

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres
in der
Medizinischen Klinik-Innenstadt, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität
München
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Der Einfluss von cAMP-erhöhenden Substanzen und
Antidepressiva auf Apoptoseinduktion
bei chronischer lymphatischer
B-Zell Leukämie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Monika Ulrike Patz
aus München

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. S. Endres

Mitberichterstatter:

Priv. Doz. Dr. M. Feuring-Buske

Prof. Dr. S. Werner

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. F. Loher

PD Dr. med. A. Eigler

Dekan:

Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung:

14.12.2006

Inhalt

1.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	6
1.1.	Chronische lymphatische B-Zell Leukämie	6
1.1.1.	Inzidenz und Pathogenese	6
1.1.2.	Klinik und Diagnose	8
1.1.3.	Stadieneinteilung und Prognose	9
1.1.4.	Therapiemöglichkeiten	11
1.2.	Apoptose	15
1.2.1.	Bedeutung der Apoptose	15
1.2.2.	Morphologische und molekulare Veränderungen während Apoptose	15
1.2.3.	Caspasen	16
1.2.4.	Triggerung von Apoptose durch externe und interne Signalwege	17
1.3.	Die Bcl-2-Proteinfamilie	20
1.3.1.	Pro- und antiapoptotische Bcl-2 Familienmitglieder	20
1.3.2.	Die Funktion der Bcl-2 Proteine bei Apoptoseinduktion	22
1.3.3.	Dysregulation der Bcl-2 Familie bei B-CLL	23
1.4.	Mutation des Tumorsuppressorgens p53 bei B-CLL	24
1.5.	Die Effekte von Serum auf Apoptose bei B-CLL-Zellen	25
1.6.	Die Rolle von Interleukin-10 bei B-Lymphozyten	25
1.6.1.	Biologie des Interleukin-10	25
1.6.2.	Die Wirkung von IL-10 auf normale und maligne B-Zellen	26
1.7.	Regulation von Apoptose durch cAMP	27
1.7.1.	Der β_2 -adrenerge Signalweg	27
1.7.2.	Die Effekte von cAMP bei B-Lymphozyten und B-CLL-Zellen	28
1.7.3.	Neue Therapiestrategien im Hinblick auf einen defekten cAMP-Signalweg	29
1.8.	cAMP-erhöhende Substanzen	30
1.8.1.	Iloprost	31
1.8.2.	Adrenalin	31
1.8.3.	Terbutalin	32
1.9.	Antidepressiva	32
1.9.1.	Die trizyklischen Antidepressiva Clomipramin und Imipramin	33
1.9.2.	Das tetrazyklische Antidepressivum Maprotilin	33
1.9.3.	Die atypischen Antidepressiva Fluoxetin und Trazodon	33
1.9.4.	Lithium	34
1.10.	Ziele der Arbeit	35
2.	PATIENTENCHARAKTERISTIKA, MATERIAL UND METHODEN	36
2.1.	Patienten	36
2.2.	Geräte	38

2.3.	Labormaterial	38
2.3.1.	Fotomaterial	39
2.3.2.	Materialien für die Zellkultur	39
2.3.3.	Puffer, Lösungen und Medien	40
2.3.4.	Antikörper	42
2.4.	Substanzen	42
2.4.1.	Fludarabin (Fludara®, Schering)	42
2.4.2.	Rolipram (Schering)	42
2.4.3.	Iloprost (Ilomedin®, Schering)	42
2.4.4.	Adrenalin (Suprarenin®, Hoechst)	42
2.4.5.	Terbutalin (Sigma)	43
2.4.6.	Clomipramin und Imipramin (Sigma)	43
2.4.7.	Maprotilin (Sigma)	43
2.4.8.	Fluoxetin (Sigma)	43
2.4.9.	Trazodon (Sigma)	43
2.4.10.	Lithiumchlorid (Sigma)	43
2.4.11.	Pancaspase-Inhibitor z-VAD-fmk (R&D Systems)	43
2.5.	Zellulär-immunologische Methoden	44
2.5.1.	Zellkultur	44
2.5.2.	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	45
2.5.3.	Konzentrationsbestimmung von Interleukin-10	47
2.5.4.	Caspase 3-Aktivitätsbestimmung	47
2.6.	Molekularbiologische Methoden	48
2.6.1.	Nachweis einer apoptotischen DNA-Leiter	48
2.6.2.	Western Blotting	49
2.7.	Statistik	52
3.	ERGEBNISSE	53
3.1.	Induktion von Apoptose durch cAMP-Erhöhung	53
3.1.1.	Apoptoseinduktion durch das Prostazyklinanalogon Iloprost alleine und in Kombination mit dem PDE 4-Inhibitor Rolipram	53
3.1.2.	Apoptoseinduktion durch β_2 -adrenerge Substanzen alleine und in Kombination mit Rolipram	54
3.1.3.	Kombination von Iloprost mit β_2 -Sympathomimetika	56
3.1.4.	Abhängigkeit der Apoptoseinduktion durch cAMP-erhöhende Substanzen von Caspasen	57
3.1.5.	Beeinflussung der Bcl-2/ Bax-Ratio durch β_2 -Sympathomimetika	59
3.1.6.	Beeinflussung des p53-Tumorsuppressorgens durch β_2 -Sympathomimetika	60
3.1.7.	Die Rolle von Interleukin-10 während Apoptoseinduktion durch β_2 -Sympathomimetika	61
3.2.	Induktion von Apoptose durch Antidepressiva	62
3.2.1.	Apoptoseinduktion durch trizyklische Antidepressiva	62
3.2.2.	Apoptoseinduktion durch das tetrazyklische Antidepressivum Maprotilin	65
3.2.3.	Apoptoseinduktion durch atypische Antidepressiva	65
3.2.4.	Apoptoseinduktion durch Lithium	66
3.2.5.	Abhängigkeit der Apoptoseinduktion durch Antidepressiva von Caspasen	66
3.2.6.	Beeinflussung der Bcl2/ Bax-Ratio durch Antidepressiva	68

3.2.7.	Beeinflussung des p53 Tumorsuppressorgens durch Antidepressiva	70
3.2.8.	Die Rolle von Interleukin-10 während Apoptoseinduktion durch Antidepressiva	71
3.3.	Nachweis der induzierten Apoptose durch DNA-Fragmentation	73
3.4.	FACS-Kinetik	74
4.	DISKUSSION	75
4.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse	75
4.1.1.	Apoptoseinduktion durch cAMP-erhöhende Substanzen	75
4.1.2.	Apoptoseinduktion durch Antidepressiva	76
4.2.	Diskussion der Methoden	77
4.2.1.	<i>In vitro</i> -Zellkultur von B-CLL-Zellen	77
4.2.2.	Messung der Apoptose	77
4.3.	Bewertung der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur	78
4.3.1.	Apoptoseinduktion durch intrazelluläre Erhöhung von cAMP	78
4.3.2.	Apoptoseinduktion durch Antidepressiva	80
4.3.3.	Die Rolle der Caspasen im Rahmen von Apoptoseinduktion bei B-CLL	81
4.3.4.	Expression der Proteine Bcl-2 und Bax nach Inkubation der CLL-Zellen mit apoptoseinduzierenden Substanzen	83
4.3.5.	Erhöhte Expression des Tumorsuppressorgens p53 durch apoptoseinduzierende Substanzen	84
4.3.6.	Die Rolle von Interleukin-10 im Rahmen der B-CLL	85
5.	ZUSAMMENFASSUNG	87
6.	ABKÜRZUNGEN	89
7.	LITERATUR	91
8.	DANKSAGUNG	118
9.	LEBENS LAUF	119

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Chronische lymphatische B-Zell Leukämie

1.1.1. Inzidenz und Pathogenese

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist mit 25 % aller Leukämien das häufigste Non-Hodgkin-Lymphom (11 %) der westlichen Welt (Linnet and Cartwright, 1988). Es wird nach der WHO-Klassifikation zu den reifen B-Zell-Neoplasien gezählt (Jaffe, 1999). Ihre Inzidenz beträgt in den USA 3/100.000 Einwohner, während in Fernost eine wesentlich geringere Inzidenz besteht (Nishiyama et al., 1969). Die Erkrankungshäufigkeit nimmt mit steigendem Lebensalter zu, wobei das mediane Alter bei Erstdiagnose bei 65 Jahren liegt. Männer sind doppelt so häufig betroffen wie Frauen.

Die CLL ist ein lymphozytisches Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) von niedrigem Malignitätsgrad und stets leukämischem Verlauf. Die Ätiologie der CLL ist noch ungeklärt, jedoch spielen hereditäre Faktoren eine Rolle. Kinder von CLL-Patienten haben im Vergleich zur Normalbevölkerung ein 3fach erhöhtes Risiko an einer lymphatischen Neoplasie zu erkranken (Capalbo et al., 2000).

Diese lymphoproliferative Erkrankung ist charakterisiert durch monoklonale Bildung und Akkumulation morphologisch reifer und funktionell unreifer, nicht immunkompetenter Lymphozyten im peripherem Blut, in der Milz, in den Lymphknoten und im Knochenmark (Bannerji and Byrd, 2000). Es handelt sich mit 95 % um B-Lymphozyten mit langsamer Proliferationsrate (Schriever and Huhn, 2003). Über 95 % der Zellen befinden sich im Stadium G0/G1 des Zellteilungszyklus, daher akkumulieren die B-CLL-Zellen auf Grund eines fehlerhaften Apoptose-Mechanismus (Dormer et al., 1983).

Immunophänotypisch zeigen die B-CLL-Zellen typische B-Zell-Oberflächenantigene wie CD (Cluster of Differentiation) 19, CD20 und CD23 als auch die Expression des Aktivierungsantigens CD5 (Matutes et al., 1994). Dieses Antigen wird physiologisch auch von T-Zellen und fetalen B-Zellen sowie von Lymphozyten der Mantelzone des Lymphknotens eines Erwachsenen exprimiert. Es hat eine den $\gamma\delta$ -T-Zellen ähnliche Struktur und gehört zum unspezifischen Immunsystem. CD5 ist jedoch charakteristisch für B-CLL-Zellen und es wird angenommen, dass diese CD5-positive B-Zelle die Ursprungszelle der CLL darstellt. Anders als normale Zellen zeigen die CLL-Zellen kein CD10, den Keimzentrums-B-Zellmarker, auf ihrer Oberfläche (Reed, 1998). Man nimmt an, dass die B-CLL-Zellen von zwei verschiedenen Gruppen von normalen B-Zellen abstammen, den post-Keimzentrums-B-Gedächtnis-Zellen und den naiven prä-Keimzentrums-B-Zellen. Bei der post-Keimzentrums-B-CLL-Zelle besteht eine somatische Mutation der variablen schweren Ig V-Kette, die bei der prä-Keimzentrums-B-CLL-Zelle fehlt (Damle et al., 1999; Hamblin et al., 1999; Maloum et al., 2000). Die un-

terschiedlich vorliegende Mutation des Ig V-Gens ist für die Prognose der B-CLL mitentscheidend.

Die Ursachen, die zu einer malignen Transformation von B-Lymphozyten führen, sind unbekannt. Mit Hilfe neuer sensitiver Methoden, wie der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs (FISH-) Analyse oder der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) können in mehr als 80 % der Fälle zytogenetische Aberrationen nachgewiesen werden (Dohner et al., 2000), Tabelle 1.

Tabelle 1: Interphasen-Zytogenetik nach (Dohner et al., 1999)

Aberration	Häufigkeit (%)	Involvierte Gene	Prognose
Deletion 13q14	53	?	günstig
Deletion 11q22.3-23.1	18	?	schlecht
Trisomie 12	15	?	günstig
Deletion 6q21-23	6	?	günstig
Deletion TP53 17p13	7	p53	schlecht
8q Trisomie 8	5	?	günstig
Translokation t(14q32)	4	?	günstig
Trisomie 3	3	?	günstig

Mit 53 % der Fälle kann am häufigsten die Deletion (13q14) beschrieben werden, die mit einer günstigen Prognose assoziiert wird. Das hier lokalisierte Tumorsuppressorgen konnte bisher nicht eindeutig beschrieben werden (Kalachikov et al., 1997).

Bei nur 7 - 11 % aller Patienten findet die Deletion (17p13) statt, die einer Mutation des Tumorsuppressorgens p53 entspricht und häufig mit einer Progression der Erkrankung und schlechter Prognose einhergeht (Callet-Bauchu et al., 1999). Das Proteinprodukt von p53 ist ein Transkriptionsfaktor und reguliert wichtige Signalproteine, die die Proliferation (p21), DNA-Reparatur (GADD45) und Apoptose (Fas, Bax, Bcl-2) der Zelle steuern (Levine et al., 1991).

Charakteristisch für CLL-Zellen ist eine Überexpression von Bcl-2, möglicherweise verursacht durch Demethylierung beider Bcl-2-Gene (Hanada et al., 1993) als auch eine niedrige Expression der Fas-Rezeptoren (Apo-1/ CD95), die über Aktivierung von Caspasen eine proapoptotische Wirkung vermitteln (Robertson et al., 1995).

Die CLL-Zellen sind anerge B-Zellen, die im Gegensatz zu normalen B-Zellen nur wenige membranständige Immunglobuline, meist vom IgM- oder IgD-Typ, exprimieren und als Ausdruck einer Monoklonalität eine Leichtketten-Restriktion aufweisen. Auf Grund des Mangels an B7 (CD80 und CD86) auf ihrer Oberfläche ist die B-CLL-Zelle eine ineffiziente Antigen präsentierende Zelle, da B7 für die Bindung des Antigen-MHC-Komplexes an den T-Zell-Rezeptor notwendig ist. Dies führt zu Anergie der T-Zellen mit deren gestörter Aktivierung und Proliferation. Dieses fehlende kostimulieren-

de Signal könnte die ausbleibende T-Zell-Antwort auf potenzielle tumorspezifische Antigene der B-CLL-Zelle erklären. Die CD4-positiven T-Helferzellen sind gegenüber Fas-induzierter Apoptose sensitiver als die CD8-positiven T-Zellen. Daher ist die CD4/CD8-Ratio in CLL-Patientenproben vermindert, was zusätzlich zu dem Immundefekt beiträgt (Bannerji and Byrd, 2000).

Auch die unterschiedliche Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche beeinflusst das klinische Erscheinungsbild. Die Adhäsionsmoleküle vermitteln die Interaktion mit anderen Zellen und Geweben und bestimmen die Gewebeteilnahme bei Erkrankung. Das Adhäsionsmolekül L-Selektin lässt sich bei ausgeprägter Lymphozytose und mäßiger Gewebeteilnahme nachweisen. Bei Patienten mit Splenomegalie ist dagegen CD11a und CD11c stark exprimiert (Pangalis et al., 2002), eine hohe Expression von CD44 besteht meist bei starker Lymphadenopathie, kurzer Lymphozytenverdopplungszeit und diffuser Knochenmarksinfiltration (Angelopoulou et al., 1999; De Rossi et al., 1993).

1.1.2. Klinik und Diagnose

Die CLL ist ein niedrigmalignes Non-Hodgkin-Lymphom mit schleichendem Beginn und langsamer Progression. Dennoch konnte bisher mit keinem Therapieansatz eine Heilung der Erkrankung erzielt werden.

Das klinische Erscheinungsbild ist uncharakteristisch mit Lymphknotenschwellung, Spleno- und Hepatomegalie und Leukozytose. Bei Diagnosestellung ist der Großteil der Patienten asymptomatisch, nur bei 20 % der Patienten besteht eine B-Symptomatik mit Nachtschweiß, Fieber und Gewichtsverlust. Neben Zeichen einer Infiltration besteht in fortgeschrittenen Stadien ein Immundefekt, der auf einer Hypogammaglobulinämie, einer verminderten Komplementaktivierung und Zytotoxizität beruht.

Haupttodesursachen sind Blutungen und Infektionen, insbesondere Pneumonien oder Sepsis. Weitere typische Komplikationen sind Autoimmunphänomene, vor allem die autoimmunhämolytische Anämie (AIHA), die durch polyklonale IgG-Wärmeantikörper ausgelöst wird. Seltener werden Autoimmunthrombozytopenien oder die so genannte „pure-red-cell“-Anämie beobachtet. Bis zu 15 % der Patienten mit CLL entwickeln im späten Verlauf der Erkrankung im Rahmen eines Richter-Syndroms eine Transformation in ein hochmalignes, eher großzellig imponierendes Lymphom.

Darüber hinaus haben CLL-Patienten unabhängig von der Therapie ein erhöhtes Risiko an einer nicht-hämatologischen Neoplasie zu erkranken (Travis et al., 1992).

