da wir mit Primärmaterial von CLL-Patienten arbeiteten, stellten wir uns die Frage, wie sich die Interaktion der CLL-Zellen mit den EL08-1D2-Zellen im zeitlichen Verlauf für die individuellen Patientenproben veränderte und ob dies mit dem Ansprechen auf die Chemotherapie der jeweiligen Probe korrelierte. Laut unserer Hypothese sollte die EMDR durch die Aktivierung des Stromas – gemessen anhand der Induktion von *IL6* und *NFKBIZ* – zur Abnahme der Chemosensitivität der CLL-Zellen führen. Also sollten höhere Level an mRNA Induktion mit einem schlechteren Ansprechen auf die Therapie in unserem ex-vivo Co-Kultur-Modell einhergehen.

Für jeden Patienten wurden Proben an mindestens zwei Zeitpunkten erfasst. Also konnten wir das Ansprechen auf die Chemotherapie einer CLL-Probe zu einem

definierten Zeitpunkt mit der mRNA-Induktion von *IL6* und *NFKBIZ* in EL08-1D2-Zellen nach Kontakt mit derselben Probe, zum selben Zeitpunkt korrelieren und den Korrelationskoeffizienten r bestimmen. Eine größtmögliche Korrelation r , die unserer Hypothese entspräche, wäre ein Wert von $r = -1$. Ein Wert von $r = -1$ würde suggerieren, dass eine stärkere Induktion von *IL6* und *NFKBIZ* in den EL08-1D2 mit einem geringeren Ansprechen der CLL-Zellen auf die Therapie zu einem bestimmten Zeitpunkt einhergehen würde. Dadurch würde gezeigt werden, dass in diesem Co-Kultur-Modell EMDR durch Induktion von *IL6* und *NFKBIZ* in EL08-1D2-Zellen vermittelt wird und zur erhöhten Resistenz der CLL-Zellen gegenüber zytostatischer Therapie führt.

5.7.1 Korrelation bei behandelten und therapienaiven Patienten

CLL-Proben von therapienaiven Patienten wurden zuerst betrachtet. Wir konnten zeigen, dass CLL-Zellen dieser Patienten in unserem Modell eine höhere Chemosensitivität hatten als Zellen von bereits vortherapierten Patienten. In Abb. 22 wurde die Anzahl der Annexin V/PI-positiven Zellen nach Behandlung mit Fludarabin (Abb. 22, A und D), Bendamustin (Abb. 22, B und E) und Vincristin (Abb. 22, C und F) auf der y-Achse und die relative mRNA-Induktion von *IL6* (Abb. 22, A-C) und *NFKBIZ* (Abb. 22, D-F) auf der x-Achse dargestellt. Es lagen $n = 13$ CLL-Proben unbehandelter Patienten mit beiden Daten (mRNA-Level der EL08-1D2 und CLL-Zellen in Apoptose) vor. Die Korrelation zwischen Ansprechen der CLL-Zellen und Geninduktion in EL08-1D2-Zellen war für Fludarabin und *NFKBIZ* signifikant mit einem Korrelationskoeffizienten $r = -0,62$ ($p=0,02$, Abb. 22, D). Für *IL6* und Fludarabin zeigte sich ein eindeutiger Trend mit $r = -0,39$ ($p=0,19$; Abb. 22, A). Für Vincristin wurde ebenfalls ein klarer Trend in der Korrelation mit der mRNA-Induktion von *IL6* ($p=0,40$; Abb. 22, C) und *NFKBIZ* ($p=0,08$; Abb. 22, F) gesehen. Das Ansprechen der CLL-Zellen auf Bendamustin zeigte bei den Proben unbehandelter Patienten keine relevante Korrelation mit der Geninduktion in EL08-1D2-Zellen (Abb. 22, B und E).

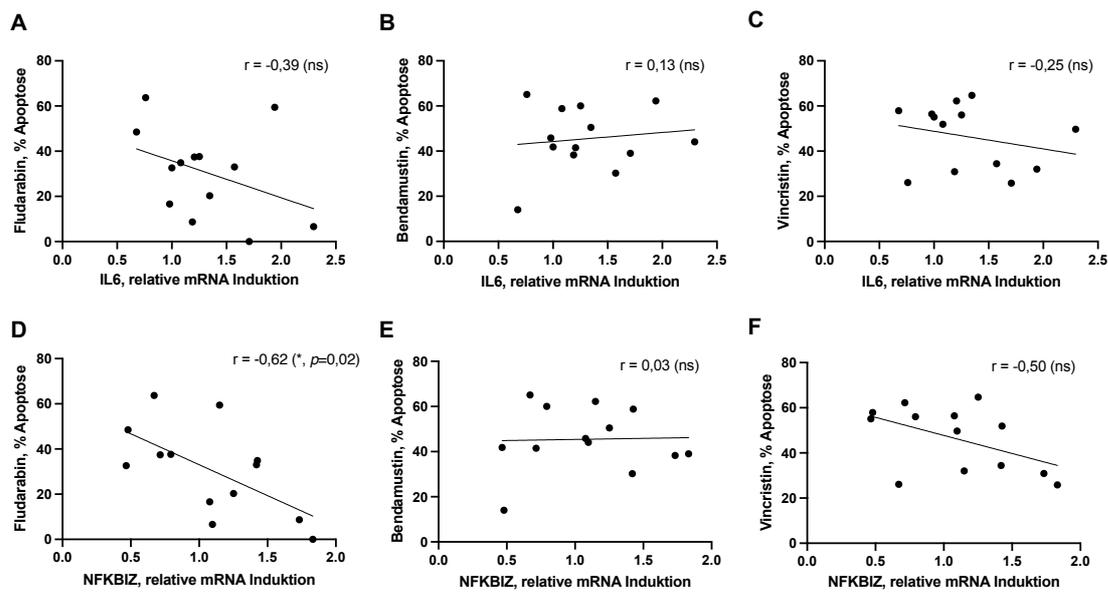


Abb. 22. Korrelation – unbehandelte Patienten. A-C zeigt die Korrelation zwischen der mRNA-Induktion von *IL6* und den Annexin V/PI-positiven Zellen nach Behandlung mit Fludarabin (A), Bendamustin (B) und Vincristin (C). D-E zeigt die Korrelation zwischen der mRNA-Induktion von *NFKB1Z* und den Annexin V/PI-positiven Zellen nach Behandlung mit Fludarabin (D), Bendamustin (E) und Vincristin (F). ns= nicht signifikant; * $p=0,02$.

In der vorbehandelten Subgruppe lagen $n = 45$ CLL-Proben mit beiden Datensätzen vor (Abb. 23). Hier wurde für Fludarabin eine deutlich geringere Korrelation als bei den unbehandelten Patienten gesehen [Abb. 23, A ($p=0,54$) und D ($p=0,16$)]. Für Bendamustin zeigte sich ein Trend [Abb. 23, B ($p=0,06$) und E ($p=0,24$)], jedoch ohne statistische Signifikanz. Für das Ansprechen der CLL-Zellen auf Vincristin war der Trend eines negativen Korrelationskoeffizienten aus der therapienaiven Kohorte ebenfalls nicht mehr nachzuvollziehen [Abb. 23, C ($p=0,36$) und F ($p=0,91$)].

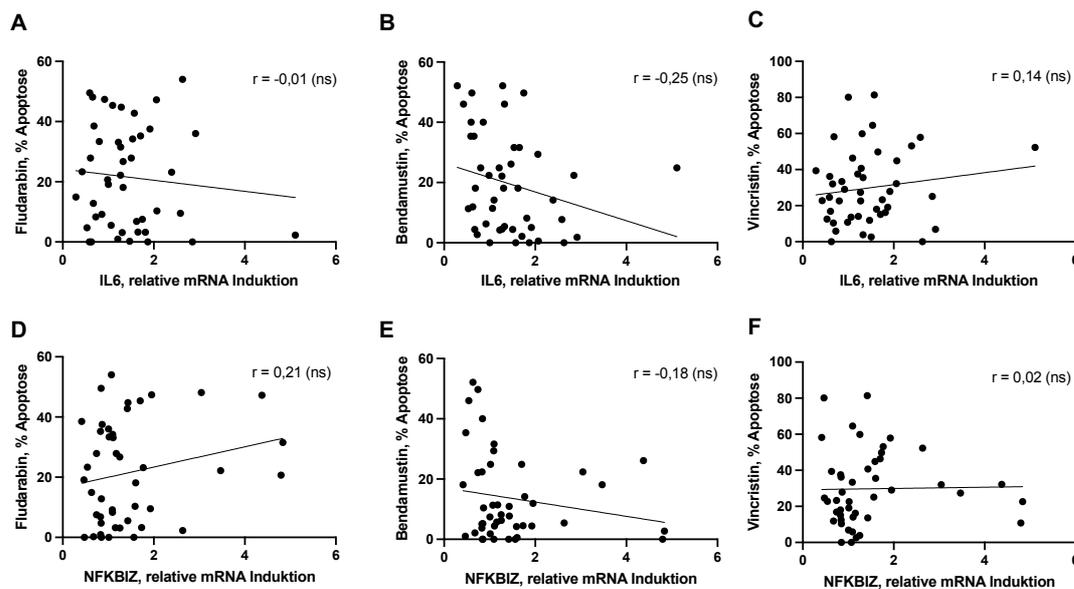


Abb. 23. Korrelation – behandelte Patienten. A-C zeigt die Korrelation zwischen der mRNA-Induktion von *IL6* und den Annexin V/PI-positiven Zellen nach Behandlung mit Fludarabin (A), Bendamustin (B) und Vincristin (C). D-E zeigt die Korrelation zwischen der mRNA-Induktion von *NFKBIZ* und den Annexin V/PI-positiven Zellen nach Behandlung mit Fludarabin (D), Bendamustin € und Vincristin (F). ns= nicht signifikant.

