



Gregor Lohmann (Autor)

**Therapeutische Nutzung der Transkriptions-gekoppelten DNS Reparaturmechanismen zur Überwindung der Resistenz in der CLL**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6968>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>



# I Einleitung

## I.1 Chronische lymphatische Leukämie (CLL)

### I.1.1 Definition und klinisches Bild

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist durch die World Health Organisation (WHO) definiert als indolentes (lymphozytisches) Lymphom, das durch einen leukämischen Verlauf charakterisiert ist. Hierbei ist die CLL immer eine Neoplasie der B-Zellen. Im Detail handelt es sich um eine Akkumulation von reifen, nicht immunkompetenten B-Zellen, die sich sowohl im peripheren Blut als auch in Milz, Knochenmark und weiteren Organen befinden (14). Bei fortschreitender Erkrankung kann es vermehrt zu einer Lymphadenopathie, Spleno- und Hepatomegalie, Knochenmarksinsuffizienz und selten Autoimmun-Zytopenien kommen. Klinisch manifeste Beschwerden sind häufig eine erhöhte Infektanfälligkeit sowie B-Symptome wie Fieber, Nachtschweiß, Fatigue und ein definierter Gewichtsverlust (13, 46).

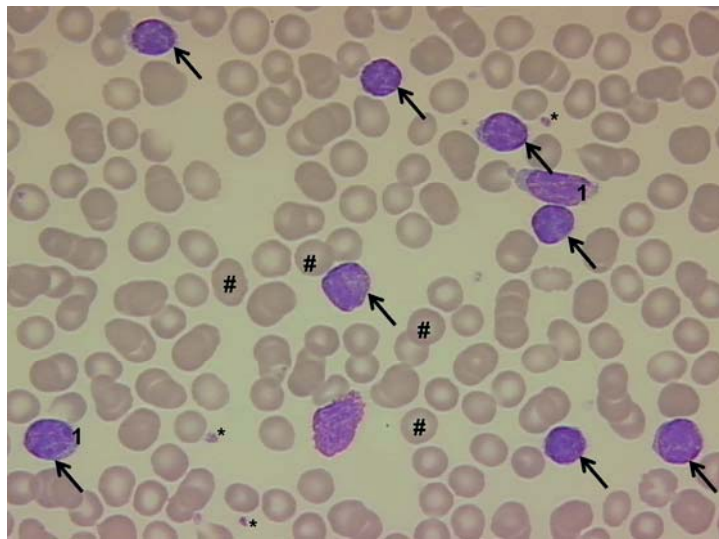
### I.1.2 Epidemiologie

Bei der CLL handelt es sich mit einem Anteil von 25-30% an diagnostizierten Leukämien, um die häufigste Form der leukämischen Erkrankung der westlichen Hemisphäre (98, 145). Die CLL wird allgemein als Leukämie des Alterns bezeichnet, da in der Altersgruppe der >65 Jährigen der Anteil auf 40% der diagnostizierten Leukämien (47) steigt und, noch wichtiger, das mediane Alter bei der Erstdiagnose für Männer bei 70 und für Frauen bei 72 Jahren liegt. Männliche Patienten sind im Verhältnis 1,7:1 häufiger betroffen als weibliche (51, 95). In Deutschland liegt die Zahl der Neuerkrankungen bei jährlich ca. 2.250 Männern und 1.500 Frauen, was einer altersstandardisierten Neuerkrankungsrate von 4,1 (Männer)/ 2,1 (Frauen) auf 100.000 Einwohner entspricht (38).

Weltweit gibt es eine sehr ungleiche Verteilung der Erkrankung. Bei Asiaten treten nur 5% der diagnostizierten Leukämien als CLL auf, gefolgt von afroamerikanischen und hispanischen Ethnien mit ebenfalls deutlich geringeren Prävalenz- und Inzidenzraten im Vergleich zu Kaukasiern (66, 143, 147).

### I.1.3 Diagnose

Für die Diagnose einer CLL müssen mindestens 5.000 B-Lymphozyten/ $\mu\text{l}$  im peripheren Blut vorliegen. Die leukämischen Zellen im Blutausstrich sind dabei typischerweise kleine, morphologisch reif wirkende Lymphozyten (47). Zusätzlich befinden sich im Blutausstrich atypische oder größere, zerstörte Zellen (Gumprechtsche Kernschatten) oder Prolymphozyten, die bis zu 55% der Lymphozyten ausmachen können (91).