Nach den Empfehlungen der „National Cancer Institute-sponsored Working Group“ (NCI/WG) sind zur Diagnosestellung folgende Kriterien obligat (Cheson et al., 1996):

Der Nachweis einer anhaltenden absoluten Lymphozytose von $> 5000/\mu\text{l}$ mit einem Anteil von $< 55\%$ Prolymphozyten und gleichzeitigem durchflusszytometrischem Nachweis des B-CLL-Immunphänotyps mit Koexpression des Oberflächenmarkers

CD5 und der typischen B-Zell-Marker (CD19, CD20) sowie einer deutlichen Expression von CD23. Zusätzlich muss als Ausdruck ihrer Monoklonalität eine Leichtkettenrestriktion vom Typ κ oder λ vorhanden sein.

Auf Grund der hohen Sensitivität der durchflusszytometrischen Analyse ist eine histologische Lymphknotenuntersuchung zur Immunophänotypisierung und Diagnosestellung nicht erforderlich. Zur Abschätzung des Krankheitsstadiums und der Prognose wird die körperliche Untersuchung mit Lymphknotenstatus durchgeführt. Dabei lässt sich bei 50 - 60 % der Patienten eine Lymphadenopathie feststellen.

Im Blutausstrich zeigen sich in der panoptischen Färbung überwiegend morphologisch reife kleine Lymphozyten mit dichtem Kern, ohne Nukleolen und schmalem Zytoplasma. Charakteristisch für die CLL ist das Auftreten von Zelltrümmern, sogenannten Gumprecht'schen Kernschatten.

Bei der zytologischen Untersuchung eines Knochenmarkpunkts verspricht ein rein noduläres Knochenmarkinfiltrationsmuster eine günstige Prognose, während ein diffus infiltriertes Knochenmark einen progressiven Verlauf erwarten lässt (Rozman et al., 1984).

1.1.3. Stadieneinteilung und Prognose

Bei der CLL besteht eine klare Abhängigkeit der Prognose von der Tumormasse bei Diagnosestellung.

Rai (Rai et al., 1975) und Binet (Binet et al., 1981) entwickelten Stadieneinteilungen, die auf der Zunahme der Tumormasse basieren (Tabelle 2): In frühen Krankheitsstadien imponiert die Vermehrung der CLL-Zellen im peripheren Blut, später in den lymphatischen Organen und in fortgeschrittenen Stadien kommt es zu zunehmender Verdrängungsmielopathie mit Insuffizienzzeichen wie Anämie oder Thrombozytopenie.

Tabelle 2: Stadieneinteilung der CLL nach Rai und Binet (Schriever and Huhn, 2003)

Risiko	Stadium	Parameter	Medianes Überleben	Therapieindikation
<u>Rai</u>				
Niedriges Risiko	0	Lymphozytose und Knochenmarkinfiltration	> 12,5 Jahre	keine
Intermediäres Risiko	I	Lymphozytose und vergrößerte Lymphknoten	8,5 Jahre	keine
	II	Lymphozytose und Hepato-/Splénomegalie	6 Jahre	Therapie optional ^c
Hohes Risiko	III	Lymphozytose und Hb < 11 g/dl	1,5 Jahre	Therapie
	IV	Lymphozytose und Thrombozyten < 100.000/ μ l	1,5 Jahre	Therapie

Risiko	Stadium	Parameter	Medianes Überleben	Therapieindikation
<u>Binet</u>				
Niedriges Risiko	A	Hb > 10 g/dl, Thrombozyten > 100.000/μl, < 3 Lymphknotenregionen ^a	> 10 Jahre	keine ^b
	A'	Lymphozyten < 30.000/μl	83 % 5 Jahre	keine ^b
	A''	Lymphozyten > 30.000/μl	62 % 5 Jahre	keine ^b
Intermediäres Risiko	B	Hb > 10 g/dl, Thrombozyten > 100.000/μl ≥ 3 Lymphknotenregionen	7 Jahre	Therapie optional ^c
Hohes Risiko	C	Hb < 10 g/dl, Thrombozyten < 100.000/μl, ± Lymphadenopathie	2 Jahre	Therapie

^a Zervikale, axilläre und inguinale Lymphknotenvergrößerungen unilateral oder bilateral, sowie Leber- und Milzvergrößerungen gelten als je eine Region.

^b Außer im Rahmen von Studien (Parameter der deutschen CLL-Studiengruppe: Lymphozytenverdopplungszeit < 12 Monate, hohe Thymidinkinase, hohes β_2 -Mikroglobulin, kein noduläres Knochenmarksinfiltrationsmuster).

^c Therapie indiziert bei Symptomen (z.B. B-Symptomatik, Bulky Disease, Autoimmunphänomene)

In Deutschland hat sich die Einteilung nach Binet durchgesetzt. Danach lässt sich die mediane Überlebenszeit abschätzen. Im Stadium Binet A (Befall von weniger als drei Lymphknotenstationen) beträgt sie über 10 Jahre, im Stadium Binet B (Befall von mehr als drei Lymphknotenstationen) 5 - 7 Jahre und in der Hochrisikogruppe mit Knochenmarkinsuffizienz (Binet C) nur 2 - 3 Jahre (Dighiero et al., 1998).

60 % der Patienten werden im Stadium Binet A diagnostiziert. Da in dieser Gruppe unterschiedliche Verlaufsformen beobachtet werden, sind in Niedrigrisikogruppen weitere Prognoseparameter notwendig, nach denen sich die Therapie richtet, wie unter anderem die Lymphozytenverdopplungszeit und das Knochenmarkinfiltrationsmuster.

Die Smouldering-CLL (Montserrat and Rozman, 1995) als besonders günstige Verlaufsform ist gekennzeichnet durch ein noduläres Knochenmarkinfiltrationsmuster, einen Hb > 12 g/dl, eine Lymphozytenverdopplungszeit > 12 Monate sowie eine absolute Lymphozytenzahl < 30.000/μl. Ein Drittel der Patienten im Stadium Binet A hat eine Smouldering-CLL und benötigt keine Therapie. Ihre Überlebenszeit unterscheidet sich nicht von altersadaptierten Kontrollgruppen.

Prognostisch ungünstige Parameter sind in Niedrigrisikogruppen dagegen eine erhöhte Aktivität der Serumthymidinkinase > 7,1 U/l (Hallek et al., 1999), eine erhöhte β_2 -Mikroglobulin-Konzentration > 3,5 mg/l (Hallek et al., 1996) und ein erhöhter Serumspiegel für lösliches CD23-Antigen (Knauf et al., 1997).

Die Analyse von molekularen Parametern kann weitere Informationen über den Erkrankungsstatus liefern und gewinnt bei der Einschätzung der Prognose zunehmend an Bedeutung. Eine ausbleibende Ig V-Mutation (Damle et al., 1999; Hamblin et al., 1999; Maloum et al., 2000), die Mutation des p53 Tumorsuppressorgens (Dohner et al., 1995) und eine erhöhte Bcl-2/Bax-Ratio (Pepper et al., 1997; Robertson et al., 1996) korrelieren mit einer schlechten Prognose und geringer Chemosensibilität.

Dohner und Mitarbeiter (Dohner et al., 1999) haben nach einer Analyse von 343 CLL-Fällen eine prognostische Unterteilung der Patienten in eine Hochrisiko- (11q- oder 17p-Deletion als Mutationen mit schlechtester Prognose) und eine Niedrigrisikogruppe nach zytogenetischen Kriterien erarbeitet (Tabelle 3). Eine vorhandene 11q-Deletion korreliert eng mit Transplantatabstoßung nach autologer Stammzelltransplantation (Stilgenbauer et al., 2000).

Tabelle 3: Zytogenetisch definierte prognostische Risikogruppen (Dohner et al., 1999)

Risikogruppe	Aberration
Niedriges Risiko	13q- oder 6q- oder normaler Karyotyp
Hohes Risiko	11q- oder 17p

1.1.4. Therapiemöglichkeiten

Die Therapie der CLL richtet sich nach dem jeweiligen Stadium. Im Vordergrund der rein palliativen Therapie stehen Verbesserung der Lebensqualität und Lebensverlängerung. Eine frühzeitige Intervention mit zytostatischer Standardtherapie bringt bisher keinen Überlebensvorteil und sollte vermieden werden.

Indikationen einer Chemotherapie sind das Stadium Binet C und alle symptomatischen Erkrankungsstadien mit zunehmender Vergrößerung von Lymphknoten oder der Milz, einer B-Symptomatik sowie einer Hyperleukozytose mit möglichem Hyperviskositätssyndrom (Cheson et al., 1996). Im Stadium Binet A ist eine zytostatische Therapie notwendig, wenn ein rasch progredienter Verlauf mit einer Lymphozytenverdopplungszeit unter sechs Monaten vorliegt oder wenn Risikofaktoren vorhanden sind, wie die Erhöhung der Tymidinkinase, des β_2 -Mikroglobulins und des löslichen CD23-Antigens. Bei diesen 30 % der Patienten im Stadium Binet A ist die Lebenserwartung mit einer mittleren Überlebenszeit von 4 Jahren deutlich eingeschränkt, ein effektives Therapieprotokoll konnte jedoch noch nicht gefunden werden (The French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia, 1990). Der frühe Einsatz von Chlorambucil oder Interferon- α erbrachte keinen Überlebensvorteil (Dighiero et al., 1998). Mit Purinanalogia, wie Fludarabin, konnte eine hohe Rate an kompletten Remissionen erreicht wer-

den. Im Rahmen einer Phase-III-Studie wird nun überprüft, ob der frühe Einsatz von Fludarabin bei Risikopatienten im Stadium Binet A zu einer Verlängerung der Überlebenszeit führt (CLL1-Protokoll der Deutschen CLL-Studiengruppe, DCLLSG).

1.1.4.1. Chemotherapie

Obwohl bisher noch kein Heilungserfolg erzielt werden konnte, zeigen einige Chemotherapeutika eine hohe Aktivität gegenüber den malignen B-CLL-Zellen (Byrd et al., 2000). Experimente zeigten, dass diese Substanzen, wie Purinanaloga und Alkylantien, ihren zytotoxischen Effekt über Induktion von Apoptose vermitteln (Begleiter et al., 1994; Bellosillo et al., 1999; Consoli et al., 1998).

Als Standardtherapie gilt die Monotherapie mit Chlorambucil, einer alkylierenden Substanz, die in intermittierenden Schemata eingesetzt wird um eine Knochenmarktoxizität in Grenzen zu halten. Mit Chlorambucil als Monotherapie kann bei 40 - 70 % der Patienten eine Remission erreicht werden, komplette Remissionen sind jedoch sehr selten (3 %) und halten mit durchschnittlich 14 Monaten nur kurz an (Rai et al., 2000). Vor allem bei älteren Patienten (> 65 Jahre) mit Begleiterkrankungen bevorzugt man Chlorambucil auf Grund der einfachen Applikationsart und der relativ niedrigen Komplikationsraten.

Mittel der Wahl bei Chlorambucil refraktärer B-CLL ist das Purinanalogon Fludarabin, mit dem in 25 - 55 % der Fälle ein Therapieerfolg erreicht werden kann, davon in 5 - 37 % der Fälle komplette Remissionen (Sorensen et al., 1997). Auch die Wirksamkeit von Fludarabin als Primärtherapie wurde in klinischen Phase-III-Studien geprüft (Keating et al., 1998). Hier zeigte sich, dass sowohl die Remissionsrate höher als auch die progressionsfreie Überlebenszeit länger war gegenüber einer Chlorambucil-Mono- bzw. Kombinationstherapie mit Cyclophosphamid, Adriamycin und Prednison oder Cyclophosphamid, Adriamycin, Vincristin und Prednison (Leporrier et al., 2001). Das Gesamtüberleben konnte mit primärer Fludarabin-Monotherapie jedoch nicht beeinflusst werden, sodass Chlorambucil weiterhin als Standardtherapeutikum gilt (Rai et al., 2000).

Mit der Kombination aus Fludarabin und Cyclophosphamid als Primärtherapie konnte bei 80 % der untersuchten Patienten ein Therapieerfolg erzielt und zu 35 % komplette Remissionsraten induziert werden (O'Brien et al., 2001). Auf Grund der erhöhten Rate an lebensbedrohlichen Infektionen (Morrison et al., 2001) wird diese Kombination nur im Rahmen klinischer Studien angewandt (CLL4-Protokoll der Deutschen CLL-Studiengruppe, DCLLSG).

Die dominierenden unerwünschten Nebenwirkungen von Fludarabin sind Myelosuppression und Lymphozytopenie mit spezifischer Schädigung der CD4-positiven T-Zellen. Fludarabin-assoziierte Infektionen betreffen 5 % der Patienten mit CLL. Vor allem die kombinierte Gabe mit Kortikosteroiden steigert die Induktion von opportunistischen Infektionen. Schwere Grad III oder IV Infektionen treten häufiger im Rahmen der

Therapie mit Fludarabin (16 %) als mit Chlorambucil (9 %) auf (Leporrier, 2004). Die initiale Gabe von Fludarabin bei Patienten mit hoher Leukozytenzahl kann ein Tumorlysesyndrom hervorrufen. Auch eine autoimmunhämolytische Anämie (AIHA) kann bei Therapie mit Fludarabin auftreten (Leporrier et al., 2001).

Versuche mit oralem Fludarabin zeigten eine ähnliche klinische Effizienz und vergleichbare Hämatotoxizität. Die im Gegensatz zum intravenös verabreichten Fludarabin häufiger auftretenden gastrointestinalen Nebenwirkungen sind moderat (Boogaerts et al., 2001).

Fludara® (Schering) enthält Fludarabinphosphat, ein wasserlösliches fluoriertes Nukleotid-Analogon des Virostatikums Vidarabin (Ara-A, 9- β -D-arabinosyl-2-Fluoroadenin), dessen Metabolit 2F-Ara-A stabil gegenüber Deaminierung durch Adenosin-Deaminase ist. Daher überwiegt die Phosphorylierung zum aktiven Metabolit 2F-Ara-ATP durch Deoxycytidin-Kinase. Dieses in hoher Konzentration zytotoxische 5'-Triphosphat akkumuliert intrazellulär, inseriert in die DNA und verhindert überwiegend die DNA-Synthese bzw. -Reparatur durch Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase, DNA-Polymerase α/δ und ϵ sowie der DNA-Primase und der DNA-Ligase. Zudem wird über Insertion in die RNA die Proteinsynthese gehemmt (Gandhi and Plunkett, 2002). Obwohl die Hemmung der DNA-Synthese der dominierende Wirkmechanismus von Fludarabin ist, zeigt das Nukleosidanalogen auch eine starke therapeutische Aktivität gegenüber indolenten lymphozytischen Erkrankungen mit niedriger Proliferationsrate (Keating et al., 1998). Pettitt beschreibt in seinem Review anschaulich den Mechanismus, über den Purinanaloga ihre zytotoxische Wirkung auf CLL-Zellen vermitteln (Pettitt, 2003).

1.1.4.2. Antikörperbehandlung

Auf Grund fehlender signifikanter Myelotoxizität scheinen chimäre monoklonale Antikörper eine attraktive Alternative gegenüber konventioneller Chemotherapie darzustellen (Schriever and Huhn, 2003). Rituximab, ein Antikörper, der an das B-Zell-Oberflächenantigen CD20 bindet, vermittelt seine zytotoxische Wirkung über Komplementaktivierung und induziert Apoptose in den malignen Zellen. Die Monotherapie mit Rituximab erzielte bisher keine höheren Erfolgsraten im Vergleich zu alkylierenden Substanzen. Klinische Studien zeigen unter intensivierter Therapie mit der Kombination aus Rituximab und Fludarabin bzw. Cyclophosphamid erfolgsversprechende Ergebnisse (Byrd et al., 2003). Dennoch konnte eine anhaltende molekulare Remission und Heilung bisher noch nicht nachgewiesen werden. Alemtuzumab, ein monoklonaler anti-CD52-Antikörper, induziert höhere Infektionsraten als Rituximab, zeigt jedoch gerade bei refraktärer CLL eine hohe Sensitivität bei tolerabler Toxizität (Keating et al., 2002; Kennedy et al., 2002).