Interessanterweise sahen wir demnach bei Patienten, die eine Behandlung erhielten, einen weniger ausgeprägter Zusammenhang zwischen dem Ansprechen der CLL-Zellen auf eine Chemotherapie und der Induktion von *IL6* und *NFKBIZ* in EL08-1D2-Zellen. Bei den Proben therapienaiver Patienten hingegen, zeigte sich der erwartete EMDR-Effekt eindeutig, dass mit stärkerer Stroma-Aktivierung eine geringere Therapiesensitivität korreliert.

5.7.2 Korrelation bei Hochrisiko-Patienten

Als nächstes wurde die Frage gestellt, ob zytogenetische Veränderungen, die bei Patienten mit einer rascheren Krankheitsprogression und schlechterem Outcome assoziiert sind, sich in diesem Modell auf den Zusammenhang zwischen dem Ansprechen der CLL-Zellen und der Geninduktion in den Stromazellen auswirken. Bei $n = 9$ Patienten mit einer Hochrisiko-Konstellation lagen $n = 22$ Proben mit sowohl Daten zum Ansprechen der CLL-Zellen auf die verschiedenen Substanzen als auch die Geninduktion von *IL6* und *NKFBIZ* in EL08-1D2-Zellen vor. Interessanterweise

zeigte sich hier entweder keine Korrelation ($r \approx 0$) oder ein Korrelationskoeffizient $r > 0$.

Für den Zusammenhang zwischen dem Ansprechen der CLL-Zellen auf Bendamustin ($r = 0,51$, $p=0,01$) und Fludarabin ($r = 0,44$, $p=0,04$) mit der *NFKB1Z*-Expression in EL08-1D2, war r statistisch signifikant.

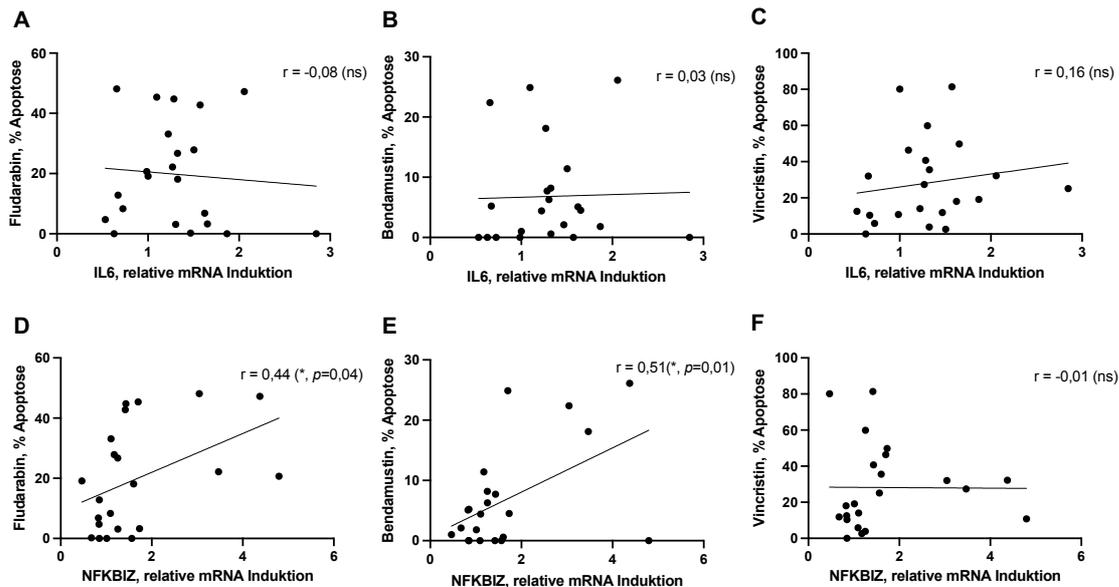


Abb. 24. Korrelation – Hochrisiko-Patienten. A-C zeigt die Korrelation zwischen der mRNA-Induktion von *IL6* und den Annexin V/PI-positiven Zellen in % nach Behandlung mit Fludarabin (A), Bendamustin (B) und Vincristin (C). D-E zeigt die Korrelation zwischen der mRNA-Induktion von *NFKB1Z* und den Annexin V/PI-positiven Zellen in % nach Behandlung mit Fludarabin (D), Bendamustin (E) und Vincristin (F). ns= nicht signifikant, (D) * $p=0,04$; (E) * $p=0,01$.

Bei Patienten mit Hochrisiko-Zytogenetik zeigte sich paradoxerweise eine höhere Sensitivität gegenüber der Behandlung mit dem Zytostatikum bei stärkerer Expression von *NFKB1Z* (Abb. 24, D und E).

Zusammenfassend konnten wir in unserem Modell unsere Hypothese nicht ausreichend bestätigen. Wir sahen zwar, dass bei nicht vortherapierten Proben eine höhere Aktivierung der Stromazellen mit einer geringeren Ansprechrate auf die Therapie einherging, allerdings war dieser Effekt, entgegen unserer Erwartung, bei vorbehandelten oder Hochrisiko-Patienten nicht vorhanden. Eine geringere Sensitivität gegenüber der Chemotherapie, die wir bei diesen Proben messen konnten, konnte nicht durch stärkere Aktivierung der Stromazellen, also einem EMDR Effekt, erklärt werden.

6 Diskussion

Für Patienten mit der Diagnose einer CLL gibt es heutzutage eine Vielzahl an Therapieoptionen (Burger et al., 2015; Fischer et al., 2019; Goede et al., 2014; Hallek et al., 2010; Shanafelt et al., 2019; Woyach et al., 2018). Obwohl die CLL als sehr gut behandelbare maligne Erkrankung gilt, ist eine Heilung nach heutigem Stand nur durch eine allogene Stammzelltransplantation möglich. Diese ist jedoch mit einer hohen therapieassoziierten Mortalität verbunden und stellt insbesondere für ältere Patienten meistens keine Option in der Behandlung der CLL dar (Dreger et al., 2005), weshalb die Indikation hierfür bei CLL immer seltener wird (Passweg et al., 2016). In der Erstlinie gelingt es in den meisten Fällen eine Remission zu erzielen, im Rezidiv kommt es jedoch, insbesondere bei Patienten mit Hochrisiko-Konstellation, zu Resistenzen gegenüber vorherigen Therapien (Hallek et al., 2010). Resistenzentwicklung stellt weiterhin eine relevante klinische Herausforderung dar. Ein wichtiger Faktor, der Resistenzen begünstigen kann, ist die Interaktion der CLL-Zellen mit dem TME (Kurtova et al., 2009; Park et al., 2020). Die Hypothese dieser Arbeit war, dass klinisch etablierte Faktoren, die einen ungünstigen Krankheitsverlauf vorhersagen können, sich unterschiedlich auf die Interaktion zwischen CLL und TME auswirken. Die Frage war, ob vorherige Therapien – als bekannter Treiber für klonale Evolution in der CLL (Landau et al., 2015) – und zytogenetische Aberrationen in einem ex-vivo Modell zu unterschiedlich stark ausgeprägter EMDR führen und ob diese durch eine verstärkte Aktivierung des TME quantifiziert werden kann. Um diese Hypothese an Patientenproben untersuchen zu können, haben wir ein Co-Kultur-System gewählt, in dem primäre CLL-Zellen kultiviert werden können. Wir konnten zeigen, dass es sich um ein robustes System handelt, in dem CLL-Zellen durch Co-Kultur mit EL08-1D2-Zellen am Leben erhalten und Effekte durch Behandlung mit verschiedenen Substanzen untersucht werden können. Wir konnten eine gute Wirksamkeit der Substanzen in der gewählten Dosierung zeigen, da in der Co-Kultur ohne Hinzugabe einer zytotoxischen Therapie nur 16,6% der CLL-Zellen in Apoptose waren. Eine wichtige Beobachtung war, dass CLL-Zellen von bereits behandelten Patienten in der Co-Kultur schlechter auf Chemotherapie mit Vincristin und Bendamustin angesprochen haben, als CLL-Zellen von therapienaiven Patienten. Für die beiden PKC- β -Inhibitoren sowie für Fludarabin zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied, allerdings war ein klarer Trend zum schlechteren Ansprechen vorbehandelter Proben

zu sehen. Um dieses Ergebnis zu bekräftigen wäre eine Wiederholung der Experimente mit größerer Kohorte vorbehandelter Patienten nötig. Für unser Projekt wäre es zudem interessant, Proben von Patienten zu untersuchen, die refraktär auf Zytostatika oder zielgerichtete Therapien wie BCL-2- oder BTK-Inhibitoren sind, um die Rolle der bereits verwendeten Therapie auf die EMDR besser zu verstehen. Interessanterweise konnten wir keinen signifikanten Unterschied im Ansprechen auf die Therapie im Co-Kultur-System zu den verschiedenen Zeitpunkten T1-T4 messen und somit den Effekt einer Resistenzentwicklung bei individuellen Patienten über die Zeit nicht ausreichend modellieren, obwohl dieser aus der Klinik gut bekannt ist. Eine Limitation war, dass uns für die meisten Proben nur drei Zeitpunkte zur Verfügung standen. Da die CLL meist eine sehr lange mediane Krankheitsdauer hat, wäre eine Wiederholung dieser Experimente mit einer Vielzahl an Zeitpunkten über einen Zeitraum von mehreren Jahren sinnvoll. Allerdings konnten wir zeigen, dass bei vortherapierten Patienten das Ansprechen direkt nach Erhalt der Therapie auf die konventionellen Chemotherapeutika schlechter war, als vor Beginn der CLL-Behandlung.