**Abbildung I. 1: Mikroskopischer Befund eines Blutausstriches von einem CLL Patienten**

Pfeil: Leukämiezellen; \*: Thrombozyten; #: Erythrozyten; 1: Gumprechtsche Kernschatten (Abbildung: Labor für molekulare Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Köln)

Als zusätzlich essentielles Diagnosekriterium muss mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Ko-Expression der Oberflächenmarker CD5 (Cluster of Differentiation), als eigentlich typisches T-Zell-Antigen, zusammen mit den B-Zell-Antigenen CD19, CD20 und CD23 auf den Zellen nachgewiesen werden. Im Vergleich zur gesunden B-Zellpopulation liegt wiederum eine schwache Expression des Oberflächenimmunglobulins von CD20 und von CD79b vor. Die Oberflächenmarker werden mit Hilfe des „Mutates score“, der die Expression der genannten Oberflächenmarker sowie FMC7 und Smlg einschließt, für eine eindeutige Diagnose ausgewertet (41, 96). Zusätzlich muss die Monoklonalität der zirkulierenden B-Lymphozyten mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt werden. Diese wird durch Expression der leichten Kette von entweder Ig kappa oder Ig lambda zusammen mit CD19 nachgewiesen (96).



### I.1.4 Stadieneinteilung nach Binet und Rai

Zur Einteilung der CLL in verschiedene Stadien sind zwei Klassifikationssysteme etabliert. Zum einen besteht das in Europa häufiger angewandte System nach Binet, zum anderen das in den Vereinigten Staaten verwendete System nach Rai (8, 112). Beide Systeme basieren auf der Einordnung der Krankheit in Stadien, aufgrund dessen über die Einleitung einer Therapie entschieden werden kann. Diese stellen eine robuste initiale Einteilung bezüglich des Krankheitsstadiums und des zu erwartenden medianen Überlebens dar, welche aber durch weitere Faktoren ergänzt werden sollte.

Stadium	Definition	Medianes Überleben
A	Hämoglobin $\geq 10\text{g/dl}$	>10 Jahre
	Thrombozyten $\geq 100.000/\mu\text{l}$	
	<3 betroffene Regionen (Lymphknoten, Leber oder Milz)	
B	Hämoglobin $\geq 10\text{g/dl}$	5 Jahre
	Thrombozyten $\geq 100.000/\mu\text{l}$	
	$\geq 3$ betroffene Regionen (Lymphknoten, Leber oder Milz)	
C	Hämoglobin $< 10\text{g/dl}$	2-3 Jahre
	Thrombozyten $< 100.000 /\mu\text{l}$	

Tabelle 1: Stadieneinteilung der CLL nach der in Europa gebräuchlichen Binet Einteilung



## **I.1.5 Prognostische Faktoren**

Die folgenden Parameter sind nicht notwendig um eine CLL zu diagnostizieren, dienen aber neben der Lymphozytenverdopplungszeit und erhöhten Thymidinkinase- und  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Level einer exakteren Prognose bezüglich des zu erwartenden Krankheitsverlaufs (47).

### **I.1.5.1 Mutationsstatus von IGHV**

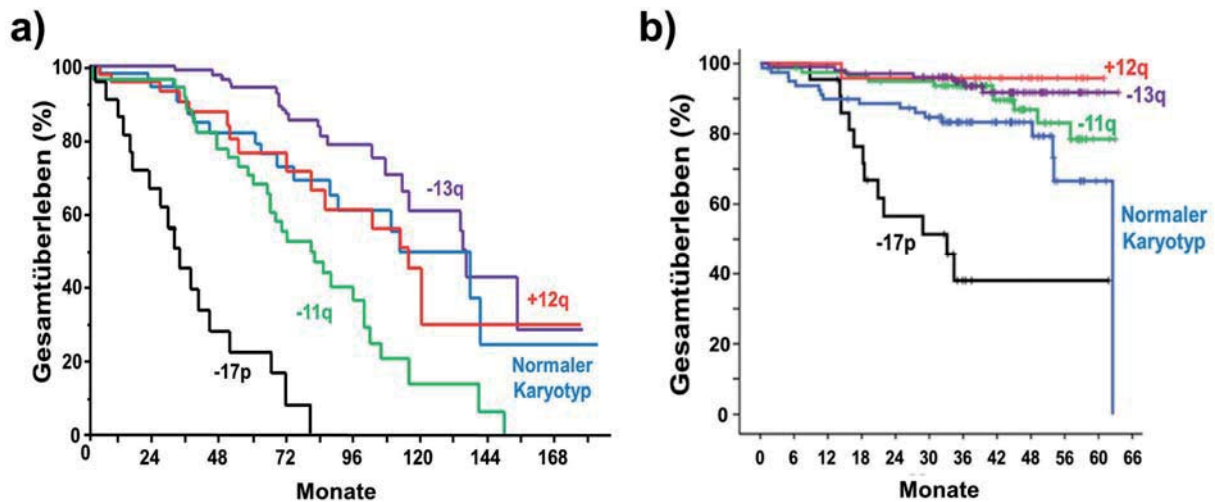
Die Bestimmung des IGHV Mutationsstatus stellt einen wichtigen Parameter zur genaueren Bestimmung der zu erwartenden klinischen Prognose dar. Als unmutierter „Fall“ gilt, wenn eine Abweichung von  $<2\%$  zum ähnlichsten Keimbahn-Gen vorliegt, wohingegen eine  $\geq 2\%$  Abweichung als mutierter Status definiert ist. Liegen bei einem Patienten im CLL Klon unmutierte IGHV Gene vor, ist von einem aggressiveren Krankheitsverlauf auszugehen, wohingegen ein mutierter IGHV Status mit einem günstigeren Krankheitsverlauf assoziiert wird (23, 53).