1.1.4.3. Transplantation

Im Rahmen des CLL3-Protokolls der Deutschen CLL-Studiengruppe wird bei Patienten unter 60 Jahren im Stadium Binet A mit Risikofaktoren für Progression die Durchführbarkeit einer Hochdosis-Radiochemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation und deren Remissionsrate überprüft. Da der Altersmedian bei Diagnosestellung fast 70 Jahre beträgt, sind weniger als 10 % der CLL-Patienten geeignet für eine Transplantation (Schriever and Huhn, 2003). Die Mortalität bei myeloablativer Chemotherapie mit nachfolgender autologer Stammzelltransplantation beträgt bis zu 19 %. Leider konnte bisher noch kein Plateau in den Überlebenskurven beobachtet werden und 50 % der Patienten zeigen 4 Jahre nach erfolgter autologer Stammzelltransplantation Rückfälle. Da die allogene Stammzelltransplantation von einer Mortalitätsrate von 25 - 50 % begleitet ist, wird diese nur sehr zurückhaltend im Rahmen von Studien eingesetzt. Der „graft-versus-leukemia“-Effekt ist hier für die verbesserte Überlebensrate verantwortlich. Die Überlebenskurven zeigen ein Plateau bei 40 - 60 % der Patienten, nur bei 10 - 25 % treten Rückfälle auf. Dennoch konnte eine signifikante Lebensverlängerung und Heilung bisher noch nicht nachgewiesen werden.

1.2. Apoptose

1.2.1. Bedeutung der Apoptose

Der programmierte Zelltod, auch Apoptose genannt, ist eines der Schwerpunktthemen in der modernen biologischen Forschung. Um ein ideales Gleichgewicht zu den neuen Zellen herzustellen, die jeden Tag durch Mitose entstehen, müssen jeden Tag ungefähr 10 Billionen Zellen sterben. Apoptose erlaubt dem Organismus die Zellzahl und die Gewebegröße zu kontrollieren (Glucksmann, 1965), sich vor pathogenen Zellen zu schützen und ist daher lebensnotwendig für multizelluläre Organismen. Apoptose spielt eine große Rolle sowohl in der embryonalen Entwicklung (Saunders, 1966) als auch in der Bildung des Nervensystems und des Immunsystems (Krammer et al., 1994) und ist wesentlich daran beteiligt pathogene und autoaggressive Zellen aus dem Körper zu eliminieren. Im Gegensatz zum nekrotischen Zelltod, der durch mechanische Läsion, physikalische oder chemische Noxen ausgelöst wird, ist der apoptotische Zelltod physiologisch und ein energieabhängiger Prozess.

1.2.2. Morphologische und molekulare Veränderungen während Apoptose

Die morphologischen Veränderungen während Apoptose wurden erstmals 1972 von Kerr und Mitarbeitern beschrieben (Kerr et al., 1972). Mit Hilfe der Elektronenmikroskopanalyse konnten eine Chromatinkondensation und eine Fragmentierung der nucleosomalen DNA durch Aktivierung endogener Nucleasen beobachtet werden (Wyllie, 1980). Im frühen Stadium sind keine Veränderungen in den Mitochondrien, im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat sichtbar, später jedoch schwillt die äußere Mitochondrienmembran an (Vander Heiden et al., 1997). Im späten Stadium lösen sich Zellkern und Mitochondrien auf und das Zytoplasma schrumpft durch Abschnürung und Abstoßung membrangebundener Vesikel (Wyllie et al., 1980). Das in der lebenden Zelle an der inneren Zellmembran lokalisierte Phospholipid Phosphatidylserin wird nun an der Membranaussenseite exponiert (Fadok et al., 2001). Die abgeschnürten Vesikel werden von Makrophagen und dendritischen Zellen phagozytiert (Platt et al., 1998) und die phagozytierenden Zellen sezernieren Zytokine. Anders als beim nekrotischen Zelltod, bei dem es durch einen Defekt des transmembranalen Wasser- und Elektronentransports zu einem vakuolären Anschwellen und Platzen von Zelle und Organellen kommt, bleibt dadurch eine Entzündungsreaktion des umgebenden Gewebes beim geplanten Zelltod aus.

Diese typischen morphologischen Veränderungen können durch ein breites Spektrum apoptotischer Stimuli induziert und in Zellen verschiedenster Gewebearten und Spezies beobachtet werden. Daher münden wohl unabhängige proapoptotische Signalwege in einen gemeinsamen endogenen Zellmechanismus, der während der gesamten Evolution beibehalten wurde (Hengartner and Horvitz, 1994; Wyllie et al., 1980).

1.2.3. Caspasen

Für den programmierten Zelltod ist eine Gruppe von Cysteinproteasen verantwortlich, die als Interleukin-1 β -converting Enzyme (ICE), CED-3 Proteasen oder seit 1996 auch einfacher als Caspasen bezeichnet werden.

Mindestens 14 verschiedene Caspasen wurden bei Säugetieren identifiziert (Alnemri et al., 1996), davon spielen wohl ungefähr zwei Drittel bei der Induktion von Apoptose eine Rolle. Die Hemmung von Caspaseaktivität, sei es durch Mutation oder durch pharmakologische Inhibitoren, kann den apoptotischen Zelltod verlangsamen oder sogar verhindern (Earnshaw et al., 1999). Beispielsweise verhindert die transgene Expression von Baculovirus Protein p35, einem sehr potenten Pan-Caspaseinhibitor, Apoptose in zahlreichen Zelllinien (Bump et al., 1995). Daher sind die Caspasen zweifellos die Schlüsselenzyme der Apoptoseinduktion. Die Caspasen sind homolog untereinander und können sowohl bei Menschen und Säugetieren als auch bei Insekten, Nematoden und Hydra (Süßwasserpolyphen) gefunden werden.

Alle bekannten Caspasen erkennen ihre Substrate an Aspartat-Xxx-Tetrapeptiden und spalten am Carboxylende des Aspartats. Die Substratspezifität wird bestimmt durch das Muster der Aminosäuren P2-P4 am aminoterminalen Ende (Thornberry et al., 1997). Die Caspasen werden als Zymogene mit niedriger intrinsischer Enzymaktivität synthetisiert, bestehend aus drei Domänen: einer N-terminalen Prodomäne, einer p20- und einer p10-Domäne. Proteolytische Spaltung jeweils zwischen den Domänen führt zu Aktivierung des Zymogens. Das reife Enzym liegt als Heterotetramer vor, wird aus jeweils zwei identischen Untereinheiten von 20 kDa und 10 kDa gebildet und besitzt zwei aktive Bindungsstellen (Earnshaw et al., 1999). Da die Spaltungsstellen aus Asp-Xxx-Bindungen bestehen, nimmt man an, dass sich die Caspasen untereinander autokatalytisch spalten können (Thornberry et al., 1997).

Man geht von drei Modellen aus, die zu Caspaseaktivierung führen können. Einmal führt die proteolytische Spaltung durch eine Initiatorcaspase, wie Caspase-8 oder -9, zu einer kaskadenartigen Aktivierung der drei Effektorcaspasen, Caspase-3, -6 und -7. Diese besitzen eine kürzere Pro-Domäne als die Initiatorcaspasen und sind dadurch reaktiver als die Caspasen, die die Kaskade auslösen. Proapoptotische Signale werden durch diesen Mechanismus amplifiziert (Thornberry and Lazebnik, 1998).

Auch eine Erhöhung der lokalen Zymogenkonzentration durch Aggregation an membrangebundene Signalkomplexe kann zum Auslösen der Kaskade führen. Durch Anlagerung multipler Procaspase-8 Moleküle an die zytoplasmatische Todesdomäne des Fas-Rezeptors (CD95) reicht deren intrinsische Aktivität aus um sich gegenseitig zu aktivieren (Muzio et al., 1998; Salvesen and Dixit, 1999).

Bei der Aktivierung der Initiator-Procaspase-9 ist dagegen ein Holoenzymkomplex aus verschiedenen Kofaktoren notwendig, die proteolytische Spaltung von Caspase-9 spielt hier eine untergeordnete Rolle (Rodriguez and Lazebnik, 1999; Stennicke et al., 1999).

Etwa hundert Substrate wurden in den letzten Jahren identifiziert. Die Spaltung eines Zielproteins führt meistens zu dessen Inaktivierung, wie es zum Beispiel bei der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), bei MDM2, einem Inhibitor von p53 oder bei der Proteinkinase C der Fall ist. Auch polymere Proteinkomplexe können gespalten und in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Die Spaltung der nukleären Filament-Polymere, der Lamine, führt zu Schrumpfung des Zellkerns (Buendia et al., 1999; Rao et al., 1996), wohingegen die gesamte Zellform verloren geht, wenn zytoskelettale Proteine, wie Fodrin oder Gelsolin, von Caspase-3 gespalten werden (Kothakota et al., 1997). Caspasen können ihre Substrate jedoch auch aktivieren durch Abspaltung negativer regulatorischer Domänen oder durch Inaktivierung einer regulatorischen Untereinheit. Beispielsweise liegt die Endonuklease CAD (caspase-activated Dnase) in der lebenden Zelle als inaktiver Komplex gebunden an die inhibitorische Untereinheit ICAD vor (Enari et al., 1998; Sakahira et al., 1998). Wird ICAD durch Caspase-3 abgespalten, so kann CAD, dessen katalytische Untereinheit freigesetzt wurde, die DNA zwischen den Nukleosomen schneiden und es werden DNA-Fragmente mit einer Länge von 180 Basenpaaren gebildet (Nagata, 2000; Wyllie, 1980). Auch bei der p21-aktivierten Kinase 2 (PAK 2) führt die Abspaltung einer negativ regulatorischen Untereinheit von der katalytischen Untereinheit zu erhöhter biologischer Aktivität und zum Abschnüren von Membranvesikeln während Apoptose (Rudel and Bokoch, 1997).

1.2.4. Triggerung von Apoptose durch externe und interne Signalwege

Sowohl extra- als auch intrazelluläre Signale können zum programmierten Zelltod führen (Budihardjo et al., 1999). Beide Signalwege münden in der Aktivierung der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 mit nachfolgender Spaltung von Zielproteinen (Abbildung 1). Jedoch arbeiten beide weitgehend unabhängig voneinander und stehen nur über Bid (Li et al., 1998), einem proapoptotischen Protein der Bcl-2 Familie, miteinander in Verbindung (Roy and Nicholson, 2000).

1.2.4.1. Vermittlung externer proapoptotischer Signale über die Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptorfamilie

Die Mitglieder der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptorfamilie können sowohl Proliferation, Differenzierung als auch Apoptose (Nagata, 1997; Wallach et al., 1998) einer Zelle vermitteln. Sie werden als membranverankerte Trimere synthetisiert, deren extrazelluläre Ligand bindenden Regionen aus einer variablen Anzahl von „cystein-repeats“ bestehen und deren intrazelluläre Abschnitte eine sogenannte Todesdomäne enthalten, die für die Übermittlung extrazellulärer proapoptotischer Signale notwendig ist (Schneider et al., 1998; Strasser and O'Connor, 1998). Für die Triggerung von Apoptose sind vier Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie von besonderer Bedeutung: CD95, auch FAS oder Apo-1 genannt (Itoh and Nagata, 1993), der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1, das TNF-Rezeptor-related-apoptosis-mediated-protein und TNF-related apoptosis-inducing-ligand 1 und 2 (Kitson et al., 1996).

Bindung von Fas-Ligand und TNF an die Membranrezeptoren der Zielzelle führt zu deren Konformationsänderung mit Ausbildung von Todesdomänen (DED, death effector domain) am zytoplasmatischen Kettenende, so dass diese sozusagen als Plattformen (DISC, death inducing signaling complex) für Caspase-8 Aktivierung dienen. Bei diesem „death by design“ genannten Signalweg sind somit proapoptotische Signale von Nachbarzellen notwendig um Apoptose auszulösen. Caspase-8 (Varfolomeev et al., 1998) und FADD (Zhang et al., 1998) sind für die Signalisierung von Apoptose über CD95 und TNF-R1 notwendig, sie werden jedoch für andere Signalwege nicht gebraucht (Smith et al., 1996). Caspase-8 Aktivierung kann durch das degenerierte Caspasehomologon FLIP (FADD-like ICE-Inhibitorprotein) verhindert werden. Es existieren 2 Spaltungsformen von FLIP (Irmeler et al., 1997). Das längere L-FLIP ähnelt Procaspase-8 in seiner Aminosäuresequenz, jedoch fehlen katalytisch aktive Zentren. Das kürzere S-FLIP besteht nur aus zwei DED Domänen. Während kompetitiver Bindung an das FADD (Fas-associated death domain protein)-Molekül kann FLIP Caspase-8 von der Todesdomäne des TNF-Rezeptors verdrängen.

1.2.4.2. Induktion von Apoptose über intrazelluläre Signale

Bei intrazellulärem Stress, ausgelöst durch DNA-Schädigung, durch Deprivation von Wachstumsfaktoren, durch Kortikosteroide und ähnliches, kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C aus dem Intermembranraum der Mitochondrien (Liu et al., 1996). Dieser Elektronencarrier ist nicht nur bei der oxidativen Phosphorylierung von Bedeutung, sondern führt unter ATP-Verbrauch zur Oligomerisation des Adaptorproteins Apaf-1 (Cain et al., 2000) und damit zur Einbindung von Procaspase-9 in einen Holoenzymkomplex, dem „Apoptosom“ (Rodriguez and Lazebnik, 1999), dessen Stoichiometrie noch unbekannt ist. Caspase-9 spaltet nun die Effektor-Procaspase-3 proteolytisch (Li et al., 1997). Dieser auch „death by neglect“ genannte Signalweg kann durch Proteine der Bcl-2-Familie reguliert werden, wohingegen der externe Signalweg unabhängig von diesen Molekülen arbeitet (Huang et al., 1997). Außer Cytochrom C werden unter anderem auch das Flavoprotein AIF (Lorenzo et al., 1999), Smac/ DIABLO und die Procaspasen -9, -2 und -3 als Antwort auf proapoptotische Signale aus dem Intermembranraum der Mitochondrien freigesetzt (Loeffler and Kroemer, 2000). Smac (Du et al., 2000) oder DIABLO (Verhagen et al., 2000) bindet an das Caspase-3 antagonisierende IAP und neutralisiert so dessen antiapoptotische Aktivität. IAPs verhindern vermutlich eine spontane Caspase-Aktivierung (Budihardjo et al., 1999).