Aus diesen Beobachtungen können keine Rückschlüsse auf das klinische Outcome von Patienten gezogen werden. Jedoch könnten Experimente dieser Art als wissenschaftliches Begleitprojekt für eine prospektive klinische Studie dienen, mit der Frage, ob Parameter des klinischen Outcomes in einem solchen ex-vivo System bereits vorher modelliert werden können und wie deren Auswirkung auf die Interaktion mit dem TME ist. Ein solcher Ansatz wurde von Dietrich et. al gewählt, in dem 63 verschiedene Medikamente ex-vivo an CLL-Zellen getestet wurden und mit Genom- und Transkriptom-Daten korreliert wurden (Dietrich et al., 2018). Es konnte gezeigt werden, dass Ansprechen auf Zytostatika ex-vivo von einer Vielzahl von Faktoren abhängig ist und dass durch zeitgleiche Genom-, Transkriptom -und Methylierungs-Analysen funktionelle Subgruppen gebildet werden können. Zum Beispiel sahen die Kollegen, dass ein Ansprechen auf Medikamente, die in den B-Zell-Rezeptor-Signalweg eingreifen, sowohl mit dem IGHV-Status als auch mit dem Vorliegen einer Trisomie 12 korrelierte. Somit könnte es in Zukunft möglich sein, Ergebnisse aus einem präklinischen ex-vivo Screening in die Therapieentscheidung mit einzubeziehen und bereits frühzeitig eine individuelle, personalisierte Therapiestrategie zu entwerfen. Allerdings sind hierzu weitere prospektive und validierende Daten nötig.

Um Patienten mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf frühzeitig zu erkennen, werden bestimmte chromosomale Veränderungen bei CLL-Patienten routinemäßig getestet (Hallek et al., 2018). Die Deletion des langen Arms von Chromosom 13 gilt als die häufigste chromosomale Aberration in der CLL und ist mit einem günstigen Krankheitsverlauf assoziiert (Döhner et al., 2000). Auch in unserer Kohorte war die del13q die häufigste Veränderung in 58% der Patienten. Eine Trisomie 12 war bei uns bei vier Patienten (17%) nachweisbar. Die prognostische Relevanz wird unterschiedlich diskutiert, die Trisomie 12 scheint aber mit einer intermediären Prognose einherzugehen (Döhner et al., 2000; Seiffert et al., 2012). Je nach Krankheitsstadium werden 11q Deletionen in 10-25% der Patienten gefunden und gehen mit einer schnelleren Krankheitsprogression und reduziertem Gesamtüberleben einher (Döhner et al., 2000; Döhner et al., 1997; Fegan et al., 1995; Neilson et al., 1997). Mitunter die ungünstigste Prognose haben Patienten mit Mutationen in dem Tumorsuppressor *TP53*. Diese entsteht entweder durch eine del17p, welche in 5-10% der Patienten gefunden wird (Döhner et al., 2000), oder eine Mutation von *TP53*, die in 4-37% der Patienten vorliegt (Dicker et al., 2009; Malcikova et al., 2009; Trbusek et al., 2006; Zenz et al., 2008; Zenz et al., 2010). In unserer Kohorte waren bei 21% der Patienten eine del17p und/oder eine *TP53*-Mutation vorhanden. Trotz der kleinen Zahl von n = 24 Patienten bildete unsere Kohorte die in der Literatur beschriebenen zytogenetischen Aberrationen somit gut ab und darf repräsentativ angenommen werden. Wir entschieden uns deshalb, Patienten mit einer del11q, del17p oder *TP53*-Mutation der Hochrisiko-Gruppe zuzuordnen (Döhner et al., 2000). Die del11q führt zu einer Inaktivierung von *ATM*, ein Gen, das für die Serin/Threonin Kinase ATM kodiert. *ATM* wird durch DNA-Doppelstrangbrüche rekrutiert und aktiviert und führt durch Phosphorylierung verschiedener Effektor-Proteine letztlich zum Zellzyklusarrest oder sogar zur Apoptose (Lee & Paull, 2007). Sowohl die Deletion von 11q oder 17p als auch inaktivierende Mutationen von *ATM* und *TP53* sind gehäuft bei CLL-Patienten mit Resistenz gegenüber einer Chemotherapie zu finden (Puente et al., 2015).

In unserem Co-Kultur Modell konnten wir zeigen, dass CLL-Zellen von Patienten mit ungünstigen zytogenetischen Veränderungen, wie einer del17p, *TP53*-Mutation oder einer del11q, signifikant schlechter auf die Behandlung mit Fludarabin, Bendamustin und Enzastaurin angesprochen haben, als CLL-Zellen aller anderen Patienten. Für Vincristin zeigte sich ein Trend, jedoch ohne Erreichen des Signifikanzniveaus. Es handelte sich zwar zum Großteil um bereits behandelte Patienten, jedoch nicht

ausschließlich. Die aus klinischen Daten bekannte Resistenz gegenüber einer Chemotherapie bei diesen Patienten (Nadeu et al., 2016) konnte demnach in unserem Modell gut gezeigt werden. Diese Aussage ist durch die kleine Fallzahl limitiert. Wir können zudem nur korrelative Daten aus unseren ex-vivo Experimenten ziehen, jedoch keine mechanistische Aussage treffen. Um den Einfluss einzelner Mutationen besser untersuchen zu können, könnte eine direkte Manipulation der CLL-Zellen dienen. Bisher gelang es häufig nicht, das Genom primärer CLL-Zellen stabil zu verändern (Seiffert et al., 2007) und Ansätze mit viraler Transfektion primärer CLL-Zellen waren häufig zu toxisch und hatten eine schlechte Effizienz (Cantwell et al., 1996). Somit wurde oft auf Zelllinien oder Mausmodelle zurückgegriffen, um mechanistische Experimente durchzuführen (Bichi et al., 2002). Rezent gelang es primäre maligne B-Zellen zu transfizieren und somit genetisch zu modifizieren (Mangolini et al., 2022). Mittels veränderten Virushüllen von Gammaretroviren (Gibbonaffen-Leukämievirus) wurde eine effiziente Transduktion mit niedriger Toxizität erreicht. Mit Hilfe dieser Methode könnten unsere Experimente wiederholt werden, indem primäre CLL-Zellen erst genetisch alteriert und dann in unserem Co-Kultur-Modell untersucht werden. Dadurch wäre es möglich den Effekt einzelner Mutationen auf die EMDR genauer zu untersuchen. Interessanterweise zeigte sich bei CLL-Proben von Hochrisiko-Patienten auch ein schlechteres Ansprechen nach Behandlung mit dem PKC- β -Inhibitor Enzastaurin. Ob CLL-Patienten mit aggressiverer Tumorbilogie im Sinne einer del11q oder del17p schlechter auf Enzastaurin ansprechen, ist uns nicht bekannt. Das TME als medikamentöses Ziel in der CLL ist jedoch vielversprechend, wie in einer Arbeit von Park et al gezeigt werden konnte. PKC- β -Inhibitoren führten in-vivo zur erhöhten Wirksamkeit von Zytostatika, indem Überlebenssignale aus dem TME antagonisiert wurden (Park et al., 2020). Insbesondere bei Patienten mit hohem Risiko für einen ungünstigen Krankheitsverlauf könnte eine solche Kombinationstherapie von Vorteil sein.

Durch das Aufkommen moderner Sequenzierungsmethoden konnte gezeigt werden, dass insbesondere bei hämatologischen Erkrankungen genetische Veränderungen im Krankheitsverlauf auftreten und teilweise zu einem neuen Phänotyp führen können (Ahn et al., 2017; Bagnara et al., 2006; Landau et al., 2013; Ding et al., 2012; Gunnarsson et al., 2011; Mullighan et al., 2008). Die Resistenzentwicklung von Tumorzellen nach antineoplastischer Therapie stellt eine der größten Herausforderungen im klinischen Alltag bei der Behandlung von Krebspatienten dar.