### **I.1.5.2 Expression von CD38 und ZAP-70**

Weitere zu ermittelnde Parameter sind die Expression des Antigens CD38 und der Tyrosinkinase ZAP-70 (zeta-associated protein 70). Beide eignen sich wegen ihrer einfachen Bestimmung als routinemäßige Parameter. Eine erhöhte Expression des Antigen CD38 ( $>30\%$ ) gilt als prognostischer Marker für eine verkürzte Überlebenswahrscheinlichkeit (23, 82). Eine hohe Expression ( $>20\%$  der CLL Zellen) der Tyrosinkinase ZAP-70 korreliert mit einer erhöhten Progressionswahrscheinlichkeit der CLL und einer kürzeren Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten (19, 114).

### **I.1.5.3 Molekulare Zytogenetik**

Die Bestimmung der molekularen Zytogenetik mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) besitzt bei der erweiterten Bestimmung der CLL eine zentrale Aussagekraft in Bezug auf die Therapieentscheidung. Ca. 80% der CLL Patienten tragen eine zytogenetische Veränderung (27), die typischerweise eine Trisomie von Chromosom 12, eine Deletion (del.) auf dem langen Arm von Chromosom 11 (-11q22-23), eine Deletion auf dem langen Arm von Chromosom 13 (-13q14), eine Deletion auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (-17p13) und/ oder eine Deletion auf dem langen Arm von Chromosom 6 (-6q23) umfassen (43).



**Abbildung I. 2: Gesamtüberleben von CLL Patienten eingeteilt in fünf verschiedene genetische Kategorien**

a) Gesamtüberleben nach Diagnose einer CLL ohne Therapie. Modifiziert nach Döhner et al., 2000.

b) Gesamtüberleben nach Therapie mit Fludarabin, Cyclophosphamid, Rituximab (FCR). Modifiziert nach Hallek et al., 2010

Die Korrelation des zytogenetischen Befundes mit dem Gesamtüberleben (Abbildung I. 2a) zeigt, dass die chromosomalen Aberrationen del.17p und del.11q zu einer schlechteren Prognose bezüglich des Krankheitsverlaufes führen, wohingegen eine Deletion auf Chromosom 13 mit einem positiveren Verlauf assoziiert werden kann (27). Die chromosomale Aberration del.17p geht häufig mit einer Inaktivierung des Onkoproteins p53 sowie del.11q mit der Inaktivierung des Ataxia telangiectasia mutated (ATM) Proteins einher (2, 148). Neben del.17p ist ein komplex aberranter Karyotyp mit mehr als drei chromosomalen Aberrationen mit der schlechtesten Prognose assoziiert (45). In Bezug auf eine prognostische Aussage einer del.17p ist festzuhalten, dass auch unter dem derzeitigen Therapiestandard FCR eine negative Prognose beim Gesamtüberleben bestehen bleibt, wohingegen eine del.11q nicht mehr automatisch mit einer negativen Prognose bei einer Fludarabin, Cyclophosphamid, Rituximab (FCR) Therapie in Verbindung gebracht werden kann (Abbildung I. 2b) (49). An dieser Stelle ist anzumerken, dass ca. 50% aller Fludarabin-resistenten Fälle auf eine Deletion des Chromosom 17 oder eine Mutation des *TP53* Gens zurückzuführen sind (148–150).



## I.2 Therapieoptionen in der CLL

Die Therapieoptionen bei einer CLL richten sich hinsichtlich der Einteilung nach Binet und oben erwähnten prognostischen Faktoren (s. Abschnitt I.1.5), hier insbesondere nach dem zytogenetischen Status (z.B. del.17p/ *TP53* mutiert). Daneben stellen die Komorbidität, ermittelt mit Hilfe des CIRS (Cumulative Illness Rating Scale) Score (92), die körperliche Fitness des Patienten, die Nierenfunktion sowie in geringerem Maße das kalendarische Alter wichtige Parameter für die folgende Therapieauswahl dar. Es ist zwischen der Erstlinientherapie und der Zweitlinientherapie auf Basis eines Früh-/ bzw. Spätrezidivs zu unterscheiden. Außerhalb der Standardtherapieprotokolle bieten verschiedene Studien mit neuartigen Therapieoptionen die Möglichkeit zur Behandlung nahezu aller Stadien der therapiebedürftigen CLL (40, 50, 52). In Bezug auf die Erstlinientherapie steht bei einem asymptomatischen Verlauf und einem Binet Stadium A/B die watch & wait Strategie (Abwarten & Überwachen) als primäre Option im Vordergrund. Gängige Indikationskriterien für den Beginn einer medikamentösen Therapie sind in diesen Stadien: Auftreten einer Anämie / Thrombozytopenie; massive Splenomegalie (> 6 cm unter dem Rippenbogen) oder Lymphadenopathie (> 10 cm im Durchmesser), Lymphozytenverdopplungszeit von weniger als 6 Monaten oder 50 % Anstieg in 2 Monaten, refraktäre Autoimmun-Zytopenie, ungewollter Gewichtsverlust, Fieber, Nachtschweiß oder schwerwiegende Fatigue.