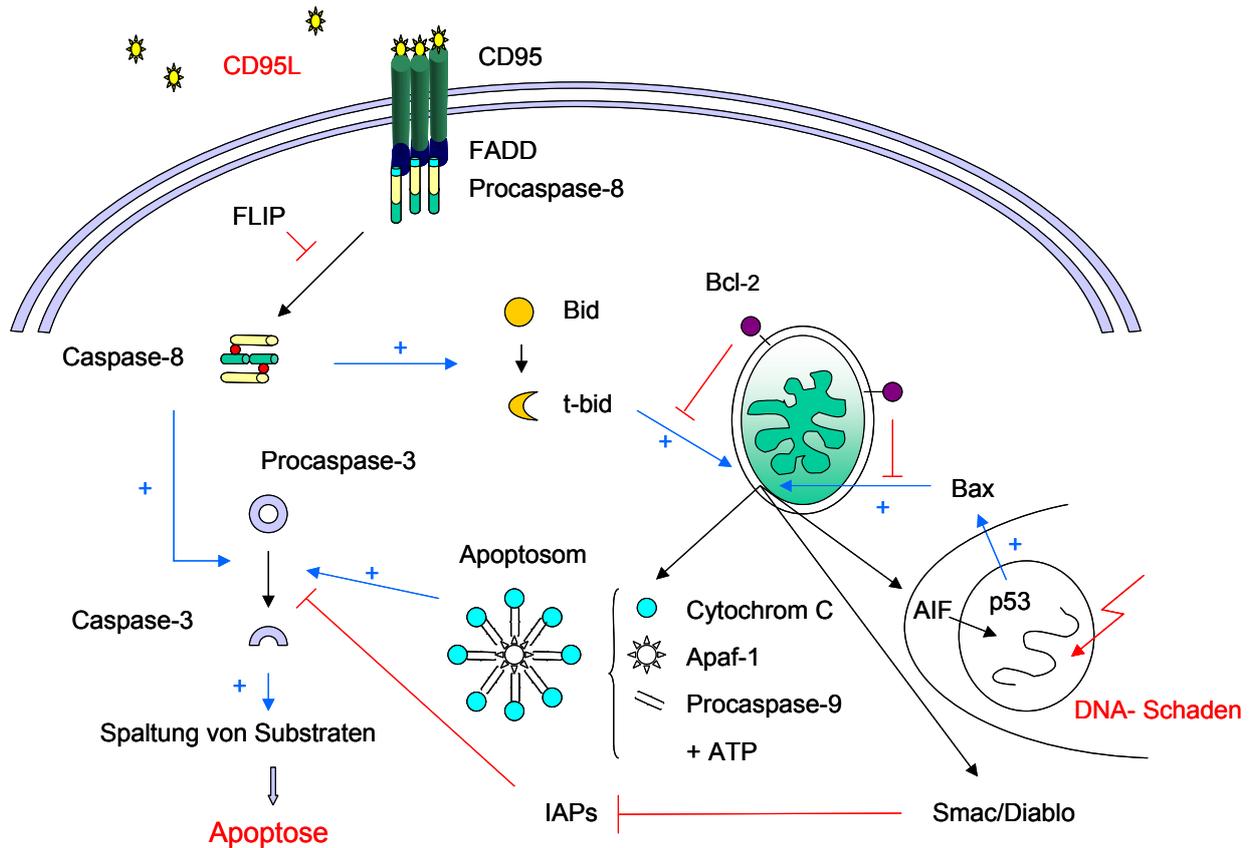


Abbildung 1: Triggerung von Apoptose durch externe und interne Signalwege

Externe proapoptotische Signale werden über TNF-Rezeptoren und Procaspase-8-Aktivierung vermittelt. Das degenerierte Caspasehomologon FLIP kann Procaspase-8 kompetitiv von der Bindungsstelle am Adaptormolekül FADD verdrängen. Durch intrazelluläre proapoptotische Signale wird Cytochrom C aus dem Intermembranraum der Mitochondrien freigesetzt. Dies führt zur Bildung eines Apoptosoms aus Cytochrom C, Apaf-1 und Procaspase 9. Die Freisetzung von Cytochrom C wird durch Mitglieder der Bcl-2-Familie, wie Bax, Bid und Bcl-2 reguliert. Beide Signalwege münden in Aktivierung der Effektorcaspase-3 und nachfolgender Spaltung von Zielproteinen. IAP-Proteine antagonisieren die Aktivierung von Caspase-3 und werden selbst von Smac/Diablo-Protein, das aus den Mitochondrien freigesetzt wird, antagonisiert. Unter den meisten Bedingungen arbeiten beide Signalwege unabhängig voneinander, sie stehen jedoch über das zytosolische Bid miteinander in Verbindung. Spaltung von Bid durch Caspase-8 erhöht dessen proapoptotische Aktivität, so dass es zu den Mitochondrien wandert und die Freisetzung von Cytochrom C fördert (Hengartner, 2000).

1.3. Die Bcl-2-Proteinfamilie

1.3.1. Pro- und antiapoptotische Bcl-2 Familienmitglieder

Die Bcl-2-(B-cell lymphoma gene)-Familie wurde 1985 nach dem Protoonkogen benannt, das aus einem B-Zell-Lymphom isoliert werden konnte (Tsujiimoto et al., 1984). Diese Protein-Familie umfasst mehr als ein Dutzend verschiedener Proteine und kann in drei Gruppen aufgeteilt werden (Abbildung 2). Die Proteine der ersten Gruppe hemmen Apoptose, die der zweiten und dritten Gruppe vermitteln proapoptotische Signale (Adams and Cory, 1998).

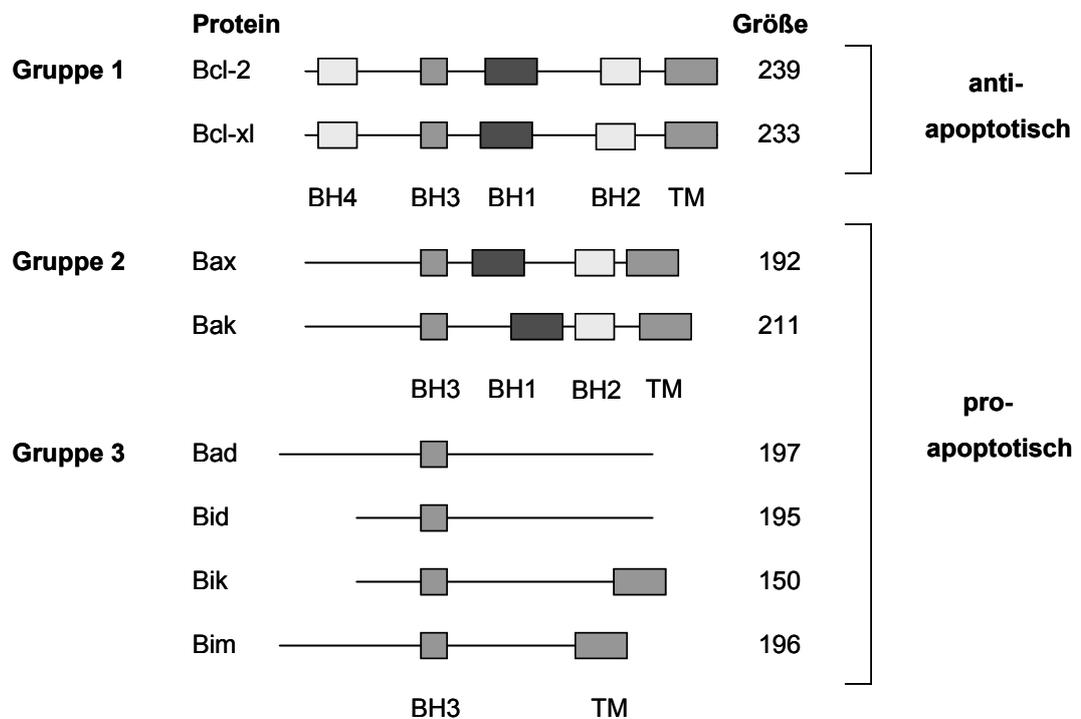


Abbildung 2: Einteilung der Mitglieder der Bcl-2 Familie in drei Gruppen. Schematische Darstellung nach (Strasser et al., 2000). TM bedeutet hydrophobe Transmembrandomäne, BH bedeutet Bcl-homologe Domäne.

Die Mitglieder der ersten Gruppe, wie zum Beispiel Bcl-2 oder Bcl-xl sind durch vier kurze Bcl-2 homologe (BH) Domänen charakterisiert (BH 1 - 4). Das C-terminale hydrophobe Ende des Proteins ist sowohl an der zytosolischen Seite der Mitochondrienaußenmembran als auch an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums und an der Kernhülle verankert (Chen-Levy and Cleary, 1990; Chen-Levy et al., 1989; Kroemer, 1997; Nguyen et al., 1994). Die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xl können sich in ihrer Funktion substituieren (Chao et al., 1995), andererseits sind apoptotische Stimuli, die gegen Bcl-2 resistent sind, auch resistent gegenüber seinen Homologena (Huang et al., 1997). Die Bcl-2 Expression wird über Zytokine reguliert (von Freed-Jeffry et al., 1997), die über Rezeptoren mit einer γ_c -Kette signalisieren. Die Expression von Bcl-xl wird dagegen durch Mitogene reguliert (Boise et al., 1995).

Die Proteine der zweiten Gruppe, beispielsweise Bax (Oltvai et al., 1993) oder Bak (Chittenden et al., 1995; Farrow et al., 1995; Kiefer et al., 1995), sind ähnlich aufgebaut wie die antiapoptotischen Proteine der Gruppe I. Sie besitzen jedoch keine N-terminale BH 4-Domäne. Die apoptotische Potenz ist determiniert durch große Regionen des Proteins, die zwei α -Helixen beinhalten. Bax liegt als zytosolisches Protein vor und wird nur unter proapoptotischer Triggerung zur Mitochondrienmembran umverteilt (Gross et al., 1998).

Die proapoptotische Gruppe III der Bcl-2 Familie, zu der unter anderem Bid (Wang et al., 1996), Bik (Boyd et al., 1995), Bad (Yang et al., 1995) und Noxa (Oda et al., 2000) zählen, besitzt nur die BH 3-Domäne mit ungefähr 12 - 16 Aminosäuren und hat kaum Strukturähnlichkeit mit den Mitgliedern der Gruppen I und II und untereinander. Diese Gruppe kann Apoptose am potentesten auslösen (Gross et al., 1999).

Die Aktivität der verschiedenen proapoptotischen Bcl-2 Proteine wird im Gegensatz zu den antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie durch spezifische posttranslationale Modifikationen kontrolliert. Bad wird über Phosphorylierung durch Akt/ PKB/ RAC oder durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A reguliert (Datta et al., 1997; del Peso et al., 1997; Harada et al., 1999), Bid wird über proteolytische Spaltung durch Caspase-8 aktiviert (Luo et al., 1998) und Bim wird durch Bindung an den Dyneinkomplex der Mikrotubuli im Zytosol sequestriert (Puthalakath et al., 1999). Auch die Aktivität von Bcl-2 und Bcl-xl kann in geringerem Maße posttranslational modifiziert werden, beispielsweise durch Phosphorylierung (Ito et al., 1997; Maundrell et al., 1997) oder proteolytische Spaltung durch Caspase-1 und -3 (Clem et al., 1998). Auf diese Weise können Phosphatasen, Kinasen, Caspasen und andere Moleküle der Signaltransduktion die zelluläre Lokalisation und Funktion der Bcl-2 Proteine beeinflussen. Da mehrere Gene für Proteine mit ähnlicher biochemischer Funktion kodieren, können Bcl-2 Proteine gewebs- und stimulusspezifisch exprimiert werden. Bok wurde zum Beispiel nur in reproduktivem Gewebe nachgewiesen, während Bak besonders in der Herz- und Skelettmuskulatur sowie in Gehirnzellen exprimiert wird. Die meisten Mitglieder der Bcl-2 Familie liegen allerdings ubiquitär vor (Krajewski et al., 1993).

1.3.2. Die Funktion der Bcl-2 Proteine bei Apoptoseinduktion

Wie Apoptose durch die einzelnen Bcl-2 Proteine reguliert wird, ist noch unbekannt; verschiedene Modelle erklären die Induktion von Apoptose. Vermutlich existiert nicht nur ein Mechanismus, sodass ein apoptotisches Signal auf unterschiedlichen Wegen amplifiziert oder inhibiert werden kann.

Sowohl während Apoptose als auch Nekrose kommt es zu einem Verlust des inneren Transmembranpotentials ($\Delta\psi_m$) der Mitochondrienmembran und zu einer erhöhten Membranpermeabilisation, so dass proapoptotische Faktoren, wie Cytochrom C (14,5kDa), Procaspasen -2 und -9 (50kDa) und AIF (57kDa) aus dem Intermembranraum in das Zytosol freigesetzt werden (Heiskanen et al., 1999; Lorenzo et al., 1999; Susin et al., 1999a). Das Hinzufügen von proapoptotischen Bcl-2 Proteinen fördert die Freisetzung aus dem Intermembranraum der Mitochondrien, wohingegen eine Überexpression von antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen die Freisetzung verhindert (Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997).

Im Gegensatz zu anderen Protoonkogenen schützt das antiapoptotische Bcl-2 die Zellen vor Apoptose, regt jedoch nicht zu Proliferation an (Korsmeyer et al., 1993). Bcl-2 ist an der Zellmembran, der Kernhülle und an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert (de Jong et al., 1994). Antiapoptotische Bcl-2 Moleküle können synthetische Lipiddoppelmembranen inserieren, dann oligomerisieren und Kanäle mit diskreter Leitfähigkeit bilden (Antonsson et al., 1997). Beispielsweise hat Bcl-xl strukturelle Ähnlichkeit mit der porenformenden Untereinheit des Diphtherie-Toxins (Muchmore et al., 1996). Durch Interaktion mit Ionenkanälen der äußeren Mitochondrienmembran, beispielsweise dem „voltage-dependent-anion-channel“ (VDAC), einem Bestandteil der „permeability transition pore“ (PTP), kann Bcl-2 das Membranpotential aufrechterhalten und so die Cytochrom C-Freisetzung und das Anschwellen der Mitochondrienmatrix verhindern (Crompton, 1999; Shimizu et al., 1999; Vander Heiden et al., 1999). Vermutlich reguliert Bcl-2 auch den Ca^{2+} -Transport in die Zelle und kann so die Funktion der Ca^{2+} -abhängigen DNA-Endonuklease regulieren (de Jong et al., 1994).

Bcl-2 kann auch nach Cytochrom C-Freisetzung ins Zytosol dessen proapoptotischen Effekt vermindern und das Überleben der Zelle verlängern (Rosse et al., 1998; Zhivotovsky et al., 1998). Die antiapoptotischen Bcl-2 Proteine können mit Apaf-1 interagieren und so die Funktion dieses Adaptorproteins blockieren (Hu et al., 1998; Pan et al., 1998). Man nimmt an, dass durch Bindung von proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie an antiapoptotische Bcl-2 Proteine das Adaptorprotein Apaf-1 freigesetzt wird, das Apoptosom gebildet und Procaspase-9 aktiviert werden kann. Denn über ihre Homologiedomänen (BH1-3) können antiapoptotische Proteine der Gruppe I vor allem mit den proapoptotischen Bcl-2 Mitgliedern der Gruppe II über Heterodimerbildung interagieren und sich gegenseitig in ihrer Funktion beeinflussen (Farrow et al., 1995; Oltvai et al., 1993; Wang et al., 1996; Yang et al., 1995). Normalerweise liegt Bax gelöst als Monomer im Zytosol vor. Zahlreiche apoptotische Stimuli triggern die Zusammenlage-

rung von Bax-Proteinen zu Homodimeren und fördern deren Translokation zu den Mitochondrien (Gross et al., 1999). Diese Translokation von Bax wird durch zytosolische Proteine (Nomura et al., 1999) oder pH-Änderung (Khaled et al., 1999) während Apoptose unterstützt. Auch die proapoptotischen Proteine Bax, Bak und Bid besitzen Ähnlichkeit mit den Ionenkanal-formenden bakteriellen Toxinen und können durch Porenbildung oder Interaktion mit Ionenkanälen der Mitochondrienmembran zu vermehrter Permeabilisation führen (Jurgensmeier et al., 1997; Marzo et al., 1998). Das BH3-only-Protein Bid wird erst nach proteolytischer Spaltung durch Caspase-8 zu t-Bid (truncated-Bid) aktiviert und zu den Mitochondrien transloziert. Dort fördert t-Bid die Konformationsänderung von Bax und dessen Insertion in die Mitochondrienausmembran (Desagher et al., 1999; Eskes et al., 2000; Yin et al., 1999). Das im Zytosol gelöste Bid wird erst apoptotisch aktiv, wenn es von Calcineurin dephosphoryliert wird. An der äußeren Mitochondrienmembran kann es nun die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xl antagonisieren und die Membranpermeabilisation triggern (Wang et al., 1999).

1.3.3. Dysregulation der Bcl-2 Familie bei B-CLL

Während der 80er Jahre wurde die Schlüsselrolle des antiapoptotischen Bcl-2 Onkogens bei malignen B-Zell-Erkrankungen erkannt. Follikuläre Lymphomzellen haben die Translokation t(14;18) gemeinsam. Bcl-2 auf Chromosom 18 gerät durch diese Translokation unter die Kontrolle des Enhancers der schweren Kette von Immunglobulin, so dass nun Bcl-2 vermehrt exprimiert wird (Levine et al., 1991). Bei B-CLL findet diese Translokation allerdings nur in weniger als 10 % der Fälle statt (Adachi et al., 1990; Raghoebier et al., 1991). Doch auch ohne den Nachweis einer t(14;18) Translokation können B-CLL-Zellen das Bcl-2 Gen stark exprimieren, wodurch die malignen Lymphozyten resistent gegen Kortikosteroid-induzierte Apoptose werden (Korner et al., 1997). Hanada und Mitarbeiter wiesen in 70 % der untersuchten B-CLL-Proben im Vergleich zu einer Zelllinie mit t(14;18) eine gleiche oder sogar höhere Expressionsrate von Bcl-2 nach. In 95 % der Fälle exprimierten die B-CLL-Zellen 1,7 bis 25 mal mehr Bcl-2 als normale B-Zellen (Hanada et al., 1993). Überexpression von Bcl-2 ist meist verbunden mit einer niedrigen Expression von Apo-1/Fas Antigen (Molica et al., 1996). Grund für die Überexpression von Bcl-2 bei B-CLL könnte zum Teil eine vollständige Demethylierung beider Allele des Bcl-2 Gens sein. Denn eine Hypomethylierung führt oft zu einer starken Genexpression. Der Bcl-2 Proteinspiegel korreliert jedoch nicht immer mit der Allel-Methylierung, daher müssen noch weitere Faktoren eine Rolle spielen (Hanada et al., 1993).

