



Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	XIV
I Einleitung	1
I.1 Chronische lymphatische Leukämie (CLL)	1
I.1.1 Definition und klinisches Bild.....	1
I.1.2 Epidemiologie	1
I.1.3 Diagnose.....	2
I.1.4 Stadieneinteilung nach Binet und Rai	3
I.1.5 Prognostische Faktoren	4
I.1.5.1 Mutationsstatus von IGHV	4
I.1.5.2 Expression von CD38 und ZAP-70.....	4
I.1.5.3 Molekulare Zytogenetik	4
I.2 Therapieoptionen in der CLL	5
I.2.1 Chemotherapeutika.....	8
I.2.1.1 Purinanaloga	8
Fludarabin	8
I.2.1.2 Alkylanzien	9
Bendamustin	9
Cyclophosphamid.....	9
Chlorambucil	10
I.2.2 Monoklonale Antikörper	10
Rituximab	10
Obinutuzumab (GA101).....	11
Alemtuzumab	11
I.2.3 Neue Therapieansätze.....	12
Tyrosinkinase Inhibitoren.....	12
Bcl-2 Inhibitoren	12
Chimäre Antigenrezeptoren.....	12
I.2.4 Apoptoseresistenz.....	13
I.3 DNS Reparaturmechanismen.....	14
I.3.1 Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER).....	14



I.3.2 Detektion von DNS-Schäden durch Globale Genom NER und Transkriptionsgekoppelte NER.....	15
I.3.3 Dysfunktionale NER.....	16
I.3.4 Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur in der CLL.....	16
I.3.4.1 Einfluss der Nukleotid-Exzisions-Reparatur auf die Fludarabin Therapie in der CLL.....	17
I.4 Neuartige NER-abhängige Substanzen für die CLL Therapie.....	18
I.4.1 Illudine.....	18
I.4.2 Trabectedin (Ecteinascedin743, Et743).....	20
I.4.3 2'-Cyano-2'-desoxyarabinofuranosylcytosin (CNDAC).....	21
I.5 Hypothese und Zielsetzung der Arbeit.....	22
II Material und Methoden.....	24
II.1 Material.....	24
II.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	24
II.1.2 Geräte.....	24
II.1.3 Software.....	26
II.1.4 Antikörper.....	27
II.1.5 Spezielle Reagenzien zur Apoptose-/ Viabilitätsmessung.....	28
II.1.6 Puffer, Lösungen und Medium.....	28
II.1.6.1 Puffer und Lösungen.....	28
II. 1.6.2 Medium für die Zellkultur.....	30
II. 1.6.3 Fertige Lösungen und Reagenzien.....	31
II.1.7 Pharmakologisch aktive Substanzen.....	32
II.1.8 Zelllinien.....	33
II.1.9 Mäuse.....	34
II.2 Methoden.....	35
II.2.1 Zellkultur.....	35
II.2.1.1 Generelle Zellkultur.....	35
II.2.1.2 Kokultur mit Stromazellen.....	35
II.2.2 <i>In vivo</i> Experimente (Mäuse).....	36
II.2.2.1 Maushaltung.....	36