Bei erforderlicher Therapie und körperlich „fitten“ Patienten mit einer niedrigen Komorbidität sind die Kombinationstherapien aus Fludarabin, Cyclophosphamid plus Rituximab (FCR) oder Bendamustin plus Rituximab (BR), die insbesondere bei eingeschränkter Nierenfunktion angezeigt ist, die Therapieprotokolle der ersten Wahl. Insbesondere FCR besitzt eine breite Studienlage inklusive aussagekräftiger Langzeitdaten, welche neben hohen Ansprechraten ein verlängertes Überleben bei behandelten Patienten zeigen (49, 139). Bei körperlich „unfitten“ Patienten ist eine Bendamustin Monotherapie dem Chlorambucil bei Ansprechraten und Gesamtüberleben überlegen (80). Bei Vorliegen einer del.17p/ mutiertes *TP53* ist eine Behandlung mit Alemtuzumab, gefolgt von einer allogenen Stammzelltransplantation oder ein bevorzugter Einschluss in Studien mit p53-unabhängig wirkenden Therapieoptionen (s. Abschnitt I.2.3), wie z.B. Ibrutinib (12), anderen Therapien vorzuziehen.



Die Auswahl der Zweitlinientherapie erfolgt neben Kriterien wie Alter und gesundheitlichem Allgemeinzustand, aber hauptsächlich nach klinischen Parametern, wie der erzielten Remissionsdauer durch die vorhergegangene Therapie. Bei einem Frührezidiv (>1-2 Jahre) und gutem Allgemeinzustand besteht entweder die Möglichkeit einer allogenen Stammzelltransplantation mit vorhergehender Therapie von Alemtuzumab beziehungsweise FCR oder die Gabe von Alemtuzumab oder Ofatumomab ohne Transplantation. Bei „unfiten“ Patienten empfiehlt sich eine Therapie mit BR oder Alemtuzumab.

Bei einem Spätrezidiv (Remission >2 Jahre) besteht die Möglichkeit einer Wiederholung der Erstlinientherapie oder das Ausweichen auf eine andere zugelassene Chemoimmuntherapie oder Chemotherapie (40).

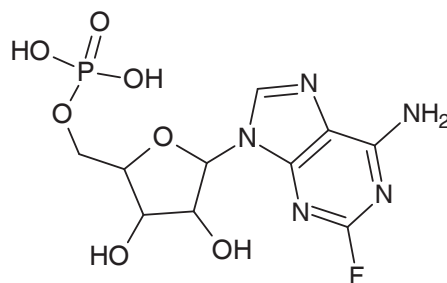


## I.2.1 Chemotherapeutika

Auch wenn durch die Entwicklung neuartiger Substanzen, die vor allem zielgerichtet veränderte Signalkaskaden in der CLL angreifen, voranschreitet, bildet zum jetzigen Zeitpunkt die Chemotherapie die zytotoxische Basis der meisten Therapieoptionen. Diese werden, solange es der allgemeine Gesundheitszustand des Patienten zulässt, mit einem monoklonalen Antikörper kombiniert. Im Folgenden werden bedeutende pharmakologische und klinische Eigenschaften der wichtigsten Substanzen für die CLL-Therapie in Kürze dargestellt.

### I.2.1.1 Purinanaloga

#### Fludarabin



**Abbildung I. 3: Fludarabinphosphat**

([[(2R,3S,4S,5R)-5-(6-Amino-2-fluor-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]methoxy}phosphat)

Die zytotoxische Wirkung von Fludarabin setzt die intrazelluläre Bildung von F-ara-ATP (Adenosintriphosphat) voraus. Der Hauptwirkmechanismus beruht auf der Inhibierung der DNS-Synthese durch kompetitive Inhibition der DNS-Polymerase als alternatives Substrat zum normalen Desoxynukleotid Desoxyadenosin-triphosphat (35, 107). Daneben besitzt Fludarabin die Fähigkeit die RNS Synthese zu inhibieren und so den Zelltod einzuleiten (67). Des Weiteren hat Fludarabin einen entscheidenden Einfluss auf die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (vgl. I.3.4.1).