Das Konzept der klonalen Evolution liefert einen Erklärungsansatz für den Mechanismus von Resistenzentwicklung auf bestimmte Therapeutika. Außerdem kann der Prozess der klonalen Evolution durch die Therapie selbst beschleunigt werden. Es gibt verschiedene Erklärungsansätze für das Entstehen einer klonalen Evolution: durch genotoxische Chemotherapie können Mutationen in den Tumorzellen induziert werden und somit eine aggressivere Erkrankung begünstigen (Wu, 2012). Durch Chemotherapie könnte jedoch auch ein bereits gegenüber der Therapie resistenter Klon selektioniert werden und somit im Rezidiv der prädominante Klon mit aggressiverem Krankheitsverlauf werden. Ein dritter Ansatz ist, dass durch das Entfernen kompetitiver Subklone nach einer Chemotherapie, ein potenterer Klon selektioniert werden kann, da für diesen Klon nun bessere Bedingungen herrschen (Landau et al., 2013). Alle drei Erklärungsansätze führen zu einer aggressiveren Erkrankung im Verlauf und unterstützen die Rationale einer initialen „watch & wait“ Strategie. Leider lagen uns keine Daten über den longitudinalen Verlauf der genetischen Veränderungen eines Patienten vor. Es wurde zwar in dem Beobachtungszeitraum mit bis zu 4 verschiedenen Zeitpunkten (T1-T4) kein Unterschied im Ansprechen auf die Chemotherapie im Verlauf der Patienten gesehen, wenn alle Patienten verglichen wurden, allerdings konnten wir bei CLL-Zellen vorbehandelter Patienten ein schlechteres Ansprechen in unserem ex-vivo Modell sehen. Ein Erklärungsansatz hierfür wäre, dass nach Beginn der CLL-Behandlung, bei diesen Patienten ein resistenterer Klon vorlag. Auch die Beobachtung, dass die CLL-Zellen der vorbehandelten Kohorte weniger sensitiv gegenüber Bendamustin und Vincristin waren, könnte hierdurch erklärt werden. Es wäre interessant zu wissen ob sich der Genotyp der CLL-Proben dieser Patienten vor und nach der Therapie verändert hat. Eine weitere Möglichkeit, um diese Experimente durchzuführen, wäre die bereits beschriebene direkte Manipulation von primären CLL-Zellen (Mangolini et al., 2022) um den Einfluss klonaler Evolution im zeitlichen Verlauf zu modellieren. Analog dazu sollten sequentielle Proben von Patienten, die einer klonalen Evolution unterlaufen sind, in diesem Co-Kultur-Modell untersucht werden. Hierzu wäre allerdings eine molekular- und zytogenetische Analyse der einzelnen Proben von individuellen Patienten über einen längeren Zeitraum nötig, was weiterhin mit hohen Kosten verbunden ist.

In den letzten Jahrzehnten wurde gezeigt, dass Tumorzellen in einer ständigen Kommunikation mit dem TME stehen und hierdurch sowohl Überlebensvorteile als

auch Resistenzmechanismen entstehen können (Hanahan & Coussens, 2012; Meads et al., 2009). Der EMDR-Effekt wurde im Kontext der CLL bereits früh beschreiben. (Burger et al., 2005; Kurtova et al., 2009). Ein verdeutlichendes Experiment für dieses Phänomen war, dass CLL-Zellen ex-vivo apoptotisch werden, jedoch in Anwesenheit von verschiedenen Stromazellen kultiviert werden können (Burger et al., 2000; Ding et al., 2009). Den protektiven Effekt der Co-Kultur konnten wir in diesem Modell mehrfach zeigen. Die Frage nach der Interaktion von CLL-Zellen mit dem TME im zeitlichen Verlauf wurde in unserem Modell deskriptiv, anhand der Induktion von *IL6* und *NFKBIZ* in EL08-1D2-Zellen nach Kontakt mit CLL-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten beschrieben. Wir konnten eine erhöhte Expression beider Gene in den EL08-1D2-Zellen nach 96 h Kontakt mit CLL-Zellen sehen. Allerdings zeigte sich im Verlauf in den verschiedenen Gruppen (therapienaiv, vortherapiert, Hochrisiko, Niedrig- und Intermediärrisiko) kein relevanter Unterschied der relativen mRNA-Induktion von *IL6* und *NFKBIZ* in den Stromazellen. Also konnte anhand der Induktion dieser beiden Gene kein relevanter Unterschied in der Interaktion von CLL-Zellen mit EL08-1D2-Zellen im Verlauf der Erkrankung gemessen werden. Da wir uns in dieser Arbeit nur auf die zwei Gene beschränkt haben, wird diese Aussage abgeschwächt. Eine Genomanalyse oder ein Panel mit mehreren Genen könnte dennoch ein Muster liefern. Zudem testeten wir die mRNA-Induktion beider Gene nur in einer Zelllinie, wobei das TME wesentlich komplexer ist. CLL-Zellen interagieren neben Stromazellen mit diversen Zellen der myeloischen Reihe, die sich zum Teil auch durch den Kontakt mit den CLL-Zellen verändern. Die sogenannten Nurse-like Zellen (NLC) entstehen aus Monozyten. NLC können aus Monozyten nach 7-14 d Co-Kultur mit CLL-Zellen generiert werden und spielen eine wichtige Rolle durch Sekretion verschiedener Chemo- und Zytokine wie CXCL12, BAFF, und APRIL (Nishio et al., 2005). Durch Expression der Chemokine CCL3 und CCL4, welche unter anderem durch NLC entstehen, können weitere Bestandteile des TME wie T-Zellen und weitere Monozyten angelockt werden (Burger et al., 2009). Auch T-Zellen selbst können Überlebenssignale und einen Schutz vor zytotoxischer Therapie ermöglichen (Bagnara et al., 2011; Patten et al., 2008). In unseren Experimenten wurde die Zelllinie EL08-1D2 verwendet, welche von Oostendorp et. al. im Jahr 2002 beschrieben wurde (Oostendorp, 2002). Bereits 2009 konnten Ding et al. zeigen, dass die Interaktion von CLL-Zellen mit mesenchymalen Stromazellen (MSC) bidirektional ist. Sie fanden eine verstärkte Expression und Aktivierung verschiedener Oberflächenmarker (CD38,

CD25, CD71, CD69, CD70) nach Co-Kultur in den CLL-Zellen. Zudem zeigte sich bereits nach 30 min eine Phosphorylierung von ERK und AKT in den MSCs, als Indikator einer Aktivierung der Stromazellen. So konnte bereits eine durch MSC vermittelte Resistenz gegenüber Fludarabin gezeigt werden (Ding et al., 2009). Eine Wiederholung mit verschiedenen Zelllinien wäre somit sinnvoll, um die Antwort des TME nach CLL-Kontakt im zeitlichen Verlauf zu untersuchen. Lutzny et al. zeigten, dass B-Zellen von CLL-Patienten in Stromazellen eine PKC- β II-Expression induzieren und dadurch den NF- κ B Signalweg aktivieren. Nach PKC- β II-Knockdown durch Transfektion von EL08-1D2-Zellen mit small interfering (si)RNA, zeigten CLL-Zellen eine deutlich geringere Viabilität nach Co-Kultur mit den transfizierten EL08-1D2, als mit Stromazellen ohne PKC- β II-Knockdown. Auch Stromazellen aus PKC- β -Knockout (KO)-Mäusen (PKC- $\beta^{-/-}$) lieferten einen geringeren protektiven Effekt für CLL-Zellen als Stromazellen aus PKC- β -Wildtyp (WT)-Mäusen (PKC- $\beta^{+/+}$). In Stromazellen von PKC- $\beta^{-/-}$ -Mäusen sowie in EL08-1D2-Zellen nach PKC- β II-Knockdown konnte keine Aktivierung von NF- κ B gemessen werden. Zuletzt wurde gezeigt, dass es bei PKC- $\beta^{-/-}$ -Mäusen nach Transplantation von CD5+/CD19+ Lymphom-Zellen, die aus transgenen Mäusen gewonnen wurden, nicht zu einer CLL-ähnlichen Erkrankung kam. PKC- $\beta^{+/+}$ -Mäuse, die mit den Lymphom-Zellen der transgenen Mäuse transplantiert wurden, entwickelten hingegen eine Erkrankung mit Nachweis von CD5+/CD19+ Zellen im peripheren Blut. Somit konnte diese Arbeit zeigen, dass die Aktivierung der Stromazellen durch Interaktion mit den CLL-Zellen essentiell für deren Überleben ist (Lutzny et al., 2013). Basierend auf diesen Daten entschieden wir uns die PKC- β -Inhibitoren Enzastaurin und AEB (=Sotrastaurin) in unserer Co-Kultur zu testen. Beide Medikamente konnten den protektiven Effekt von EL08-1D2-Zellen zum Teil überkommen. Wir konnten sehen, dass Patienten der Hochrisiko-Gruppe schlechter auf Enzastaurin angesprochen haben. Ob Patienten bereits eine Therapie erhalten hatten, spielte keine signifikante Rolle hinsichtlich des Ansprechens auf die PKC- β -Inhibitoren. Die Wirkung von Medikamenten, die in die TME/Tumor-Interaktion eingreifen, erfolgt unter anderem über eine Antagonisierung von stromalen Signalen, die zur EMDR führen. Stromale PKC- β -Signalisierung ist essentiell für die EMDR in der CLL (Park et al., 2020). In einer Co-Kultur von primären CLL-Zellen mit PCK- β WT oder KO MSCs konnte gesehen werden, dass die protektiven Effekte des TME auf zytotoxischen Stress durch Fludarabin, Bendamustin Venetoclax, Idelalisib oder Ibrutinib in Abwesenheit von PKC- β nicht vorhanden waren. Darüber hinaus konnte