X



II.2.2.2 Syngene Transplantation leukämischer Zellen in C3H/B6 F1 Mäuse und anschließende <i>in vivo</i> Behandlung	36
II.2.3 Zellisolation	37
II.2.3.1 Dichtegradientenzentrifugation	37
II.2.3.2 Isolation von murinen Splenozyten	37
II.2.4 Protein Biochemie	38
II.2.4.1 Lysate und Bradford Analyse	38
II.2.4.2 Denaturierende Gel Elektrophorese (SDS- Page)	38
II. 2.4.3 Western Blot	39
II.2.5 Fluoreszenz aktivierte Durchflusszytometrie (FACS)	40
II.2.5.1 Detektion von Oberflächenmarkern aus murinem Blut	40
II.2.5.2 Messung des allgemeinen Zellüberlebens und der apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen via FACS	40
II.2.6 Zellviabilität: MTT	41
II.2.7 Zellzahlbestimmung	42
II.2.8 Fluoreszenzmikroskopie	42
II.2.9 Patientenproben	43
II.2.10 Statistik	43
III Resultate	44
III.1 Chemisch modifizierte Illudine zeigen NER-abhängigen Wirkmechanismus .	44
III.2 NER-aktive Substanzen zeigen eine hohe zytotoxische und spezifische Aktivität auf CLL-Zellen	47
III.2.1 Nur IlludinM und Ferrocen-IM zeigen eine spezifische Aktivität in CLL-Zellen im Vergleich zu PBMC aus gesunden Spendern	47
III.2.2 CNDAC erzeugt kaum Zelltod in CLL-Zellen	50
III.2.3 Trabectedin zeigt zytotoxisches Potential im nanomolekularen Bereich gegenüber CLL-Zellen	51
III.3 Aktivität der Illudine und Trabectedin in CLL ähnlichen Zelllinien	52
III.4 Wirkung von IlludinM, Ferrocen-IM und Trabectedin in CLL Patientenkohorten	56
III.4.1 IlludinM, Ferrocen-IM und Trabectedin wirken unabhängig vom IGHV oder ZAP-70 Status der CLL Patienten	58



III.4.2 IlludinM, Ferrocen-IM und Trabectedin zeigen vergleichbare Aktivität in CLL Hoch-Risikogruppen (del.11q, del.17p).....	60
III.4.3 Fehlende ATM Expression hat keinen Einfluss auf die zytotoxische Aktivität der Illudine oder Trabectedin	62
III.5 Wirkung neuartiger NER-Substanzen in CLL-Zellen von klinisch vorbehandelten Patienten	64
III.6 Wirkung NER-aktiver Substanzen in CLL Kokultur	65
III.7 Kombination von neuen NER-Substanzen mit Fludarabin/ Bendamustin	67
III.7.1 IlludinM/ Ferrocen-IM + Fludarabin.....	67
III.7.2 IlludinM/ Ferrocen-IM + Bendamustin.....	72
III.7.3 Trabectedin + Fludarabin / Bendamustin.....	73
III.8 Wirkmechanismus NER-aktiver Substanzen in primären CLL-Zellen	74
III.9 Untersuchung des zytostatischen Potentials von Trabectedin im Mausmodell	78
III.9.1 Trabectedin verlangsamt exponentiellen Anstieg der Leukozyten <i>in vivo</i>	78
III.9.2 Trabectedin verlängert das Überleben leukämischer Mäuse.....	79
IV Diskussion	82
IV.1 Bedeutung des „NER targeting“ in der CLL	82
IV.2 Chemisch modifizierte Illudine besitzen einen NER abhängigen Wirkmechanismus.....	83
IV.3 Die untersuchten Illudine IlludinM und Ferrocen-IM wirken selektiv in CLL-Zellen	84
IV.4 Trabectedin zeigt großes anti-leukämisches Potential in CLL	86
IV.5 Etablierte prognostische Faktoren der CLL haben keinen prädiktiven Wert bzgl. der Apoptoseinduktion durch die ‚NER-aktiven‘ Substanzen.....	87
IV.6 Eine klinische Vorbehandlung der Patienten hat keinen negativen Einfluss auf die <i>in vitro</i> Aktivität der Illudine und Trabectedin.....	90
IV.7 Illudine induzieren mit Fludarabin synergistischen Zelltod in der CLL	91
IV.8 Illudine und Trabectedin induzieren p53-unabhängige Apoptose in der CLL.	93
Illudine (IlludinM und Ferrocen-IM).....	93
Trabectedin	94
IV.9 Trabectedin - ein vielversprechender Kandidat für <i>in vivo</i> Experimente zur präklinischen Testung in der CLL.....	95



IV.10 Trabectedin überzeugt im <i>in vivo</i> Mausmodell mit einer Verlangsamung des Tumorwachstums und Verlängerung des Gesamtüberlebens	97
IV.11 Ausblick	101
V Zusammenfassung	102
VI Literaturverzeichnis	104
VII Vorabveröffentlichung von Ergebnissen	119
VIII Anhang	120
VIII.1 Abbildungsverzeichnis	120
VIII.2 Tabellenverzeichnis	123
IX Lebenslauf	124