1.4. Mutation des Tumorsuppressorgens p53 bei B-CLL

Das p53-Tumorsuppressorgen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der eine große Rolle bei der Kontrolle von zellulären Schäden spielt (Shaw et al., 1992; Yonish-Rouach et al., 1991). p53 wird auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, da es seine Aufgabe ist, das Wachstum von potentiell neoplastischen Zellen mit DNA-Schäden zu supprimieren. p53-Tetramere binden an DNA-Sequenzen in Promoterregionen oder Introns von spezifischen Genen, die das Zellwachstum regulieren. Dazu zählen unter anderem p21, ein Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinasen (Brugarolas et al., 1995), oder auch GADD 45 (growth arrest and DNA damage), ein Protein, das bei Überexpression das Zellwachstum hemmt (Kastan et al., 1992). Außerdem führt p53 in manchen Zellen zu erhöhter Bax/Bcl-2-Ratio (Miyashita et al., 1994) und triggert den proapoptischen Fas-Signalweg (Owen-Schaub et al., 1995). Die Halbwertszeit von p53 ist mit 20 - 30 Minuten sehr kurz. Erst nach DNA-Stress oder inadäquater proliferativer Signale wird p53 stabilisiert und seine DNA-Bindungsaktivität erhöht. Die p53-Aktivität wird autoregulativ inhibiert durch Interaktion mit dem Onkogen mdm2. Aktiviertes p53 induziert die Expression von mdm2, welches nun an die N-terminale Domäne von p53 bindet und dessen Aktivität hemmt (Momand et al., 1992). Vor allem phosphoryliertes p53 ist besonders stabil gegenüber mdm2-induzierter Degradation (Shieh et al., 1997).

Bei der chronischen lymphatischen Leukämie wird in 10 - 17 % der untersuchten Fälle eine Mutation des p53 Gens gefunden. Diese Patienten haben ein signifikant höheres Risiko für Krankheitsprogression und eine partielle Remission wird seltener erreicht (el Rouby et al., 1993; Ichikawa et al., 1993; Wattel et al., 1994). Vor allem in fortgeschrittenen Stadien (Binet C) sind p53 Mutationen häufig (Fenaux et al., 1992). Bei der Therapie mit Purinanaloga ist die p53 Gendeletion der stärkste prognostische Faktor für das Überleben der Patienten (Dohner et al., 1995).

1.5. Die Effekte von Serum auf Apoptose bei B-CLL-Zellen

Die Dysregulation von Apoptose bei CLL beruht nicht nur auf intrinsischen, sondern auch auf extrinsischen Mechanismen. Man hat festgestellt, dass die B-CLL-Zellen *in vivo* weniger durch vermehrte Proliferation als durch eine erniedrigte Apoptoserate akkumulieren (Dormer et al., 1983). *In vitro* sterben die isolierten malignen Zellen jedoch schnell programmiert ab. Daher sind wohl neben intrinsischen Faktoren sowohl Knochenmarksstromazellen und Endothelzellen als auch verschiedene Zytokine für die klonale Vermehrung von B-CLL-Zellen verantwortlich. Beispielsweise spielen Interferon (INF)- α , INF- γ , Interleukin (IL)-2, IL-4, IL-8, IL-10 und IL-13 in der Regulation von Apoptose eine Rolle. Bomstein und Mitarbeiter haben den Effekt von autologem Serum und autologen T-Zellen nach Zugabe zu unfraktionierten B-CLL-Zellen *in vitro* untersucht (Bomstein et al., 2003). Autologes Serum konnte dabei auch in niedriger Konzentration (0,2 %) im Vergleich zu Hitze inaktiviertem FCS die spontane Apoptoserate bis zu 35 % stadienabhängig senken. Normale B-Zellen, die in autologem Serum inkubiert werden, begehen Apoptose zu einer höheren Rate als maligne Zellen. Daher vermutet man, dass im Serum von Patienten in fortgeschrittenen Stadien von CLL lösliche antiapoptotische Faktoren vorliegen müssen.

1.6. Die Rolle von Interleukin-10 bei B-Lymphozyten

1.6.1. Biologie des Interleukin-10

Interleukin-10 (IL-10) ist ein pleiotropes Zytokin, das erstmals auf Grund seiner hemmenden Aktivität gegenüber der Zytokin-Sekretion von Th1- und NK-Zellen als „cytokine-synthesis-inhibiting factor“ (CSIF) beschrieben wurde (Fiorentino et al., 1989). Das 18 kDa schwere Polypeptid besteht aus 178 Aminosäuren (Vieira et al., 1991), deren Sequenz zu 73 % identisch ist mit der Aminosäuresequenz von murinem IL-10. Den Interferonen ähnlich, ist das Polypeptid als α -helikale Struktur geformt. Humanes IL-10 liegt in aktiver Form als nicht kovalent gebundenes Homodimer aus 37 kDa vor, ähnlich wie Interferon- γ bestehend aus zwei Polypeptidketten (Walter et al., 1995). Im Gegensatz zu murinem IL-10, das am N-Terminus glykosyliert ist, fehlen dem humanen IL-10 Carbohydrat-Reste. Diese Glykosylierung hat jedoch keinen Einfluss auf die biologische Aktivität von IL-10 (Vieira et al., 1991). Humanes IL-10 wirkt zugleich auf murine und humane Zellen, während murines IL-10 nur an murine IL-10 Rezeptoren binden kann (Liu et al., 1994).

Fünf Exone kodieren für das entsprechende Gen auf Chromosom 1 (Kim et al., 1992). IL-10 wird meist als Antwort auf einen Stimulus in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert. Die mRNA besteht aus ungefähr 2 kb (Vieira et al., 1991). Die Expression wird je nach Zelltyp durch unterschiedliche Mechanismen reguliert. Die IL-10 Transkription wird im Gegensatz zu den meisten anderen Zytokinen von den Transkriptionsfaktoren

Sp1 und Sp3 reguliert (Tone et al., 2000), jedoch können auch posttranskriptionelle Mechanismen zu RNA-Degradation und zu schneller Kontrolle der IL-10 Expression führen (Powell et al., 2000).

Der IL-10 Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, die zu der Interferon-Rezeptorfamilie gehören. Die Ligand-bindende Untereinheit IL-10-R1 oder -R α bindet an IL-10 mit hoher Affinität (Liu et al., 1994). Strukturanalysen zeigen eine Analogie zur Klasse II der Zytokinrezeptorfamilie (CRF2), zu der auch die Rezeptoren von Interferon- α , - β und - γ gehören. Die meisten hämatopoetischen Zellen exprimieren nur wenige hundert IL-10-R1-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Die zweite Untereinheit IL-10-R2 oder -R β besitzt kaum Affinität zu IL-10, ihre Hauptfunktion ist wohl, die Jak-Kinase (Tyk2) in den Signaltransduktionskomplex einzugliedern (Kotenko et al., 1997; Spencer et al., 1998). IL-10 führt zur Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT1 (signal transducer and activator of transcription), STAT3 und STAT5 durch die Tyrosinkinasen Jak1 und Tyk2 (Finbloom and Winestock, 1995; Riley et al., 1999; Wehinger et al., 1996). STAT3 bindet an zwei Tyrosinreste der zytoplasmatischen IL-10-R1-Domäne, die durch IL-10 phosphoryliert werden. STAT1 und STAT5 interagieren dagegen nicht direkt mit dem IL-10/IL-10-Rezeptor-Komplex (Weber-Nordt et al., 1996).

1.6.2. Die Wirkung von IL-10 auf normale und maligne B-Zellen

IL-10 induziert bei normalen B-Lymphozyten Wachstum und Differenzierung zu Immunglobulin sezernierenden Plasmazellen (Fluckiger et al., 1994) und verhindert in Keimzentrum-B-Zellen deren Apoptose (Levy and Brouet, 1994). Die Wirkung von IL-10 auf das Überleben von normalen B-Zellen ist abhängig von deren Aktivierungsgrad: Während der beginnenden Aktivierung des Antigenrezeptors führt IL-10 zu Apoptose, in einem späteren Stadium dagegen zu Differenzierung (Itoh and Hirohata, 1995). Mit IL-2 liegt ein Synergismus für Proliferation und Zelldifferenzierung sowohl bei leukämischen als auch normalen B-Zellen vor (Fluckiger et al., 1993). In nicht aktivierten B-CLL-Zellen führt IL-10 hingegen dosisabhängig zu Apoptose (Fluckiger et al., 1994). Dieser proapoptotische Effekt wird von Zytokinen, die von T-Zellen sezerniert werden, wie beispielsweise IL-2, IL-4 und IFN- γ , als auch von anti-CD-40-Antikörpern antagonisiert. Bei Vorstimulation der B-CLL-Zellen mit anti-CD-40-Antikörpern führt IL-10 zu vermehrter DNA-Synthese und IgM-Produktion (Fluckiger et al., 1993).

Experimente mit frischen B-CLL-Proben konnten zeigen, dass IL-10 zum Überleben von malignen B-Lymphozyten führt. Im Gegensatz zu eingefrorenen Patientenproben, deren Zellen reduzierte IL-10-Bindungsspezifitäten besitzen, wurde kein proapoptotischer Effekt von IL-10 nachgewiesen. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass IL-10 einen ähnlichen Signaltransduktionsmechanismus mit Interferonen teilt, deren antiapoptotische Wirkung bekannt ist. Genauso wie auch bei Stimulation mit IFN- α und IFN- γ führt die Aktivierung des IL-10-Rezeptors der B-CLL-Zellen zu Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 (Jurlander et al., 1997). Durch Tyro-

sinphosphorylierung dimerisieren die STAT-Proteine und wandern zum Zellkern, wo sie an spezifische DNA-Sequenzen der Promoterregionen ihrer Zielproteine binden. Frank und Mitarbeiter konnten bei allen getesteten B-CLL-Proben im Gegensatz zu normalen B-Zellen eine Phosphorylierung des Serinrestes 727 von STAT1 und STAT3 nachweisen (Frank et al., 1997). Es wird angenommen, dass eine Serinphosphorylierung nicht zur STAT-Aktivierung ausreicht, sondern die durch Tyrosinphosphorylierung der STAT-Proteine induzierte Gentranskription verstärken kann. Inhibition der STAT-Serinkinasen könnte daher das Überleben von B-CLL-Zellen vermindern.

1.7. Regulation von Apoptose durch cAMP

1.7.1. Der β_2 -adrenerge Signalweg

Wenn Katecholamine und andere β_2 -adrenerge Hormone an den membranständigen β_2 -Rezeptor auf der Oberfläche einer Zelle binden, führt dies zu einer zellulären Antwort durch den sekundären Botenstoff zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat (cAMP). Dieser „second messenger“ wurde 1957 von dem amerikanischen Biochemiker E.W.Sutherland entdeckt (Sutherland, 1970). Um ein extrazelluläres Signal vermitteln zu können ist der β_2 -Rezeptor an ein stimulierendes Guanin-bindendes Protein, das G-Protein, gekoppelt, das aus drei Untereinheiten (α , β und γ) besteht. Die α -Untereinheit liegt als inaktive Form gebunden an GDP vor und Hormonbindung an den Rezeptor führt zu deren Aktivierung durch Phosphorylierung des GDP zu GTP. So kann die α -Untereinheit aus dem G-Protein-Komplex dissoziieren und an die Adenylatzyklase binden. Die aktivierte Adenylatzyklase katalysiert die Pyrophosphatabspaltung von Adenosintriphosphat (ATP) und führt so zur Ringbildung zwischen dem dritten C-Atom der Ribose und dem Phosphatrest und damit zur Entstehung von zyklischem Adenosin-3',5'-Monophosphat (cAMP). Die Hydrolyse von GTP durch das Enzym GTPase der G- α -Untereinheit hebt die Aktivierung der Adenylatzyklase auf (Brodde et al., 1981; Gilman, 1984; Tang and Gilman, 1992). Es wurden neun verschiedene Adenylatzyklase-Gene geklont, deren Expression in den verschiedenen Geweben variiert (Smit and Iyengar, 1998). Walsh und Mitarbeiter beschreiben, dass cAMP zur Aktivierung von cAMP-abhängigen Proteinkinasen führt (Taylor et al., 1990; Walsh et al., 1968). Diese phosphorylieren unter ATP-Verbrauch die OH-Gruppen von Serin-, Threonin- und Tyrosin-Seitenketten von Zielproteinen der Zelle. Inaktive Proteinkinasen liegen als Dimere vor, bestehend aus einer katalytischen Untereinheit und einer cAMP-bindenden Untereinheit. Erst die Bindung an cAMP führt zur Abspaltung der katalytisch wirksamen Einheit und zur Aktivierung von Zielproteinen (Kemp et al., 1977). Zyklisches AMP seinerseits wird durch zyklische Nukleotid-Phosphodiesterasen (PDE) zu Adenosinmonophosphat (AMP) hydrolysiert und abgebaut.

1.7.2. Die Effekte von cAMP bei B-Lymphozyten und B-CLL-Zellen

Daniel und Kollegen konnten 1973 erstmals demonstrieren, dass die Inkubation muriner Lymphomzellen der Zelllinie S49.1 mit der Kombination aus dem zellpermeablen cAMP-Analogen dibutyryl-cAMP (dbcAMP) und dem Methylxanthin Theophyllin innerhalb von 48 Stunden zu Zytolyse führt (Daniel et al., 1973). Diese Zytolyse wird ausgelöst durch Phosphorylierung unbekannter Zielproteine durch die Proteinkinase A (Coffino et al., 1975). McConkey et al. konnten zeigen, dass diese dbcAMP induzierte Zytolyse von Ratten-Thymozyten von DNA-Fragmentierung begleitet ist, die charakteristisch für Apoptose ist (McConkey et al., 1990). Ob cAMP in einer Zelle eine pro- oder eine antiapoptotische Wirkung entfaltet, ist abhängig von dem Gewebetyp (Franklin and McCubrey, 2000; Yan et al., 2000). In myeloischen Vorläuferzellen, B-Vorläuferzellen, leukämischen Zellen, Granulosazellen und Herzmyozyten u.a. führt cAMP-Erhöhung zu Induktion von Apoptose. Die Empfindlichkeit von lymphoiden Zellen gegenüber cAMP-induzierter Apoptose variiert beträchtlich je nach Zelllinie und Reifestadium. Periphere B-Lymphozyten begehen in Kultur schneller Apoptose als periphere T-Lymphozyten. Gerade Keimzentrums-B-Zellen, die *in vivo* häufig apoptotisch werden, zeigen höhere basale cAMP-Spiegel als andere B-Zellpopulationen (Knox et al., 1993; Lomo et al., 1995). Eine Erhöhung des intrazellulären cAMP führt in reifen B-Zellen zu einer Hemmung von Zellproliferation, Zellmotilität und Antikörper-Sekretion (Coffey and Hadden, 1985; Monahan et al., 1975; Seuwen and Pouyssegur, 1992) und verstärkt die Differentierung von unreifen und malignen Lymphozyten (Olsson and Breitman, 1982). Zyklisches AMP gilt als Gegenspieler des Tumor-Nekrose-Faktors- α (TNF- α), einem der wichtigsten Wachstumsfaktoren der CLL-Zellen (van Kooten et al., 1993). Bei der chronischen lymphatischen Leukämie jedoch ist der cAMP-Spiegel in Plasma, Urin und innerhalb der Zellen vermindert (Peracchi et al., 1983). Die β_2 -Adrenorezeptordichte auf der Zelloberfläche ist reduziert und die Sensibilität der B-CLL-Zellen gegenüber Katecholaminen ungenügend (Paietta and Schwarzmeier, 1983; Sheppard et al., 1977). Hallek und Mitarbeiter wiesen einen verminderten cAMP-Spiegel in mononukleären Zellen von Patienten mit niedrigmalignem Non-Hodgkin-Lymphom nach. Diese Störung beruht auf einer Dysfunktion des β_2 -Adrenorezeptor-Adenylatzyklase-Komplexes (Hallek et al., 1991). Die gleiche Arbeitsgruppe konnte später eine Korrelation zwischen defektem β_2 -adrenergem Signaltransduktionsweg und Krankheitsprogression aufzeigen (Kamp et al., 1997).

1.7.3. Neue Therapiestrategien im Hinblick auf einen defekten cAMP-Signalweg

Der intrazelluläre cAMP-Spiegel wird durch ein Gleichgewicht von Adenylatzyklase- und PDE-Aktivität bestimmt (McKnight, 1991). Lerner und Mitarbeiter diskutieren daher mehrere regulierende Eingriffsmöglichkeiten um die Dysfunktion des β_2 -adrenergen Signaltransduktionsweges bei CLL aufzuheben (Lerner et al., 2000).