gezeigt werden, dass CLL-Zellen durch eine zusätzliche Behandlung mit einer niedrigen Dosis Enzastaurin, die so gering war, dass sie nicht zytotoxisch war, zu erhöhter Wirksamkeit von Fludarabin, Bendamustin und Venetoclax führte. Somit konnte durch die medikamentöse Inhibition von PKC- β durch Enzastaurin der Phänotyp von PKC- β KO Stromazellen kopiert werden. Mechanistisch scheint die durch stromale PKC- β vermittelte EMDR über eine post-transkriptionelle Regulation von BCL-X_L in CLL-Zellen zu funktionieren. Auch im Mausmodell bestätigte sich der Effekt, dass durch PKC- β -Inhibitoren die EMDR ausgeschaltet werden kann und dadurch eine erhöhte Wirksamkeit mit zytostatischen Medikamenten erreicht werden kann. Wie auch bei unseren Experimenten wurden in dieser Arbeit für Co-Kultur mit Primärmaterial eine Zelllinie verwendet um das TME zu untersuchen. Auf Grund der komplexen Struktur des TME liegt es nahe, dass es sich bei den PKC- β vermittelten Überlebensvorteilen für CLL-Zellen um einen dynamischen Prozess handelt und dass sich die Interaktion im Verlauf der Erkrankung ändern kann. Eine erneute Experimentreihe mit sequentiellen Proben nach Therapie-getriebener klonaler Evolution mit PKC- β -Inhibition und zytotoxischer Therapie wäre also sehr interessant, um zu verstehen, ob klinische Parameter wie Vortherapie oder die Biologie der Erkrankung selbst sich auf diese Interaktion auswirkt. Auch andere Medikamente, die bereits im klinischen Einsatz sind, greifen zusätzlich zu ihrer zytotoxischen Wirkung in den CLL-Zellen, auch in Signalwege des TME ein (Fiorcari et al., 2016; Herman et al., 2015).

Klinisch relevante Parameter, wie eine vorherige Therapie oder eine Hochrisiko-Zytogenetik hatten Einfluss auf das Ansprechen auf die Therapie in unserem Modell. Für jede Probe hatten wir sowohl den Parameter der Sensibilität auf die Therapie als auch die mRNA-Induktion von *IL6* und *NFKBIZ* in den EL08-1D2-Zellen nach Kontakt mit derselben Probe. Zudem ist bekannt, dass bestimmte Veränderungen wie del11q oder del17p/*TP53*-Mutation die CLL-Zellen selbst unempfindlicher gegenüber einer Chemotherapie machen können (Nadeu et al., 2016; Neilson et al., 1997; Zenz et al., 2008). Wie sehr die Aktivierung von EL08-1D2-Zellen nach Kontakt mit CLL-Zellen und die Empfindlichkeit gegenüber einer zytotoxischen Therapie in unserem Modell miteinander zusammenhängen, haben wir in den verschiedenen Subgruppen dieser Kohorte korreliert. Bei Patienten ohne vorherige Therapie zeigte sich für Fludarabin und Vincristin ein negativer Korrelationskoeffizient r . Hier ging eine höhere Resistenz der CLL-Zellen gegenüber der Chemotherapie mit einer stärkeren Induktion von *IL6*

oder *NFKBIZ*, also einer vermehrten EMDR durch EL08-1D2-Zellen einher. Für Fludarabin und *NFKBIZ* war diese Korrelation signifikant. Dieser Zusammenhang ließ sich bei vorbehandelten Patienten nur abgeschwächt nachvollziehen. Hier war r für Fludarabin und Vincristin nahe null oder positiv. Interessanterweise ließ sich bei Bendamustin kein Trend erkennen. Bei den Hochrisiko-Patienten zeigte sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen stärkerer Geninduktion der Stromazellen und geringerem Ansprechen der CLL-Zellen auf die zytostatische Behandlung ex-vivo. Wir hatten nach unserer Hypothese erwartet, dass es im Verlauf der Erkrankung zur stärkeren Aktivierung des TME kommt und dass dadurch eine Resistenzentwicklung erfolgt. Diesen Effekt konnten wir mit diesem Modell nicht zeigen. Allerdings hat das Modell, wie bereits beschrieben, einige Limitationen. Beispielsweise könnten durch eine breitere Messung der induzierten Gene in den Stromazellen Effekte gesehen werden, die wir nicht erfasst haben. Auch die Dosierung der Chemotherapeutika hatte Limitationen, da sie eingangs fest definiert wurde. Es wäre sinnvoll, für jede Probe verschiedene Dosierungen zu wählen, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erlangen. Bei Hochrisiko-Patienten zeigte sich paradoxerweise eine signifikante positive Korrelation der mRNA-Level von *NFKBIZ* und dem Ansprechen auf Fludarabin und Bendamustin. Trotz geringer Induktion beider Gene in den Stromazellen, zeigte sich hier kaum ein Effekt der zytotoxischen Therapie. Eine Hypothese hierfür ist, dass der intrinsische anti-apoptische Effekt der CLL-Zellen primär durch die vorhandenen Mutationen in z.B. *TP53* kommt und dass die Interaktion mit dem TME weniger für das Überleben der CLL benötigt wird. Allerdings führte das in diesen Proben nicht zu einem Überleben ex-vivo in Monokultur. Somit ist das nur als Hypothese formulierbar und kann anhand dieser Daten nicht gezeigt werden, zumal hier nur eine sehr kleine Fallzahl vorliegt. Dennoch wäre diese Fragestellung für nachfolgende Experimente mit Proben von Hochrisiko-Patienten interessant.

Ob eine klonale Evolution in dem beobachteten Zeitraum stattgefunden hat, ist uns leider nicht bekannt, anhand der von uns beschriebenen Veränderungen der CLL/Stroma-Interaktion und der bekannten Häufigkeit einer klonalen Evolution bei Patienten mit einer CLL (Landau et al., 2013), können wir diese Vermutung jedoch aufstellen. Trotz den beschriebenen Limitationen konnten wir ein robustes System beschreiben, in dem CLL-Zellen kultiviert und hinsichtlich der EMDR untersucht werden können. Wir konnten zeigen, dass klinische Parameter wie Vorbehandlung oder Hochrisiko-Zytogenetik zur Abnahme der Chemosensitivität ex-vivo führen.

Außerdem sahen wir, dass ein Ansprechen auf Chemotherapie in der Co-Kultur mit der Aktivierung des TME korreliert und dass die klinischen Parameter hier ebenfalls zu relevanten Unterschieden führen. Abschließend wurde die Hypothese formuliert, dass CLL-Zellen mit Schlüssel-Mutationen weniger stark mit Stromazellen in Interaktion treten müssen, um zu überleben.

7 Zusammenfassung

In diesem Projekt untersuchten wir den Einfluss verschiedener klinischer Faktoren von CLL-Patienten auf die Interaktion von CLL-Zellen mit Stromazellen des TME. Hierfür bedienten wir uns einem Co-Kultur Modell, in dem sequentielle CLL-Zellen von n = 24 Patienten mit insgesamt n = 65 Proben mit EL08-1D2-Zellen inkubiert wurden. Durch Behandlung mit fünf verschiedenen Substanzen, haben wir die Sensitivität der CLL-Zellen gegenüber den Chemotherapeutika Fludarabin, Bendamustin und Vincristin sowie den PKC- β -Inhibitoren Enzastaurin und AEB beschrieben und mit den klinischen Parametern korreliert. Zudem wurden EL08-1D2 nach Co-Kultur mit CLL-Zellen hinsichtlich der Genexpression von *IL6* und *NFKBIZ* untersucht. Wir konnten zeigen, dass Patienten, die bereits eine Therapie für die CLL erhalten hatten, schlechter auf zytostatische Behandlung ex-vivo angesprochen haben, als therapienaive Patienten. Bei den vorbehandelten Patienten ließ sich darüber hinaus ein schlechteres Ansprechen nach Beginn der CLL-Therapie messen. Zudem sahen wir ein schlechteres Ansprechen der CLL-Zellen von Patienten der Hochrisiko-Gruppe. Durch Kontakt mit den CLL-Zellen wurde die Genexpression von *IL6* und *NFKBIZ* in den EL08-1D2 induziert, änderte sich jedoch nicht relevant im beobachteten Zeitraum. Das Ansprechen der CLL-Zellen auf die zytostatische Therapie korrelierte bei unbehandelten Patienten mit verstärkter Genexpression von *IL6* und *NFKBIZ* der EL08-1D2-Zellen. Bei Patienten mit Hochrisiko-Zytogenetik sahen wir diesen Effekt umgekehrt, so dass wir die Hypothese formulierten, dass diese Zellen durch Zugewinn elementarer Treibermutationen in TP53 oder *ATM* weniger auf das TME angewiesen sein könnten.

8 Ausblick

Um die aufgestellten Hypothesen weiter zu prüfen sollten in nachfolgenden Experimenten zunächst Proben von Patienten mit einer CLL über einen Zeitraum von mehreren Jahren gesammelt und zyto- sowie molekulargenetisch analysiert werden. Dazu parallel würden wir CLL-Zellen wie beschrieben direkt genetisch modifizieren (Mangolini et al., 2022). Dadurch könnte klinisch relevante Aberrationen und deren Auswirkung auf die CLL/TME-Interaktion mechanistisch genauer charakterisiert werden. Methodisch sollte ein Ansatz gewählt werden, der eine parallele Analyse von mehreren Medikamenten und deren Kombinationen an einer größeren Kohorte zulässt (Dietrich et al., 2018). Insbesondere Kombinationen mit PKC- β -Inhibitoren zur Überwindung der EMDR wären von Interesse (Park et al., 2020). Durch diese Ansätze wäre es möglich die Hypothese zu testen, ob klonale Evolution und bestimmte Schlüssel-Mutationen zu einer autonomeren Biologie der CLL-Zellen führen und ob die Abhängigkeit der CLL/TME-Interaktion dadurch abnimmt.

