

III. Medizinische Klinik
Klinikum rechts der Isar
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel)

Proteasomeninhibition bei proliferierenden

B-CLL Zellen:

Hemmung der p27 Degradierung,

Bax- und Caspase Cleavage

Christian Bogner

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

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

Prüfer der Dissertation:

1. **Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel**
2. **Priv.-Doz. Dr. H. Bernhard**
3. **Univ.-Prof. Dr. F. Fend**

Die Dissertation wurde am **03.11.2004** bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für **Medizin** am **15.06.2005** angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von August 2000 bis Januar 2002 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Christian Peschel und Herrn Dr. med. Thomas Decker in der hämatologischen Abteilung des Klinikums rechts der Isar angefertigt.

Herrn Prof. Peschel möchte ich für die Bereitstellung der gut ausgestatteten Labors danken, ohne die ich die Arbeit nicht durchführen hätte können. Ihm verdanke ich auch die Teilnahme an mehreren Kongressen, die mir die Präsentation verschiedener Teile meiner Arbeit ermöglicht haben.

Bei Herrn Dr. med. Thomas Decker bedanke ich mich für die Einarbeitung, die geistige Unterstützung sowie die kritische Durchsicht dieses Manuskripts.

Desweiteren bedanke ich mich bei allen im Labor für die angenehme Zeit und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	B-CLL Pathogenese	1
1.2	Klinik	2
1.3	Das Proteasom	7
1.4	Lactacystin	7
1.5	B-CLL Proliferationszentren	8
1.6	CpG Oligonukleotide (ODN)	10
1.7	Interleukin 2	13
1.8	Aufgabenstellung	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Zellproben	15
2.1.2	Medien	15
2.1.3	Puffer	16
2.1.4	Agarosegele	17
2.1.5	Oligonukleotide	17
2.1.6	Interleukin 2	17

2.1.7	Lactacystin	18
2.1.8	Antikörper	18
2.1.9	Sonstige Materialien	18
2.2	Methoden	20
2.2.1	Separationsverfahren	20
2.2.2	Kulturbedingungen	21
2.2.3	Proliferationsassays	21
2.2.4	Durchflusszytometrie	21
2.2.5	Immunoblots	24
2.2.6	Statistische Analysen	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Lactacystin inhibiert die Proliferation aktivierter B-CLL Zellen	26
3.2	Lactacystin beeinflusst wichtige zellzyklusregulierende Proteine	27
3.3	Lactacystin induziert Apoptose bei B-CLL Zellen	28
3.3.1	Annexin V	28
3.3.2	Mitochondriales Membranpotential $\Delta\Psi_m$	30
3.3.3	Bcl-2, Bax, mcl-1 und bak	30
3.3.4	Caspase 3, Caspase 8 und Caspase 9	31
3.3.5	Z-VAD.fmk	32
3.3.6	Calpeptin	32
3.4	Lactacystin beeinflusst die Regulation von p53 und p21	33
3.5	Abbildungen	35
4	Diskussion	58
5	Zusammenfassung	69
	Literatur	71

Abbildungsverzeichnis

1.1	Das Proteasom	6
1.2	Lactacystin	8
1.3	CpG Oligonukleotide	11
3.1	Lactacystintitration im Proliferationsassay	35
3.2	Zellzyklusproteine im Immunoblot	36
3.3	p27 im Immunoblot	37
3.4	Annexin V Assay nach 24 Stunden	38
3.5	Lactacystintitration im Annexinassay - 24 Stunden	39
3.6	Nichtmaligne B-Zellen, Lactacystintitration - 24 Stunden	40
3.7	Annexin V Assay nach 6 Stunden	41
3.8	zeitversetzte Lactacystinzugabe im Annexinassay	42
3.9	$\Delta\Psi_m$ nach 24 Stunden - Facscananalyse	43
3.10	$\Delta\Psi_m$ nach 6 Stunden - Facscananalyse	44
3.11	Tunel Assay nach 24 Stunden - Facscananalyse	45
3.12	Bcl-2, bax, mcl-1 und bak stimulierter B-CLL Zellen im Immunoblot	46
3.13	Bcl-2, bax, mcl-1 und bak ruhender B-CLL Zellen im Immunoblot	47
3.14	Caspase 3, 8 und 9 stimulierter B-CLL Zellen im Immunoblot . . .	48

3.15 Bax, 3 - 12 Stunden im Immunoblot	49
3.16 Caspase 3, 3 - 12 Stunden im Immunoblot	50
3.17 Caspase 3 mit Calpeptin und z-VAD.fmk im Immunoblot	51
3.18 Annexinassay bei Vorinkubation mit z-VAD.fmk - 24 Stunden	52
3.19 Tunel Assay versus Annexinassay nach 24 Stunden - Facscanalyse	53
3.20 Bax mit Calpeptin und z-VAD.fmk im Immunoblot	54
3.21 p53, 12-24 Stunden im Immunoblot	55
3.22 p53, 12-72 Stunden im Immunoblot	56
3.23 p21 im Immunoblot	57

Abkürzungsverzeichnis

AP1	Activator protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
bak	Bcl-2 homologous antagonist-killer
bax	Bcl-2-associated X protein
B-CLL	Chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell Typ
bcl-2	B-Cell Leukemia 2 Family Protein
CD	Cluster of differentiation
cIAP	Inhibitor of apoptosis protein
c-FOS	Member of the immediate-early gene family
c-Jun	Member of the immediate-early gene family
c-Myc	Member of the immediate-early gene family
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison
$\Delta\Psi_m$	Mitochondrial membrane potential
DiOC ₆ (3)	Mitochondrial marker
DNA	Desoxyribonuclein Acid
DSP30	Oligodinucleotid
E2F	Family of heterodimeric transcription factors
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FCS	Fetal calf serum

Hb	Hämoglobin
HCL	Hydrogenchlorid
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinesulphonic acid
IAP	Inhibitor of apoptosis
Il-2	Interleukin-2
Jak	Janus Kinase
Jnk	c-Jun-N-terminal Kinase
mcl-1	Myeloid cell leukemia-1 protein
MAP	Mitogen-activated protein
MEM	Minimal essential medium
MHC	Major Histocompatibility Complex
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NAIP	Neuronal apoptosis inhibitory protein
NF- κ B/1 κ B	Nuclear factor - κ B
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBMNC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PI	Propidium Jodid
PMSF	Phenylmethylysulphonyl fluoride
PVDF	Polyvinylidene fluoride
Rb	Retinoblastom Protein
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Standard deviation scores
Src	Non-receptor protein tyrosine kinase
Stat	Signal transducer and activator of transcription
TLR-9	Toll-Like-Receptor 9

XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
X/MB1	Untereinheit des Proteasoms
z-vad.fmk	Irreversible fluoro- or chloromethylketone (Pan-Caspaseinhibitor)

1. Einleitung

1.1 B-CLL Pathogenese

Die chronische lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp ist eine Erkrankung charakterisiert durch fortschreitende maligne Proliferation kleiner CD5 positiver B-Lymphozyten mit Akkumulation vorzugsweise in Knochenmark, Lymphknoten, Milz, Leber und peripherem Blut. Sie repräsentiert mit einem Anteil von 30% aller auftretenden Fälle die häufigste Leukämieform der westlichen Welt [Rozman C et al, 1995]. 90% der erkrankten Patienten sind älter als 50 Jahre, die Inzidenz beträgt etwa 5 pro 100.000 im 5. Lebensjahrzehnt und circa 30 pro 100.000 im 8. Lebensjahrzehnt, im Mittel 2-3 pro 100.000 Einwohner/Jahr, bei einer Geschlechtsverteilung von 1,7:1 Männer zu Frauen und einer mittleren Überlebenszeit von 8 bis 10 Jahren [Das Rote Buch, 2002].

Die malignen CD5 positiven B-CLL Zellen im peripheren Blut weisen eine niedrige proliferative Aktivität, jedoch eine verlängerte Lebenszeit auf [OBrian S et al, 1995]. Man nimmt an das dies, und der Mangel an immunologischen Funktionen die Lymphozytenakkumulation in Blut, Knochenmark, Milz, Lymphknoten und Leber zur Folge haben. Patienten mit B-CLL weisen im Durchschnitt das 50 - 100 fache des normalen Körperbestandes an Lymphozyten ($> 15 \times 10^9$) auf.

Obwohl die Pathogenese der chronischen lymphatischen Leukämie bis heute nur teilweise geklärt werden konnte, scheint ein defektes Apoptoseverhalten der malignen Klone eine wichtige Rolle zu spielen [Reed CJ, 2000]. Die hohe Expression des antiapoptotischen Proteins bcl-2 [Hanada M et al, 1993] [Mc Conkey DJ et al, 1996] [Raghobier S et al, 1991] [Rechavi G et al, 1989] führt zu einem veränderten bcl-2/bax Verhältnis [Mc Conkey DJ et al, 1996], das für die B-CLL Pathogenese mitverantwortlich gemacht wird [Meinhardt G et al, 1999]. Ebenso lassen sich andere, in hohem Maße exprimierte apoptoseregulierende Proteine nachweisen, die in Verbindung mit Chemotherapieresistenzen gebracht werden [Kitata S et al, 1998] [Klein A et al, 2000]. Zusätzlich zur defekten Apoptoseregulation wird die Fehlregulation zellzyklussteuernder Gene diskutiert, die die Vermehrung der malignen Klone fördern könnte. Beschrieben wird unter anderem die hohe Expression von p27^{Kip1} und Zyklin D2 bei der B-CLL im Vergleich zu nichtmalignen B-Zellen [Delmer A et al, 1995] [Vrhovac R et al, 1998]. Zusätzlich von Bedeutung sind Zyklin D2 und D3, da im Gegensatz zu nichtmalignen B-Zellen die RB Phosphorylierung während der G1 Phase des Zellzyklus über diese Proteine gesteuert wird. [Decker T et al, 2002].

1.2 Klinik

Die Diagnose einer B-CLL erfolgt in 40 bis 60 % der Fälle als symptomloser Zufallsbefund [Kalil N et al, 1999]. Falls Symptome vorhanden sind äussern sich diese häufig durch Leistungsschwäche, Unwohlsein, indolent vergrösserte Lymphknoten, Hauterscheinungen und vermehrt auftretenden Einblutungen. Häufig treten Splenomegalie, Granulo - und Thrombozytopenie auf. Das Fortschreiten der Erkrankung ist charakterisiert durch Knochenmarkinsuffizienz und einem Tumorsyndrom mit generalisierten Lymphknotenschwellungen sowie durch Entwicklung

lymphatischer Raumforderungen der Weichteile.

Zu den schweren Komplikationen im Verlauf der Erkrankung zählen Infekte aufgrund Granulozytopenie und Antikörpermangelsyndrom (50 % der Fälle = häufigste Komplikation und häufigste Todesursache) [Das Rote Buch, 2002]. Hypersplenismus, Coombspositive autoimmun-hämolytische Anämie (AIHA) in 10 % aller Fälle (+ eventuelle Autoimmunthrombozytopenie = Evans Syndroms), das Richter Syndrom (Transformation in sekundär höhermalignes NHL ungünstiger Prognose) in 5 % aller Fälle, und das Auftreten von Zweitmalignomen stellen weitere Komplikationen dar [Das Rote Buch, 2002]. Die B-CLL kann im Verlauf der Erkrankung jedes Organ infiltrieren.

Die Laborparameter zeigen eine permanente Leukozytose mit einem hohen Lymphozytenanteil von 70 bis 95 %, und eine permanente Erhöhung der gesamten Lymphozytenzahl auf $> 10.000 / \mu l$. In der Knochenmarkzytologie beziehungsweise Histologie zeigt sich ein Anteil reifer Lymphozyten > 40 % aller kernhaltigen Zellen, bei normalem oder erhöhtem Zellgehalt [Das Rote Buch, 2002]. Dabei ist die noduläre Ausbreitung der CLL im Knochenmark prognostisch günstiger als die diffuse Knochenmarkinfiltration [Das Rote Buch, 2002]. Bei der Bestimmung des Immunphänotyps der malignen Lymphozyten lassen sich schwache Expressionen membranständiger Immunglobuline (IgM mit oder ohne IgD), B-Zellantigene (CD19, CD20), sowie CD5 und CD23 nachweisen [Kalil N et al, 1999]. Es finden sich Serumeiweißveränderungen und das Auftreten inkompletter Wärmeanantikörper. Die Höhe des β_2 - Mikroglobulinserumspiegels [Kalil N et al, 1999] und der Thymidinkinase [Hallek M et al, 1999] korrelieren bei normaler Nierenfunktion mit der Gesamttumormasse. Chromosomenanalysen ergeben bei circa 50 % der Patienten eine Deletion von 13q14, gefolgt von d(11q22-q23) in circa 20 % der Fälle [Kalil N et al, 1999]. Trisomie 12 und d(17p13) treten zu je 15 % auf [Kalil N et al, 1999]. Die chronische lymphatische Leukämie wird nach Rai(1976,1990)

und Binet(1981) eingeteilt:

Stadieneinteilung nach Rai:

Risiko	Stadium	Definition	Überleben
Niedrig	0	Lymphozytose $> 5000/\mu l$ Knochenmark-Infiltration $> 30\%$	$>12,5$ Jahre
Mittel	I	Lymphozytose + Lymphadenopathie	8,5 Jahre
	II	Lymphozytose + Splenomegalie und/oder Hepatomegalie (mit oder ohne Lymphadenopathie)	6 Jahre
Hoch	III	Lymphozytose + Anämie (Hämoglobin $< 11 g/dl$) (mit oder ohne Adenopathie/ Organomegalie)	1,5 Jahre
	IV	Lymphozytose + Thrombopenie (Thrombozyten $< 100.000/\mu l$) (mit oder ohne Anämie/ Adenopathie/Organomegalie)	1,5 Jahre

Stadieneinteilung nach Binet:

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

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

Stadiengerechte Therapie der CLL:

Binet A,B Rai 0,I,II		Binet C Rai III,IV
ohne Therapieindikation	mit Therapieindikation	
	Autoimmunhämolyse rezidivierende Infekte sympt. Splenomegalie oder Lymphadenopathie, Progredienz, B-Symptome	
supportive Therapie, Beobachtung	systemische Therapie*	systemische Therapie*

* Leukeran/Prednison, Purinanaloga, CHOP, supportive Therapie

Asymptomatische Patienten im Stadium Binet A und B, Rai 0,I,II werden nicht therapiert. Symptomatische Patienten im Stadium Binet A und Stadium Binet B sowie alle Patienten im Stadium Binet C, Rai III,IV werden mittels konventioneller Chemotherapie (intermittierende Gabe von Chlorambucil/Prednison, Gabe von Purinanaloga (Fludarabin oder Chlorodeoxyadenosin), CHOP, supportive Therapie) behandelt. Bei Versagen der konventionellen Therapie ist eine myoablative Hochdosischemotherapie mit nachfolgender autologer beziehungsweise allogener Stammzelltransplantation (Altersgrenze circa 60 Jahre) zu erwägen. Die B-CLL stellt trotz der vorhandenen Therapiemöglichkeiten nach wie vor eine Erkrankung dar, die in den meisten Fällen nicht dauerhaft heilbar ist.

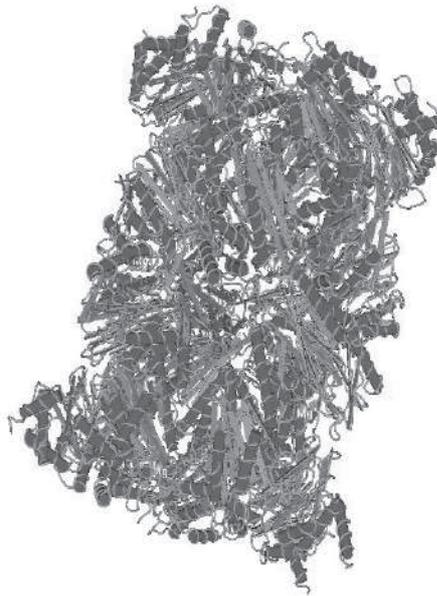


Abbildung 1.1: Das Proteasom

1.3 Das Proteasom

Das 26S Proteasom ist ein ATP abhängiger multienzymatischer Multienzymkomplex, der in allen eukaryoten Zellen vorkommt, und auf dem Wege der ubiquitin-abhängigen Degradierung selektiv kernassoziierte und zytoplasmatische kurzlebige Proteine degradiert. Der Degradierung geht die kovalente Anlagerung von Poliubiquitinketten voran. Das Proteasom ist für die Degradierung von etwa 70 bis 90% der kurzlebigen zellulären Proteine verantwortlich. Zu den Substraten des Proteasoms zählen zahlreiche Proteine der Immunabwehr, des transkriptionellen Regulationssystems und der Zellzykluskontrolle. MHC Klasse 1 gebundene Peptidantigene, die T-Zellrezeptor α Kette, der NF- κ B/1 κ B-Komplex, c-FOS, c-Jun, c-Myc sowie diverse Zykline ([Hershko A, 1997] [Rock et al, 1999] [Spataro V et al, 1998]), zyklinabhängige Kinaseinhibitoren wie p27^{Kip1} [Pagano M et al, 1995], pro- und antiapoptotische Proteine aus der bcl-2 Familie [Zhang XM et al, 1999] [Marshansky V et al, 2001] [Li B et al, 2000] sowie das Tumorsuppressorprotein p53 [Lopes UG et al, 1997] gehören dazu. Der Abbau dieser Proteine durch das Proteasom stellt einen entscheidenden Weg der Regulation zellulärer Prozesse wie Apoptose und Zellzyklus dar [Fentany G et al, 1998] [Yew PR, 2001] [Voges D et al, 1999]. Seit kurzem sind Proteasomeninhibitoren als eine neue potentielle Klasse von Tumortheraeutika in das Interesse der Forschung gerückt [Adams J et al, 1999] [An WG et al, 2000].

1.4 Lactacystin

Lactacystin ist ein Streptomycesderivat und ein spezifischer Inhibitor der drei am besten charakterisierten Peptidaseaktivitäten des Proteasoms [Fentany G et al, 1998]. Um in die Zelle zu gelangen wird es zuerst in das aktive clasto-Lactacystin

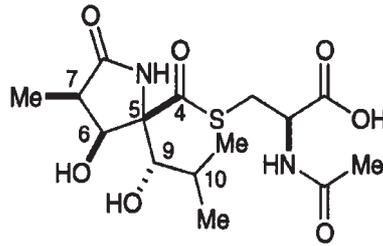


Abbildung 1.2: Lactacystin

β Lacton umgewandelt. Es modifiziert intrazellulär kovalent den aminoterminalen Threoninrest der Proteasomenuntereinheit X/MB1. Bei einer Wirkzeit von circa 24 Stunden blockiert es die ubiquitinabhängige Proteindegradierung durch das Proteasom. Abhängig vom Zelltyp und dem Aktivierungsgrad der Zellen resultieren verschiedene Effekte auf Zellzyklusprogression und Apoptoseinduktion durch die Inhibition des Proteasoms [Wang X et al, 1998] [Drexler HCA, 2000] [Hirsch T et al, 1998]. Es ist bekannt, dass die Inhibition des Proteasoms durch Lactacystin Apoptose in einer Reihe von Tumorzelllinien auslöst [Kudo Y et al, 2000] [Mein AB et al, 1998], eingeschlossen humanen Leukämiezelllinien [Zhang XM et al, 1999] [Drexler HCA, 1997], dem humanen primären Myelom [Hideshima T et al, 2000], sowie bei der B-CLL [Masdehors et al, 1999] [Chandra J et al, 1998]. B-CLL Zellen sind charakterisiert durch ein dysreguliertes Ubiquitin-Proteasomen System und Lactacystin ist bereits niedrig konzentriert in der Lage Apoptose in diesen Zellen auszulösen. Anders verhält es sich bei nichtmalignen B-Lymphozyten, wo circa die 20 *ig* fache Konzentration an Lactacystin benötigt wird um eine vergleichbare Apoptoseinduktion zu erzielen [Masdehors et al, 2000]. Der exakte Mechanismus der durch Lactacystin induzierten Apoptose bei malignen und nichtmalignen B-Zellen ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

1.5 B-CLL Proliferationszentren

Periphere B-CLL Zellen weisen nahezu keine proliferative Aktivität auf, sie sind in der G0/frühen G1 Phase des Zellzyklus arretiert; eine Tatsache, die vermuten lässt, dass die Ursache der Erkrankungsprogression anderswo zu suchen ist. Es werden proliferierende leukämische Zellen beschrieben, vorkommend als Pseudofollikel in sogenannten Proliferationszentren in Lymphknoten und Knochenmark [Lampert IA et al, 1999]. Diese Kompartimente scheinen von ganz erheblicher Bedeutung für die Progression der Erkrankung zu sein, da sie Ausgangspunkte von Rezidiven darstellen könnten, und in der Lage wären den Pool der proliferativ inaktiven Zellen im peripheren Blut immer neu aufzufüllen. Dabei werden im Hinblick auf die proliferative Aktivität dieser Zellen sowohl diverse Proteine aus der bcl-2 Genfamilie diskutiert (bcl-2, mcl-1 u.a.) [Hanada M et al, 1993] [Mc Conkey DJ et al, 1996] [Raghobier S et al, 1991] [Rechavi G et al, 1989], als auch Interaktionen mit CD4 positiven T- Lymphozyten in Knochenmark und Lymphknoten [Granziero L et al, 1997], sowie Proteine aus der IAP Genfamilie, zu der neben Survivin [Ambrosini et al, 1997] auch NAIP [Liston P et al, 1996], cIAP1, cIAP2 [Rothe M et al, 1995], XIAP [Duckett CS et al, 1996] und Apollon [Chen Z et al, 1999] gehören. Survivin ist ein Protein, das durch die Blockade von Caspase 3 und durch Interaktion mit dem Kinaseinhibitor p21^{WAF1/Cip1} die Zelle vor dem Zelltod bewahren kann [Tamm I et al, 1998]. Granziero et al [Granziero L et al, 1997] beschreiben Survivin positive B-CLL Zellen, vorkommend in Pseudofollikeln innerhalb von Lymphknoten und Knochenmark, welche proliferativ aktiv sind. Beim Verlassen des Lymphknoten- und Knochenmarkpools wird die Survivinexpression dieser Zellen vermindert, sie werden proliferativ inaktiv. Granziero et al folgern, dass diese Zellen aufgrund ihrer verlängerten Lebenszeit in Lymphknoten und Knochenmark rezirkulieren können, durch Interaktionen

mit CD4 positiven T-Zellen ihre Survivinexpression erneut hochregulieren und durch die daraufhin wieder einsetzende proliferative Aktivität den Pool der ruhenden B-CLL Zellen im peripheren Blut neu auffüllen könnten.