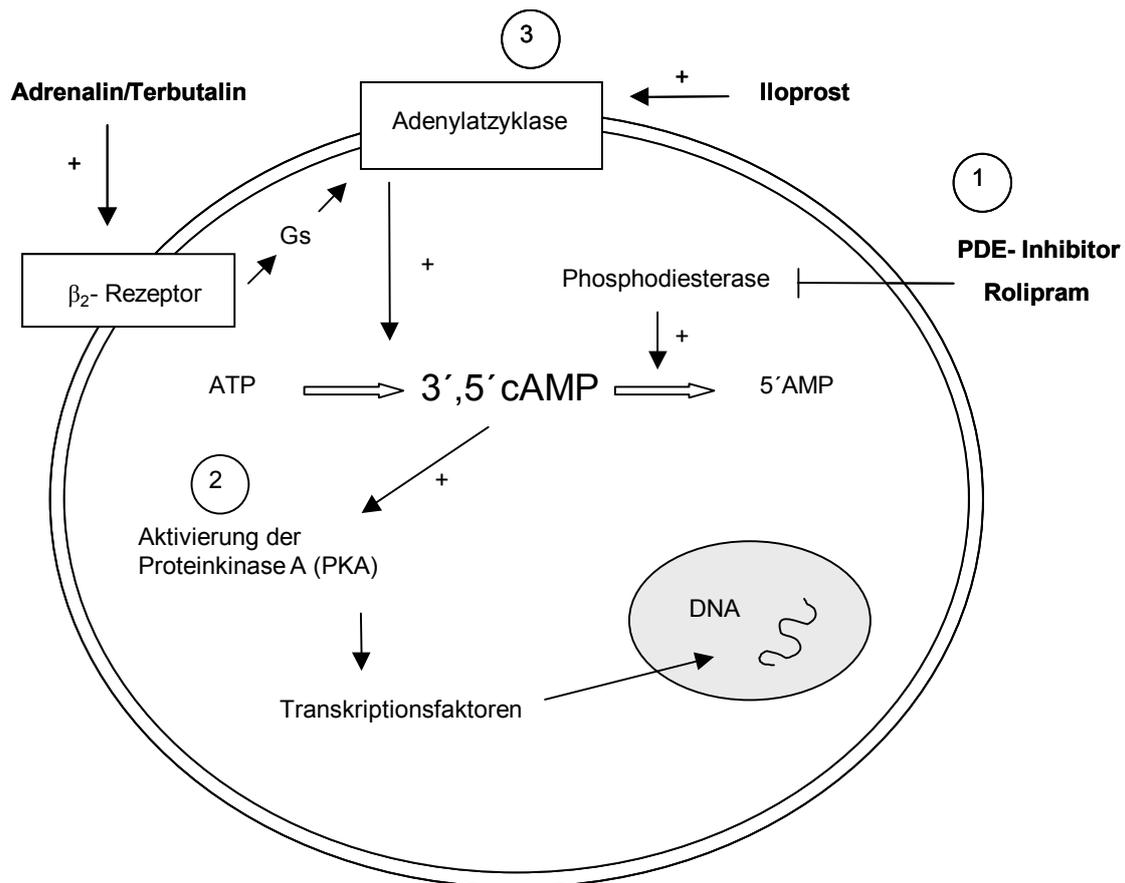


Abbildung 3: Verschiedene Eingriffsmöglichkeiten in den cAMP-Signaltransduktionsweg vom membranständigen Rezeptor bis zur Deoxyribonukleinsäure (DNA) im Zellkern (Lerner et al., 2000). Therapeutische Anhebung des cAMP-Spiegels in malignen B-CLL-Zellen durch: 1) Hemmung von Phosphodiesterasen, beispielsweise durch den selektiven PDE 4-Inhibitor Rolipram. 2) Aktivierung von Zielproteinen, wie z.B. der Proteinkinase A (PKA), die durch cAMP reguliert werden. 3) Stimulation der cAMP-Produktion durch β_2 -Adrenorezeptoragonisten, wie Adrenalin bzw. Terbutalin, oder durch Adenylatzyklaseaktivatoren, beispielsweise durch das Prostazyklinanalogon Iloprost. ATP steht für Adenosin-Triphosphat, 5'AMP für 5'Adenosin-Monophosphat und 3',5'cAMP für zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat.

Erstens könnte der cAMP-Spiegel in malignen B-Zellen durch Hemmung der Phosphodiesterasen (PDE) angehoben werden (Beavo, 1995); in Abbildung 3 mit „1“ gekennzeichnet. Es existieren mindestens sieben verschiedene Isoenzyme von PDE in Säugtierzellen. In B-CLL-Zellen werden vor allem die Isoenzyme PDE 1B1, PDE 3B, PDE 4A, PDE 4B, PDE 4D und PDE 7A1 exprimiert (Kim and Lerner, 1998; Lee et al., 2002). Daher kann der spezifische PDE 4-Inhibitor Rolipram im Vergleich zu Theophyllin, einem unspezifischen PDE-Inhibitor (Mentz et al., 1999), besonders selektiv und effektiv in den cAMP-Signalweg von CLL-Zellen eingreifen und so eine höhere Apoptoserate induzieren (Kim and Lerner, 1998; Siegmund et al., 2001). Auch PDE 5- und 6-Inhibitoren können Apoptose von B-CLL-Zellen potent induzieren (Sarfati et al., 2003).

Zweitens wäre denkbar in den Signalweg einzugreifen, indem man die cAMP-regulierten Zielproteine der Zellen aktiviert (in Abbildung 3 mit „2“ gekennzeichnet). Darunter zählen unter anderem Ionenkanäle, die Proteinkinase A (PKA), die von vielen cAMP-vermittelten Signalen aktiviert wird (Taylor et al., 1990) sowie der GDP-exchange-factor der GTPase Rap1 (de Rooij et al., 1998). Versuche mit Antisense-Oligonucleotiden gegen PKA Typ I, der regulatorischen RI-Untereinheit, die vor allem in neoplastischen Zellen angereichert ist, zeigten eine Hemmung der Proliferation von verschiedenen Tumorzelllinien (Ciardiello et al., 1998; Nesterova and Cho-Chung, 1995).

Drittens (in Abbildung 3 mit „3“ gekennzeichnet) wäre es möglich die cAMP-Produktion innerhalb einer B-CLL-Zelle durch Stimulation der Adenylatzyklase anzuheben um auf diese Weise einen apoptotischen Zelltod zu vermitteln (McKnight, 1991; Tang and Gilman, 1992). Durch die Prostazyklinanaloga Cicaprost und Iloprost konnte über cAMP-Erhöhung die Hemmung der TNF- α -Synthese erreicht werden (Eisenhut et al., 1993). Doch gerade die Kombination aus Adenylatzyklaseaktivatoren bzw. β_2 -Adrenorezeptor-Agonisten mit PDE-Inhibitoren könnte besonders effektiv Apoptose bei B-CLL-Zellen induzieren. Houslay und Milligan vertreten die Ansicht, dass eine Monotherapie mit PDE-Inhibitoren nur dann effektiv sein kann, wenn ein genügend hoher basaler cAMP-Spiegel durch eine intakte Adenylatzyklasefunktion bereitgestellt wird (Houslay and Milligan, 1997). Tatsächlich führt die Kombination von Cicaprost mit Rolipram zu einer noch stärkeren Suppression der TNF-Synthese (Greten et al., 1996; Siegmund et al., 1997).

1.8. cAMP-erhöhende Substanzen

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Iloprost und β_2 -Adrenorezeptor-Agonisten bezüglich Induktion von Apoptose bei B-CLL-Zellen untersucht. Dabei wurde auch ein möglicher Wirkungssynergismus durch die Kombination der einzelnen Substanzen mit dem PDE-Inhibitor Typ 4 Rolipram überprüft.

1.8.1. Iloprost

Die verwendete Substanz Ilomedin® enthält den Wirkstoff Iloprost-Trometamol und wird als durchblutungsförderndes Mittel bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, bei Raynaud-Symptomatik, bei pulmonaler Hypertonie und bei der fortgeschrittenen Thromboangiitis obliterans eingesetzt. Iloprost ist ein Prostaglandin I₂-Analogon und gehört zu der Gruppe der Eicosanoide. Dazu gehören auch die physiologisch vorkommenden Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene und Lipoxine. Diese Substanzen werden von Endothelzellen der Blutgefäße, Thrombozyten und Leukozyten sezerniert und regulieren den Gefäßtonus, die Thrombozytenaggregation und Leukozytenfunktion (Moncada and Vane, 1978). Die Biosynthese der Eicosanoide geht von den C₂₀-Fettsäuren Dihomo- γ -Linolensäure (20:3, n-6), Arachnidonsäure (20:4, n-6) und Eicosapentaensäure (20:5, n-3) aus. Es existieren acht verschiedene Prostanoid-Rezeptoren, die über einen G-Protein-gekoppelten-Signaltransduktionsmechanismus verschiedene Funktionen erfüllen. Prostaglandin I₂ (Prostazyklin) hemmt über den IP-Rezeptor die Thrombozytenaggregation (Moncada, 1982) und wirkt über intrazelluläre cAMP-Erhöhung stark gefäßerweiternd (Breyer et al., 2001). Seine biologische Halbwertszeit ist mit 1 bis 2 Minuten sehr kurz, daher wurden stabilere synthetische PGI₂-Analoge entwickelt. Iloprost ist gegen einen schnellen Abbau durch eine zusätzliche Methylgruppe in Position 16 und 3fach-Bindung in seiner unteren Seitenkette geschützt.

Iloprost entfaltet eine ähnliche Wirkung wie Prostazyklin, der genaue Wirkmechanismus ist jedoch unbekannt. Über Stimulation der Adenylatzyklase führt Iloprost zu einem intrazellulärem Anstieg von cAMP (Hayes et al., 1999). Bei maximaler Dosierung sind nach i.v.-Gabe Plasmaspiegel von etwa 135 \pm 24 pg/ml zu erwarten. Iloprost wird über β -Oxidation der Carboxylseitenketten metabolisiert.

1.8.2. Adrenalin

Der Wirkstoff Epinephrinhydrochlorid (Suprarenin®) wird als Antihypotonikum zur Therapie verschiedener Schockformen sowie als vasokonstringierender Zusatz zu Lokalanästhetika-Lösungen eingesetzt.

Epinephrin bezeichnet als INN (International Non-proprietary Name) das biologisch aktive, linksdrehende oder R-(-)-Adrenalin. Es ist das physiologische Hormon aus den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks. Reines Epinephrin ist der Wirkstoff von Suprarenin. Bei der Synthese entsteht auch das unphysiologische und hormonell praktisch inaktive rechtsdrehende oder S-(+)-Adrenalin in gleicher Menge. Daher ist das synthetische Adrenalin optisch inaktiv und biologisch nur zur Hälfte wirksam. Seine volle Aktivität wird durch Abtrennung der unphysiologischen rechtsdrehenden Fraktion erreicht.

Adrenalin wird von den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks aus Noradrenalin synthetisiert, in Vesikeln gespeichert und bei Erregung der cholinergen präganglionär-

sympathischen Neuronen freigesetzt. Als Applikationsform ist die intravenöse, subkutane, lokale und die inhalative Gabe möglich. Adrenalin stimuliert α - und β -Rezeptoren verschiedener Gewebe, daher entfaltet es eine komplexe Wirkung auf die Zielorgane und das Immunsystem. Die physiologische Funktion von Epinephrin ist die β -Rezeptorvermittelte Regulation der Herzfrequenz und der myokardialen Kontraktilität, des Tonus der glatten Muskulatur, der Drüsensekretion und der Stoffwechselaktivitäten unter Belastung. Die Serumhalbwertszeit von Epinephrin beträgt drei Minuten. Über Methylierung der phenolischen 3-Hydroxygruppe und oxidative Abspaltung der Aminogruppe zu Vanillinmandelsäure wird Epinephrin metabolisiert und im Urin ausgeschieden.

1.8.3. Terbutalin

Das 3,5-Dihydroxyphenyl-Derivat Terbutalin wird als kurzwirksames orales Broncholytikum bei obstruktiven Atemwegserkrankungen eingesetzt. Es handelt sich um ein direkt wirkendes β -Sympathomimetikum mit vorwiegender β_2 -Selektivität. Eine Stimulation der β_1 -Rezeptoren kommt erst bei höherer Dosierung zum Ausdruck. Die pharmakologischen Wirkungen von Terbutalin werden über Aktivierung der Adenylatzyklase durch den β_2 -Rezeptor vermittelt, wodurch es zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration von zyklischem 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) kommt. Es werden Steady-State-Konzentrationen von bis zu 40 ng/ml im Plasma erreicht.

1.9. Antidepressiva

Neben Störungen des monoaminergen Transmissionsmechanismus wird bei Major Depression vor allem auch eine Überfunktion der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse beobachtet. Dies führt zu Nebennierenhypertrophie und zu einer Erhöhung des Kortisolspiegels in Plasma, Liquor und Urin der Patienten (Gibbons, 1964). Die Aktivierung des proinflammatorischen Immunsystems zeigt sich in einer Erhöhung der peripheren Leukozytenzahl, der CD4/CD8-Ratio und der Plasmakonzentration von Akutephase-Proteinen, wie Haptoglobin, CRP und α_1 -Antitrypsin (Szuster-Ciesielska et al., 2003).

Antidepressiva fördern einerseits die Genexpression des Glukokortikoid- und Mineral-kortikoidrezeptors im Gehirn und führen so zu einer Normalisierung des defekten negativen Feedback-Mechanismus (Brady et al., 1991; Seckl and Fink, 1992). Andererseits können Antidepressiva die durch Stress und Glukokortikoide induzierten Effekte mildern. Sie vermindern die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. Interferon- γ , und erhöhen die Konzentration des antiinflammatorischen Interleukin-10 (Kubera et al., 2001; Maes et al., 1999; Szuster-Ciesielska et al., 2003; Xia et al., 1996b). Major Depression ist begleitet von einer Aktivierung des proinflammatorischen Immunsystems und Antidepressiva scheinen eine immunregulative Wirkung auf die Leukozytenfunktion auszuüben. Antidepressiva haben wohl auch eine apoptoseregulierende Wirkung auf normale Lymphozyten. Xia und Mitarbeiter konnten eine Erhöhung

der Apoptoserate von peripheren Lymphozyten durch die trizyklischen Antidepressiva Imipramin und Clomipramin nachweisen (Xia et al., 1998). Durch Inkubation der humanen peripheren Lymphozyten mit trizyklischen Antidepressiva wurde die intrazelluläre Bcl-2-Expression bis zu 27 % erniedrigt (Xia et al., 1996a). In der vorliegenden Arbeit wurde nun untersucht, ob trizyklische Antidepressiva auch in B-CLL-Zellen Apoptose induzieren.

1.9.1. Die trizyklischen Antidepressiva Clomipramin und Imipramin

Clomipramin ist eine psychotrope Substanz aus der Klasse der trizyklischen Antidepressiva. Während einer akuten Therapie inhibiert Clomipramin vor allem die neuronale Aufnahme von Serotonin. Die Hemmwirkung auf die neuronale Aufnahme von Noradrenalin und der Antagonismus an muskarinergen Cholinozeptoren (M1 und M2), an Histaminrezeptoren (H1 stärker als H2), an α -adrenergen Rezeptoren (α_1 stärker als α_2) und an Serotoninrezeptoren (5-HT2 stärker als 5-HT1) ist weniger stark ausgeprägt.

Auch Imipramin ist eine psychotrope Substanz aus der Klasse der trizyklischen Antidepressiva. Akut gegeben zeigt Imipramin eine starke Hemmung der neuronalen Aufnahme von Noradrenalin, überwiegend bedingt durch seinen Hauptmetabolit Desipramin. Im Gegensatz zu Clomipramin fehlt im Molekül das Chlorid, dadurch hat Imipramin eine größere Polarität und ist eine hydrophilere Substanz als Clomipramin.

1.9.2. Das tetrazyklische Antidepressivum Maprotilin

Maprotilin ist eine tetrazyklische Verbindung, deren Struktur mit den trizyklischen Antidepressiva eng verwandt ist.