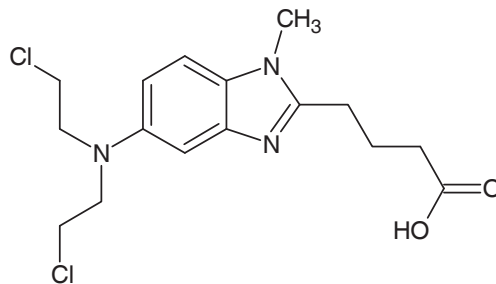
Fludarabin ist in der derzeitigen Therapie das am häufigsten verwendete Zytostatikum. Im Vergleich zu anderen Protokollen, wie z.B. CHOP (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison) oder Chlorambucil, konnte mit Fludarabin als Einzelsubstanz eine deutlich höhere Remissionsrate in der CLL Therapie erzielt werden, wobei allerdings das Gesamtüberleben nicht verlängert wurde (52, 111, 131). Die Kombination mit Cyclophosphamid führt zu einer erhöhten

Rate an kompletten Remissionen, progressionsfreiem Überleben und verlängertem Gesamtüberleben (28, 48).

Schwere und häufige Nebenwirkungen sind Myelosuppression (Neutropenien, Thrombozytopenien und Anämien) sowie schwerwiegende opportunistische Infektionen (37).

### I.2.1.2 Alkylanzien

#### Bendamustin

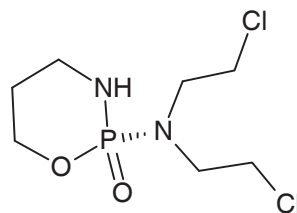


**Abbildung I. 4: Bendamustin**

(4-[5-[Bis(2-chlorethyl)amino]-1-methylbenzimidazol-2-yl]butansäure)

Bendamustin ist ein bi-funktionelles Alkylanz, welches nach Dissoziation in elektrophile Gruppen kovalente Bindung mit den nukleophilen Bereichen der DNS eingeht und so zu vermehrten Doppelstrangbrüchen führt (84). Obwohl der exakte Wirkmechanismus derzeit noch nicht bekannt ist, scheint es einen Wirkmechanismus unabhängig vom *p53* Status in CLL-Zellen *in vitro* zu geben (118). Bendamustin zeigt Wirksamkeit in ruhenden und proliferierenden B-Zellen (126). Im Vergleich zu Chlorambucil erreicht Bendamustin eine höhere Ansprechrate bei gleichzeitig vermehrten Nebenwirkungen aber keine Verlängerung des Gesamtüberlebens (80). Schwere und häufige Nebenwirkungen bei der Behandlung mit Bendamustin sind Myelosuppression und Infektionen (99).

#### Cyclophosphamid

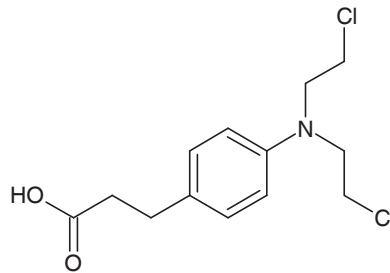


**Abbildung I. 5: Cyclophosphamid**

((RS)- N,N-bis(2-Chlorethyl)-1,3,2-oxaza-phosphinan- 2-amin-2-oxid)

Bei Cyclophosphamid handelt es sich um ein Prodrug, das durch das Cytochrom P450 System aktiviert wird (16). Die Wirkung beruht auf der Alkylierung der DNS und Bildung sogenannter Kreuzverbindungen in der DNS und bei Proteinen. Der Einsatz beschränkt sich heute weitestgehend auf eine Kombination mit Fludarabin oder anderen zytotoxischen Substanzen.

## Chlorambucil



**Abbildung I. 6: Chlorambucil**  
(4-[bis(2-Chlorethyl)amino]benzenbutansäure)

Chlorambucil galt lange Zeit als Goldstandard in der Therapie der CLL (18). Es gehört zur Gruppe der Stickstoff-Lost Verbindungen mit einem DNS-alkylierenden Wirkmechanismus (4). Die Vorteile einer Therapie mit Chlorambucil sind die orale Applizierbarkeit, die vergleichsweise geringen Nebenwirkungen sowie der relativ niedrige Preis. Aufgrund der niedrigen Ansprechrate wird Chlorambucil alleine heute nur noch bei alten und „unfiten“ Patienten eingesetzt. Im Gegensatz dazu besitzt es in Kombination mit monoklonalen Antikörpern weiterhin seine Bedeutung in der Therapie der CLL.