Die Erforschung des Effekts der Proteasomeninhibition auf proliferierende B-CLL Zellen stellt deshalb einen wichtigen Ansatz dar, diesen Pool der B-CLL im Körper besser zu charakterisieren und daraus auch für die Klinik relevante Ergebnisse zu gewinnen.

1.6 CpG Oligonukleotide (ODN)

Bakterielle DNA wurde aufgrund der hohen Konservierung der Struktur lange für immunologisch inert gehalten. Zu Beginn der 90iger Jahre konnte gezeigt werden, dass bakterielle DNA und bestimmte synthetische Oligonukleotide starke Stimulatoren des Immunsystems sind [Tokunaga T et al, 1992]. Bakterielle und eukaryotische DNA unterscheiden sich in zweierlei Hinsicht. Das Dinukleotid 5'-CG-3' wird in eukaryotischer DNA vermindert exprimiert und ist meist methyliert, während es in bakterieller DNA mit der erwarteten Frequenz (1:16) auftritt [Bird A, 1992] [Wagner H, 1999]. Diese strukturellen Unterschiede erlauben den Zellen des Immunsystems DNA, die zum Beispiel bei dem Zerfall von Bakterien entsteht, zu erkennen [Sparwasser T et al, 1997]. Die immunstimulatorische Wirkung bakterieller DNA und synthetischer Oligonukleotide mit unmethylierten CG Dinukleotiden (CpG-ODN) wurde zunächst im murinen System an B-Zellen, NK-Zellen und dendritischen Zellen gezeigt [Tokunaga T et al, 1992] [Krieg AM et al, 1995] [Liang H et al, 1996]. Im humanen System sind die Effekte weniger strikt vom CpG-Motiv abhängig. Das Vorhandensein des CpG-Motivs ist aber für die optimale Stimulation humaner B-Zellen von Bedeutung [Liang H et al, 1996]. Humane B-Zellen proliferieren, bilden Immunglobuline und exprimieren

vermehrt Oberflächenstrukturen wie CD40, CD25 und CD86. [Bauer M et al, 1999]. Die stimulatorische Wirkung von CpG Oligonukleotiden wird durch den Toll-like Rezeptor 9 (TLR-9) vermittelt [Hemmi H et al, 2000]. Nach Übersetzung des CpG-Motivs in ein Signal durch TLR-9 erfolgt die weitere Signalübertragung in der Zelle über den Stresskinase Weg, der über die Aktivierung von p38 zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 führt [Häcker H et al, 1998] (siehe Abbildung 1.3 auf Seite 11). $\text{Nf}\kappa\text{B}$ Aktivierung konnte ebenfalls nachgewiesen werden [Macfarlane et al, 1998]. In verschiedenen Zelltypen werden allerdings unterschiedliche Wege des MAP-Kinasen Weges eingeschlagen [Häcker H et al, 1999]. In humanen B-Zellen werden die Stress-Kinasen p38 und Jnk nach Stimulation mit CpG ODN phosphoryliert [Hartmann G et al, 2000]. Der Signaltransduktionsweg und die Regulation der zellzyklus- und apoptosesteuernden Proteine bei malignen B Zellen ist bisher nicht untersucht. Zellbiologische Untersuchungen bei B-CLL Zellen zeigen den Einfluss von Zytokinen, Stromazellkontakten, T-Zellen und Ligation von Oberflächenmolekülen. Der Einfluss von CpG-ODN auf Proliferation, Zytokinproduktion und Expression von Oberflächenmolekülen von B-CLL Zellen und normalen B Zellen zeigt eine deutliche, vom CpG-Motiv abhängige Proliferation, die durch Zugabe von IL-2 oder CD40 Ligand transfizierten Mausfibroblasten beträchtlich gesteigert werden kann. Im Gegensatz zur reduzierten Aktivierbarkeit durch verschiedene etablierte B-Zell Stimuli sind B-CLL Zellen durch CpG Oligonukleotide ähnlich aktivierbar wie normale B-Zellen. Die malignen Zellen proliferieren, sezernieren IL-6 und $\text{TNF-}\alpha$ und regulieren wichtige kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86 und CD54 hoch [Decker T et al (1), 2000], [Decker T et al (3), 2000]. Die für Interaktionen mit T-Zellen wichtigen Rezeptoren CD40 und CD25 (Interleukin-2 Rezeptor α Kette) werden bei B-CLL Zellen sogar deutlich stärker reguliert als bei normalen B-Lymphozyten. Die α -Kette des IL-2 Rezeptors bewirkt die Formation hochaffiner IL-2 Rezeptoren nach

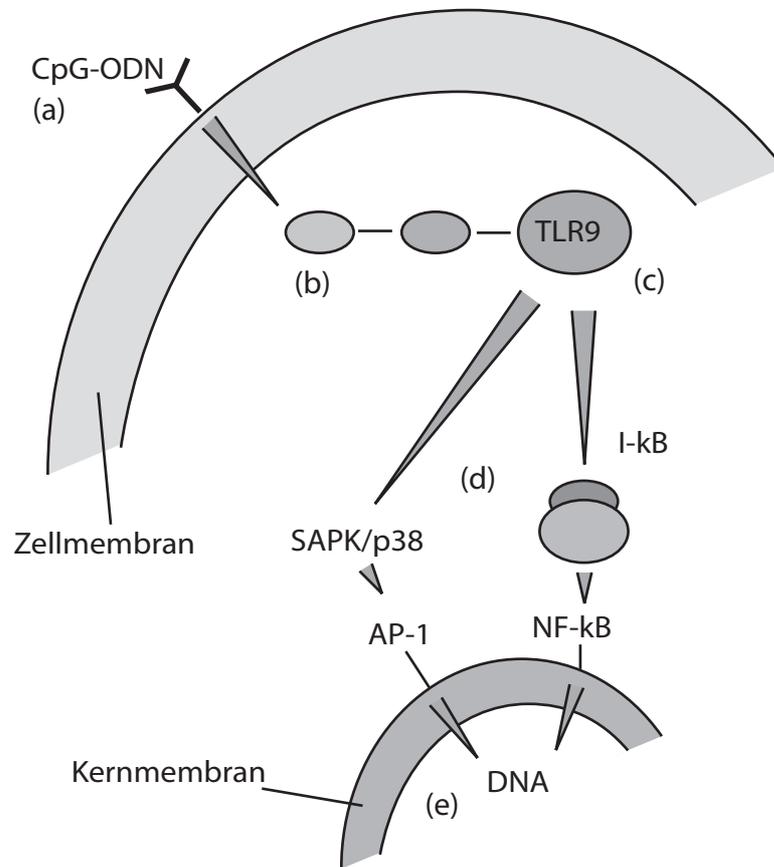


Abbildung 1.3: CpG Oligonukleotide - Wirkmechanismus

Wirkmechanismen bakterieller DNA oder CpG Oligonukleotidsequenzen (CpG ODN):

- a) Sequenzunabhängige Bindung an Zelloberflächenproteine
- b) Translokation in Endosome
- c) Übersetzung der CpG-ODN Sequenz in ein Signal mit Hilfe des Toll-like Rezeptors, TLR9 [Hemmi H et al, 2000].
- d) Aktivierung des Stress-Kinase Weges
- e) Translokation der aktiven Transkriptionsfaktoren in den Nucleus, Bindung an deren komplementäre DNA-Bindungsstellen, Aktivierung.

Stimulation mit CpG-ODN bei B-CLL-Zellen wie in Scatchard-plot Analysen gezeigt werden konnte. Demgegenüber werden bei normalen B Zellen zwar auch IL-2 Rezeptoren exprimiert - allerdings mit reduzierter Affinität und in geringerer Anzahl. Bei Koaktivierung durch CpG-ODN und IL-2 oder CD40-Ligation kommt es zu einer synergistischen Wirkung auf Wachstum, Zytokinproduktion und Expression kostimulatorischer Moleküle bei CLL-B-Zellen. Diese synergistischen Wirkungen sind bei B-CLL Zellen stärker ausgeprägt als bei normalen B Zellen [Decker T et al (2), 2000]

1.7 Interleukin 2

Interleukin 2 (IL-2) gehört zur Klasse der Zytokine und wird von T-Lymphozyten und anderen Zellen als Antwort auf aktivierende Reize gebildet und ausgeschüttet. Zytokine vermitteln eine Reihe von Effektorfunktionen und stellen einen prinzipiellen Mechanismus der Kommunikation von Zellen bei Immun- und Entzündungsreaktionen dar. IL-2 ist als B-Zell Proliferationsfaktor beschrieben und bewirkt bei einem Teil der B-CLL Patienten die CD25 positiv sind ohne Zugabe weiterer Stimulatoren einen Thymidin-Einbau [Hivroz et al, 1986]. Gesteigert wird dieser Effekt bei Kostimulation mit Substanzen, die die Expression eines hochaffinen IL-2 Rezeptors auf B-CLL Zellen bewirken, wie SAC, anti- μ mAK oder CpG-Oligonukleotide [Decker T et al (2), 2000] [Karray S et al, 1990] [Begley CG et al]. Die Expression des CD25 Antigens ist zwar entscheidend für die Regulation der Affinität des IL-2 Rezeptorkomplexes, hochaffine, funktionell wirksame Rezeptoren werden aber erst nach gemeinsamer Expression der α -Kette, β -Kette und γ -Kette gebildet. Über an die β - und γ -Kette assoziierte Tyrosinkinassen (Jak1, Jak3, Lyck) kommt es dann zur Phosphorylierung der Stat Transkriptionsfaktoren und zum Eintritt in den Zellzyklus [Nelson BH et al, 1998] [Johnston

J et al, 1994] [Johnston J et al, 1995]. Aufgrund der konstitutiven Serin- Phosphorylierung der Stat Proteine bei B-CLL Zellen könnten Zytokine, die diesen Signaltransduktionsweg benötigen bei B-CLL Zellen stärkere Effekte zeigen [Frank DA et al, 1997] [Wen Z et al, 1995]. Neben dem JaK-Stat Pfad stimuliert IL-2 abhängig vom Zelltyp auch Protein Tyrosinkinase der Src Familie, den Stresskinase Weg und die Phosphatidyl-3 Kinase [Karnitz LM et al, 1996] [Karnitz LM et al, 1995]. Welche dieser Signaltransduktionswege bei B-CLL Zellen nach Stimulation durch IL-2 eine Rolle spielen, ist bisher nicht untersucht. Auch über die Regulation von Zellzyklus- und apoptosesteuernden Proteinen durch IL-2 bei B-CLL ist bisher wenig bekannt.

1.8 Aufgabenstellung

Die nachfolgenden Untersuchungen zeigen den Effekt von Lactacystin auf aktivierte B-CLL Zellen, kostimuliert mit dem Oligonukleotid DSP30 und Interleukin 2 im Hinblick auf Proliferation, Regulation von Zellzyklusproteinen und Apoptosesteuerung mit Regulation von pro- und antiapoptotischen Proteinen. Die Ergebnisse werden verglichen mit nichtstimulierten B-CLL Zellen und tragen bei zum Verständnis der Zellzyklus- und Apoptoseregulation bei malignen B Zellen. Sie sind klinisch relevant im Hinblick auf derzeit laufende Studien mit spezifischen Proteasomeninhibitoren bei Patienten mit Krebs.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellproben

Patienten mit der Diagnose einer chronischen lymphatischen Leukämie vom B-Zelltyp wurden ausführlich über die Verwendung ihrer Zellen zu wissenschaftlichen Zwecken im Sinne der weiteren Erforschung der Pathogenese dieser Erkrankung informiert. Nachdem sie Einverständnis zur Verwendung ihrer Zellen erklärt hatten, wurden diesen Patienten zwischen 10 und 50 *ml* peripheres venöses Blut entnommen. Die Diagnose einer B-CLL wurde nach klinischen und immunphenotypischen Kriterien gestellt. Die Patienten waren unbehandelt oder hatten innerhalb der letzten drei Monate keine zellreduzierende Chemotherapie erhalten. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren alle Patienten infektfrei und wurden regelmäßig ambulant betreut.

2.1.2 Medien

Als Medium diente RPMI 1640 Medium der Firma *Gibco BRL., Life Technologies Ltd.*, (Paisley, Scotland), versetzt mit einem 10%igen Anteil fetalem Kälberser-

ums (FCS) der Firma *Biochrom*, (Berlin, Deutschland), Penicillin/Streptomycin in einer Konzentration von 501 *U/ml*, Na-Pyruvat in 1 *mM* Konzentration, L-Glutamin in 2 *mM* Konzentration, L-Asparagin in einer Menge von 20 $\mu\text{g/ml}$, 2-Mercaptoethanol in 0,05 *mM* Konzentration, HEPES der Firma *Fluka Biochemika* (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) in 10 *mM* Konzentration und MEM nicht essentielle Aminosäuren 0,7 \times der Firma *Biochrom*.

2.1.3 Puffer

Zum Waschen der Zellen nach Entnahme aus der Kultur wurde PBS - Dulbecco's, (*Gibco BRL.*), verwendet.

Zur Analyse mittels Durchflusszytometer wurde Annexinpuffer der Firma *Immunotech* (Marseille, Frankreich) verwendet.

Zur Lyse der Zellen für die Gewinnung von Proteinen wurde 2 *ml* 5 \times Lysis Puffer, bestehend aus 10 *mM* Tris-HCL der Firma *Carl Roth GmbH* (Karlsruhe, Deutschland) pH 7,4, 5 *mM* EDTA (*Fluka Biochemika*), 130 *mM* NaCl (*Roth*), 1% Triton, 1 *mM* Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 *mM* Na₃VO₄ und jeweils 10 *mg/ml* Phenantrolin, Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin in Form einer Protease Inhibitor Tablette der Firma *Roche Diagnostics GmbH* (Mannheim, Deutschland) zusammen mit 0,4 *ml* 25 \times Phosphatpuffer pH 7,0 , 2 *ml* 25 \times Na-Pyrophosphat pH 7,5, 1 *ml* 10 \times NaF, 0,1 *ml* 100 \times 100 *mM* Orthovanadate der Firma *Sigma Chemical CO.* (St. Louis, MO, USA), 0,1 *ml* 100 \times PMSF, und 4,4 *ml* destilliertem Wasser der Firma *Delta Pharma GmbH* (Pfullingen, Deutschland) verwendet.

Bei der elektrischen Auftrennung der Proteine in der Elektrophoresekammer wurde 1% Running Buffer, verdünnt aus 10% Running Buffer, (288 *g* Glycin (*Roth*),

60 g Tris (*Roth*), 20 g SDS (*Fluka Biochemika*) aufgefüllt auf 2 l mit destilliertem Wasser (*Delta Pharma GmbH*), verwendet. Beim Transfer der Gele auf PVDF Membranen in einer Transferkammer wurde Transferpuffer in einer Gesamtmenge von 5 l, bestehend aus 3,5 l destilliertem Wasser (*Delta Pharma GmbH*), 1 l Methanol der Firma *J.T.Baker* (Mallinkrodt Baker B.V., Devantes, Holland) und 0,5 l 10% Running Buffer verwendet.

2.1.4 Agarosegele

Zur Proteinbestimmung im Immunoblot wurden 12% Agarosegele bestehend aus Trenngel (9 ml Acryl/Bis 1.69 rotiphorese Gel 30 (*Roth*), 5,625 ml 4× Tris/HCL (*Roth*) pH 8.8 SDS (*Fluka Biochemica*), 7,875 ml destilliertes H₂O (*Delta Pharma GmbH*), 75 µl 10% iges APS (Ammoniumpersulfat) (*Sigma Chemical C.O.*) und 15 µl Temed (*Fluka Biochemica*)), und Sammelgel (1,8 ml Acryl/Bis 1.69, 3,5 ml Tris/HCL pH 6,8 SDS, 8,54 ml destilliertes H₂O, 70 µl 10% APS, und 14 µl Temed) jeweils ausreichend für zwei Gele benutzt. Die Gele wurden zwischen je zwei Glasplatten der Firma *Biometra* (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland), 14,7× 14,3 mm gegossen. Die verwendeten Isoliergummies und Käbme für die Gelkammern wurden ebenfalls von *Biometra* bezogen.

2.1.5 Oligonukleotide

Das Oligonukleotid DSP30 (TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTGCC), einzelsträngig verwendet wurde von der Firma *TibMolBiol* (Berlin, Deutschland) bezogen.

2.1.6 Interleukin 2

Interleukin 2 (IL-2) wurde von *Peppo Tech* (London) erworben.

2.1.7 Lactacystin

Lactacystin Synthetic wurde von *Calbiochem* (La Jolla, Ca., USA) bezogen.

2.1.8 Antikörper

Zur Bestimmung der Proteinverteilungen im Immunoblot wurden murine primary Antikörper der Firmen *Santa Cruz* (Ca., USA) und *BDPharmingen* (San Diego, Ca., USA) verwendet.

Santa Cruz

P21, p27, Cyclin D2, Cyclin D3, Cyclin E, mcl-1, p53.

BDPharmingen

CDK-2, CDK-4, bcl-2, Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, bax.

Sekundärantikörper selektiv für mouse oder rabbit (Mouse - Rabbit Ig, secondary antibody), wurden von der Firma *Amersham Life Science Pharmacia Biotech UK limited* (Buckinghamshire, England) bezogen.