Maprotilin hemmt die Wiederaufnahme von Noradrenalin in die präsynaptischen Speicher und erhöht so die Konzentration des Neurotransmitters im synaptischen Spalt. Es hat keinen Einfluss auf die Wiederaufnahme von Dopamin und Serotonin. Anders als die trizyklischen Antidepressiva besitzt Maprotilin stark sedierende Eigenschaften, die auf einer Blockade von Histamin H1-Rezeptoren und von α_1 -Rezeptoren beruhen. Maprotilin wirkt geringer anticholinerg als die trizyklischen Antidepressiva.

1.9.3. Die atypischen Antidepressiva Fluoxetin und Trazodon

Studien beim Menschen haben gezeigt, dass Fluoxetin in klinisch relevanter Dosierung die Aufnahme von Serotonin in Thrombozyten hemmt. Auch bei Tierversuchen hemmt Fluoxetin die Aufnahme von Serotonin stärker als von Noradrenalin. Daher beruht die antidepressive Wirkung von Fluoxetin wohl auf einer Hemmung der Serotoninwiederaufnahme in die präsynaptischen Nervenenden. *In vitro* ließ sich im Vergleich zu den trizyklischen Antidepressiva eine wesentlich geringere Affinität von Fluoxetin an histaminerge, muskarinerge und α_1 -Rezeptoren erkennen, wodurch die durch diese Rezep-

toren vermittelten anticholinergen, sedativen und kardiovaskulären Nebenwirkungen weniger stark ausgeprägt sind.

Serafeim und Mitarbeiter wiesen für Fluoxetin und weitere selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmstoffe (SSRIs) eine apoptoseinduzierende Wirkung auf Burkitt-Lymphomzellen nach (Serafeim et al., 2003).

Die Wirkung des nichttrizyklischen Antidepressivums Trazodon beruht auf einem dual-serotonergem Prinzip. Es hemmt präsynaptisch die Serotoninwiederaufnahme und blockiert postsynaptisch die 5HT_{2A}-Rezeptoren. Die sedierende Wirkkomponente beruht vor allem auf der stark ausgeprägten antagonistischen Bindung an zentrale α_1 -Rezeptoren und einer schwachen antagonistischen Affinität zu H₁-Rezeptoren. Trazodon besitzt keine signifikante Affinität zu β -adrenergen, histaminergen H₂-, dopaminergen und cholinergen Rezeptoren.

1.9.4. Lithium

Lithium wurde bisher eingesetzt zur Prophylaxe von Depressions- und Maniezuständen. Es wird ein therapeutischer Serumspiegel von bis zu 1,0 mmol/l angestrebt, doch können schon bei 1,2 mmol/l toxische Symptome auftreten. Der genaue Wirkmechanismus von Lithium, einem monovalenten Kation, ist noch unbekannt. Möglicherweise hat die Behandlung Einfluss auf den Noradrenalin- bzw. Serotoninstoffwechsel. Auf Grund seiner chemischen Ähnlichkeit mit Natrium und Kalium könnte Lithium auch an der Nervenzellmembran regulierend wirken.

1.10. Ziele der Arbeit

Folgende Fragestellungen sollen in der vorliegenden Arbeit geklärt werden:

1. Lässt sich über Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch das Prosta-zyklinanalogon Iloprost, bzw. durch die β_2 -Sympathomimetika Suprenin und Terbutalin, Apoptose bei B-CLL-Zellen dosisabhängig induzieren?
2. Besteht ein Synergismus bei der Kombination von cAMP-erhöhenden Substanzen? Welchen Effekt hat die gleichzeitige Inkubation von Iloprost bzw. β_2 -Sympathomimetika mit dem PDE4-Inhibitor Rolipram?
3. Kann eine durch Antidepressiva dosisabhängig induzierte Apoptose bei B-CLL-Zellen nachgewiesen werden?
4. Zeigt die Kombination von Clomipramin mit Rolipram oder Fludarabin einen synergistischen Effekt?
5. Ist die Induktion von Apoptose durch oben genannte Substanzen abhängig von Caspasen?
6. Lässt sich das Verhältnis der proapoptotischen zu den antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie zu Gunsten von Apoptose durch die verschiedenen Substanzen verschieben? Lässt sich die p53-Expression erhöhen?
7. Welche Rolle spielt Interleukin-10 bei der Induktion von Apoptose?

2. Patientencharakteristika, Material und Methoden

2.1. Patienten

Die Blutproben von 51 B-CLL-Patienten (7 Frauen und 44 Männer) mit einem mittleren Alter von 66 Jahren (zwischen 47 und 90 Jahre) wurden untersucht (Tabelle 4). Die Diagnose der B-CLL wurde mit Hilfe klinischer und labortechnischer Standardkriterien gestellt. 46 Patienten erhielten innerhalb der letzten 6 Monate keine Chemotherapie, drei Patienten erhielten Chlorambucil (Leukeran®), ein Patient Rituximab (Mabthera®) und ein Patient Bendamustin. Die mittlere Leukozytenzahl liegt bei $67 \times 10^9/l$ (zwischen 5 und $328 \times 10^9/l$), für das β_2 -Mikroglobulin wurde ein Mittelwert von 4 mg/l (zwischen 2 und 24 mg/l) errechnet und für die Thymidinkinase ein Mittelwert von 17 U/l (zwischen 2 und 144 U/l).

Nach Einverständniserklärung wurde den Patienten 20 ml Blut aus der Armvene entnommen. Dem Blut wurden 50 internationale Einheiten (I.E.) Na-Heparin pro Milliliter zugesetzt. Die Blutentnahme war durch die Ethikkommission genehmigt.

Die Stadieneinteilung der Patienten erfolgte nach der Binet Klassifikation (Binet et al., 1981). Bei 31 Patienten wurde das Stadium Binet A diagnostiziert, während sieben Patienten dem Stadium Binet B und 13 Patienten dem Stadium Binet C zugeteilt werden konnten.

Tabelle 4: Merkmale der untersuchten B-CLL-Patienten.

Pat.- Nr.	Alter/ Geschlecht	Leukozyten (10 ⁹ /l)	β ₂ M (mg/l)	Tk (U/l)	Stadium (Binet)	Therapie
1	71/M	114,3	4,4	45,9	C	Chlorambucil
2	63/M	60,3	3,3	10,2	A	Keine
3	59/M	12,8	1,9	2,4	A	Keine
4	58/M	43	2,2	5,8	A	Keine
5	81/W	33	2,9	3,4	A	Keine
6	61/M	101,3	5,4	3,8	A	Keine
7	71/M	114,3	4,4	110	C	Chlorambucil
8	75/W	19,9	15	2	A	Keine
9	64/M	88	3,2	6,2	A	Keine
10	60/M	46	6,3	4,7	C	Keine
11	81/M	50,7	2,8	24,2	A	Keine
12	74/M	38,4	4,1	20,5	B	Keine
13	61/M	75,7	3,1	3,2	A	Keine
14	73/W	42	2,4	5,4	A	Keine
15	60/M	20,7	1,6	6,7	A	Keine
16	58/M	9,4	1,6	7,5	A	Keine
17	64/M	48,2	4,1	15,9	C	Keine
18	55/W	28,5	2,7	4,1	A	Keine
19	71/M	33,2	12,5	22,8	C	Keine
20	90/M	62,2	4,7	6,5	A	Bendamustin
21	52/W	4,8	24,1	3,3	B	Rituximab
22	47/M	39	1,8	11,7	A	Keine
23	64/M	93	2,9	11	A	Keine
24	73/M	41,7	5,6	5,8	C	Keine
25	60/M	81	5,1	10,7	C	Keine
26	76/M	10,8	3,1	6,8	B	Keine
27	78/M	72,5	3,6	27,6	B	Chlorambucil
28	69/M	43	2,4	3	A	Keine
29	51/M	52,5	1,8	9,2	A	Keine
30	76/W	104	3	34,9	A	Keine
31	62/M	33,9	2,2	11,6	A	Keine
32	61/M	76,4	2,4	4	A	Keine
33	64/M	98	5,2	4,3	A	Keine
34	64/M	97	3,3	10,2	A	Keine
35	63/M	41,1	2,8	6,5	A	Keine
36	51/M	56	1,7	9,2	A	Keine
37	78/M	93,9	3	25	B	Keine
38	57/M	62,4	3,1	3,1	C	Keine
39	51/M	62,4	1,8	12,8	A	Keine
40	62/M	7,5	2,2	4,9	C	Keine
41	62/M	45,3	1,8	8,9	A	Keine
42	78/M	193	3	25	B	Keine
43	58/M	52,7	1,7	14,7	A	Keine
44	77/W	134,3	3	34,9	A	Keine
45	87/M	328	6,9	28,1	C	Keine
46	60/M	48,1	5,3	15,3	C	Keine
47	72/M	46,7	5,8	144	C	Keine
48	51/M	78,9	1,7	12,8	A	Keine
49	58/M	59,3	4,2	6,1	C	Keine
50	57/M	180	4,3	47	A	Keine
51	76/M	43,8	7,2	5,6	B	Keine

2.2. Geräte

Fluorescence activated cell sorter (FACS) Calibur	Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Begasungsbrutschrank (BBD C220)	Fa. Heraeus (Hanau)
Enzyme linked immuno sorbent Assay (ELISA) Reader	Fa. Dynatech- Laboratories (Guernsey, GB)
Mikroskop (Axiovert 25)	Fa. Zeiss (Jena)
Lamin Air (HB 244 8)	Fa. Heraeus
Zentrifuge (5417 R)	Fa. Eppendorf (Hamburg)
Omnifuge 2 ORS	Fa. Heraeus
Gene Quant RNA/DNA Calculator	Fa. Pharmacia Biotech (Freiburg)
Waage (SBC 21)	Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt)
Waage (LP 6209)	Fa. Sartorius (Göttingen)
Vortex VF2	Fa. Bender & Hobein AG (Zürich, Schweiz)
Thermocycler 60	Fa. bio-med (Theres)
Hamilton Spritze	Fa. Hamilton Co. (Reno, Nevada, USA)
Mini Protean II Electrophoreses Cell	Fa. Bio-Rad (München)
Mini-Trans Blot Electrophoreses	Fa. Bio-Rad (München)
Wide Mini Sub™ Cell	Fa. Bio-Rad (München)
Power Pac 200 Spannungsgerät	Fa. Bio-Rad (München)
Laserscanner Image Master™	Fa. Pharmacia Biotech
Photokammer	Fa. Kodak (Rochester, NY, USA)
Kamera Nikon F90X	Fa. Nikon GmbH (Düsseldorf)
Entwicklungsgerät Curix 60	Fa. Agfa (München)

2.3. Labormaterial

Kaleidoscope Prestained Standards Premixed	Fa. Bio-Rad
Combithek® Protein Molecular Weight Marker	Fa. Roche (Mannheim)
Tris-HCl Ready Gels 4-20 %	Fa. Bio Rad
Enhanced chemiluminescence (ECL) Westernblotting Detection Reagents	Fa. Amersham (Little Chalfont, GB)
Polyvinylidene fluoride (PVDF)	Fa. Millipore (Bedford, MA, USA)
Blotting Papier	Fa. Schleicher & Schuell (Dassel)
Peroxidase labelled anti-rabbit ab	Fa. Amersham
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fa. Sigma

Bio-Rad-Protein-Assay	Fa. Bio-Rad (München)
Ribonuklease (RNase), Dnase-frei	Fa. Roche
Proteinase K	Fa. Sigma (Deisenhofen)
Phenol-Chloroform	Fa. Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Fa. Sigma
Agarose	Fa. Sigma
OptEIA Humaner IL-10 Set	Fa. Pharmingen
Caspase-3 Colorimetric Assay (BF3100)	R&D Systems Inc.

2.3.1. Fotomaterial

Hyperfilm ECL	Fa. Amersham
Polaroid Typ 611 (3 ^{1/4} x 4 ^{1/4})	Fa. Polaroid (Bedford, MA, USA)
Polaroid Typ 665 PN (3 ^{1/4} x 4 ^{1/4})	Fa. Polaroid (Bedford, MA, USA)

2.3.2. Materialien für die Zellkultur

Fötale Kälberserum (FCS) (30 Min bei 65 °C hitzeinaktiviert)	Fa. Seromed (Berlin)
L-Glutamin	Fa. Gibco BRL (Paisley, Schottland)
Penicillin/Streptomycin	Fa. Sigma
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N´-(2-Ethanoesulfonsäure) (HEPES)-Puffer	Fa. Sigma
RPMI-1640 Medium	Fa. Biochrom (Berlin)

Die Standard-Laborchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in Analysen- und Reinstqualität von den Firmen Sigma, Roth (Karlsruhe), Gibco BRL (Eggenstein) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

2.3.3. Puffer, Lösungen und Medien

RPMI-Vollmedium:	500 ml RPMI-1640 Medium 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 3mM L-Glutamin 10 mM HEPES Puffer 10 % hitzeinaktiviertes FCS
”Phosphate-Buffered Saline” (PBS):	0,2 g/l KCl 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ 8,0 g/l NaCl 2,16 g/l Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O
PBS-Tween:	500 ml PBS 500 µl Poly-oxy-ethylen-sorbitan-Monolaurate (Tween 20)
Towbin-Puffer (Blotting Puffer):	3,03 g Tris-Base 14,4 g Glycine 200 ml Methanol 800 ml Aqua dest.
Tris-Glycine-SDS-Elektrophorese Laufpuffer:	0,1 % Sodium-Dodecyl-Sulfat, SDS 192 mM Glycin 25 mM Tris-Base mit Aqua dest. aufgefüllt auf 1l
DNA Ladepuffer:	50 ml Glycerol 10 mg Bromphenolblau 50 ml Aqua dest.
DNA Lyse-Puffer:	10 mM TrisHCL 100 mM Ethyl-diamin-tetra-essigsäure (EDTA) 0,02 M NaCl

Tris-Azetat/ EDTA- Elektrophorese (TAE)-Puffer:	0,001 M EDTA 0,04 M Tris-Acetat
5x Laemmli-Puffer:	0,6 ml Tris HCL pH 6,8 5 ml 50 % Glycerol 2 ml 10 % SDS 0,5 ml 2 % Mercaptoethanol 1 ml 1 % Bromphenolblau 0,9 ml H ₂ O
Blocking Lösung (5 %):	750 mg fettarme Trockenmilch 15 ml PBS-Tween
Western Blot Lyse-Puffer:	10 mM Tris-HCL pH 7,4 1 mM EDTA 0,1 % SDS 0,1 % Triton-X 100 1 µM Aprotinin 0,1mM Phenylmethan-sulfonsäure- fluorid (PMSF; gelöst in 100 % Isopropanol)
Annexin V-Binding-Puffer:	10 mM HEPES/NaOH pH 7,4 140 mM NaCl 2,5 mM CaCl ² (durch 0,2 µm Porenfilter gefiltert)

2.3.4. Antikörper

Folgende Antikörper wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet (Tabelle 5): m steht für Mausantikörper, ra für Rattenantikörper und rb für Hasenantikörper.

Tabelle 5: Verwendete Antikörper (Immunglobuline, Ig).

Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff	Isotyp	Firma
Annexin V	FITC	-	BenderMedSystems
CD5	FITC	mIgG1-κ	Beckton Dickinson
CD19	PE	mIgG1-κ	Beckton Dickinson
Bcl-2 (sc 783)	-	rb IgG	SantaCruz
Bax (sc 493)	-	rb IgG	SantaCruz
P53 (sc 6243)	-	rb IgG	SantaCruz
Anti-human-IL10	-	ra IgG _{2a}	BD Pharmingen

2.4. Substanzen

2.4.1. Fludarabin (Fludara®, Schering)

Fludarabin Trockensubstanz wurde in 2 ml Aqua rekonstituiert, in RPMI-Vollmedium auf eine Konzentration von 100 µM verdünnt (Molekulargewicht: 365,2 g/mol) und aliquotiert bei -30 °C eingefroren.

2.4.2. Rolipram (Schering)

Rolipram ist ein spezifischer PDE 4-Inhibitor mit einem Molekulargewicht von 275,4 g/mol. Rolipram wurde freundlicherweise von der Firma Schering, Berlin zur Verfügung gestellt. Es wurde in RPMI-1640 Medium suspendiert, leicht erwärmt und bis zur Klärung geschüttelt, danach aliquotiert und bei -30 °C eingefroren.

2.4.3. Iloprost (Ilomedin®, Schering)

Iloprost wurde freundlicherweise von der Firma Schering, Berlin zur Verfügung gestellt. Die Infusionslösung wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml steril aliquotiert und mit RPMI-Vollmedium weiterverdünnt.