9 Dank

Ich möchte zunächst Ingo Ringshausen für die stets geduldige und gute Betreuung danken. Besonderer Dank außerdem gilt Madlen Oelsner, Frederik Götte und Constanze Weber. Zudem danke ich Jan Dürig für die Bereitstellung und klinische Datenerhebung der CLL-Proben, ohne die das Projekt nicht möglich gewesen wäre. Zhaojun Zhu danke ich für Unterstützung in den letzten Jahren. Abschließend danke ich meinen Eltern, die mich mein bisheriges Leben in allen Kräften unterstützt haben.

10 Referenzen

- Ahn, I. E., Underbayev, C., Albitar, A., Herman, S. E. M., Tian, X., Maric, I., Arthur, D. C., Wake, L., Pittaluga, S., Yuan, C. M., Stetler-Stevenson, M., Soto, S., Valdez, J., Nierman, P., Lotter, J., Xi, L., Raffeld, M., Farooqui, M., Albitar, M., & Wiestner, A. (2017). Clonal evolution leading to ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *129*(11), 1469-1479.
- Bagnara, D., Callea, V., Stelitano, C., Morabito, F., Fabris, S., Neri, A., Zanardi, S., Ghiotto, F., Ciccone, E., Grossi, C. E., & Fais, F. (2006). IgV gene intraclonal diversification and clonal evolution in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, *133*(1), 50-58.
- Bagnara, D., Kaufman, M. S., Calissano, C., Marsilio, S., Patten, P. E., Simone, R., Chum, P., Yan, X. J., Allen, S. L., Kowitz, J. E., Baskar, S., Rader, C., Mellstedt, H., Rabbani, H., Lee, A., Gregersen, P. K., Rai, K. R., & Chiorazzi, N. (2011). A novel adoptive transfer model of chronic lymphocytic leukemia suggests a key role for T lymphocytes in the disease. *Blood*, *117*(20), 5463-5472.
- Balkwill, F. R., Capasso, M., & Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci*, *125*(Pt 23), 5591-5596.
- Bichi, R., Shinton, S. A., Martin, E. S., Koval, A., Calin, G. A., Cesari, R., Russo, G., Hardy, R. R., & Croce, C. M. (2002). Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(10), 6955-6960.
- Binet, J. L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Pigué, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., Thomas, M., Tchernia, G., Jacquillat, C., Boivin, P., Lesty, C., Duault, M. T., Monconduit, M., Belabbès, S., & Gremy, F. (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, *48*(1), 198-206.
- Burger, J. A., & Gribben, J. G. (2014). The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol*, *24*, 71-81.
- Burger, J. A., Quiroga, M. P., Hartmann, E., Bürkle, A., Wierda, W. G., Keating, M. J., & Rosenwald, A. (2009). High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurse-like cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood*, *113*(13), 3050-3058.
- Burger, J. A., Tedeschi, A., Barr, P. M., Robak, T., Owen, C., Ghia, P., Bairey, O., Hillmen, P., Bartlett, N. L., Li, J., Simpson, D., Grosicki, S., Devereux, S., McCarthy, H., Coutre, S., Quach, H., Gaidano, G., Maslyak, Z., Stevens, D. A., Janssens, A., Offner, F., Mayer, J., O'Dwyer, M., Hellmann, A., Schuh, A., Siddiqi, T., Polliack, A., Tam, C. S., Suri, D., Cheng, M., Clow, F., Styles, L., James, D. F., & Kipps, T. J. (2015). Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, *373*(25), 2425-2437.
- Burger, J. A., Tsukada, N., Burger, M., Zvaifler, N. J., Dell'Aquila, M., & Kipps, T. J. (2000). Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*, *96*(8), 2655-2663.
- Burger, M., Hartmann, T., Krome, M., Rawluk, J., Tamamura, H., Fujii, N., Kipps, T. J., & Burger, J. A. (2005). Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor

- (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, *106*(5), 1824-1830.
- Cantwell, M. J., Sharma, S., Friedmann, T., & Kipps, T. J. (1996). Adenovirus vector infection of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, *88*(12), 4676-4683.
- CLL-IPI-working-group. (2016). An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*, *17*(6), 779-790.
- Clodi, K., Kliche, K. O., Zhao, S., Weidner, D., Schenk, T., Consoli, U., Jiang, S., Snell, V., & Andreeff, M. (2000). Cell-surface exposure of phosphatidylserine correlates with the stage of fludarabine-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and expression of apoptosis-regulating genes. *Cytometry*, *40*(1), 19-25.
- Crump, M., Leppä, S., Fayad, L., Lee, J. J., Di Rocco, A., Ogura, M., Hagberg, H., Schnell, F., Rifkin, R., Mackensen, A., Offner, F., Pinter-Brown, L., Smith, S., Tobinai, K., Yeh, S.-P., Hsi, E. D., Nguyen, T., Shi, P., Hahka-Kemppinen, M., Thornton, D., Lin, B., Kahl, B., Schmitz, N., Savage, K. J., & Habermann, T. (2016). Randomized, Double-Blind, Phase III Trial of Enzastaurin Versus Placebo in Patients Achieving Remission After First-Line Therapy for High-Risk Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, *34*(21), 2484-2492.
- in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cell*, *152*(4), 714-726.
- Demchenko, A. P. (2013). Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology*, *65*(2), 157-172.
- Dicker, F., Herholz, H., Schnittger, S., Nakao, A., Patten, N., Wu, L., Kern, W., Haferlach, T., & Haferlach, C. (2009). The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*, *23*(1), 117-124.
- Dietrich, S., Oleś, M., Lu, J., Sellner, L., Anders, S., Velten, B., Wu, B., Hüllelin, J., da Silva Liberio, M., Walther, T., Wagner, L., Rabe, S., Ghidelli-Disse, S., Bantscheff, M., Oleś, A. K., Słabicki, M., Mock, A., Oakes, C. C., Wang, S., Oppermann, S., Lukas, M., Kim, V., Sill, M., Benner, A., Jauch, A., Sutton, L. A., Young, E., Rosenquist, R., Liu, X., Jethwa, A., Lee, K. S., Lewis, J., Putzker, K., Lutz, C., Rossi, D., Mokhir, A., Oellerich, T., Zirlik, K., Herling, M., Nguyen-Khac, F., Plass, C., Andersson, E., Mustjoki, S., von Kalle, C., Ho, A. D., Hensel, M., Dürig, J., Ringshausen, I., Zapatka, M., Huber, W., & Zenz, T. (2018). Drug-perturbation-based stratification of blood cancer. *J Clin Invest*, *128*(1), 427-445.
- Ding, L., Ley, T. J., Larson, D. E., Miller, C. A., Koboldt, D. C., Welch, J. S., Ritchey, J. K., Young, M. A., Lamprecht, T., McLellan, M. D., McMichael, J. F., Wallis, J. W., Lu, C., Shen, D., Harris, C. C., Dooling, D. J., Fulton, R. S., Fulton, L. L., Chen, K., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., Magrini, V. J., Cook, L., McGrath, S. D., Vickery, T. L., Wendl, M. C., Heath, S., Watson, M. A., Link, D. C., Tomasson, M. H., Shannon, W. D., Payton, J. E., Kulkarni, S., Westervelt, P., Walter, M. J., Graubert, T. A., Mardis, E. R., Wilson, R. K., & DiPersio, J. F. (2012). Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, *481*(7382), 506-510.
- Ding, W., Nowakowski, G. S., Knox, T. R., Boysen, J. C., Maas, M. L., Schwager, S. M., Wu, W., Wellik, L. E., Dietz, A. B., Ghosh, A. K., Secreto, C. R., Medina, K. L., Shanafelt, T. D., Zent, C. S., Call, T. G., & Kay, N. E. (2009). Bi-directional activation between mesenchymal stem cells and CLL B-cells: implication for CLL disease progression. *British Journal of Haematology*, *147*(4), 471-483.

- Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Kröber, A., Bullinger, L., Döhner, K., Bentz, M., & Lichter, P. (2000). Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, *343*(26), 1910-1916.
- Döhner, H., Stilgenbauer, S., James, M. R., Benner, A., Weilguni, T., Bentz, M., Fischer, K., Hunstein, W., & Lichter, P. (1997). 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*, *89*(7), 2516-2522.
- Dores, G. M., Anderson, W. F., Curtis, R. E., Landgren, O., Ostroumova, E., Bluhm, E. C., Rabkin, C. S., Devesa, S. S., & Linet, M. S. (2007). Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *Br J Haematol*, *139*(5), 809-819.
- Dreger, P., Brand, R., Milligan, D., Corradini, P., Finke, J., Lambertenghi Delilieri, G., Martino, R., Russell, N., van Biezen, A., Michallet, M., & Niederwieser, D. (2005). Reduced-intensity conditioning lowers treatment-related mortality of allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: a population-matched analysis. *Leukemia*, *19*(6), 1029-1033.
- Erez, N., Truitt, M., Olson, P., & Hanahan, D. (2010). Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF- κ B-Dependent Manner. *Cancer Cell*, *17*(2), 135-147.
- Faul, M. M., Gillig, J. R., Jirousek, M. R., Ballas, L. M., Schotten, T., Kahl, A., & Mohr, M. (2003). Acyclic N-(azacycloalkyl)bisindolylmaleimides: isozyme selective inhibitors of PKC β . *Bioorg Med Chem Lett*, *13*(11), 1857-1859.
- Fegan, C., Robinson, H., Thompson, P., Whittaker, J. A., & White, D. (1995). Karyotypic evolution in CLL: identification of a new sub-group of patients with deletions of 11q and advanced or progressive disease. *Leukemia*, *9*(12), 2003-2008.
- Fiorcari, S., Maffei, R., Audrito, V., Martinelli, S., Ten Hacken, E., Zucchini, P., Grisendi, G., Potenza, L., Luppi, M., Burger, J. A., Deaglio, S., & Marasca, R. (2016). Ibrutinib modifies the function of monocyte/macrophage population in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*, *7*(40), 65968-65981.
- Fischer, K., Al-Sawaf, O., Bahlo, J., Fink, A. M., Tandon, M., Dixon, M., Robrecht, S., Warburton, S., Humphrey, K., Samoylova, O., Liberati, A. M., Pinilla-Ibarz, J., Opat, S., Sivcheva, L., Le Dû, K., Fogliatto, L. M., Niemann, C. U., Weinkove, R., Robinson, S., Kipps, T. J., Boettcher, S., Tausch, E., Humerickhouse, R., Eichhorst, B., Wendtner, C. M., Langerak, A. W., Kreuzer, K. A., Ritgen, M., Goede, V., Stilgenbauer, S., Mobasher, M., & Hallek, M. (2019). Venetoclax and Obinutuzumab in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *N Engl J Med*, *380*(23), 2225-2236.
- Goede, V., Fischer, K., Busch, R., Engelke, A., Eichhorst, B., Wendtner, C. M., Chagorova, T., de la Serna, J., Dilhuydy, M. S., Illmer, T., Opat, S., Owen, C. J., Samoylova, O., Kreuzer, K. A., Stilgenbauer, S., Döhner, H., Langerak, A. W., Ritgen, M., Kneba, M., Asikanius, E., Humphrey, K., Wenger, M., & Hallek, M. (2014). Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med*, *370*(12), 1101-1110.
- Gunnarsson, R., Mansouri, L., Isaksson, A., Göransson, H., Cahill, N., Jansson, M., Rasmussen, M., Lundin, J., Norin, S., Buhl, A. M., Smedby, K. E., Hjalgrim, H., Karlsson, K., Jurlander, J., Geisler, C., Juliusson, G., & Rosenquist, R. (2011). Array-based genomic screening at diagnosis and during follow-up in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, *96*(8), 1161-1169.

- Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M., Montserrat, E., Chiorazzi, N., Stilgenbauer, S., Rai, K. R., Byrd, J. C., Eichhorst, B., O'Brien, S., Robak, T., Seymour, J. F., & Kipps, T. J. (2018). iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*, *131*(25), 2745-2760.
- Hallek, M., Fischer, K., Fingerle-Rowson, G., Fink, A. M., Busch, R., Mayer, J., Hensel, M., Hopfinger, G., Hess, G., von Grünhagen, U., Bergmann, M., Catalano, J., Zinzani, P. L., Caligaris-Cappio, F., Seymour, J. F., Berrebi, A., Jäger, U., Cazin, B., Trneny, M., Westermann, A., Wendtner, C. M., Eichhorst, B. F., Staib, P., Bühler, A., Winkler, D., Zenz, T., Böttcher, S., Ritgen, M., Mendila, M., Kneba, M., Döhner, H., & Stilgenbauer, S. (2010). Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, *376*(9747), 1164-1174.
- Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, *21*(3), 309-322.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674.
- Herman, S. E., Mustafa, R. Z., Jones, J., Wong, D. H., Farooqui, M., & Wiestner, A. (2015). Treatment with Ibrutinib Inhibits BTK- and VLA-4-Dependent Adhesion of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells In Vivo. *Clin Cancer Res*, *21*(20), 4642-4651.
- Houldsworth, J., Guttapalli, A., Thodima, V., Yan, X. J., Mendiratta, G., Zielonka, T., Nanjangud, G., Chen, W., Patil, S., Mato, A., Brown, J. R., Rai, K., Chiorazzi, N., & Chaganti, R. S. (2014). Genomic imbalance defines three prognostic groups for risk stratification of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, *55*(4), 920-928.
- Kurtova, A. V., Balakrishnan, K., Chen, R., Ding, W., Schnabl, S., Quiroga, M. P., Sivina, M., Wierda, W. G., Estrov, Z., Keating, M. J., Shehata, M., Jäger, U., Gandhi, V., Kay, N. E., Plunkett, W., & Burger, J. A. (2009). Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood*, *114*(20), 4441-4450.
- Landau, D.A., Carter S., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Michael, Sougnez, C., Stewart, C., Sivachenko, A., Wang, L., Wan, Y., Zhang, W., Sachet, Vartanov, A., Stacey, Saksena, G., Cibulskis, K., Tesar, B., Gabriel, S., Hacohen, N., Meyerson, M., Eric, Neuberg, D., Jennifer, Getz, G., & Wu, C.J. (2013). Evolution and Impact of Subclonal Mutations
- Landau, D. A., Tausch, E., Taylor-Weiner, A. N., Stewart, C., Reiter, J. G., Bahlo, J., Kluth, S., Bozic, I., Lawrence, M., Böttcher, S., Carter, S. L., Cibulskis, K., Mertens, D., Sougnez, C. L., Rosenberg, M., Hess, J. M., Edelman, J., Kless, S., Kneba, M., Ritgen, M., Fink, A., Fischer, K., Gabriel, S., Lander, E. S., Nowak, M. A., Döhner, H., Hallek, M., Neuberg, D., Getz, G., Stilgenbauer, S., & Wu, C. J. (2015). Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*, *526*(7574), 525-530.
- Lee, J. H., & Paull, T. T. (2007). Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene*, *26*(56), 7741-7748.
- Lutzny, G., Kocher, T., Schmidt-Supprian, M., Rudelius, M., Klein-Hitpass, L., Andrew, Dürig, J., Wagner, M., Haferlach, C., Kohlmann, A., Schnittger, S., Seifert, M., Wanninger, S., Zabolisky, N., Oostendorp, R., Ruland, J., Leitges, M., Kuhnt, T., Schäfer, Y., Lampl, B.,

- Peschel, C., Egle, A., & Ringshausen, I. (2013). Protein Kinase C- β -Dependent Activation of NF- κ B in Stromal Cells Is Indispensable for the Survival of Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells In Vivo. *23*(1), 77-92.
- Malcikova, J., Swardova, J., Rocnova, L., Tichy, B., Kuglik, P., Vranova, V., Cejkova, S., Svitakova, M., Skuhrova Francova, H., Brychtova, Y., Doubek, M., Brejcha, M., Klabusay, M., Mayer, J., Pospisilova, S., & Trbusek, M. (2009). Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood*, *114*(26), 5307-5314.
- Mangolini, M., Maiques-Diaz, A., Charalampopoulou, S., Gerhard-Hartmann, E., Bloehdorn, J., Moore, A., Giachetti, G., Lu, J., Roamio Franklin, V. N., Chilamakuri, C. S. R., Moutsopoulos, I., Rosenwald, A., Stilgenbauer, S., Zenz, T., Mohorianu, I., D'Santos, C., Deaglio, S., Hodson, D. J., Martin-Subero, J. I., & Ringshausen, I. (2022). Viral transduction of primary human lymphoma B cells reveals mechanisms of NOTCH-mediated immune escape. *Nat Commun*, *13*(1), 6220.
- Meads, M. B., Gatenby, R. A., & Dalton, W. S. (2009). Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer*, *9*(9), 665-674.
- Mullighan, C. G., Phillips, L. A., Su, X., Ma, J., Miller, C. B., Shurtleff, S. A., & Downing, J. R. (2008). Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science*, *322*(5906), 1377-1380.
- Nadeu, F., Delgado, J., Royo, C., Baumann, T., Stankovic, T., Pinyol, M., Jares, P., Navarro, A., Martin-Garcia, D., Bea, S., Salaverria, I., Oldreive, C., Aymerich, M., Suarez-Cisneros, H., Rozman, M., Villamor, N., Colomer, D., Lopez-Guillermo, A., Gonzalez, M., Alcoceba, M., Terol, M. J., Colado, E., Puente, X. S., Lopez-Otin, C., Enjuanes, A., & Campo, E. (2016). Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1 and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia.
- Neilson, J. R., Auer, R., White, D., Bienz, N., Waters, J. J., Whittaker, J. A., Milligan, D. W., & Fegan, C. D. (1997). Deletions at 11q identify a subset of patients with typical CLL who show consistent disease progression and reduced survival. *Leukemia*, *11*(11), 1929-1932.
- Nishio, M., Endo, T., Tsukada, N., Ohata, J., Kitada, S., Reed, J. C., Zvaifler, N. J., & Kipps, T. J. (2005). Nurselike 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*, *106*(3), 1012-1020.
- O'Neill, K., Aghaeepour, N., Spidlen, J., & Brinkman, R. (2013). Flow cytometry bioinformatics. *PLoS Comput Biol*, *9*(12), e1003365.
- Oostendorp, R. A. J. (2002). Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity. *Blood*, *99*(4), 1183-1189.
- Park, E., Chen, J., Moore, A., Mangolini, M., Santoro, A., Boyd, J. R., Schjerven, H., Ecker, V., Buchner, M., Williamson, J. C., Lehner, P. J., Gasparoli, L., Williams, O., Bloehdorn, J., Stilgenbauer, S., Leitges, M., Egle, A., Schmidt-Suppran, M., Fietze, S., & Ringshausen, I. (2020). Stromal cell protein kinase C- β inhibition enhances chemosensitivity in B cell malignancies and overcomes drug resistance. *Sci Transl Med*, *12*(526).
- Passweg, J. R., Baldomero, H., Bader, P., Bonini, C., Cesaro, S., Dreger, P., Duarte, R. F., Dufour, C., Kuball, J., Farge-Bancel, D., Gennery, A., Kröger, N., Lanza, F., Nagler, A., Sureda, A., & Mohty, M. (2016). Hematopoietic stem cell transplantation in Europe