2.1.9 Sonstige Materialien

Amersham Life Science Pharmacia Biotech UK limited, (Buckinghamshire, England)

HyperfilmTMECLTM, Hyperprocessor, Full range RainbowTM Molecular weight marker RPN 800

Beckmann (München, Deutschland)

B-Counter

BD Biosciences Clontech (Palo Alto, Ca., USA):

ApoAlertTM DNA Fragmentation Assay Kit

Biochrom KG seromed ® (Berlin, Deutschland):

Biocoll Separating Solution, 50ml Tubes

Biometra, Biotron GmbH (Göttingen, Deutschland)

Elektrophoresekammern für Immunoblots, Schüttler

Bio-Rad Laboratories (Richmond, Ca.,USA):

Bio-Rad Assay

Bio-Tek Instruments, Inc. (Winooski, Vermont, USA)

EL_x800 Universal Microplate Reader

Calbiochem (La Jolla, Ca., USA):

Caspase Inhibitor I (z-VAD.fmk), Calpeptin

Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, Ca., USA):

ApoAlert ® Cell Fractionation Kit inklusive mAb Cytochrom C

Coulter (Hamburg, Deutschland):

Coulter Epics XL, Flowzytometer

Du Pont (Paris, Frankreich):

³H-Thymidin

Dunn Labortechnik (Asbach, Deutschland)

PHD Cellharvester

Dynabeads M450 (Dynal, Oslo, Norwegen):

Anti CD2 und Anti CD 14 magnetische Beads

Eppendorf - Netheler - Hinz GmbH (Hamburg, Deutschland)

Eppendorf Safe Lock Tubes 1,5ml, Centrifuge 5415C, Thermomixer comfort

Fluka Biochemika (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)

Skim Milk Powder

Heraeus Instruments GmbH (Zweigniederlassung München, Deutschland):

Heraeus Megafuge 3.0 RS

Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Deutschland)

Hettich Zentrifuge Micro 22R

Immobilon-P, Millipore (Bedford, MA, USA):

PVDF Membranen

Immunotech (Marseille, Frankreich):

Annexin V-FITC Kit 200 tests, inklusive Annexin V-FITC solution, 10× konzentrierter Annexin Puffer und 0,25 mg Propidium Iodid

Molecular Probes (Oregon, USA):

DiOC₆(3)

Nunc GmbH & Co. KG. Nalgene Nunc International (Wiesbaden, Deutschland)

NUNCLONTM SURFACE 6well Platten, 24well Platten, 96well Platten, Facsröhrchen

Pharmacia Biotech (San Francisco, CA., USA)

Transferkammern für Immunoblots

Pierce Chemical Company (KMF GmbH, Deutschland)

Super Signal ® Chemoluminiszenzsubstrate (Femto, Dura, Pico)

2.2 Methoden

2.2.1 Separationsverfahren

Mononukleare Zellen aus dem peripheren Blut (PBMNC) wurden aus heparinierten Blutproben durch Zentrifugation über eine Biocoll- Hypaque Schicht in einer Dichte von 1.077g/ml gewonnen. Zur Separation von B-CLL Zellen wurden

die PBMNC mit anti-CD2 und anti-CD14 magnetischen Beads inkubiert laut Anweisungen des Herstellers. Diese so präparierten B-CLL Zellen waren nach Separation zu $> 98\%$ rein, überprüft mittels Durchflusszytometer. Der Anteil an nicht malignen B-Zellen war zu vernachlässigen, da 99% der Zellen vor und nach Stimulation mit CpG- Oligonukleotiden CD5 und CD19 positiv waren.

2.2.2 Kulturbedingungen

Aufgereinigte B-CLL Zellen wurden in RPMI 1640 Medium, versetzt mit 10% fetalem Kälberserum, Penicillin/Streptomycin 501 U/ml , Na-Pyruvat 1 mM , L-Glutamin 2 mM , L-Asparagin 20 $\mu g/ml$, 2-Mercaptoethanol 0,05 mM , HEPES 10 mM und MEM nichtessentiellen Aminosäuren $0,7\times$ bei $37^{\circ}C$ und 5% CO_2 in einer Atmosphäre mit 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.2.3 Proliferationsassays

Aufgereinigte B-CLL Zellen wurden in 96well Rundbodenplatten in einer Menge von 5×10^4 Zellen/200 μl Gesamtvolumen in Medium alleine oder zusammen mit DSP30 in einer Konzentration von 1 μM und IL-2 in einer Menge von 200 U/ml in Kultur gebracht. Lactacystin wurde in ansteigender Konzentration von 0,63 μM - 10 μM zu den Ansätzen titriert, die Ansätze 72 Stunden im Brutschrank kultiviert, im Anschluss daran mit 1 μCi 3H -Thymidin/well gepulst und nach weiteren 8 Stunden Inkubation bei $-20^{\circ}C$ eingefroren. Zur Bestimmung der 3H -Thymidinaufnahme wurden sie in einem PHD Zellharvester verarbeitet, und die Thymidinaufnahme anschliessend in einem B-Counter bestimmt.

2.2.4 Durchflusszytometrie

Aufgereinigte B-CLL Zellen in einer Menge von 5×10^5 Zellen/ ml wurden in 24well Platten in einem Gesamtvolumen von 2 ml in Medium alleine oder zu-

sammen mit DSP30 ($1 \mu M$) und IL-2 ($100 U/ml$) kultiviert. Zur Bestimmung der lactacystinabhängigen Apoptoseinduktion wurde Lactacystin in einer ansteigenden Konzentration von $0,63 \mu M$ - $10 \mu M$ zu den Ansätzen titriert, diese für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert, im Anschluss daran 5 Minuten bei $1.400 U/min$ zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen, in Facscanröhrchen überführt und in $500 \mu l$ Annexinpuffer pro Ansatz zusammen mit $1 \mu l$ Annexin-FITC Stock Lösung und $5 \mu l$ PI in einer Konzentration von $20 \mu g/ml$ aufgenommen. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur unter lichtgeschützten Bedingungen wurden die Proben zur Bestimmung des Transportes von Phosphatidylserin zur äusseren Membran mittels eines Durchflusszytometers der Marke Coulter analysiert, wobei jeweils 5.000 Counts gemessen wurden.

Zur Analyse des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ wurden die Zellen bei gleichem Ansatz für 30 Minuten vor Entnahme aus der Kultur bei $37^{\circ}C$ mit 3,3'-Dihexyl-oxacarbocyanin Iodid ($DiOC_6(3)$) in einer Konzentration von $20 nM$ inkubiert, anschliessend aus der Kultur entnommen, 5 Minuten bei $1.400 U/min$ zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen, in Facscanröhrchen überführt, in $500 \mu l$ Annexin Puffer zusammen mit $5 \mu l$ PI in einer Konzentration von $20 \mu g/ml$ aufgenommen und mittels Durchflusszytometrie analysiert, 5.000 Counts messend. Zur Untersuchung der Induktion genomischer DNA Strangbrüche durch Lactacystin wurde der ApoAlertTM DNA Fragmentation Assay Kit Direct der Firma BD Biosciences Clontech verwendet. Dazu wurden aufgereinigte B-CLL Zellen in einer Menge von 1×10^6 Zellen/ ml in 24well Platten alleine oder zusammen mit DSP30 ($1 \mu M$) und IL-2 ($100 U/ml$) kultiviert. Lactacystin wurde in einer Konzentration von $2,5 \mu M$ zugegeben. Nach 24h erfolgte die Weiterverarbeitung nach dem ApoAlertTM Direct Protokoll mit abschließender Analyse im Durchflusszytometer, 5.000 Counts messend.

Zur Untersuchung der Lactacystinwirkung bei zeitversetzter Zugabe wurden B-

CLL Zellen in einer Menge von 5×10^5 Zellen/*ml* in 24well Platten mit DSP30 ($1 \mu M$) und IL-2 ($100 U/ml$) stimuliert in Kultur genommen. Lactacystin wurde in einer Konzentration von $2,5 \mu M$ sofort, nach 12 oder nach 24 Stunden zu den Ansätzen hinzugegeben und mit stimulierten B-CLL Zellen ohne Lactacystinzugabe verglichen. Nach 48 Stunden wurden die Zellen aus der Kultur entnommen, 5 Minuten bei $1.400 U/min$ zentrifugiert, einmal in PBS gewaschen, in Facscanröhrchen überführt und in $500 \mu l$ Annexinpuffer pro Ansatz zusammen mit $1 \mu l$ Annexin-FITC Stock Lösung und $5 \mu l$ PI in einer Konzentration von $20 \mu g/ml$ aufgenommen. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur unter lichtgeschützten Bedingungen wurden die Proben mittels Durchflusszytometrie analysiert, jeweils 5.000 Counts messend.

Zur Überprüfung des Apoptoseverhaltens bei Zugabe von z-VAD.fmk, einem Pan-caspaseinhibitor, wurden B-CLL Zellen in einer Menge von 5×10^5 Zellen/*ml* (Annexin Assay, mitochondriales Membranpotential) bzw. 1×10^6 Zellen/*ml* (ApoDirect Assay) in 24well Platten kultiviert und mit z-VAD.fmk in einer Konzentration von $50 \mu M$ eine Stunde vorinkubiert, im Anschluss daran in Medium alleine belassen oder mit DSP30 ($1 \mu M$) und IL-2 ($100 U/ml$) stimuliert, und Lactacystin in einer Konzentration von $2,5 \mu M$ zu nichtstimulierten und stimulierten Ansätze hinzugegeben. Als Kontrolle dienten nichtstimulierte und stimulierte B-CLL Zellen ohne Zugabe von z-VAD.fmk beziehungsweise Lactacystin. Nach 24 Stunden wurden die Ansätze aus der Kultur entnommen, 5 Minuten bei $1.400 U/min$ zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen, in Facscanröhrchen überführt und in $500 \mu l$ Annexinpuffer pro Ansatz, zusammen mit $1 \mu l$ Annexin-FITC Stock Lösung und $5 \mu l$ PI in einer Konzentration von $20 \mu g/ml$ aufgenommen. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter lichtgeschützten Bedingungen wurden die Ansätze mittels Durchflusszytometrie analysiert, wobei jeweils 5.000 Ereignisse gemessen wurden.

2.2.5 Immunoblots

Zur Untersuchung zellulärer Proteine mittels Immunoblot wurden B-CLL Zellen in einer Menge von 1×10^7 Zellen/*ml* bei einer Gesamtzellzahl pro Ansatz von 5 bis 10×10^7 Zellen in 6well Platten in Medium alleine oder zusammen mit DSP30 ($1 \mu M$) und IL-2 ($100 U/ml$) kultiviert und mit Lactacystin in einer Konzentration von $2,5 \mu M$ inkubiert. Bei den Untersuchungen der Hemmung von Procaspase 3 durch z-VAD.fmk, und der Hemmung der bax Cleavage durch Calpeptin wurden die Proben zusätzlich mit z-VAD.fmk in einer Konzentration von $50 \mu M$ oder Calpeptin einer Konzentration von $100 \mu M$ vorinkubiert. Nach 12 oder 24 Stunden wurden die Ansätze aus der Kultur entnommen, 5 Minuten bei $1.400 U/min$ zentrifugiert, einmal in PBS gewaschen, und anschliessend bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80^{\circ}C$ in $50 ml$ Röhren tiefgefroren. Zur Weiterverarbeitung wurden die einzelnen Ansätze in $50 \mu l$ eiskaltem Lysis Puffer (siehe Kapitel 2.1.3 Puffer auf Seite 24) aufgenommen, in ein $1,5 ml$ Tube übernommen, mit einer Eppendorf 20 - $200 \mu l$ - Pipette bis zum Aufschäumen der Proben resuspendiert, 20 Minuten auf Eis gelegt, bei $12.000 U/min$ 20 Minuten zentrifugiert und die Überstände ($50 \mu l$) zusammen mit $50 \mu l$ Loading Buffer in 2 $1,5 ml$ Tubes überführt. $10 \mu l$ zur Proteinmengenbestimmung wurden pro Ansatz separat in ein $1,2 ml$ Tube pipettiert. Die $50 \mu l$ Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei $-20^{\circ}C$ tiefgefroren. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte anhand der Bio-Rad Assay Methode an einem Photometer der Firma *Bio Tek*. Zur Erstellung von Immunoblots wurden die Proben zuerst 10 Minuten bei $95^{\circ}C$ aufgekocht und anschließend für 10 Minuten bei $14.000 U/min$ zentrifugiert. Um einen gleichmäßigen Proteinanteil in allen Proben zu erreichen, wurden diese je nach einzeln ermitteltem Proteinanteil im Bio Rad Assay, mit einer entsprechenden Menge an Loading Buffer auf

insgesamt 40 μl pro Probe verdünnt und in einer Menge von 60 μg Protein pro 40 μl auf ein 12% -iges SDS-Agarosegel bestehend aus Sammelgel und Trenngel, (siehe 2.1.4 Agarosegele auf Seite 15), aufgetragen. Als Marker diente Full range RainbowTM Molecular weight marker. In einer Elektrophoresekammer gefüllt mit 1% Running Buffer liefen die Proben bei einer Voltzahl von 28V über Nacht ins Gel und wurden am nächsten Tag in einer Transferkammer 40 Minuten bei 800 mA auf PVDF Membranen transferiert. Nach dem Transfer wurden die Membranen in je 20 ml einer Lösung aus 20 ml PBS-Tween 1% + 1 g/20 ml Skim Milk Powder 60 Minuten bei 37°C geblockt und anschließend 3 × 10 Minuten mit PBS + 1% Tween gewaschen. Danach wurden die Membranen 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einem für das zu untersuchende Protein spezifischen primären Mouse oder Rabbit Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000, aufgelöst in 20 ml PBS-Tween 1% + 1 g/20 ml Skim Milk Powder pro Membran, inkubiert. Nach erneutem 3 × 10 minütigem Waschen mit PBS + 1% Tween wurden die Membranen mit einem Sekundärantikörper spezifisch für Mouse oder Rabbit, in einer Verdünnung von 1:10000, aufgelöst in 20 ml PBS-Tween 1% + 1 g/20 ml Skim Milk Powder, für 45 Minuten inkubiert. Nach nochmaligem 3 × 10 minütigem Waschen, den letzten Waschschrift nur mit PBS ohne Tween durchführend, wurden die Membranen kurz in 2 ml Super Signal® Chemolumineszenz Substrat der Stärke Femto, Dura oder Pico getaucht und anschließend in der Dunkelkammer in einem Hyperprocessor auf Chemolumineszenzfilme geblotet.

2.2.6 Statistische Analysen

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

3. Ergebnisse

3.1 Lactacystin inhibiert die Proliferation aktivierter B-CLL Zellen

Die Stimulation von B-CLL Zellen mit dem CpG-Oligonukleotid DSP30 zusammen mit IL-2 löst eine erhebliche Proliferationszunahme dieser Zellen aus [Decker T et al (2), 2000].

Um den Effekt von Lactacystin auf das Proliferationsverhalten aktivierter B-CLL Zellen zu untersuchen, wurden diese mit DSP30 und IL-2 stimuliert und mit einer ansteigenden Konzentration von Lactacystin versetzt ($0,63\mu\text{M}$ bis $10\mu\text{M}$). Nach 72 Stunden Inkubationszeit wurden die Ansätze mit $1\mu\text{Ci}$ ^3H -Thymidin/well gepulst, und nach weiteren 8 Stunden Inkubationszeit das Proliferationsverhalten anhand von Proliferationsassays bestimmt. Bereits Konzentrationen von $1,25\mu\text{M}$ Lactacystin führen zu einer deutlichen Inhibition der Proliferation stimulierter B-CLL Zellen. Konzentrationen von $2,5\mu\text{M}$ Lactacystin inhibieren die Proliferation zu nahezu 100%. Ein repräsentatives Ergebnis dieser Versuche ist in Abbildung 3.1 auf Seite 35 dargestellt. Als Kontrolle dienten nichtstimulierte B-CLL Zellen.

3.2 Lactacystin beeinflusst wichtige zellzyklusregulierende Proteine

Die Inkubation von stimulierten B-CLL Zellen mit Lactacystin hat Änderungen der Expression wichtiger zellzyklusregulierender Proteine zur Folge.

Aufgereinigte B-CLL Zellen, stimuliert mit DSP30 und IL-2 befanden sich mit oder ohne Lactacystin einer Konzentration von 2,5 μM für 12 Stunden oder 24 Stunden in Kultur. Die Konzentration für Lactacystin wurde aus den vorangegangenen Proliferationsuntersuchungen (siehe Abbildung 3.1 auf Seite 35) als die optimale Konzentration zur Hemmung der Proliferation sowie Beeinflussung des Zellzyklus gewählt. Durchgeführte Immunoblots der Proteine p27, Zyklin D2, Zyklin D3, CDK2, CDK4, und Zyklin E, dargestellt in Abbildung 3.2 auf Seite 36, zeigen die Herabregulation des CDK Inhibitors p27 im Verlauf der Stimulation der B-CLL Zellen mit DSP30 und IL-2. Zusätzliche Inkubation mit Lactacystin führt zur Akkumulation von p27. Die Stimulation mit DSP30 und IL-2 hat zudem eine Hochregulation von Zyklin D2 und Zyklin D3 zur Folge, welche beide dazu in der Lage sind das RB Protein in vitro zu phosphorylieren [Decker *et al.*, 2002]. Durch Inkubation mit Lactacystin wird die Hochregulation beider Proteinen verhindert. Die Expression von CDK2, CDK4, und Zyklin E bleibt im Gegensatz dazu im Verlauf der Stimulation mit DSP30 und IL-2, mit oder ohne Zugabe von Lactacystin unverändert. Untersuchungen an nichtstimulierten B-CLL Zellen, dargestellt als Immunoblot in Abbildung 3.3 auf Seite 37, zeigen, dass p27 im Gegensatz zu stimulierten B-CLL Zellen keine Regulationsänderung erfährt. Die Expression bleibt sowohl mit als auch ohne Zugabe von Lactacystin auf gleichem Niveau.

3.3 Lactacystin induziert Apoptose bei B-CLL

Zellen

Die Inkubation von stimulierten und ruhenden B-CLL Zellen mit Lactacystin beeinflusst das Apoptoseverhalten dieser Zellen in hohem Maße.

3.3.1 Annexin V

Abbildung 3.4 auf Seite 38 zeigt ein repräsentatives Ergebnis einer Facsscanalyse, durchgeführt an ruhenden und stimulierten B-CLL Zellen, die sich 24 Stunden mit oder ohne Lactacystin einer Konzentration von $2,5 \mu\text{M}$ in Kultur befanden. Die Abbildung zeigt den Anteil annexinpositiver Zellen in Form eines Dichteblots. Die Zugabe von Lactacystin zu ruhenden als auch stimulierten B-CLL Zellen bewirkt eine Verschiebung der Zelldichte in den annexinpositiven Bereich, bei stimulierten B-CLL Zellen im dargestellten Beispiel eine Verschiebung von anfangs 5,3% annexinpositiver Zellen hin zu 88,6% annexinpositiver Zellen, 24 Stunden nach Zugabe von Lactacystin. In Abbildung 3.5 auf Seite 39 ist das Ergebnis aus 8 Versuchen an B-CLL Zellen 8 verschiedener Patienten dargestellt. Die Abbildung zeigt den Anteil annexinpositiver Zellen in Prozent, bei Inkubation ruhender und stimulierter B-CLL Zellen mit Lactacystin einer zunehmenden Konzentration ($0,63 \mu\text{M}$ bis $10 \mu\text{M}$) für 24 Stunden. Die Inkubation mit Lactacystin führt bei ruhenden sowie stimulierten B-CLL Zellen bereits in geringen Konzentrationen zur Verschiebung der Zelldichte in den annexinpositiven Bereich. Stimulierte B-CLL Zellen reagieren dabei sensibler auf gleiche Konzentrationen von Lactacystin als ruhende B-CLL Zellen. Bei einer Konzentration von beispielsweise $1,25 \mu\text{M}$ findet sich ein prozentualer Anteil annexinpositiver Zellen von circa 65% stimulierter B-CLL Zellen, und circa 41% ruhender Zellen. Eine

Konzentration von $2,5 \mu\text{M}$ hat eine Rate von knapp unter 90% annexinpositiver stimulierter B-CLL Zellen zur Folge, im Vergleich zu circa 70% nichtstimulierter B-CLL Zellen. Die Untersuchungen wurden auch an stimulierten sowie nichtstimulierten peripheren nichtmalignen B-Lymphozyten durchgeführt. Diese Zellen weisen eine erheblich geringere Sensibilität gegenüber Lactacystin auf als die malignen Zellen. Bei einer Konzentration von beispielsweise $2,5 \mu\text{M}$ findet sich ein prozentualer Anteil annexinpositiver Zellen von knapp unter 40% bei normalen nichtstimulierten B-Lymphozyten beziehungsweise circa 60% bei stimulierten B-Lymphozyten, im Vergleich zu circa 70% bei ruhenden beziehungsweise knapp unter 90% bei stimulierten B-CLL Zellen. Nichtmaligne Zellen weisen eine Rate von $\geq 80\%$ annexinpositiver Zellen erst bei Lactacystinkonzentrationen von $>10 - 50 \mu\text{M}$ auf (siehe Abbildung 3.6 auf Seite 40). Die Verschiebung von Phosphatidylserin zur äusseren Membran beginnt etwa 6 Stunden nach Zugabe von Lactacystin, repräsentativ dargestellt in Abbildung 3.7 auf Seite 41, und erreicht ein Maximum nach 24 Stunden (siehe Abbildung 3.4 auf Seite 38). Um die Frage zu klären ob der Zeitpunkt der Zugabe von Lactacystin Auswirkungen auf das Ausmaß der induzierten Apoptose bei proliferierenden B-CLL Zellen haben könnte, wurde Lactacystin zeitversetzt zu stimulierten B-CLL Zellen gegeben. Abbildung 3.8 auf Seite 42 zeigt repräsentativ die zeitverzögerte Zugabe von Lactacystin nach 12 und 24 Stunden zu stimulierten B-CLL Zellen im Vergleich zur sofortigen Zugabe. Die Facscananalyse wurde durchgeführt nach 48 Stunden. Lactacystin induziert sowohl zum Zeitpunkt 0, als auch nach 12 sowie nach 24 Stunden nicht signifikant unterschiedliche Annexinpositivitäten, im Bereich von 75-90%.