## I.2.2 Monoklonale Antikörper

### Rituximab

Bei Rituximab handelt es sich um einen gegen CD20 gerichteten, monoklonalen chimären Mensch-Maus Antikörper. Das glykosylierte Phosphoprotein CD20 wird auf reifen B-Zellen und B- Vorläuferzellen in deutlich höherem Ausmaß exprimiert als auf CLL-Zellen, so dass als potentielle Wirkmechanismen für Rituximab neben der direkten Apoptose-Induktion und Zelllyse der CLL-Zellen, die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität über Makrophagen, Granulozyten und natürliche Killerzellen diskutiert wird (144).



Klinisch findet Rituximab seinen Einsatz in Kombination mit alkylierenden Substanzen wie Bendamustin und Cyclophosphamid sowie Fludarabin. Diese Kombinationen zeigen für die CLL ein sehr hohe Ansprechrates, verlängertes progressionsfreies Überleben sowie verlängertes Gesamtüberleben (52). Als Nebenwirkungen werden hauptsächlich grippeähnliche Symptome beschrieben.

Der humanisierte monoklonale Antikörper Ofatumumab wird aufgrund fehlender Vergleichsresultate mit Rituximab und der daraus unklaren therapeutischen Bedeutung hier nicht weiter besprochen.

### **Obinutuzumab (GA101)**

Obinutuzumab ist ein humanisierter, ebenfalls gegen CD20 gerichteter, monoklonaler Antikörper (102). Obinutuzumab zeigt *in vitro* gegenüber Rituximab eine verbesserte Wirksamkeit bezüglich direkter Apoptose-Induktion und antikörperabhängiger Zelltoxizität (104). Bezüglich seiner *in vivo* Aktivität weist Obinutuzumab gegenüber Rituximab, wenn kombiniert mit Chlorambucil bei „unfitten“ Patienten, ein verbessertes Ansprechen, ein verlängertes progressionsfreies Überleben und ein verlängertes Gesamtüberleben auf (42). Dadurch stellt Obinutuzumab eine Alternative bei „unfitten“ Patienten in der Kombinationstherapie dar und steht in den Vereinigten Staaten und Europa kurz vor der Zulassung.

### **Alemtuzumab**

Alemtuzumab ist ein humanisierter, gegen CD52 gerichteter, monoklonaler IgG Antikörper. Das CD52-Antigen befindet sich auf der Oberfläche von mehr als 95% aller Lymphozyten und Monozyten sowie auf den meisten B- und T-Zell-Lymphomen und in geringen Mengen auf Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten. Stammzellen exprimieren dieses Antigen nicht. Daher wird durch den Einsatz von Alemtuzumab die normale Hämatopoese nicht negativ beeinflusst. Der Einsatz von Alemtuzumab erweist sich als wirkungsvoll bei Fludarabin-refraktären und resistenten CLL Fällen (132). Alemtuzumab kann auch bei Hoch-Risikopatienten mit einer del.11q, del.17p oder eine TP53 Mutation zum Einsatz kommen. Es ist anzumerken, dass die Zulassung des Präparates durch die Firma Sanofi/ Genzyme zurückgenommen wurde und daher ein breiter Zugang für den Patienten nicht mehr möglich ist (30).



### **I.2.3 Neue Therapieansätze**

Für die medikamentöse Therapie der CLL befinden sich im Moment eine große Anzahl an Substanzen in verschiedenen Stadien klinischer Studien. Im Folgenden wird eine Auswahl vielversprechender Wirkstoffe kurz vorgestellt.

#### **Tyrosinkinase Inhibitoren**

Der Tyrosinkinase Inhibitor Idelalisib (CAL-101) inhibiert durch seine selektive Wirkung auf die PI3K Isoform  $\delta$ , die in der CLL konstitutiv aktive PI3K Signalkaskade. Die induzierte Apoptose ist spezifisch in CLL-Zellen und zeigt keine Wirkung auf gesunde T- und NK-Zellen (65). Klinische Studien zeigen ein vielversprechendes Ansprechen der CLL bei einer Idelalisib Therapie (52), so dass eine Zulassung in Europa erfolgte.

Die Bruton Tyrosin Kinase (BTK) übernimmt wichtige Funktionen bei der Vermittlung von Zellüberleben stimulierender B-Zell-Rezeptor-Signalkaskaden wie NF- $\kappa$ B und MAP Kinase. Die Inhibierung dieser B-Zell Rezeptor Signaltransduktion durch Ibrutinib (PCI-32765) führt vermutlich zur Apoptose in den CLL-Zellen (59). Klinisch zeigt Ibrutinib ein hervorragendes Ansprechen, auch in refraktären und resistenten Fällen (1, 12).