- 2014: more than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant*, 51(6), 786-792.
- Patten, P. E., Buggins, A. G., Richards, J., Wotherspoon, A., Salisbury, J., Mufti, G. J., Hamblin, T. J., & Devereux, S. (2008). CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood*, 111(10), 5173-5181.
- Pedersen, I. M., Kitada, S., Leoni, L. M., Zapata, J. M., Karras, J. G., Tsukada, N., Kipps, T. J., Choi, Y. S., Bennett, F., & Reed, J. C. (2002). Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood*, 100(5), 1795-1801.
- Puente, X. S., Beà, S., Valdés-Mas, R., Villamor, N., Gutiérrez-Abril, J., Martín-Subero, J. I., Munar, M., Rubio-Pérez, C., Jares, P., Aymerich, M., Baumann, T., Beekman, R., Belver, L., Carrio, A., Castellano, G., Clot, G., Colado, E., Colomer, D., Costa, D., Delgado, J., Enjuanes, A., Estivill, X., Ferrando, A. A., Gelpí, J. L., González, B., González, S., González, M., Gut, M., Hernández-Rivas, J. M., López-Guerra, M., Martín-García, D., Navarro, A., Nicolás, P., Orozco, M., Payer Á, R., Pinyol, M., Pisano, D. G., Puente, D. A., Queirós, A. C., Quesada, V., Romeo-Casabona, C. M., Royo, C., Royo, R., Rozman, M., Russiñol, N., Salaverría, I., Stamatopoulos, K., Stunnenberg, H. G., Tamborero, D., Terol, M. J., Valencia, A., López-Bigas, N., Torrents, D., Gut, I., López-Guillermo, A., López-Otín, C., & Campo, E. (2015). Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 526(7574), 519-524.
- Puente, X. S., Pinyol, M., Quesada, V., Conde, L., Ordóñez, G. R., Villamor, N., Escaramis, G., Jares, P., Beà, S., González-Díaz, M., Bassaganyas, L., Baumann, T., Juan, M., López-Guerra, M., Colomer, D., Tubío, J. M., López, C., Navarro, A., Tornador, C., Aymerich, M., Rozman, M., Hernández, J. M., Puente, D. A., Freije, J. M., Velasco, G., Gutiérrez-Fernández, A., Costa, D., Carrió, A., Guijarro, S., Enjuanes, A., Hernández, L., Yagüe, J., Nicolás, P., Romeo-Casabona, C. M., Himmelbauer, H., Castillo, E., Dohm, J. C., de Sanjosé, S., Piris, M. A., de Alava, E., San Miguel, J., Royo, R., Gelpí, J. L., Torrents, D., Orozco, M., Pisano, D. G., Valencia, A., Guigó, R., Bayés, M., Heath, S., Gut, M., Klatt, P., Marshall, J., Raine, K., Stebbings, L. A., Futreal, P. A., Stratton, M. R., Campbell, P. J., Gut, I., López-Guillermo, A., Estivill, X., Montserrat, E., López-Otín, C., & Campo, E. (2011). Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 475(7354), 101-105.
- Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A. D., Levy, R. N., & Pasternack, B. S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46(2), 219-234.
- Renström, J., Istvanffy, R., Gauthier, K., Shimono, A., Mages, J., Jardon-Alvarez, A., Kröger, M., Schiemann, M., Busch, D. H., Esposito, I., Lang, R., Peschel, C., & Oostendorp, R. A. (2009). Secreted frizzled-related protein 1 extrinsically regulates cycling activity and maintenance of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 5(2), 157-167.
- RKI, K. (2019). Robert - Koch Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (Hrsg.) Krebs in Deutschland 2015 - 2016, 1. Auflage 2019; .
- Seiffert, M., Dietrich, S., Jethwa, A., Glimm, H., Lichter, P., & Zenz, T. (2012). Exploiting biological diversity and genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 53(6), 1023-1031.
- Seiffert, M., Stilgenbauer, S., Döhner, H., & Lichter, P. (2007). Efficient nucleofection of primary human B cells and B-CLL cells induces apoptosis, which depends on the microenvironment and on the structure of transfected nucleic acids. *Leukemia*, 21(9), 1977-1983.

- Seymour, J. F., Kipps, T. J., Eichhorst, B., Hillmen, P., D'Rozario, J., Assouline, S., Owen, C., Gerecitano, J., Robak, T., De la Serna, J., Jaeger, U., Cartron, G., Montillo, M., Humerickhouse, R., Punnoose, E. A., Li, Y., Boyer, M., Humphrey, K., Mobasher, M., & Kater, A. P. (2018). Venetoclax-Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*, *378*(12), 1107-1120.
- Shanafelt, T. D., Wang, X. V., Kay, N. E., Hanson, C. A., O'Brien, S., Barrientos, J., Jelinek, D. F., Braggio, E., Leis, J. F., Zhang, C. C., Coutre, S. E., Barr, P. M., Cashen, A. F., Mato, A. R., Singh, A. K., Mullane, M. P., Little, R. F., Erba, H., Stone, R. M., Litzow, M., & Tallman, M. (2019). Ibrutinib-Rituximab or Chemoimmunotherapy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*, *381*(5), 432-443.
- Suzuki, T., Fujikura, K., Higashiyama, T., & Takata, K. (1997). DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *J Histochem Cytochem*, *45*(1), 49-53.
- Trbusek, M., Malcikova, J., Swardova, J., Kuhrova, V., Mentzlova, D., Francova, H., Bukovska, S., Svitakova, M., Kuglik, P., Linkova, V., Doubek, M., Brychtova, Y., Zagal, J., Kujickova, J., Pospisilova, S., Dvorakova, D., Vorlicek, J., & Mayer, J. (2006). Inactivation of p53 and deletion of ATM in B-CLL patients in relation to IgVH mutation status and previous treatment. *Leukemia*, *20*(6), 1159-1161.
- van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., & Reutelingsperger, C. P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, *31*(1), 1-9.
- Wang, L., Lawrence, M. S., Wan, Y., Stojanov, P., Sougnez, C., Stevenson, K., Werner, L., Sivachenko, A., DeLuca, D. S., Zhang, L., Zhang, W., Vartanov, A. R., Fernandes, S. M., Goldstein, N. R., Folco, E. G., Cibulskis, K., Tesar, B., Sievers, Q. L., Shefler, E., Gabriel, S., Hacohen, N., Reed, R., Meyerson, M., Golub, T. R., Lander, E. S., Neuber, D., Brown, J. R., Getz, G., & Wu, C. J. (2011). SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, *365*(26), 2497-2506.
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, *39*(1), 75-85.
- Woyach, J. A., Ruppert, A. S., Heerema, N. A., Zhao, W., Booth, A. M., Ding, W., Bartlett, N. L., Brander, D. M., Barr, P. M., Rogers, K. A., Parikh, S. A., Coutre, S., Hurria, A., Brown, J. R., Lozanski, G., Blachly, J. S., Ozer, H. G., Major-Elechi, B., Fruth, B., Nattam, S., Larson, R. A., Erba, H., Litzow, M., Owen, C., Kuzma, C., Abramson, J. S., Little, R. F., Smith, S. E., Stone, R. M., Mandrekar, S. J., & Byrd, J. C. (2018). Ibrutinib Regimens versus Chemoimmunotherapy in Older Patients with Untreated CLL. *N Engl J Med*, *379*(26), 2517-2528.
- Wu, C. J. (2012). CLL clonal heterogeneity: an ecology of competing subpopulations. *Blood*, *120*(20), 4117-4118.
- Zenz, T., Kröber, A., Scherer, K., Häbe, S., Bühler, A., Benner, A., Denzel, T., Winkler, D., Edelmann, J., Schwänen, C., Döhner, H., & Stilgenbauer, S. (2008). Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood*, *112*(8), 3322-3329.
- Zenz, T., Vollmer, D., Trbusek, M., Swardova, J., Benner, A., Soussi, T., Helfrich, H., Heuberger, M., Hoth, P., Fuge, M., Denzel, T., Häbe, S., Malcikova, J., Kuglik, P., Truong, S., Patten, N., Wu, L., Oscier, D., Ibbotson, R., Gardiner, A., Tracy, I., Lin, K., Pettitt, A., Pospisilova, S., Mayer, J., Hallek, M., Döhner, H., & Stilgenbauer, S. (2010). TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease

specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia*, 24(12), 2072-2079.

Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., & Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*, 32(12), e103.