3.3.2 Mitochondriales Membranpotential $\Delta\Psi_m$

Die Inkubation von stimulierten und ruhenden B-CLL Zellen mit Lactacystin führt zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials dieser Zellen.

Die Zugabe von DiOCC₆(3) zu ruhenden und mit DSP30 und IL-2 stimulierten B-CLL Zellen nach 24 Stunden, repräsentativ dargestellt in Abbildung 3.9 auf Seite 43, zeigt, dass Lactacystin in einer Konzentration von 2,5 μM in der Lage ist, das mitochondriale Membranpotential ruhender B-CLL Zellen zu 80% zu zerstören, das stimulierter B-CLL Zellen zu nahezu 100%. Der Verlust des Membranpotentials wird 6 Stunden nach Zugabe von Lactacystin erkennbar, repräsentativ dargestellt in Abbildung 3.10 auf Seite 44.

3.3.3 Bcl-2, Bax, mcl-1 und bak

Das mitochondriale Membranpotential wird durch die Balance zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen aufrechterhalten. In der vorliegenden Arbeit wurden das antiapoptotische Protein bcl-2 und mcl-1 sowie die proapoptotischen Proteine bax, bak, Caspase 3, Caspase 8 und Caspase 9 untersucht. Bcl-2 und sein Gegenspieler bax werden als bedeutend für die Pathogenese der B-CLL beschrieben [Hanada M et al, 1993] [Mc Conkey DJ et al, 1996]. Die Expression beider Proteine wurde im Immunoblot untersucht. Das antiapoptotische Protein bcl-2, dargestellt in den Abbildungen 3.12 und 3.13 auf Seite 46 und 47, zeigt weder bei stimulierten noch bei ruhenden B-CLL Zellen im Verlauf der Inkubation mit Lactacystin eine Änderung der Regulation. Im bax Immunoblot tritt sowohl bei aktivierten (siehe Abbildung 3.12 auf Seite 46), als auch ruhenden B-CLL Zellen (siehe Abbildung 3.13 auf Seite 47) ein prominentes, 18kDa grosses bax Cleavage Produkt im Verlauf der Inkubation mit Lactacystin auf. Um die Zeitpunkte zu

erfassen nach denen dieses Bax Cleavage Produkt zum ersten Mal sichtbar wird, wurden Zeitkinetikversuche von 0 Stunden über 3, 6, 9 und 12 Stunden durchgeführt. In Abbildung 3.15 auf Seite 49 ist ein Ergebnis repräsentativ dargestellt. Aus diesen Versuchen geht hervor, dass die Cleavage von Bax bereits 6 Stunden nach Inkubationsbeginn nachweisbar wird, im weiteren Verlauf jedoch prominenter hervortritt.

Untersuchungen des antiapoptotischen Proteins mcl-1 sowie des proapoptotischen Proteins bak zeigten eine verminderte Expression von mcl-1 bei stimulierten B-CLL Zellen im Verlauf der Inkubation mit Lactacystin, bei ruhenden B-CLL Zellen eine unveränderte Expression, dargestellt in den Abbildungen 3.12 und 3.13 auf den Seiten 46 und 47. Bak, ebenfalls dargestellt in den Abbildungen 3.12 und 3.13 akkumuliert im Fall stimulierter B-CLL Zellen durch die Inkubation mit Lactacystin, bei ruhenden Zellen bleibt auch dieses Protein unverändert exprimiert.

3.3.4 Caspase 3, Caspase 8 und Caspase 9

Die Inkubation von stimulierten B-CLL Zellen mit Lactacystin führt zur Cleavage von Procaspase 3, Procaspase 8 und Procaspase 9.

Caspasen gehören zur Familie der Cysteinproteasen und werden als Modulatoren der Endstrecke der Apoptose beschrieben. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass Caspasen an der medikamenteninduzierten Apoptosevermittlung bei B-CLL Zellen beteiligt sind [Chandra et al, 1997] [Belosillo et al, 1997]. Im Immunoblot wird nach Inkubation von stimulierten B-CLL Zellen mit Lactacystin, bei Procaspase 3 neben der 32kDa Bande ein prominentes 17-22kDa grosses Fragment sichtbar (siehe Abbildungen 3.14 auf Seite 48). Dieses 17-22kDa Fragment tritt erstmals 6 Stunden nach Inkubationsbeginn auf, beispielhaft dargestellt in Abbildung 3.16

auf Seite 50. Ebenso zeigen Procaspase 8 und Procaspase 9, repräsentativ dargestellt in Abbildung 3.14 auf Seite 48 bei Inkubation mit Lactacystin eine verminderte Expression der Procaspaseform.

3.3.5 Z-VAD.fmk

Z-VAD.fmk, ein Pancaspase Inhibitor ist in der Lage die Cleavage von Procaspase 3 zu hemmen.

Da Caspasen eine wichtige Rolle im Verlauf der Apoptose spielen und ein prominentes Cleavageprodukt durch die Inkubation von stimulierten sowie ruhenden B-CLL Zellen mit Lactacystin im Immunoblot auftritt (siehe Abbildungen 3.12 und 3.13 auf Seite 46 und 47), wurde versucht durch Inkubation mit z-VAD.fmk und der daraus resultierenden Hemmung der Cleavage von Procaspase 3 auch die durch Lactacystin ausgelöste Apoptose der B-CLL Zellen zu beeinflussen. Caspase 3 Immunoblots, beispielhaft dargestellt in Abbildung 3.16 und 3.17 auf Seite 50 und 51, weisen durch Zugabe von z-VAD.fmk einen vollständigen Verlust des 17kDa Caspase 3 Cleavageprodukts nach 12 beziehungsweise 24 Stunden Inkubation mit Lactacystin auf. Im Annexinassay, repräsentativ dargestellt in Abbildung 3.18 auf Seite 52 verringert die Inkubation mit z-VAD.fmk den Anteil der annexinpositiven B-CLL Zellen, im Vergleich zu Zellen ohne Zugabe von z-VAD.fmk, allerdings nur um knapp 50%. Durchgeführte Tunel Assays, repräsentativ dargestellt in Abbildung 3.19 auf Seite 53, zeigen im Vergleich zu den Annexinassays eine Verminderung der DNA - Strangbruchrate bei zusätzlicher Inkubation mit z-VAD.fmk, auf Werte, die bei Inkubation ohne Lactacystin gefunden werden.

3.3.6 Calpeptin

Die Cleavage von Bax wird beeinflusst durch Calpaine [Wood DE et al, 1998] [Gao G et al, 2000].

Calpaine gehören zu einer Familie von kalziumabhängigen Thiol-Proteasen, die weit verbreitet sind in menschlichen Zellen. Es existieren sowohl gewebespezifische als auch ubiquitär vorkommende Formen von Calpainen. Durch Inkubation mit Calpeptin, einem membranpenetrierenden Calpaininhibitor, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, durch die Beeinflussung der Cleavage von Bax, die durch Lactacystin induzierte Apoptose zu beeinflussen. Durchgeführte Bax Immunoblots, beispielhaft dargestellt in Abbildung 3.15 und 3.20 auf Seite 49 und 54 zeigen, dass durch Inkubation mit Calpeptin keine Hemmung der Bax Cleavage erzielt werden konnte. Auch durch Inkubation der B-CLL Zellen mit z-VAD.fmk kommt es zu keinem Cleavageverlust bei Bax.

3.4 Lactacystin beeinflusst die Regulation von p53 und p21

Als wichtiges Regulatorprotein der Apoptose wurde p53 im Verlauf der Arbeit in Form von Immunoblots mehrfach untersucht. Abbildung 3.21 auf Seite 55 zeigt das repräsentative Ergebnis eines p53 Immunoblots, durchgeführt an B-CLL Zellen nach 12 und 24 Stunden. Die Zellen wurden zusammen mit DSP30 und IL-2 mit oder ohne Lactacystin in einer Konzentration von $2,5 \mu M$ inkubiert. Die Stimulation mit DSP30 und IL-2 führt zunächst zu einer erhöhten Expression von p53. Der längeren Stimulation von 48 bis 72 Stunden folgt allerdings eine erneute Expressionsabnahme, repräsentativ dargestellt in Abbildung 3.22 auf Seite 56. Bei zusätzlicher Inkubation mit Lactacystin kommt es zu einer Abnahme der

Expression von p53 im Verlauf von 12 bis 24 Stunden (siehe Abbildung 3.21 auf Seite 55).

P21^{WAF1/Cip1} aus der Gruppe der CDK Inhibitoren besitzt die Eigenschaften eines zyklinabhängigen Kinaseinhibitors. Bei den Untersuchungen von p21 in der vorliegenden Arbeit in Form von Immunoblots (siehe Abbildung 3.23 auf Seite 57) stellte sich heraus, dass die Stimulation von B-CLL Zellen mit DSP30 und IL-2 zu einer Hochregulation von p21 führt. Bei zusätzlicher Inkubation mit Lactacystin vermindert sich die Expression von p21 im Verlauf von 12 - 24 Stunden.

3.5 Abbildungen

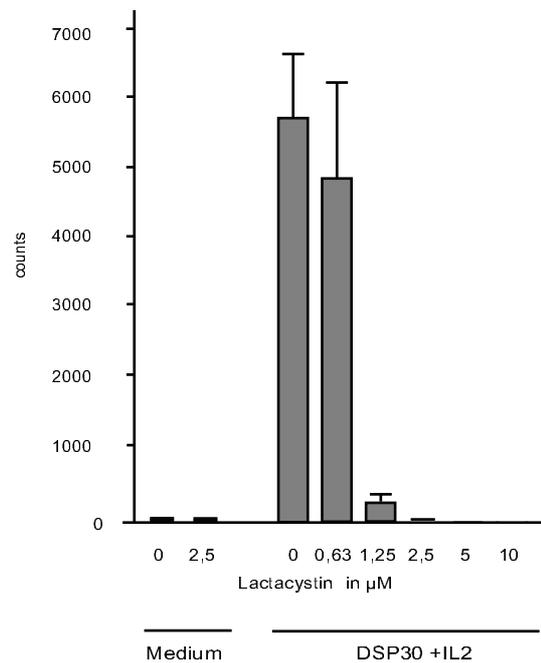


Abbildung 3.1: Lactacystintitration im Proliferationsassay

Die Behandlung mit Lactacystin verhindert die Thymidinaufnahme aktivierter B-CLL Zellen: Aufgereinigte B-CLL Zellen wurden in Medium alleine oder zusammen mit DSP30 (1 μM) und IL-2 (100 U/ml) kultiviert und Lactacystin in angegebener Konzentration hinzugegeben. Die ^3H -Thymidinaufnahme wurde nach 3 Tagen in Kultur als Dreifachbestimmung gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel.

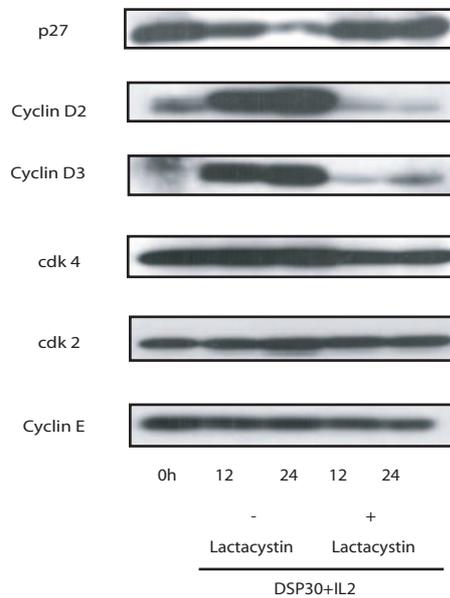


Abbildung 3.2: Zellzyklusproteine im Immunoblot

Die Inkubation mit DSP30 und Interleukin 2 führt zu einer verminderten Expression von p27 und erhöhter Expression von Zyklin D2 und D3 bei stimulierten B-CLL Zellen. Zusätzliche Inkubation mit Lactacystin führt zur p27 Akkumulation und verminderter Expression von Zyklin D2 und D3: Aufgereinigte B-CLL Zellen wurden für 12 oder 24 Stunden zusammen mit DSP30 ($1 \mu M$) und IL-2 ($100 U/ml$) mit oder ohne Lactacystin einer Konzentration von $2,5 \mu M$ in Kultur gegeben. Die Proteinexpression wurde bestimmt mit murinen Antikörpern gegen p27, Zyklin D2, Zyklin D3, CDK2, CDK4, und Zyklin E, bei einer Gesamtproteinmenge von $60 \mu g$ pro Probe. Die Proteinbestimmung mittels der Bio-Rad Assay Methode stellte äquivalente Proteinmengen in allen Proben sicher. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse der durchgeführten Immunoblots.

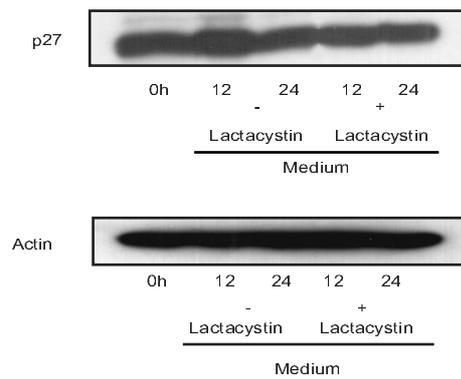


Abbildung 3.3: p27 im Immunoblot

Eine Verminderung der Expression von p27 zeigt sich bei stimulierten, nicht jedoch bei ruhenden B-CLL Zellen im Verlauf der Inkubation mit Lactacystin: P27, repräsentativ dargestellt bei ruhenden, in Medium alleine kultivierten B-CLL Zellen zeigt keine Änderung der Regulation bei Inkubation mit oder ohne Lactacystin. Zur Überprüfung der Proteingleichverteilung wurden, an dieser Stelle beispielhaft dargestellt, zusätzlich zur Proteinbestimmung mittels des Bio Rad Assays, Actin Immunoblots durchgeführt.

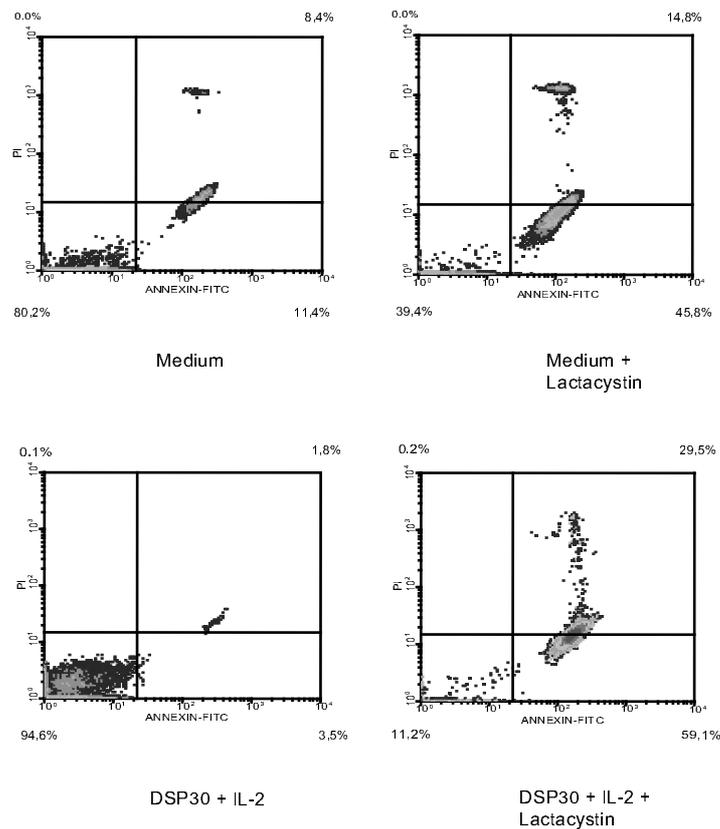


Abbildung 3.4: Annexin V Assay nach 24 Stunden

Lactacystin löst Apoptose aus bei ruhenden sowie stimulierten B-CLL Zellen:
Als repräsentatives Beispiel ist die prozentuale Verschiebung von B-CLL Zellen in den annexinpositiven Bereich bei Stimulation mit Lactacystin sowohl bei ruhenden als auch stimulierten B-CLL Zellen nach 24 Stunden gezeigt.

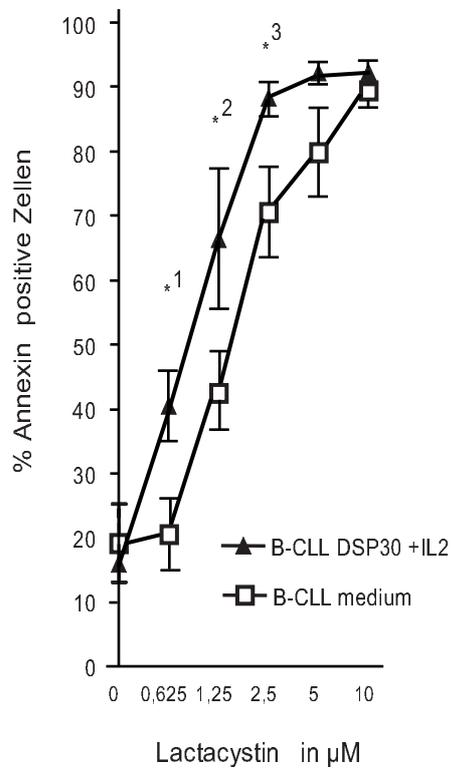


Abbildung 3.5: Lactacystintitration im Annexinassay - 24 Stunden

Aktivierte B-CLL Zellen reagieren sensibler auf die Inkubation mit Lactacystin als ruhende Zellen: Aktivierte (DSP30 und IL-2) und ruhende (Medium) B-CLL Zellen wurden mit Lactacystin in angegebener Konzentration für 24 Stunden inkubiert. Der Phosphatidylserintransport zur äusseren Membran wurde anhand des Annexin V Assays gemessen. Dargestellt ist der Prozentsatz an annexinpositiven Zellen \pm SEM von B-CLL Zellen 8 verschiedener Patienten. Gepaarte t Tests für stimulierte versus ruhende B-CLL Zellen wurden durchgeführt um signifikante Unterschiede zwischen aktivierten und ruhenden B-CLL Zellen zu ermitteln. Der * markiert die Punkte an denen der Unterschied signifikant war ($p < 0.05$).

(*¹ $p=0.007$; *² $p=0.01$; *³ $p=0.005$).

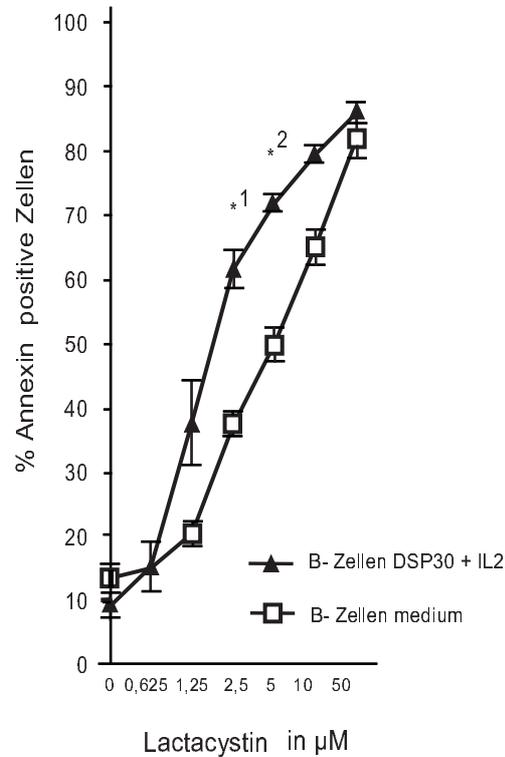


Abbildung 3.6: Nichtmaligne B-Zellen, Lactacystintitration - 24 Stunden

Nichtmaligne B-Zellen reagieren weniger sensibel auf die Inkubation mit Lactacystin als B-CLL Zellen: Aktivierte (DSP30 und IL-2) und ruhende (Medium) periphere B-Lymphozyten wurden mit Lactacystin in angegebener Konzentration für 24 Stunden inkubiert. Der Phosphatidylserintransport zur äusseren Membran wurde anhand des Annexin V Assays gemessen. Dargestellt ist der Prozentsatz an annexinpositiven Zellen \pm SEM von B-Zellen 3 verschiedener Personen. Gepaarte t Tests für stimulierte versus ruhende B-Lymphozyten wurden durchgeführt um signifikante Unterschiede zwischen ruhenden und aktivierten Zellen zu ermitteln. Der * markiert die Punkte an denen der Unterschied signifikant war ($p < 0.05$) (*¹ $p=0.0015$; *² $p=0.0061$).