#### **Bcl-2 Inhibitoren**

Die Proteine der Bcl-2 Familie befinden sich in CLL-Zellen durch eine vermehrte Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 im Ungleichgewicht (121). Die Bcl-2 Inhibitoren verschieben das Gleichgewicht in Richtung pro-apoptotischen Proteine, indem sie an die anti-apoptotischen Proteine Bcl-XL, Bcl-2, Bcl-w und Bcl-B inhibieren. ABT-263 zeigte erste Erfolge in klinischen Studien, wurde aber durch ABT-199 abgelöst, das sich durch eine verbesserte Verträglichkeit auszeichnet und eine sehr gutes Ansprechen in Fludarabin-refraktären und del.17p Patienten zeigt (116, 129).

#### **Chimäre Antigenrezeptoren**

Chimäre Antigenrezeptoren (CAR) kombinieren den Antigen Erkennungsbereich des Antikörpers mit intrazellulären Signalbereichen in einem Protein. Hier zeigen vor allem die CAR modifizierten, an CD137 gekoppelten, autologen T-Zellen gegen



CD19 (CART19) vielversprechende Ergebnisse in ersten klinischen Studien in der CLL (110).

### **I.2.4 Apoptoseresistenz**

Die menschliche Zelle besitzt mit der Autophagie, der Nekrose und der Apoptose drei Hauptmechanismen zu sterben. Bei der Apoptose handelt es sich, im Gegensatz zur Nekrose, um einen programmierten und daher als geordnet bezeichneten Zelltod. Die Apoptose zeichnet sich durch ein komplexes System aus einzelnen Zellsignalen aus, das unter anderem aus Wachstumsfaktoren, Hormonen, Zytokinen oder Toxinen besteht. Dieses System ist bei CLL-Zellen - ähnlich anderer Krebszellen - jedoch gestört, da diese der Apoptose entgehen und ihr Überleben pathologisch verlängern können. Dies gelingt, indem die Zellen über mehrere Jahre verschiedene Mutationen akquirieren und so verschiedene Tumorsuppressorproteine ausgeschaltet werden (5, 78). Im Gegensatz zu vielen anderen Krebserkrankungen besitzen CLL-Zellen im peripheren Blut keine erhöhte mitotische Aktivität, sondern ruhen größtenteils in der G<sub>0</sub> oder zu einem kleinen Teil in der G<sub>1</sub> Phase des Zellzyklus (101). Dieser ‚Zellzyklusarrest‘ stellt eine der bekannten Schwierigkeiten der CLL Therapie mit klassischen Chemotherapeutika dar, deren Wirksamkeit sich auf die S-Phase des Zellzyklus, also bei sich (schnell) teilenden Zellen, fokussiert.

Obwohl der exakte Mechanismus der Apoptoseresistenz bis heute nicht vollständig geklärt ist, gilt es als gesichert, dass die Mutation des Tumorsuppressors TP53, gerade in Bezug auf Therapieresistenz der Chemotherapie, eine entscheidende Rolle spielt. Eine Mutation des Gens *TP53* ist in ca. 7% der CLL Fälle festzustellen und führt zu einer häufigen Resistenz bei einer Chemo- oder Chemoimmuntherapie. Es ist ebenfalls festzuhalten, dass nur ca. 50% der therapieresistenten Fälle, bei einer Behandlung mit fludarabin- oder bendamustinhaltigen Regimes, direkt mit einer Mutation von *TP53*/del.17p in Verbindung gebracht werden können (31, 32, 148, 149). Daher werden verschiedene weitere Mechanismen der Zelle diskutiert, wie die veränderte DNS-Reparatur(119), die veränderte Expression der Bcl (B-cell lymphoma) Proteinfamilie (121), die XIAP (IAP, inhibitory of apoptosis family of proteins) Überexpression (25), Veränderung des Glutathionlevels (103), Verlust der DAP (death associated protein) Kinase (115) sowie eine erhöhte TCL1 Expression (57, 58) die zur Apoptoseresistenz und/oder einer schlechteren Prognose beitragen.



## I.3 DNS Reparaturmechanismen

Jede der schätzungsweise  $\sim 10^{13}$  Zellen im menschlichen Körper erfährt täglich mehrere zehntausend DNS-Schäden (85). Die durch exogene (ionisierende oder UV-Strahlung, Chemikalien, Alkylanzien, Toxine) und endogene Ursachen (Replikationsfehler, reaktive Sauerstoffspezies, Thermoinstabilität der DNS-Basen) entstandenen DNS-Schäden können durch verschiedene Mechanismen repariert werden. DNS-Schäden in Form von Einzelstrangbrüchen kann die menschliche Zelle mit Hilfe der Basenexzisionsreparatur, DNS-Mismatch-Reparatur oder der Nukleotid-Exzisions-Reparatur reparieren. Zusätzlich dazu verfügt die Zelle über die Möglichkeit mit Hilfe des homologen und nicht-homologen ‚end joinings‘ Doppelstrangbrüche der DNS zu reparieren (63). Verschiedene DNS-Schäden und daraus folgende Mutationen werden mit verschiedenen Krankheiten des Alterns, insbesondere mit einer erhöhten Krebswahrscheinlichkeit, in Verbindung gebracht (63, 64, 125).