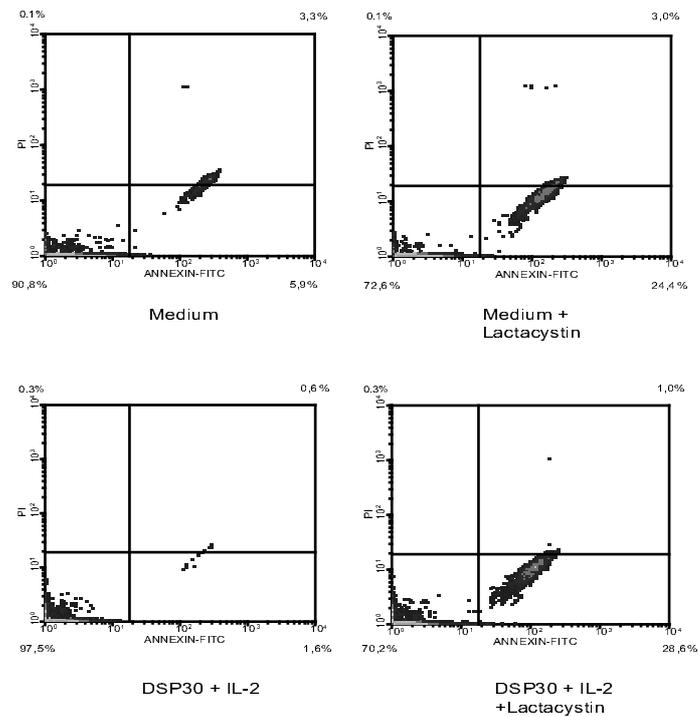


Abbildung 3.7: Annexin V Assay nach 6 Stunden

Die Apoptoseinduktion durch Lactacystin wird bereits nach 6 Stunden sichtbar: Als repräsentatives Beispiel ist die prozentuale Verschiebung von B-CLL Zellen in den annexinpositiven Bereich in Form eines Dichteblots sowohl bei ruhenden als auch stimulierten B-CLL Zellen nach einer Inkubationszeit mit Lactacystin von 6 Stunden gezeigt.

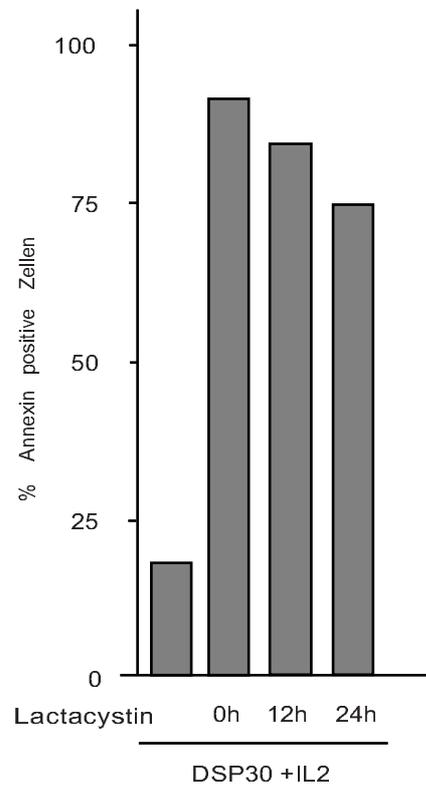


Abbildung 3.8: zeitversetzte Lactacystinzugabe im Annexinassay

Die zeitverzögerte Zugabe von Lactacystin bewirkt keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Apoptoseauslösung bei aktivierten B-CLL Zellen: Aufgereinigte B-CLL Zellen wurden zusammen mit DSP30 und IL-2 kultiviert. Lactacystin wurde sofort, nach 12 oder 24 Stunden in einer Konzentration von $2,5 \mu\text{M}$ zugegeben. Repräsentativ dargestellt ist der prozentuale Anteil annexinpositiver Zellen nach 48 Stunden.

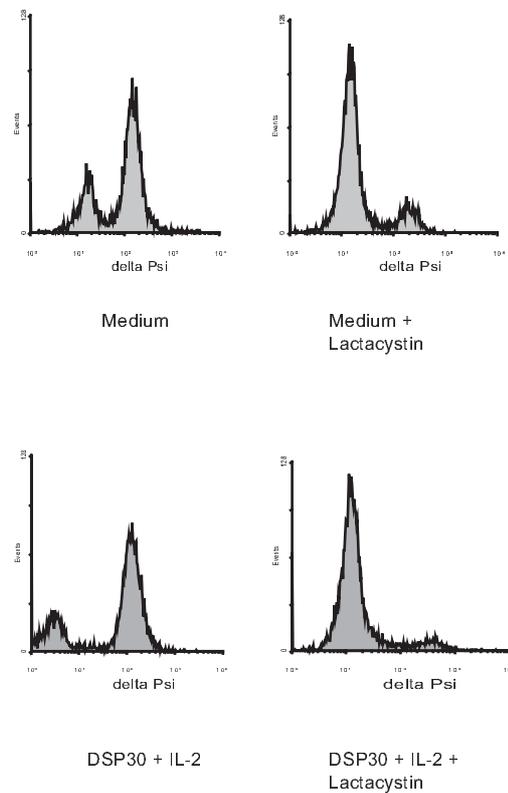


Abbildung 3.9: $\Delta\Psi_m$ nach 24 Stunden - Facscananalyse

Die Apoptoseinduktion durch Lactacystin wird begleitet durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials: B-CLL Zellen, in Medium alleine oder zusammen mit DSP30 und IL-2 stimuliert, befanden sich 24 Stunden mit oder ohne Lactacystin in Kultur. 30 Minuten vor Entnahme wurden sie mit $\text{DIOC}_6(3)$ inkubiert und der Einfluss von Lactacystin auf das mitochondriale Membranpotential im Durchflusszytometer ermittelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis.

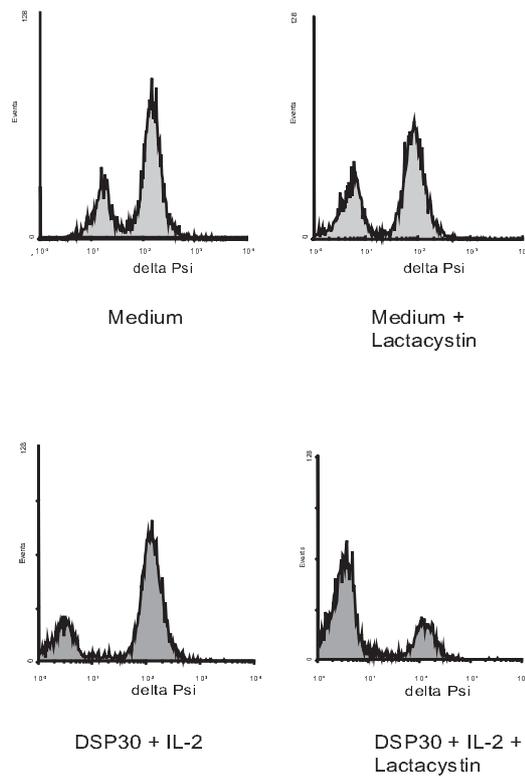


Abbildung 3.10: $\Delta\Psi_m$ nach 6 Stunden - Facscananalyse

Der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials wird erstmals sichtbar nach einer Lactacystin-Inkubationszeit von 6 Stunden: B-CLL Zellen, in Medium alleine oder zusammen mit DSP30 und IL-2 stimuliert, befanden sich 6 Stunden mit oder ohne Lactacystin in Kultur. 30 Minuten vor Entnahme wurden sie mit DIOC₆(3) inkubiert und der Einfluss von Lactacystin auf das mitochondriale Membranpotential im Durchflusszytometer ermittelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis.

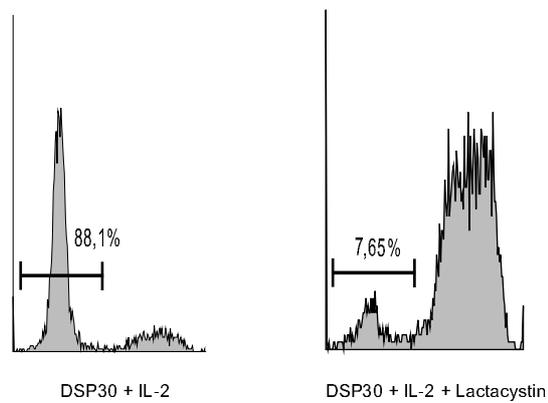


Abbildung 3.11: TUNEL Assay nach 24 Stunden - Facscanalyse

Die Inkubation mit Lactacystin führt zu DNA Strangbrüchen: Aufgereinigte B-CLL Zellen wurden zusammen mit DSP30 und Interleukin 2 für 24 Stunden mit oder ohne Zugabe von Lactacystin einer Konzentration von $2,5 \mu M$ inkubiert. Die DNA Strangbruchrate wurde mit Hilfe des TUNELassays, repräsentativ dargestellt als Facscanalyse, ermittelt.

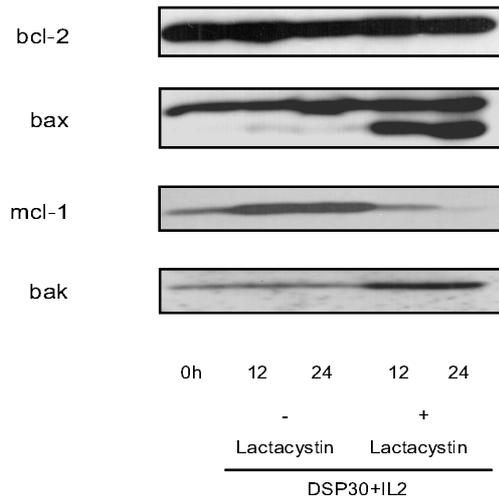


Abbildung 3.12: Bcl-2, bax, mcl-1 und bak stimulierter B-CLL Zellen im Immunoblot

Inkubation mit DSP30 und Interleukin 2 führt zur Akkumulation von mcl-1 bei unveränderter Expression von bcl-2 und bax mit minimaler Expression von bak. Zusätzliche Inkubation mit Lactacystin führt zur Cleavage von bax, verminderter Expression von mcl-1 und Akkumulation von bak bei unveränderter Expression von bcl-2: Aufgereinigte B-CLL Zellen wurden für 12 oder 24 Stunden zusammen mit DSP30 und IL-2 mit oder ohne Lactacystin inkubiert. Repräsentativ dargestellt ist die Expression von bcl-2, bax, mcl-1 und bak im Immunoblot bei einer Proteinmenge von 60 μ g pro Probe.

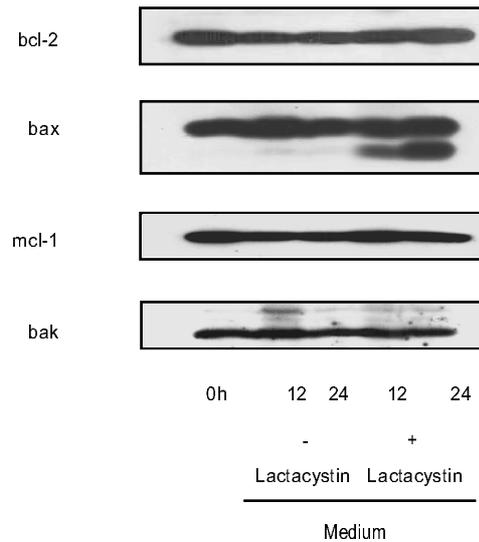


Abbildung 3.13: Bcl-2, bax, mcl-1 und bak ruhender B-CLL Zellen im Immunoblot

Inkubation nichtstimulierter B-CLL Zellen mit Lactacystin führt zur Cleavage von bax bei sonst unveränderter Expression von bcl-2, mcl-1 und bak im Vergleich zur Inkubation ohne Lactacystin: Aufgereinigte B-CLL Zellen wurden für 12 oder 24 Stunden in Medium mit oder ohne Lactacystin inkubiert. Repräsentativ dargestellt ist die Expression von bcl-2, bax, mcl-1 und bak im Immunoblot bei einer Proteinmenge von 60 μ g pro Probe .

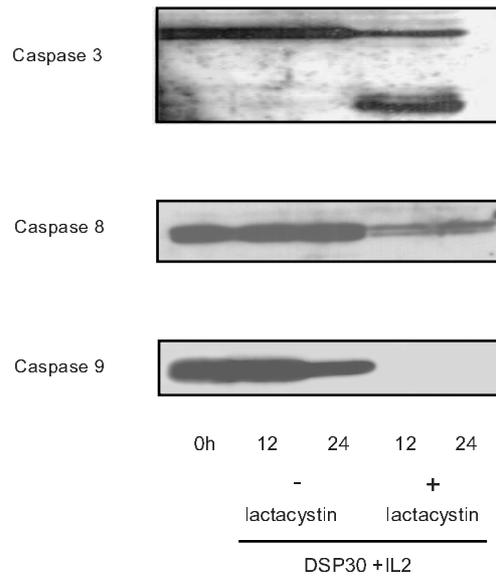


Abbildung 3.14: Caspase 3, 8 und 9 stimulierter B-CLL Zellen im Immunoblot

Inkubation mit Lactacystin führt zur Cleavage von Procaspase 3 sowie zur verminderten Expression von Procaspase 8 und 9 bei stimulierten B-CLL Zellen im Vergleich zur Inkubation ohne Lactacystin: Aufgereinigte B-CLL Zellen wurden für 12 oder 24 Stunden zusammen mit DSP30 und IL-2 mit oder ohne Lactacystin einer Konzentration von $2,5 \mu M$ inkubiert. Repräsentativ dargestellt ist die Expression von Caspase 3, 8 und 9 im Immunoblot bei einer Proteinmenge von $60 \mu g$ pro Probe.

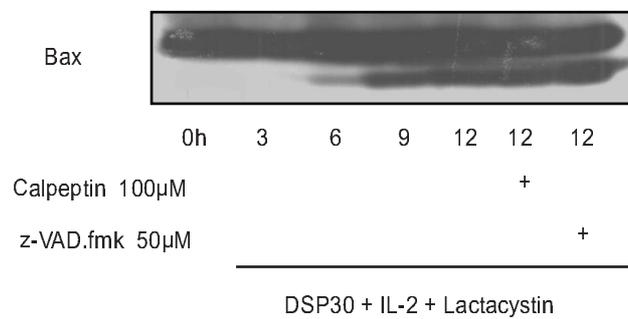


Abbildung 3.15: Bax, 3 - 12 Stunden im Immunoblot

Die Cleavage von Bax ist bereits nach 6 Stunden Inkubationszeit mit Lactacystin nachweisbar: Aufgereinigte B-CLL Zellen wurden, stimuliert mit DSP30 und IL-2, zusammen mit 2,5 µM Lactacystin für 3 - 12 Stunden inkubiert. Zusätzlich wurde ein Teil zuvor mit z-VAD.fmk und Calpeptin vorbehandelt. Die Expression von bax ist repräsentativ dargestellt als Immunoblot bei einer Proteinmenge von 60 µg pro Probe.

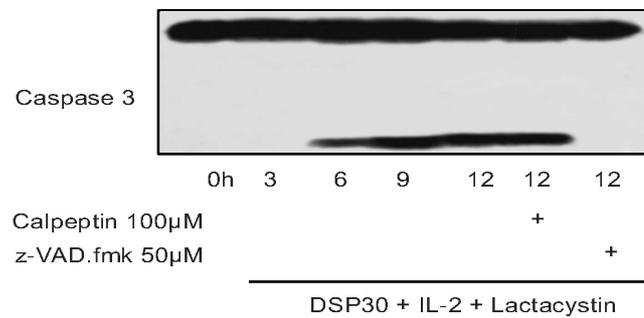


Abbildung 3.16: Caspase 3, 3 - 12 Stunden im Immunoblot

Die Cleavage von Procaspase 3 ist 6 Stunden nach Inkubation mit Lactacystin nachweisbar: Aufgereinigte B-CLL Zellen, stimuliert mit DSP30 und IL-2, wurden zusammen mit 2,5 µM Lactacystin für 3 - 12 Stunden inkubiert. Zusätzlich wurde ein Teil mit z.VAD.fmk und Calpeptin vorbehandelt. Die Expression von Caspase 3 ist repräsentativ dargestellt als Immunoblot bei einer Proteinmenge von 60 µg pro Probe.

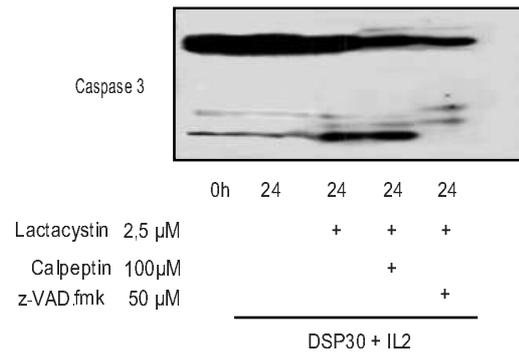


Abbildung 3.17: Caspase 3 mit Calpeptin und z-VAD.fmk im Immunoblot

Inkubation mit z-VAD.fmk hemmt die Cleavage von Procaspase 3: Aufgereinigte B-CLL Zellen wurden für 24 Stunden zusammen mit DSP30 und IL-2 mit oder ohne Lactacystin inkubiert. 1 Stunde zuvor wurde ein Teil mit z-VAD.fmk oder Calpeptin vorbehandelt. Die Expression von Caspase 3 ist repräsentativ dargestellt als Immunoblot bei einer Proteinmenge von 60 μ g pro Probe.

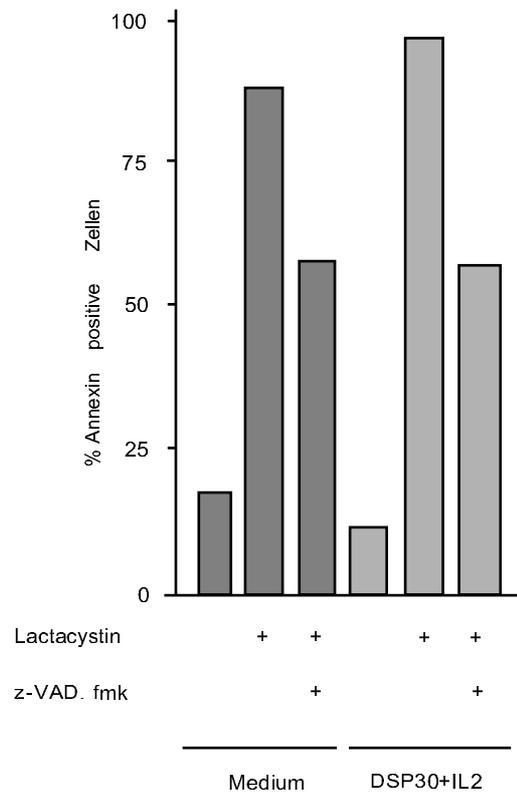


Abbildung 3.18: Annexinassay bei Vorinkubation mit z-VAD.fmk - 24 Stunden

Die zusätzliche Inkubation mit dem Pancaspaseinhibitor z-VAD.fmk kann die lactacystinvermittelte Apoptose nur zum Teil inhibieren: Aufgereinigte B-CLL Zellen wurden für 24 Stunden in Medium alleine oder zusammen mit DSP30 und IL-2 mit oder ohne Lactacystin inkubiert. 1 Stunde vor Stimulationsbeginn wurde den Zellen z-VAD.fmk, ein Pancaspaseinhibitor zugegeben. Diese Ansätze wurden verglichen mit ruhenden und stimulierten B-CLL Zellen ohne z-VAD.fmk Inkubation. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel einer durchflusszytometrischen Untersuchung.

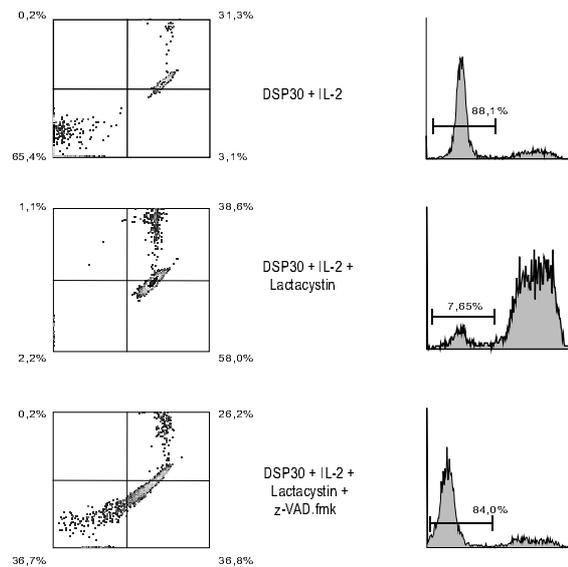


Abbildung 3.19: TUNEL Assay versus Annexinassay nach 24 Stunden - Facscanalyse

Die zusätzliche Inkubation mit dem Pancaspaseinhibitor z.VAD.fmk verhindert DNA Strangbrüche im Tunelassay: Aufgereinigte B-CLL Zellen wurden für 24 Stunden zusammen mit DSP30 und IL2 mit oder ohne Lactacystin einer Konzentration von $2,5 \mu\text{M}$ inkubiert. 1 Stunde vor Inkubationsbeginn wurde den Zellen z-VAD.fmk, ein Pancaspaseinhibitor zugegeben. Diese Ansätze wurden verglichen mit stimulierten B-CLL Zellen ohne z-VAD.fmk Inkubation. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel einer durchflusszytometrischen Untersuchung, wobei Annexinassay und Tunelassay miteinander verglichen wurden.

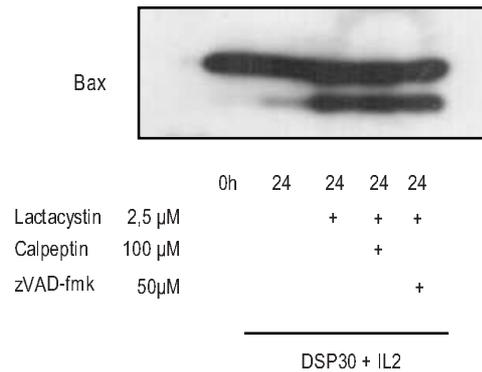


Abbildung 3.20: Bax mit Calpeptin und z-VAD.fmk im Immunoblot

Die Inkubation mit z-VAD.fmk und Calpeptin kann die Cleavage von Bax nicht verhindern: Aufgereinigte B-CLL Zellen wurden für 24 Stunden zusammen mit DSP30 und IL-2 mit oder ohne Lactacystin kultiviert. 1 Stunde zuvor wurde ein Teil mit z-VAD.fmk oder Calpeptin vorbehandelt. Die Expression von bax ist repräsentativ dargestellt als Immunoblot bei einer Proteinmenge von 60 μg pro Probe.

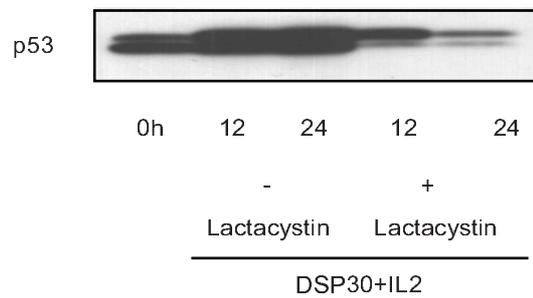


Abbildung 3.21: p53, 12-24 Stunden im Immunoblot

P53 wird durch Stimulation mit DSP30 und IL-2 vermehrt, durch zusätzliche Inkubation mit Lactacystin vermindert exprimiert: Aufgereinigte B-CLL Zellen wurden zusammen mit DSP30 und IL-2 mit oder ohne Lactacystin für 12 oder 24 Stunden inkubiert. Die Expression von p53 ist repräsentativ dargestellt als Immunoblot bei einer Proteinmenge von 60 μ g pro Probe.

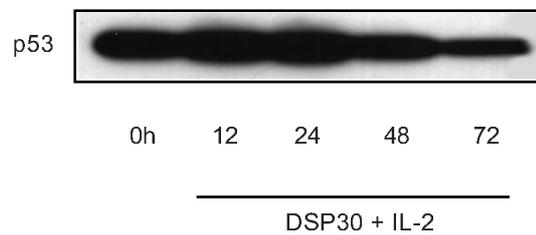


Abbildung 3.22: p53, 12-72 Stunden im Immunoblot

P53 wird durch Stimulation mit DSP30 und IL-2 im Verlauf von 12-24 Stunden vermehrt exprimiert, bei fortführender Stimulation wieder vermindert exprimiert: Aufgereinigte B-CLL Zellen wurden zusammen mit DSP30 und IL-2 für 12 bis 72 Stunden inkubiert. Die Expression von p53 ist repräsentativ dargestellt als Immunoblot bei einer Proteinmenge von 60 μg pro Probe.

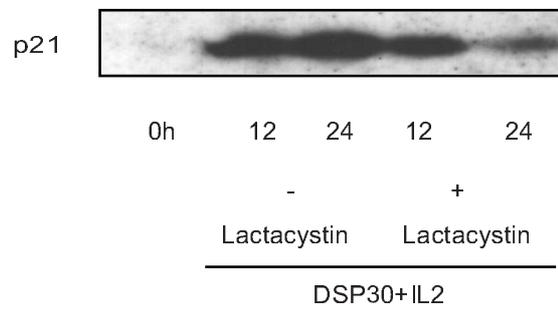


Abbildung 3.23: p21 im Immunoblot

P21 wird durch Stimulation mit DSP30 und IL-2 vermehrt, durch zusätzliche Inkubation mit Lactacystin vermindert exprimiert: Aufgereinigte B-CLL Zellen wurden zusammen mit DSP30 und IL-2 mit oder ohne Lactacystin für 12 oder 24 Stunden inkubiert. Die Expression von p21 ist repräsentativ dargestellt als Immunoblot bei einer Proteinmenge von 60 μg pro Probe.

4. Diskussion

B-CLL Zellen reagieren sehr sensibel auf die Inhibition des Proteasoms durch Proteasomeninhibitoren [Wang X et al, 1998] [Chandra et al, 1997]. Masdehors et al [Masdehors et al, 2000] konnten zeigen, dass der spezifische Proteasomeninhibitor Lactacystin bereits in niedriger Konzentration von $2,5\mu\text{M}$ in der Lage ist bei B-CLL Zellen Apoptose auszulösen, nicht jedoch bei normalen B-Lymphozyten, wo Konzentrationen von $50\mu\text{M}$ und mehr an Lactacystin benötigt wurden um ähnliche Effekte zu erzielen (siehe auch Abbildung 3.5 auf Seite 39). Die erhöhte Sensibilität der malignen B-CLL Zellen in Bezug auf die Inhibition des Proteasoms wird mit der erhöhten Aktivität des Ubiquitin-Proteasomen Abbauweges bei der B-CLL in Zusammenhang gebracht [Masdehors et al, 2000].

Aufgrund der fortschreitenden Akkumulation maligner B-Zellen trotz der proliferativen Inaktivität dieser Zellen im peripheren Blut, wurde die Theorie proliferierender B-CLL Zellen, vorkommend in sogenannten Proliferationszentren in Lymphknoten und Knochenmark, näher untersucht [Decker T et al, 2002]. Dieser Pool an proliferierenden B-CLL Zellen könnte den Pool der inaktiven B-CLL

Zellen im peripheren Blut der Patienten immer neu auffüllen [Granziero L et al, 1997], und damit die Progression der Erkrankung fördern. Um das Ansprechen auf Therapeutika zu verbessern darf die Therapie der B-CLL nicht nur im Hinblick auf den proliferativ inaktiven Teil der malignen Zellen im peripheren Blut ausgerichtet werden, sondern es muss im besonderen Maße der proliferierende Anteil in Lymphknoten und Knochenmark ins Auge gefasst werden.

Da die Auswirkungen der Inhibition des Proteasoms auf Zellen abhängig sind vom Zelltyp und dem Aktivierungsgrad der Zellen [Zhang XM et al, 1999] [Drexler HCA, 2000] [Hirsch T et al, 1998], wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt der Proteasomeninhibition durch Lactacystin auf ruhende B-CLL Zellen mit den Wirkungen von Lactacystin auf ein in vitro Modell aktivierter B-CLL Zellen verglichen [Fentany G et al, 1998] [Decker T et al (2), 2000].

Ergebnisse der Proliferationsuntersuchungen, als repräsentativer Versuch dargestellt in Abbildung 3.1 auf Seite 35, zeigen, dass eine Inhibition der Proliferation aktivierter B-CLL Zellen bei Lactacystinkonzentrationen von $0,63 \mu\text{M}$ messbar wird, eine Konzentration von $1,25 \mu\text{M}$ an Lactacystin die Proliferation bereits zu über 90 % inhibiert, und Lactacystinkonzentrationen von $2,5 \mu\text{M}$ einen nahezu 100 %igen Proliferationsstop der aktivierten B-CLL Zellen zur Folge haben. Die Ursachen des Verlustes der proliferativen Aktivität der stimulierten B-CLL Zellen wird in Verbindung gebracht mit der Beeinflussung der Regulation wichtiger Zellzyklusproteine durch die Inhibition des Ubiquitin- Proteasomenabbaues. Die Phasen des Zellzyklus (G0, G1, S, G2, M) sind charakterisiert durch das Zusammenwirken verschiedener Zykline sowie zyklinabhängiger Kinasen, die deren Ablauf regulieren. Die G1 Phase des Zellzyklus wird abhängig vom Zelltyp durch die Expression von Zyklin D1, D2, D3, assoziiert an die zyklinabhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 reguliert [Sherr CJ, 1993]. Ein Substrat der zyklinabhängigen Kinasen ist das Retinoblastom Protein (RB), das nach Phosphorylierung

den Transkriptionsfaktor E2F aus der Bindung entlässt. E2F wiederum aktiviert wichtige für die S-Phase benötigte Gene. Die weitere Regulation erfolgt durch Aktivierung von Zyklin E/CDK2 am G1/S Übergang, Zyklin A/CDK2 während der S-Phase und Zyklin B/CDK1 vor der Mitose [Nurse P, 1994]. Negativregulatoren des Zellzyklus sind zwei Familien von CDK-inhibitorischen Proteinen: Die Mitglieder der INK4 Familie (p15, p16, p18 und p19) binden und blockieren CDK4 und CDK6. Dadurch werden die zyklinabhängigen Kinasen an der Phosphorylierung ihrer Substrate gehindert. Die zweite Familie der CDK-Inhibitoren besteht aus mindestens drei Proteinen (p21^{WAF1/Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}). Diese Gruppe von CDK Inhibitoren spielt eine entscheidende Rolle bei der Formierung von Zyklin-CDK Komplexen [Hirama T et al, 1995]. P21 wird durch p53 reguliert und stellt einen wichtigen Effektor des p53 vermittelten Zellzyklusarrests dar [El-Deiry WS et al, 1993]. P53 Mutationen sind die häufigsten in humanen Tumoren gefundenen Mutationen. Auch bei der B-CLL sind Alterationen von p53 bei 20 % der Patienten beschrieben und werden als ungünstiger Prognosefaktor bewertet [Döhner H et al, 1995]. Andererseits scheint p27 eine entscheidende Rolle in der Kontrolle des G1 Restriktionspunkts zu spielen. In ruhenden Zellen ist der p27 Spiegel hoch (Abbildung 3.3 auf Seite 37) und fällt bei Eintritt in den Zellzyklus (Abbildung 3.2 auf Seite 36) [Kato J et al, 1994] ab. Zellen von Patienten mit erhöhter p27 Expression gehen in vitro einher mit verminderter Apoptose dieser Zellen. Hier deutet sich ein Zusammenhang zwischen frühem Zellzyklusarrest und verminderter Apoptose an [Vrhovac R et al, 1998]. Neben der erhöhten p27 Expression ist eine Überexpression von Zyklin D2, das in der frühen Phase der G1 Progression eine Rolle spielt, bei B-CLL Patienten beschrieben [Delmer A et al, 1995]. Die Aktivierung von B-Zellen durch Antigen, Zellkontakte oder Zytokine ist ein komplexer Vorgang, der zu Zellproliferation, Differenzierung oder Apoptose führen kann [Sherr CJ, 1993]. Über Signaltrans-

duktionswege, die die Expression von zellzyklusregulierenden Proteinen (der sog. *delayed early genes*) kontrollieren, ist bei normalen oder malignen B-Zellen bisher wenig bekannt. Die Regulation der Zyklin D1 Expression ist in Zelllinien solider Tumoren und Normalgewebe vergleichsweise gut untersucht und wird durch den Ras/MAP-Kinasen Weg [Danen EH et al, 2000] [Bakiri L et al, 2000] und durch die Stat Transkriptionsfaktoren reguliert [Sinibaldi D et al, 2000] [Matsumura I et al, 1999]. Auch Zyklin D2 wird durch verschiedene Signaltransduktionswege reguliert. Neben dem Src- und MAP-Kinasen Weg [Dey A et al, 2000] spielt auch c-Myc eine wichtige Rolle [Bouchard C et al, 1999] [Coller HA et al, 2000]. Die Regulation der Zyklin D3 Expression ist demgegenüber weniger gut untersucht. Eine wichtige Rolle scheint die p70s6 Kinase zu spielen [Fluckinger AC et al, 1992]. Die Gegenspieler der D-Typ Zykline, die CDK-Inhibitoren p21 und p27 werden überwiegend posttranskriptionell durch Abbau über den Ubiquitin-Proteasomen Weg reguliert [Nguyen H et al, 1999] [Di Cunto F et al, 1998].

Die Untersuchungen der Zellzyklusregulation in der vorliegenden Arbeit umfassten die Protein Zyklin D2, Zyklin D3, die zyklinabhängigen Kinasen CDK2 und CDK4, die CDK Inhibitoren p21 und p27 sowie p53 im Hinblick auf den Einfluss von Lactacystin auf deren Regulation sowohl bei ruhenden als auch bei stimulierten B-CLL Zellen. Der CDK Inhibitor p27 (siehe Abbildung 3.2 auf Seite 36) zeigt bei stimulierten B-CLL Zellen im Verlauf von 12 bis 24 Stunden eine deutliche Abnahme der Expression. Bei zusätzlicher Inkubation mit Lactacystin akkumuliert p27. Demgegenüber kommt es zu keiner Regulationsänderung von p27 bei ruhenden B-CLL Zellen (siehe Abbildung 3.3 auf Seite 37). Dies lässt den Schluss zu, dass p27 bei proliferierenden B-CLL Zellen durch das Proteasom degradiert wird, und so seinen inhibitorischen Einfluss auf die Zellzyklusprogression verliert. Durch Inkubation mit Lactacystin kann diese Regulation blockiert werden, und es kommt, wahrscheinlich mitbedingt durch die Akkumulation von p27 zur Beein-

flussung der Zellzyklusregulation der stimulierten B-CLL Zellen mit Inhibierung der weiteren Proliferation dieser Zellen (siehe 3.1 auf Seite 35). Während die Expression von CDK2, CDK4 und Zyklin E unverändert bleibt, wird die erhöhte Expression von Zyklin D2 und D3, die bei stimulierten B-CLL Zellen im Verlauf von 12 bis 24 Stunden erfolgt, durch die Inkubation mit Lactacystin blockiert (siehe Abbildung 3.2 auf Seite 36). Dieses unerwartete Ergebnis steht möglicherweise im Zusammenhang mit der schnellen Apoptoseinduktion durch Lactacystin innerhalb von 6 Stunden, (siehe Abbildungen 3.7, 3.10, 3.15 und 3.16 auf Seite 41, 43, 49 und 50), welche die Transkription von early response genes wie die der D-Typ Zykline blockieren könnte. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Tatsache, dass Lactacystin in der Lage dazu ist, die generelle Transkriptionsmaschinerie humaner Tumorzelllinien zu hemmen [Mimnaugh EG et al, 1997].

Das Tumor Suppressor Protein p53 repräsentiert ein kernassoziiertes Protein mit kurzer Halbwertszeit, dessen Akkumulation aufgrund von Stress, (zum Beispiel Schädigung der DNA), eine zentrale proapoptotischen Rolle in der Zelle spielt [Lowe SW et al, 1993], [Levine AJ, 1997], und als ein Substrat des Ubiquitin-Proteasomenabbauweges bekannt ist [Lopes UG et al, 1997]. Der CDK Inhibitor p21^{WAF1/Cip1} ist als Inhibitor diverser Zyklin/CDK Komplexe beschrieben, eingeschlossen ZyklinA/CDK2, ZyklinB/Cdc2, ZyklinE/CDK2 und ZyklinD/CDK4. P21 wird durch p53 reguliert und bei Stressituationen der Zelle wie zum Beispiel nach Bestrahlung, durch p53 hochreguliert. Neben der Funktion als Inhibitor wird p21 auch assoziiert als Zyklin/CDK/p21 Komplex beschrieben, während diese Komplexe innerhalb des Zellzyklus aktiv sind [Zhang H et al, 1994] [Michieli P et al, 1994] [Nourse J et al, 1994] [Mantel C et al, 1996] [Halaban R et al, 1998]. Zhang et al beschreiben, dass die aktiven Komplexe einzelne p21 Proteine enthalten, während die inaktiven Komplexe multiple p21 Proteine aufweisen. Untersuchungen von p53 und des CDK Inhibitors p21 in der vorliegenden

Arbeit ergaben, dass beide Proteine durch die Stimulation mit DSP30 und IL-2 vermehrt exprimiert werden. Bei zusätzlicher Inkubation mit Lactacystin fehlt diese vermehrte Expression, es kommt vielmehr zu einer Verminderung der Expression beider Proteine im Verlauf der Inkubation (siehe Abbildungen 3.21 und 3.23 auf Seite 55 und 57). Die erhöhte Expression von p53 bei Stimulation mit DSP30 und IL-2 kann als Reaktion auf die eingetretene Stresssituation interpretiert werden, da bei längerer Inkubation von 12 bis 72 Stunden eine erneute Abnahme der Expression erfolgt (siehe Abbildung 3.22 auf Seite 56). Die fehlende, beziehungsweise verminderte Expression von p53 im Verlauf der Stimulation mit Lactacystin kann ebenso wie bei den zellzyklusregulierenden Proteinen Zyklin D2 und D3 in der frühen Blockade von early response genes während der Inkubation mit Lactacystin begründet sein. Die Resultate aus den p21 Immunoblots (siehe Abbildung 3.23 auf Seite 57), können zum einen die Regulation von p21 durch p53 widerspiegeln, jedoch auch die beschriebene Expressionszunahme von p21 bei Aktivierung der Zelle im Sinne der Funktion eines Positivregulators des Zellzykluses, die bei Inkubation mit Lactacystin verminderte Expression von p21 zusätzlich den Zusammenhang mit der frühen Blockade von early response genes.

Zu wichtigen, in der Zelle apoptoseregulierenden Proteinfamilien zählen Proteine aus der Bcl-2 Genfamilie, der IAP-Genfamilie (siehe Kapitel 1.5 B-CLL Proliferationszentren), der Familie der Caspasen und der Calpaine. Mitglieder aus der Bcl-2 Familie sind Schlüsselregulatoren der Apoptose und modulieren die Zelle sowohl antiapoptotisch (bcl-2, bcl-XL, mcl-1) sowie proapoptotisch (bax, bak, bcl-XS) [Arch RH et al, 1998]. Bcl-2 ist dabei ein Acronym für B-cell lymphoma/leukemia-2 gene. Dieses Gen wurde entdeckt im Zusammenhang mit seiner Rolle bei malignen B-Zell Erkrankungen.