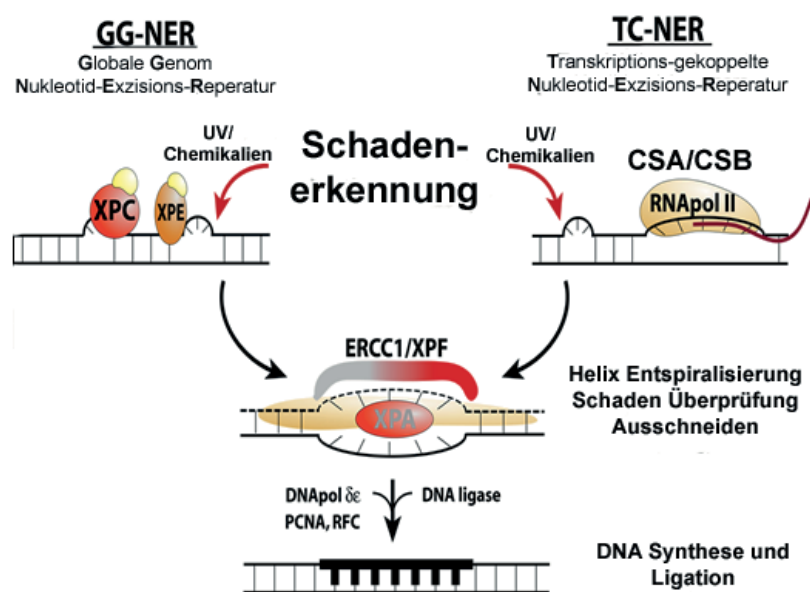
### I.3.1 Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)

Die Zelle verwendet den Mechanismus der NER hauptsächlich bei Schäden, die entweder durch UV-Strahlen und der daraus resultierenden Bildung von 4-6 Pyrimidin-Dimere, entstehen oder durch Chemikalien, welche neben der chemischen Modifikation durch Bildung sogenannter ‚bulky adducts‘ die Helix Struktur der DNS verändern (62, 100, 134). Für die vollständige Reparatur durchläuft die DNS in der Zelle einen komplexen Mechanismus, der über 30 verschiedene Proteine beinhaltet. Neben der Schadenserkenung (vgl. I.3.2) werden die lokale Entspiralisierung der Helix und die Verifizierung des Schadens durch die Proteine Xeroderma pigmentosum (XP) A und Transcription factor II Human (TFIIH) mit den Komplexuntereinheiten XPB, XPD und Trichothiodystrophie A (TTDA) übernommen. Das Herausschneiden des Schadens in Form von 25-30 Nukleotiden wird durch die Proteine des ERCC1/ XPF Komplex und durch XPG übernommen. Die abschließende Synthese neuer DNS und das Auffüllen des Stranges mit der korrekten DNS-Sequenz wird durch DNS Polymerase und Ligasen übernommen (70, 100). Anders als bei der Schadenserkenung werden die gleichen Proteine und Mechanismen für die Schritte der TC-NER und GG-NER verwendet.

### I.3.2 Detektion von DNS-Schäden durch Globale Genom NER und Transkriptions-gekoppelte NER

Die NER verfügt über zwei unabhängige Mechanismen zur Detektion der beschriebenen DNS-Schäden. Die Globale Genom (GG) NER überprüft die DNS auf Schäden innerhalb des gesamten Genoms. Dies geschieht - wenn auch nicht ausschließlich - in sich teilenden Zellen. Die GG-NER wird durch die Erkennung von DNS-Schäden durch den Xeroderma pigmentosum C (XPC)-HHR23B Komplex und durch den Xeroderma pigmentosum E- DNA damage binding 2 (XPE-DDB2) Proteinkomplex aktiviert, die sich am Ort des Schadens lokalisieren (33, 70, 133).

Neben der GG-NER gibt es einen Transkriptions-abhängigen (TC) Detektionsmechanismus für DNS-Schäden. Im Unterschied zur GG-NER repariert die TC-NER ausschließlich transkribierende DNS-Abschnitte(70). Aktiviert wird dieser Mechanismus durch Blockade der RNA-Polymerase II, wodurch die beiden Proteine Cockayne Syndrom A&B (CSA/ CSB) an der beschädigten Stelle der DNS lokalisiert werden (s. Abbildung I.7) (26).



**Abbildung I.7: Schematische Darstellung der Nukleotid-Exzisions-Reparatur** (modifiziert nach Schumacher et al., 2008 (125))

In Bezug auf Ihre Aktivität haben beide Reparaturmechanismen gemeinsam, dass sie auch zellzyklusunabhängig funktionieren, wobei der TC-NER eine noch wichtigere Rolle in sich nicht teilenden Zellen zugesprochen wird (70).