Einige low-grade non-Hodgkin Lymphome wie zum Beispiel das folliculäre Keim-

zentrums - Lymphom sind charakterisiert durch Fehlregulation dieses Genlokus aufgrund einer t(14;18) Translokation [Aisenberg AC et al, 1988], mit einer daraus resultierenden hohen Expression des antiapoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedes bcl-2 [Hanada M et al, 1993]. Bei der chronischen lymphatischen Leukämie sind Patienten nur in seltenen Fällen von der t(14;18) Translokation betroffen, die Überexpression des bcl-2 Proteins findet sich jedoch auch dort in der überwiegenden Mehrheit der Fälle [Hanada M et al, 1993] [Mc Conkey DJ et al, 1996]. Der Grund für die hohe Expression von bcl-2 bei der B-CLL ist bis heute noch nicht gänzlich geklärt. Untersuchungen an B-CLL Zellen zeigen aber eine De- beziehungsweise Hypomethylierung in der Promotorregion des Bcl-2 Gens [Hanada M et al, 1993] [Raghobier S et al, 1991] [Rechavi G et al, 1989]. Dies könnte eine Erklärung für die hohe Expressionsrate des bcl-2 Proteins darstellen, die auch als eine Ursache der verlängerten Lebenszeit der malignen Klone diskutiert wird.

Einige der Bcl-2 Proteinfamilienmitglieder sind neben ihrem Vorkommen in der Kernhülle und in Teilbereichen des endoplasmatischen Retikulums, in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert [Adams JM et al, 1998] [Green DR et al, 1998] [Gross A et al, 1999] und können dort die Freisetzung von Cytochrom C beeinflussen. Bei Freisetzung von Cytochrom C werden Effektorcaspasen aktiviert [Thornberry NA et al, 1998], welche wiederum eine Reihe wichtiger zellulärer Zielproteine wie das Retinoblastom Protein (RB) [An B et al, 1996] [Tan X et al, 1997], die poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) [Lazebnik Y et al, 1994], Laminin [Lazebnik Y et al, 1995] und die DNA dependent protein kinase [Song Q et al, 1996] beeinflussen. Die Freisetzung von Cytochrom C wird durch die proapoptotischen Bcl-2 Mitglieder, wie bax, bad und bid induziert und durch die antiapoptotischen Mitglieder bcl-2 und bcl-XL verhindert [Adams JM et al, 1998] [Green DR et al, 1998] [Gross A et al, 1999]. Dabei ist das Gleichgewicht der einzelnen Gegenspieler wichtig für die Zellviabilität [Luo X et al, 1998] [Kirsch

[DG et al, 1999]. Der proapoptotische Effekt der Inhibition des Proteasoms wird in Verbindung gebracht mit der daraus resultierenden Beeinflussung der Umsetzung der proapoptotischen Bcl-2 Mitglieder, wie zum Beispiel bax und bak [Pagano M et al, 1995] [Li B et al, 2000]. Zusätzlich dazu wird eine Cleavage des antiapoptotischen Proteins bcl-2 sowie die Anhäufung des proapoptotischen Cleavageproduktes von bid (tbid) nach Inkubation mit Lactacystin beschrieben [Hideshima T et al, 2000] [Breitschopf K et al, 2000]. In der vorliegenden Arbeit kam es bei der Untersuchung von bcl-2 im Immunoblot, sowohl bei unstimulierten als auch stimulierten B-CLL Zellen, mit oder ohne Lactacystininkubation zu keiner Regulationsänderung oder Cleavage (siehe Abbildung 3.12 und 3.13 auf Seite 46 und 47). Es tritt jedoch ein prominentes bax Cleavage Produkt von 18kDa auf, dargestellt in Abbildung 3.12 und 3.13 auf Seite 46 und 47, das sowohl bei ruhenden als auch stimulierten B-CLL Zellen im Verlauf der Inkubation mit Lactacystin sichtbar wird. Das antiapoptotische Protein mcl-1 wird bei stimulierten B-CLL Zellen vermehrt exprimiert, die Inkubation mit Lactacystin verhindert diese Regulation. Bei ruhenden B-CLL Zellen zeigt dieses Protein keine Regulationsänderung. Das proapoptotische Protein bak akkumuliert bei stimulierten B-CLL Zellen im Verlauf der Inkubation mit Lactacystin leicht, bei unstimulierten Zellen zeigt auch dieses Protein keine Änderung der Regulation (siehe Abbildungen 3.12 und 3.13 auf Seite 46 und 47). Die Unterschiede der Regulation, abhängig vom Stimulationsstatus der Zellen, könnten die Bedeutung der Proteine mcl-1 und bak, oder deren Verhältnis zueinander, bei proliferierenden B-CLL Zellen in der Kontrolle der Apoptose beschreiben. Die unterschiedliche Regulation dieser beiden Proteine bei ruhenden und stimulierten B-CLL Zellen könnte mit zur Erklärung beitragen, warum die Inhibition des Proteasoms durch Lactacystin Unterschiede der Sensibilität bei ruhenden und stimulierten B-CLL Zellen hervorruft (siehe Abbildung 3.5 auf Seite 39).

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass das 18kDa Cleavageprodukt von bax eine hohe proapoptotische Aktivität aufweist im Vergleich zum 21kDa Baxprotein [Wood DE et al, 2000]. Interessanterweise war die Fähigkeit des bax p/18 Proteinfragmentes Zelltod auszulösen unabhängig von der Proteinexpression des bcl-2 Proteins [Gao G et al, 2000]. Es wird beschrieben, dass die Cleavage von bax eine Folge von Caspase und Calpain Aktivierung darstellt [Wood DE et al, 1998] [Wood DE et al, 1999]. Die Familie der Caspasen, zu denen unter anderen Caspase 3 gehört, repräsentiert eine Familie von Cysteinproteasen, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden [Nicholson DW et al, 1997], und ihre Substrate in einer hoch sequenzspezifischen Weise (Aspartat in der P1 Position nötig) spalten [Cohen GM, 1997]. Zu den Substraten der Caspasefamilie gehören neben dem RB Protein, strukturelle Proteine des Nucleus wie PARP (poly (ADP-ribose) Polymerase), und Proteine des Zytoskeletts (zum Beispiel Laminin und Gesolin). Durch die Spaltung einiger dieser Caspasesubstrate treten charakteristische Änderungen der Morphologie und der Biochemie innerhalb der Zelle auf, wie sie im Ablauf der Apoptose beobachtet werden [Cryns V et al, 1998]. Caspase 3 zum Beispiel vermittelt die Spaltung des DNA fragmentation factors, die zur Chromatin Kondensation und DNA Fragmentierung während der Apoptose führt [Liu X et al, 1997] [Liu X et al, 1998]. In der vorliegenden Arbeit kam es sowohl bei ruhenden als auch stimulierten B-CLL Zellen im Verlauf der Inkubation mit Lactacystin zu einer Cleavage von Caspase 3 in ein 17kDa Produkt (siehe Abbildungen 3.12 und 3.13 auf Seite 46 und 47). Sichtbar wird die Caspase 3 Cleavage nach einer Inkubationszeit mit Lactacystin von 6 Stunden (siehe Abbildung 3.16 auf Seite 50).

Calpaine gehören zu einer Familie von kalziumabhängigen Cysteinproteasen von denen zwei Isoenzyme, μ - und m -Calpain ubiquitär in der Zelle exprimiert werden [Carafoli E et al, 1998]. Diese Enzyme sind heterodimer aufgebaut und

bestehen aus einer katalytischen 80 kDa Untereinheit und einer 30 kDa Untereinheit deren Funktion noch unklar ist [Carafoli E et al, 1998]. Im Gegensatz zu Caspasen sind Calpaine nicht strikt sequenzabhängig um ihre Substrate zu spalten [Carafoli E et al, 1998], zu denen nukleäre Proteine wie p53 und Zyklin D1 [Pariat M et al, 1997] [Choi YH et al, 1997], sowie Proteine, die mit dem Zytoskelett und der Plasmamembran in Verbindung stehen, (zum Beispiel Talin und der N-methyl- D-aspartate receptor) gehören [Yuan Y et al, 1997] [Bi X et al, 1998]. Bax wird ebenfalls als ein Substrat von Calpainen diskutiert [Wood DE et al, 1998]. Anders als Caspasen, die nur während der Apoptose aktiv sind, werden Calpaine auch bei Prozessen die dem normalen Zellmetabolismus dienen [Choi YH et al, 1997] [Yuan Y et al, 1997] [Bi X et al, 1998] [Potter DA et al, 1998] [Musleh W et al, 1997], sowie bei der Modellierung des Actinzytoskeletts bei der aktiven Zellbewegung gefunden [Potter DA et al, 1998].

In der vorliegenden Arbeit konnte eine partielle Inhibition der Apoptose durch den Einsatz hoher Dosen des Pancaspaseinhibitors z-VAD.fmk erreicht werden, (siehe Abbildung 3.18 auf Seite 52). Obwohl die Cleavage von Procaspase 3 durch die Zugabe von z-VAD.fmk komplett inhibiert wird (siehe Abbildung 3.17 auf Seite 51), kommt es lediglich zu einer Reduktion der Annexin-positiven Zellen im Annexin Assay um circa 50 %. Dies lässt den Schluss zu, dass die Apoptosevermittlung durch Lactacystin bei der B-CLL nur zum Teil auf caspaseabhängigen Wegen abläuft.

Die Cleavage von bax wird weder durch z-VAD.fmk noch durch die Inkubation mit Calpeptin, einem Calpaininhibitor beeinflusst (siehe Abbildung 3.20 auf Seite 54). Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit war z-VAD.fmk bei einem transienten Transfektionssystem von humanen 293T Zellen nur teilweise in der Lage die bax/p18 induzierte Apoptose zu hemmen, wo hingegen bei bax/p21 transfizierten Zellen eine komplette Blockierung der Apoptose gelang [Wood DE

et al, 2000]. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Akkumulation des proapoptischen 18kDa bax Cleavageproduktes verursacht wird durch die Inhibition des Proteasoms. Bax wird in diesem Zusammenhang auch als ein Ziel des Ubiquitin - Proteasomen Abbauweges beschrieben [Pagano M et al, 1995] [Chang YC et al, 1998]. Die proteasomenregulierte Degradierung von bax könnte somit einen Überlebensmechanismus der B-CLL Klone darstellen.

Masdehors et al beschreiben, dass eine Inkubation von ruhenden B-CLL Zellen mit Lactacystin über 6 Stunden zu keiner bax Cleavage bei diesen Zellen führt [Masdehors et al, 1999]. In der vorliegenden Arbeit konnte durch Zeitkinetikversuche gezeigt werden, dass nach 6 Stunden Inkubation mit Lactacystin das 18kDa bax Proteinfragment erstmals sichtbar wird, zu späteren Zeitpunkten jedoch deutlicher zum Vorschein kommt (siehe Abbildung 3.15 auf Seite 49). Das Auftreten des Cleavageproduktes stand in Verbindung mit dem Auftreten von annexinpositiven Zellen im Annexinassay (siehe Abbildung 3.7 auf Seite 41), dem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und der Cleavage von Caspase 3 (siehe Abbildung 3.10 und 3.16 auf Seite 43 und 50), sowohl bei ruhenden als auch bei aktivierten B-CLL Zellen.

Aktivierte B-CLL Zellen reagieren sensibler auf die Inhibition des Proteasoms durch Lactacystin als ruhende B-CLL Zellen (siehe Abbildung 3.5 auf Seite 39). Dies könnte die Notwendigkeit widerspiegeln, kurzlebige Proteine, die für die Zellzyklusregulation der proliferierenden B-CLL Zellen zuständig sind, vermehrt zu zerstören [Drexler HCA, 2000]. Tatsächlich wird eine erhöhte Proteasomenaktivität bei proliferierenden T-Zellen im Vergleich zu ruhenden T-Zellen beschrieben [Wang X et al, 1997].

Die erhöhte Sensibilität aktivierter B-CLL Zellen gegenüber der Inhibition des Proteasoms durch Lactacystin stellt ein zusätzliches Argument dar, Proteasomeninhibitoren bei dieser nach wie vor meist unheilbaren Erkrankung weiter zu

erforschen. Das proapoptotische Bax Cleavage Fragment, das bei mit Lactacystin inkubierten Zellen gefunden wurde, könnte verantwortlich sein für die Induktion der Apoptose bei B-CLL Zellen trotz der hohen Expressionsrate von bcl-2.

5. Zusammenfassung

Die chronische lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp (B-CLL) ist charakterisiert durch fortschreitende maligne Akkumulation kleiner CD5 positiver B-CLL Zellen im peripheren Blut. Obwohl die peripheren B-CLL Zellen in der G0/frühen G1 Phase des Zellzyklus arretiert sind, werden proliferierende leukämische Zellen beschrieben, vorkommend als Pseudofollikel in sogenannten Proliferationszentren in Lymphknoten und Knochenmark. Diese proliferativ aktiven Zellen scheinen von Bedeutung in Bezug auf die Progression der Erkrankung zu sein. Sie können sowohl Ausgangspunkt für Rezidive darstellen als auch den Pool der peripheren CLL Zellen erneuern.

In der vorliegenden Arbeit wird anhand eines Modells (B-CLL Zellen stimuliert mit CpG-Oligonukleotiden zusammen mit Interleukin 2) der proliferative Anteil der B-CLL untersucht.

Lactacystin ist ein mikrobieller Metabolit und hemmt spezifisch die proteolytische Aktivität des Proteasoms. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass Lactacystin in der Lage ist, hocheffektiv in die Zellzyklus- und Apoptoseregulation sowohl proliferierender als auch ruhender B-CLL Zellen einzugreifen. Lactacystin inhibiert die Degradierung des CDK Inhibitors p27 bei aktivierten B-CLL Zellen. Die Hochregulation von Zyklin D2 und Zyklin D3 wird inhibiert, wohingegen die

Expression von CDK2, CDK4 und Zyklin E unbeeinflusst bleibt.

Lactacystin löst bei stimulierten als auch ruhenden B-CLL Zellen Apoptose aus. Dabei reagieren aktivierte B-CLL Zellen signifikant sensibler auf Lactacystin als ruhende B-CLL Zellen. Die Apoptoseinduktion wird begleitet durch den kompletten Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Desweiteren tritt eine Cleavage von Procaspase 3 auf. Z-VAD.fmk, ein Pancaspaseinhibitor, ist in der Lage die Cleavage von Procaspase 3 komplett zu hemmen, die Apoptoseinduktion jedoch nur zum Teil.

Ein als proapoptotisches Protein beschriebenes 18kD Cleavageprodukt von bax akkumuliert bei mit Lactacystin behandelten Zellen. Im Gegensatz dazu kommt es zu keiner Änderung der Expression oder Cleavage von bcl-2. Die Cleavage von bax kann weder durch z-VAD.fmk, noch durch Calpeptin, einem Calpaininhibitor, gehemmt werden.

Die Inhibition des Proteasoms durch Lactacystin löst hoch effektiv Apoptose bei proliferierenden B-CLL Zellen aus. Dabei werden caspaseabhängige sowie unabhängige Wege benutzt. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass Therapeutika mit Aktivität gegen das proliferative Kompartiment der B-CLL eine attraktive Ergänzung in der Therapie dieser meist unheilbaren Erkrankung darstellen können.

Literaturverzeichnis

- [Adams J et al, 1999] Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ. Proteasom Inhibitors: A novel Class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Research* 59: 2615-2622 1999
- [Adams J et al, 2000] Adams J, Palombella VJ, Elliot PJ. Proteasome inhibition: a new strategy in cancer treatment. *Investigational New Drugs* 18: 109-121, 2000. *Oncologist* 2002;
- [Adams JM et al, 1998] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326 1998
- [Aisenberg AC et al, 1988] Aisenberg AC, Wilkes BM, Jacobson JO. The bcl-2 gene is rearranged in many diffuse B-cell Lymphomas. *Blood* 71: 969-972 1988
- [Ambrosini et al, 1997] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel antiapoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3: 917-921 1997
- [An WG et al, 2000] An WG, Hwang SG, Trepel JB, Blagosklonny MV. Protease inhibitor-induced apoptosis: accumulation of wt p53, p21 WAF/CIP1, and induction of apoptosis are independent markers of proteasom inhibition. *Leukemia* 14: 1276-1283 2000

- [An B et al, 1996] An B, Dou QP. Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: an interleukin 1 β -converting enzyme like protease as candidate. *Cancer Res* 56: 438-442 1996
- [Arch RH et al, 1998] Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)– a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev* 12: 2821-2830 1998
- [Bakiri L et al, 2000] Bakiri L, Lallemand D, Bossey-Wetzel E, Yaniv M. Cell cycle-dependent variants in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of Cyclin D1 expression. *EMBO J* 19: 1056-2068 2000
- [Bauer M et al, 1999] Bauer M, Wagner H, Heeg K, Lipford GB. DNA activates human immune cells through a CpG sequence dependent manner. *Immunology* 1999
- [Begley CG et al] Begley CG, Burton JD, Tsudo M, Brownstein BH, Ambrus JL, Waldmann TA. Human B lymphocytes express the p75 component of the interleukin 2 receptor. *Leukemia Res* 14: 263-271
- [Belosillo et al, 1997] Belosillo BDM, Colomer D, Gil J. Involvement of CED-3/ICE proteases in the apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 89: 3378-3384 1997
- [Bi X et al, 1998] Bi X, Rong Y, Chen J, Dang S, Wang Z, Baudry M. Calpain-mediated regulation of NMDA receptor structure and function. *Brain Res* 790: 245-253 1998
- [Bird A, 1992] Bird A. The essentials of DNA methylation. *Cell* 70: 5 1992
- [Bouchard C et al, 1999] Bouchard C, Thieke K, Maier A, Saffrich R, Hanley-Hide J, Ansorge W, Reed S, Sicinski P, Bartek J, Eilers M. Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J* 18: 5321-5333 1999

- [Breitschopf K et al, 2000] Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S. Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of Bid. *J Biol Chem* 275: 21648-21652 2000
- [Carafoli E et al, 1998] Carafoli E, Molinari M. Calpain: a protease in search of a function? *Biochem Biophys Res Commun* 247: 193-203 1998
- [Chandra J et al, 1998] Chandra J, Niemer I, Gilbreath J. Proteasome inhibitors induce apoptosis in glucocorticoid-resistant chronic lymphocytic leukemic lymphocytes. *Blood* 92: 4220-4229 1998
- [Chandra et al, 1997] Chandra J, Gilbreath J, Freireich EJ, Kliche KO, Andreeff M, Keating M, McConkey DJ: Protease activation is required for glucocorticoid-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemic lymphocytes. *Blood* 90: 3673-3680 1997
- [Chang YC et al, 1998] Chang YC, Lee YS, Tejima T, Tanaka K, Omura S, Heintz NH, Magae J. Mdm2 and bax, downstream mediators of the p53 response, are degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Growth Differ* 9: 79-84 1998
- [Chen Z et al, 1999] Chen Z, Naito M, Hori S, Mashima T, Yamori T, Tsuruo T. A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264: 847-854 1999
- [Choi YH et al, 1997] Choi YH, Lee SJ, Nguyen P, Jang JS, Lee J, Wu ML, Takano E, Maki M, Henkart PA, Trpel JB. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J Biol Chem* 272: 28479-28484 1997
- [Cohen GM, 1997] Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326: 1-16 1997
- [Coller HA et al, 2000] Coller HA, Grandori C, Tamayo P, Colbert T, Lander ES, Eisenman RN, Golub TR. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that myc regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci*: 24096-22105 2000

- [Cryns V et al, 1998] Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev* 12: 1551-1570 1998
- [Danen EH et al, 2000] Danen EH, Sonneveld P, Sonnenberg A, Yamada KM. Dual stimulation of Ras/mitogen-activated protein kinase and RhoA by cell adhesion to fibronectin supports growth-factor-stimulated cell cycle progression. *J Cell Biol* 151: 1413-1422 2000
- [Das Rote Buch, 2002] Berger D P, Engelhardt R, Mertelsmann R. *Das Rote Buch. Hämatologie und Onkologie. 2. Auflage, 2002. 422-429*
- [Decker T et al (1), 2000] Decker T, Schneller F, Sparwasser T, Tretter T, Lipford GB, Wagner H, Peschel C. Immunostimulatory CpG-Oligonucleotides cause proliferation, cytokine secretion and an immunogenic phenotype in B-CLL patients. *Blood* 95: 999-1006 2000
- [Decker T et al (2), 2000] Decker T, Schneller F, Kronschnabl M, Deschow T, Lipford GB, Wagner H, Peschel C. Immunostimulatory CpG-Oligonucleotides induce the expression of functional IL-2 receptors on B-CLL cells: Costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype. *Exp Hematol* 28: 558-568 2000
- [Decker T et al (3), 2000] Decker T, Schneller F, Hipp S, Jahn T, Wagner H, and Peschel C. Differential Regulation of early D-Type Cyclins and p27 in B-CLL Cells and normal B cells upon Stimulation with CpG - Oligonucleotides (ODN) and IL-2. *Blood* 95:999-1006 2000
- [Decker T et al, 2002] Decker T, Schneller F, Hipp S, Miething C, Jahn T, Duyster J and Peschel C. Cell Cycle Progression of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells is Controlled by Cyclin D2, Cyclin D3, Cyclin Dependent Kinase (cdk)4 and the cdk Inhibitor p27. *Leukemia* 16: 327-34 2002
- [Delmer A et al, 1995] Delmer A, Ajchenbaum-Cymbalista F, Tang R, Ramon S, Fausat AM, Marie JP, Zittuon R. Overexpression of Cyclin D2 in chronic B-Cell malignancies. *Blood* 85: 2870-2876 1995

- [Dey A et al, 2000] Dey A, She H, Kim L, Boruch A, Guris DL, Carlberg K, Sebti SM, Woodley DT, Imamoto A, Li W. Colony-stimulating factor-1 receptor utilizes multiple signaling pathways to induce cyclin D2 expression. *Mol Biol Cell*: 3835-3848 2000
- [Di Cunto F et al, 1998] Di Cunto F, Topley G, Calautti E, Hsiao J, Ong L, Seth PK, Dotto G. Inhibitory function of p21Cip1/WAF1 in differentiation of primary mouse keratinocytes independent of cell cycle control. *Science* 280: 1069-1072 1998
- [Döhner H et al, 1995] Döhner H, Fischer K, Bentz M et al. P53 gene deletion Predicts for Poor survival and Nonresponse to Therapy with Purin Analogs in Chronic B-cell Leukemias. *Blood* 85: 1580-1589 1995
- [Drexler HCA, 1997] Drexler HCA. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 855-860 1997
- [Drexler HCA, 2000] Drexler HC, Risau W, Konerding MA. Inhibition of proteasome function induces programmed cell death in proliferating endothelial cells. *FASEB J* 14: 65-77 2000
- [Duckett CS et al, 1996] Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW et al. A conserved family of cellular genes related to the bacularviral IAP gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J* 15: 2685-2694 1996
- [El-Deiry WS et al, 1993] El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54: 1169-1174 1993
- [Fentany G et al, 1998] Fenteany G, Schreibers SL. Lactacystin, Proteasome Function and Cell Fate. *J Biol Chem* 273: 8545-8548 1998
- [Frank DA et al, 1997] Frank DA, Mahajan S, Ritz J. B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT)1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues. *J Clin Invest* 100: 3140 1997

- [Fluckinger AC et al, 1992] Fluckiger AC, Rossi JF, Bussel A, Bryon P, Bancherau J, Defrance T. Responsiveness of chronic lymphocytic leukemia B cells activated via surface Igs or CD40 to B-cell tropic factors. *Blood* 80: 3173 1992
- [Gao G et al, 2000] Gao G, Dou P. N-terminal Cleavage of Bax by Calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes Bcl-2 independent cytochrome c release and apoptotic cell death. *J Cell Biochem* 80: 53-72 2000
- [Gartel A et al, 1999] Gartel A, Tyner A. Transcriptional Regulation of the p21^{WAF1/Cip1} Gene. *Experimental Cell Research* 246: 280-289 1999
- [Granziero L et al, 1997] Granziero L, Ghia P, Circosta P, Gottardi D, Strola G, Geuna M, Montagna L, Piccoli P, Chilosi M, Caligaris-Cappio F. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 97: 2777-2783 2001
- [Green DR et al, 1998] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312 1998
- [Gross A et al, 1999] Gross A, Mc Donnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13: 1899-1911 1999
- [Häcker H et al, 1998] Häcker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB and Wagner H: CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non specific endocytosis and endosomal maturation. *Embo J* 17: 6230 1998
- [Häcker H et al, 1999] Häcker H, Mischak H, Häcker G, Eser S, Prenzel N, Ullrich A and Wagner H. Cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinases by CpG-DNA controls interleukin-12 release from antigen-presenting cells. *EMBO* 18: 6973 1999
- [Halaban R et al, 1998] Halaban R, Cheng E, Zhang Y, Mandigo CE, Miglurese MR. Release of cell cycle constraints in mouse melanocytes by overexpressed mutant

- E2F1 E132, but not the deletion of p16INK4A or p21WAF1/CIP1. *Oncogene* 16: 2489-2501 1998
- [Hallek M et al, 1999] Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dietzfelbinger H, Adorf D, Ostwald M, Busch R, Kuhn-Hallek I, Thiel E, Emmerich B. Elevated Serum Thymidin Kinase Levels Identify a Subgroup at High Risk of Disease Progression in Early, Nonsmoldering Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 93: 1732-1737 1999
- [Hanada M et al, 1993] Hanada M, Delia D, Aiello A, Dtsdtmauer E, Reed JC: bcl-2 hypomethylation and highlevel expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 82: 1820 1993
- [Hartmann G et al, 2000] Hartmann G, Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 164: 944-953 2000
- [Hemmi H et al, 2000] Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsun M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A toll like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740-745 2000
- [Hershko A, 1997] Hershko A. Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* 9: 788-799 1997
- [Hideshima T et al, 2000] Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, Anderson KC. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Research* 61: 3071-3076 2000
- [Hirama T et al, 1995] Hirama T, Koeffler P. Role of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitors in the developement of cancer. *Blood* 86: 841-854 1995
- [Hirsch T et al, 1998] Hirsch T, Dallaporta B, Zamzami N, Susin SA, Ravagnan L, Marzo I, Brenner C, Kroemer G. Proteasome activation occurs at an early, pre-mitochondrial step of thymocyte apoptosis. *J Immunol* 161 : 35-40 1998

- [Hivroz et al, 1986] Hivroz C, Grillo-Courvallin C, Brouet JC, Seligman M. Heterogeneity of responsiveness of chronic lymphocytic leukemic B cells to B cell growth factor IL-2. *Eur J Immunol* 16: 1001 1986
- [Johnston J et al, 1994] Johnston J, Kawamura M, Kirken RA, Chen YQ, Blake TB, Shibuya K, Ortaldo JR, McVicar DW, O'Shea JJ. Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2. *Nature* 370: 151-153 1994
- [Johnston J et al, 1995] Johnston J, Bacon CM, Finbloom DS, Rees RC, Kaplan D, Shibuya K, Ortaldo JR, Gupta S, Chen YQ, Giri JD, O'Shea JJ. Tyrosine phosphorylation and activation of Stat5, Stat3 and Janus kinases by Interleukins 2 and 15. *Proc Natl Acad Sci* 92: 8705-8709 1995
- [Kalil N et al, 1999] Kalil N, Cheson B D. Chronic Lymphocytic Leukemia. *The Oncologist* 4: 352-369 1999
- [Karnitz LM et al, 1996] Karnitz LM and Abraham RT. Interleukin-2 receptor signaling mechanisms. *Adv Immunol* 61: 147 1996
- [Karnitz LM et al, 1995] Karnitz LM, Burns LA, Sutor SL, Blenis J and Abraham RT. Interleukin-2 triggers a novel phosphatidylinositol 3-Kinase dependent MEK pathway. *Mol Cell Biol* 15: 3049 1995
- [Karray S et al, 1990] Karray S, Dautry-Varsat A, Tsudo M, Merle Beral H, Debre P, Galanaud P. IL-4 inhibits the expression of high affinity IL-2 receptors on monoclonal human B cells. *J Immunol* 145: 1152 1990
- [Kato J et al, 1994] Kato J, Matsuoka M, Polyak K, Massague J, Sherr CJ. Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 79:487 1994
- [Kirsch DG et al, 1999] Kirsch DG, Doseff A, Chau BN, Lim DS, de Souza-Pinto NC, Hansford R, Kastan MB, Lazebnik YA, Hardwick JM. Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J Biol Chem* 274: 21155-21161 1999

- [Kitata S et al, 1998] Kitada S, Andresen J, Akar S, Zapata J M, Takayama S, Krajewski S, Wang H G, Zhang C M, Rai K, Hines J, and Reed J C. Expression of Apoptosis-Regulating Proteins in Chronic lymphocytic Leukemia: Correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. *Blood* 91: 3379-3389 1998
- [Klein A et al, 2000] Klein A, Miera O, Bauer O, Golfier S, Schriever F. Chemosensitivity of B cell chronic lymphocytic leukemia and correlated expression of proteins regulating apoptosis, cell cycle and DNA repair. *Leukemia* 14: 40-46 2000
- [Krieg AM et al, 1995] Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky DA and Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546 1995
- [Kudo Y et al, 2000] Kudo Y, Takata T, Ogawa I, Kaneda T, Sato S, Takekoshi T, Zhao M, Miyauchi M, Nikai H. p27kip1 accumulation by inhibition of proteasom function induces apoptosis in oral squamos cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 6: 916-923 2000
- [Lampert IA et al, 1999] Lampert IA, Wotherspoon A, van Noorden S, Hasserjan RP. High expression of CD 23 in the proliferation centers of chronic lymphocytic leukemia in lymph nodes and spleen. *Hum Pathol* 30: 648 1999
- [Lazebnik Y et al, 1995] Lazebnik Y, Takahashi A, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9042-9046 1995
- [Lazebnik Y et al, 1994] Lazebnik Y, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371: 346-347 1994
- [Levine AJ, 1997] Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331 1997

- [Li B et al, 2000] Li B, Dou P. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway. Involvement in tumor survival and progression. *Proc Natl Acad Sci.* 97: 3850-3855 2000
- [Liang H et al, 1996] Liang H, Nishioka Y, Reich CF, Pisetsky DS, Lipsky P. Activation of Human B cells by Phosphorothioate Oligonucleotides. *J Clin Invest* 98: 1119-1129 1996
- [Liston P et al, 1996] Liston P, Roy N, Tamai K, et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379: 349-353 1996
- [Liu X et al, 1998] Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Luo X, Garrard WT, Wang X. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8461-8466 1998
- [Liu X et al, 1997] Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89: 175-184 1997
- [Lopes UG et al, 1997] Lopes UG, Erhardt P, Yao R, Cooper GM. P53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J Biol Chem* 272: 12893-12896 1997
- [Lowe SW et al, 1993] Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW et al. P53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362: 847-849 1993
- [Luo X et al, 1998] Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94: 481-490 1998
- [Macfarlane et al, 1998] Macfarlane DE, Manzel L. Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol* 160: 1122 1998

- [Mantel C et al, 1996] Mantel C, Luo Z, Canfield J, Braun S, Deng C, Broxmeyer HE. Involvement of p21cip-1 and p27kip-1 in the molecular mechanisms of steel factor-induced proliferative synergy in vitro and of p21cip-1 in the maintenance of stem/progenitor cells in vivo. *Blood* 88: 3710-3719 1996
- [Masdehors et al, 2000] Masdehors P, Merle-Beral H, Maloum K, Omura S, Magdelenat H, Delic J. Deregulation of the ubiquitin system and p53 proteolysis modify the apoptotic response in B-CLL lymphocytes. *Blood* 96: 269-274 2000
- [Masdehors et al, 1999] Masdehors P, Omura S, Merle-Beral H, Mentz F, Cosset JM, Dumont J, Magdelenat H, Delic H. Increased sensitivity of CLL-derived lymphocytes to apoptotic death activation by the proteasome-specific inhibitor lactacystin. *Br J Haematol* 105: 752-757 1999
- [Marshansky V et al, 2001] Marshansky V, Wang X, Bertrand R, Luo H, Duguid W, Chinnadurai G, Kanaan N, Vu MD, Wu J. Proteasomes modulate balance among proapoptotic and antiapoptotic bcl-2 family members and compromise functioning of the electron transport chain in leukemic cells. *J Immunol* 166: 3130-3142 2001
- [Matsumura I et al, 1999] Matsumura I, Kitamura T, Wakao H, Tanaka H, Hashimoto K, Alba C, Downward J, Pestell RG, Kanakura Y. Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. *EMBO J* 18: 1367-1377 1999
- [Mc Conkey DJ et al, 1996] McConkey DJ, Chandra J, Wright S, Plunkett W, McDonnald TJ, Reed JC, Keating M. Apoptosis sensitivity in chronic lymphocytic leukemia is determined by endogenous endonuclease content and relative expression of Bcl-2 and Bax. *J Immunol* 156: 2624 1996
- [Meinhardt G et al, 1999] Meinhardt G, Wendtner CM, Hallek M. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signaling pathways regulating cell growth and survival. *J Mol Med* 77: 282-293 1999

- [Meiin AB et al, 1998] Meriin AB, Gabai VL, Yaglom J, Shifrin VI, Sherman MY. Proteasom Inhibitors activate stress kinases and Induce Hsp72. *J Biol Chem* 273: 6373-6379 1998
- [Michieli P et al, 1994] Michieli P, Chedid D, Lin D, Pierce J, Mercer W, Givol D. Induction of WAF1/CIP1 by a p53 independent pathway. *Cancer Research* 54: 3391-3395 1994
- [Mimnaugh EG et al, 1997] Mimnaugh EG, Chen HJ, Davies JR. Rapid deubiquitination of nucleosomal histones in human tumor cells caused by proteasome inhibitors and stress response inducers: effect on replication, transcription, translation, and the cellular stress response. *Biochemistry* 36: 14418-14429 1997
- [Musleh W et al, 1997] Musleh W, Bi X, Tocco G, Yagoubi S, Baudry M. Glycine-induced long-term potentiation is associated with structural and functional modifications of alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 9451-9456 1997
- [Nelson BH et al, 1998] Nelson BH, Willerford DM. Biology of the Interleukin-2 Receptor. *Advances in Immunology* 70: 1 1998
- [Nguyen H et al, 1999] Nguyen H, Gitig DM, Koff A. Cell-free degradation of p27, a G1 cyclin-dependent kinase inhibitor, is dependent on CDK2 activity and the proteasome. *Mol Cell Biol* 19: 1190-1201 1999
- [Nicholson DW et al, 1997] Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22: 299-306 1997
- [Nourse J et al, 1994] Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, Coat S, Polyak H, Lee MH, Massague J, Grubbs GR, Roberts JM. Interleukin 2 mediated elimination of the p27 Kip1 cyclin dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 372: 570-573 1994
- [Nurse P, 1994] Nurse P. Ordering S Phase and M Phase in the cell cycle. *Cell* 79: 547-550 1994

- [OBrian S et al, 1995] OBrian S, Del Giglio A, Keating M. Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 85: 306-318 1995
- [Pagano M et al, 1995] Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269: 682-685 1995
- [Pariat M et al, 1997] Pariat M, Carillo S, Molinari M, Salvat C, Debussche L, Bracco L, Milner J, Piechaczyk M. Proteolysis by calpains: a possible contribution to degradation of p53. *Mol Cell Biol* 17: 2806-2815 1997
- [Potter DA et al, 1998] Potter DA, Tirnauer JS, Janssen R, Croall D, Hughes CN, Fiacco KA, Mier JW, Herman IM. Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J Cell Biol* 141: 647-662 1998
- [Raghobier S et al, 1991] Raghobier S, van Krieken JH, Kluin-Nelemans JC, Gillis A, van Ommen GJ, Ginsberg AM, Raffeld M, Kluin PM: Oncogene rearrangements in chronic B-cell leukemia. *Blood* 77: 1560 1991
- [Rechavi G et al, 1989] Rechavi G, Katzir N, Brok-Simoni F, Holtzman F, Mandel M, Gurfinkel M, Givol D, Ben-Bassat I, Ramot B: A search for cbl1, bcl-2 and c-myc oncogene rearrangements in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 3: 57 1989
- [Reed CJ, 2000] Reed CJ. Apoptosis and cancer: strategies for integrating programmed cell death. *Semin Hematol* 37: 9-16 2000
- [Rock et al, 1999] Rock KL, Goldberg AL. Degradation of cell proteins and generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 17: 739-779 1999
- [Rothe M et al, 1995] Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83: 1243-1252 1995

- [Rozman C et al, 1995] Rozman C, Montserrat E. Current concepts: chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 333: 1052-1057 1995
- [Sherr CJ, 1993] Sherr CJ. Mammalian G1 Cyclins. *Cell* 73: 1059-1065 1993
- [Sinibaldi D et al, 2000] Sinibaldi D, Wharton W, Turkson J, Bowman T, Pledger WJ, Jove R. Induction of p21 WAF/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: a role of activated STAT3 signaling. *Oncogene* 19: 5419-5427 2000
- [Song Q et al, 1996] Song Q, Lees-Miller SP, Kumar S, Zhang N, Chan DW, Smith GCM, Jackson SP, Alnemri ES, Litwack G, Khanna KK, Lavin MF. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a target for an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J* 15: 3238-3246 1996
- [Sparwasser T et al, 1997] Sparwasser T, Miethke T, Lipford GB, Borschert K, Häcker H, Heeg K, and Wagner H. Bacterial DNA causes septic shock. *Nature* 386: 336 1997
- [Spataro V et al, 1998] Spataro V, Norbury C, Harris AL. The ubiquitin-proteasome pathway in cancer. *Br J Cancer* 77: 447-455 1998
- [Tamm I et al, 1998] Tamm I, Wang Y, Sausville E et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), bax, caspases, and anti cancer drugs. *Cancer Res* 58: 5315-5320 1998
- [Tan X et al, 1997] Tan X, Martin SJ, Grenn DR, Wang YG. Degradation of retinoblastoma protein in tumor necrosis factor and CD-95 induced cell death. *J Biol Chem* 272: 9613-9616 1997
- [Thornberry NA et al, 1998] Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 281: 1312-1316 1998
- [Tokunaga T et al, 1992] Tokunaga T, Yano O, Kuramoto E, Kimura T, Yamamoto T, Katakao T and Yamamoto S. Synthetic oligonucleotides with particular base

- sequence from the cDNA-encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons and activate natural killer cells. *Microbiol Immunol* 147: 1759 1992
- [Voges D et al, 1999] Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68: 1015-1068 1999
- [Vrhovac R et al, 1998] Vrhovac R, Delmer A, Tang R, Marie JP, Zittuon R, Ajchenbaum-Cymbalista F. Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27 in Chronic B-Cell Lymphocytic Leukemia. *Blood* 91: 4694-4700 1998
- [Wagner H, 1999] Wagner H. Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv Immunol* 73: 329 1999
- [Wang X et al, 1998] Wang X, Luo H, Chen H, Duguid W, Wu J. Role of proteasomes in T cell activation and proliferation. *J Immunol* 160: 788-801 1998
- [Wang X et al, 1997] Wang X, Omura S, Szweda I, Yang Y, Berard J, Seminaro J, Wu J. Rapamycin inhibits proteasome activator expression and proteasome activity. *Eur J Immunol* 27: 2781-2786 1997
- [Wen Z et al, 1995] Wen Z, Zhong Z, Darnell JE. Maximal activation of transcription by STAT1 and STAT3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82: 241 1995
- [Wood DE et al, 2000] Wood DE, Newcomb EN. Cleavage of Bax enhances its cell death function. *Exp Cell Res* 256: 375-382 2000
- [Wood DE et al, 1999] Wood DE, Newcomb EW. Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274: 8309-8315 1999
- [Wood DE et al, 1998] Wood DE, Thomas A, Devi LA, Berman Y, Beavis RC, Reed JC, Newcomb EW. Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis *Oncogene* 17: 1069-1078 1998

-
- [Yew PR, 2001] Yew PR. Ubiquitin-mediated proteolysis of vertebrate G1-and S-phase regulators. *J Cell Physiol* 187: 1-10 2001
- [Yuan Y et al, 1997] Yuan Y, Dopheide SM, Ivanidis C, Salem HH, Jackson SP. Calpain regulation of cytoskeletal signaling complexes in von Willebrand factor-stimulated platelets. Distinct roles for glycoprotein Ib-V-IX and glycoprotein IIb-IIIa (integrin α IIb β 3) in von Willebrand factor-induced signal transduction. *J Biol Chem* 272: 21847-21854 1997.
- [Zhang XM et al, 1999] Zhang XM, Lin H, Chen C, Chen BDM. Inhibition of ubiquitin-proteasome pathway activates a caspase-3-like protease and induces Bcl-2 cleavage in human M-07e leukemic cells. *Biochem L* 340: 127-133 1999
- [Zhang H et al, 1994] Zhang H, Hannon GJ, Beach D. P21 containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev* 8: 1750 1994