2.4.4. Adrenalin (Suprarenin®, Hoechst)

Der Inhalt einer Ampulle mit einer Konzentration von 1,0 mg/ml wurde steril aliquotiert, bei -30°C aufbewahrt und später mit RPMI-Vollmedium weiterverdünnt.

2.4.5. Terbutalin (Sigma)

Terbutalin Trockensubstanz (Molekulargewicht 274,3) wurde in 50 ml Aqua dist. in einer Konzentration von 1mg/ml gelöst und aliquotiert bei -30 °C eingefroren. Die jeweiligen Verdünnungen wurden mit RPMI-Medium durchgeführt.

2.4.6. Clomipramin und Imipramin (Sigma)

Die Trockensubstanzen Clomipramin (Molekulargewicht 351,3), bzw. Imipramin (Molekulargewicht 316,9), wurden in Aqua dist. in einer Konzentration von 50mg/ml gelöst und aliquotiert bei -30 °C eingefroren. Die jeweiligen Verdünnungen wurden mit RPMI-Medium durchgeführt.

2.4.7. Maprotilin (Sigma)

Maprotilin Trockensubstanz (Molekulargewicht 313,9) wurde in Aqua dist. in einer Konzentration von 50mg/ml gelöst und aliquotiert bei -30 °C eingefroren. Die jeweiligen Verdünnungen wurden mit RPMI-Medium durchgeführt.

2.4.8. Fluoxetin (Sigma)

Fluoxetin Trockensubstanz (Molekulargewicht 345,8) wurde in Aqua dist. in einer Konzentration von 0,5mg/ml gelöst und aliquotiert bei -30 °C eingefroren. Die jeweiligen Verdünnungen wurden mit RPMI-Medium durchgeführt.

2.4.9. Trazodon (Sigma)

Trazodon Trockensubstanz (Molekulargewicht 408,3) wurde in Aqua dist. in einer Konzentration von 50mg/ml gelöst und aliquotiert bei -30 °C eingefroren. Die jeweiligen Verdünnungen wurden mit RPMI-Medium durchgeführt.

2.4.10. Lithiumchlorid (Sigma)

Lithiumchlorid (Molekulargewicht 42,39) wurde in Aqua dist. in einer Konzentration von 100mmol/l gelöst, steril aliquotiert, bei -30°C aufbewahrt und anschließend mit RPMI-Medium verdünnt.

2.4.11. Pancaspase-Inhibitor z-VAD-fmk (R&D Systems)

Carbobenzoxycarboxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone (z-VAD-fmk, R&D Systems Inc.) ist ein effektiver, zellpermeabler Pan-Caspase-Inhibitor (Villa et al., 1997), der irreversibel an das katalytische Zentrum einer aktivierten Caspase bindet. Caspaseinhibitoren entstehen durch Bindung caspasespezifischer Peptide an bestimmte Aldehyde, Nitrite oder Ketone. Das Fluoromethylketon (fmk)-Derivat wirkt als

irreversibler Inhibitor ohne eigenen zytotoxischen Effekt. Inhibitoren mit einer Benzyloxycarbonyl-Gruppe (-z) am N-Terminus und O-Methylierung an der P1-Position der Asparaginsäure zeigen eine verbesserte Zellpermeabilität. Das Lyophilisat wurde in sterilem Dimethyl-sulfoxid (DMSO) rekonstituiert und bei -20°C aufbewahrt. In Konzentrationen von 50 µM und 200 µM kann z-VAD-fmk die Induktion von Apoptose verhindern.

2.5. Zellulär-immunologische Methoden

2.5.1. Zellkultur

2.5.1.1. Kulturbedingungen

Die Zellkultur erfolgte in einem Brutschrank (HERAEUS, Hanau) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem 5 % Kohlendioxid (CO₂)/Luft-Gemisch.

2.5.1.2. Isolation von peripheren Blutlymphozyten

Heparinisiertes Vollblut von B-CLL-Patienten wurde über einem Dichtegradienten aufgetrennt (Boyum, 1968): 20 ml des Vollblutes wurden in einem 50 ml Leucosep-Röhrchen (Fa.Greiner, Frickenhausen) über 15 ml Ficoll "Seperating Solution" geschichtet und 10 Minuten (min) bei 1000 g (Zentripetalbeschleunigung der Erde) bei minimaler Bremsung zentrifugiert. Die Zellen in der Interphase können anschließend vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und dreimal mit 30 - 50 ml PBS gewaschen werden.

Ficoll ist ein polysaccharidähnliches Makromolekül, das auf Grund seiner Dichte von 1,077 g/ml mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) an der Blutserum/Ficoll-Interphase konzentrieren kann. Granulozyten und Erythrozyten sedimentieren wegen ihrer höheren spezifischen Dichte in der Ficoll-Schicht bzw. am Boden, während Thrombozyten auf Grund ihrer geringeren Dichte in der Serumschicht oberhalb des Ficoll verbleiben.

2.5.1.3. Aufnahme in Zellkulturmedium und Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden in RPMI-1640 Medium (Fa. Biochrom, Berlin) mit 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 mM HEPES-Puffer und 10 % Hitzeinaktiviertem FCS resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden ca. 10 µl der Suspension mit 5 % Trypanblaulösung angefärbt. Die Zellzahl wurde durch Auszählen geeigneter Verdünnungen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Zellzahl wurde anschließend auf 5 Mio/ml eingestellt.

2.5.1.4. Inkubation der Zellen

Die Zellen wurden mit den verschiedenen Substanzen auf eine 48-well Zellkulturplatte aufgebracht. Die Ansätze für den ELISA, der colorimetrischen Bestimmung der Caspaseaktivität und der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) mit Zusatz von Caspase-Inhibitoren wurden 24 Stunden (h) inkubiert, die Ansätze für die FACS-Analyse ohne Inkubation mit Caspaseinhibitoren und für den Western-Blot dagegen 48 h. Die Zellen für den Nachweis der DNA-Fragmentation blieben 72 h in Kultur.

2.5.2. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

2.5.2.1. Allgemeines Funktionsprinzip

Die FACS-Analyse bietet die Möglichkeit Zellen an Hand ihrer Oberflächenantigene zu unterscheiden und zu quantifizieren. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen das entsprechende Oberflächenantigen markiert und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom so schnell beschleunigt, dass es möglich wird, jede Zelle einzeln in einem Laserstrahl abzulesen (hydrodynamische Fokussierung) und zu identifizieren.

Zusätzlich können die Zellen mit Hilfe zweier Linsen auf Größe und Granularität hin untersucht werden. Eine der Linsen ist in Verlaufsrichtung des Laserstrahls ($0^\circ - 10^\circ$) angebracht (FSC: forward scatter) und die zweite Linse rechtwinklig zur Verlaufsrichtung (90° ; SSC: sideward scatter), sodass der FSC hauptsächlich von der Größe und der SSC von der Granularität der Zelle beeinflusst wird.

Sowohl das Streulicht als auch die Emission von Lichtquanten der durch den Laser angeregten Fluoreszenzfarbstoffe (Tabelle 6) werden von Photodetektoren erkannt und in elektrische Signale umgewandelt. Das Zwischenschalten von Bandpassfiltern ermöglicht es das einfallende Licht nach Wellenlängen aufzutrennen und die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe getrennt voneinander zu quantifizieren.

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und deren Wellenlängen.

Fluoreszenzfarbstoff	Wellenlänge
Fluorescein-Isozyanat (FITC)	525 nm
Phycoerithrin (PE)	575 nm
Propidiumiodid (PI)	650 nm

Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der gebundenen Antikörper und somit zur Anzahl der untersuchten Oberflächenmoleküle. Damit die verschiedenen Messungen vergleichbar sind, ist es nötig, eine Probe mit einer Isotypkontrolle anzufärben, die dann als negativ für das entsprechende Antigen gewertet wird. Das entsprechende Signal muss soweit herunterreguliert werden, dass die Fluoreszenzintensi-

tät unter 10^1 mean fluorescence intensity (MFI) liegt. Dies ermöglicht es unterschiedliche Proben in etwa mit der gleichen Verstärkereinstellung zu messen.

In dieser Arbeit wurde ein FACSCalibur-Durchflusszytometer verwendet. Es arbeitet mit einem Argonlaser. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit FlowJo Software (Version 2.7.8).

2.5.2.2. Durchflusszytometrische Messung

Für die FACS-Analyse wurden 90.000 Zellen in einem 5 ml Polystyren-Röhrchen (12 x 75 mm, Fa. Becton Dickinson) bei 400 g sieben min abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen je nach geplanter Messung angefärbt.

2.5.2.3. Färbung von Oberflächenmarkern

Durch das Anfärben spezifischer Oberflächenmarker können Zellen charakterisiert und es kann eine bestimmte Zellpopulation einzeln gemessen und ausgewertet werden. Dazu wurden die Zellen einer Probe in 195 μ l PBS resuspendiert und mit jeweils 5 μ l der für B-CLL-Zellen typischen Antikörper CD5-FITC und CD19-PE (Konzentration 200 μ g/ml) 15 min unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde einmal mit PBS gewaschen. Die in 190 μ l PBS resuspendierten Zellen wurden nun auf einem FACSCalibur mit Hilfe von FlowJo Software analysiert.

2.5.2.4. Annexin V- und PI-Färbung

Die Annexin V/ PI-Färbung ermöglicht es früh- und spätapoptotische Zellen von nekrotischen Zellen mit Hilfe der FACS-Analyse zu unterscheiden. Das Funktionsprinzip besteht darin, dass sich das Phospholipid Phosphatidylserin bei normalen Zellen auf der Innenseite der Zellmembran befindet. Sobald Apoptose induziert wird, beginnt sich die physiologische Membranasymmetrie aufzuheben und Phosphatidylserin befindet sich auch an der Membranaußenseite. Nun kann Annexin V in einer Ca^{2+} -abhängigen Reaktion an das exponierte Phosphatidylserin binden und apoptotische Zellen markieren. Eine zusätzliche Färbung mit PI, das durch Defekte der Zellmembran in das Zellinnere gelangt und dort an die DNA bindet, ermöglicht es zwischen frühapoptotischen Zellen (nur Annexin V positiv) und spätapoptotischen oder nekrotischen Zellen (sowohl Annexin V als auch PI positiv) zu unterscheiden (Vermes et al., 1995).

Während der Annexin V/ PI-Färbung wurden die Zellen in 195 μ l Annexin V-Binding-Buffer resuspendiert, mit 5 μ l Annexin-FITC (Konzentration 200 μ g/ml) 15 min unter Lichtausschluss inkubiert und dann mit PBS einmal gewaschen. Nun wurden die Zellen in ca. 190 μ l Annexin V-Binding-Buffer resuspendiert und sofort nach Zugabe von jeweils 10 μ l PI (Konzentration 100 μ g/ml) analysiert.

2.5.3. Konzentrationsbestimmung von Interleukin-10

Zur Bestimmung der IL-10 Konzentration wurde ein kommerzieller ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, OptEIA Human IL-10 Set) durchgeführt. Eine 96-well-Mikrotiterplatte wurde mit einem Ratten-anti-human-IL-10-Antikörper beschichtet und bei 2 - 8 °C über Nacht inkubiert. Nach drei Waschschritten mit einem Puffer aus PBS und 0,05 % Tween20 wurde die Platte mit 100 µl Assay-Lösung (PBS mit 10 % FBS, pH 7,0) pro well geblockt, über eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und nochmals dreimalig gewaschen. Neben den Standard-IL-10-Verdünnungen wurden nun alle Proben in die mit IL-10-Antikörper beschichteten Wells pipettiert. Während einer zwei-stündigen Inkubationszeit bindet das vorhandene IL-10 an die Antikörper. Nach fünf Waschschritten wurde ein zweiter biotinylierter Anti-IL-10-Antikörper als auch ein Avidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (Av-HRP) zugegeben. Der zweite Antikörper bindet das bereits gebundene IL-10 an einem anderen Epitop, während die Enzym-Reagenz an Biotin bindet. Bei diesem Sandwich-ELISA mit Bildung mehrerer Biotin-Avidin-Brücken pro Antikörper wird eine Verstärkung der Nachweisreaktion und eine höhere Sensitivität erreicht. Nach Entfernen des Konjugates durch weitere sieben Waschschriffe gibt man die Substratlösung aus Substrat A und Substrat B im Verhältnis 1:1 hinzu. Während einer 30 min Inkubation unter Lichtausschluss wird gebundenes Enzym nun zu Farbstoff umgesetzt. Anschließend wurde die Reaktion mit 1 molarer Schwefelsäure gestoppt. Die Farbintensität, die proportional zur IL-10-Konzentration der Probe ist, wurde nun in einem ELISA-Reader bei 450 nm gelesen. Durch die Standard-Verdünnungsreihe besteht die Möglichkeit die exakte in der Probe enthaltene Konzentration zu berechnen.

2.5.4. Caspase 3-Aktivitätsbestimmung

Caspase-3, auch CPP-32, Yama oder Apopain genannt (Alnemri et al., 1996), ist eine intrazelluläre Cystein-Protease, die unter physiologischen Bedingungen als Zymogen vorliegt und erst während Induktion von Apoptose aktiviert wird. Caspase-3 spaltet nun eine große Anzahl zellulärer Proteine, die ein bestimmtes Aminosäuremotiv (DEVD) enthalten, wie z.B. die poly-ADP-ribose Polymerase (PARP) oder die Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (Cascola-Rosen et al., 1996). Da die Caspase-3 in verschiedensten Zelllinien vorliegt, handelt es sich hierbei wohl um ein Schlüsselenzym der Apoptose.

Zur Bestimmung der enzymatischen Caspase-3-Aktivität wurde ein kommerzieller Caspase-3-colorimetrischer Assay von R&D Systems verwendet. Die B-CLL-Zellen, die mit verschiedenen Substanzen inkubiert wurden um Apoptose zu induzieren, werden zuerst lysiert um die intrazellulären Proteine zu sammeln. Nach Zugabe eines Caspase-3-spezifischen Peptides, das an das Substrat DEVD-p-Nitroanilin (DEVD-p-NA) gebunden ist, kann die Protease-Aktivität gemessen werden. Bei Spaltung durch Caspase-3 wird das Chromophor p-NA freigesetzt, das nun spektrometrisch quantifi-

ziert werden kann. Die Farbreaktion ist direkt proportional zu der enzymatischen Caspase-3-Aktivität des Zellysats.

Zwei x 10^6 Zellen wurden 10 min bei 250 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 25 μ l des Lyse-Puffers pro 1×10^6 Zellen lysiert. Das Zellysate wurde nun 10 min auf Eis inkubiert und dann eine min bei 10.000 g zentrifugiert. Im Anschluss daran wurden die Überstände abgenommen und auf Eis gekühlt. Die durchschnittliche Proteinkonzentration der Überstände beträgt 4 - 8 mg/ml. Kontrollen mit erstens keinem Zellysate und zweitens keinem Substrat sowie 50 μ l jeder Probe wurden auf eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert und die Proben mit 50 μ l des Reaktionspuffers versetzt. Diesem wurde 10 μ l DDT pro 1 ml zugegeben. Jeder Probe wurde anschließend 5 μ l Caspase-3-colorimetrisches Substrat (DEVD-pNA) beigefügt und die Platte für 1 - 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte in einem ELISA Reader bei 405 nm Wellenlänge abgelesen.

2.6. Molekularbiologische Methoden

2.6.1. Nachweis einer apoptotischen DNA-Leiter

Die Darstellung einer DNA-Leiter gilt als qualitativ eindeutiger Nachweis für Apoptose (McConkey et al., 1991). Die für Apoptose typischen DNA-Fragmente mit einer Größe von 180 Basenpaaren wandern im elektrischen Feld und lassen sich mit Ethidiumbromid darstellen. Je nach ihrer Größe können die einzelnen DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt werden, so dass eine charakteristische DNA-Leiter entsteht und das Ausmaß der induzierten Apoptose abgeschätzt werden kann.

2.6.1.1. DNA-Extraktion

Vier x 10^6 Zellen wurden geerntet, bei 600 g und 4 °C über 5 min zentrifugiert, dekantiert, einmal in 4 °C kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Zur Disruption der Membranen wurde 200 μ l DNA-Lyse-Puffer zugegeben und leicht geschüttelt. Danach wurde sterile 0,9 %ige NaCl-Lösung in einer Endkonzentration von 50 mM sowie 3,0 μ l Proteinase K zugegeben um die DNA zu stabilisieren. Anschließend wurden die Proben 5 h bei 50 °C auf einem Schüttler bei niedriger Rotationszahl inkubiert, so dass alle DNA-bindenden Proteine gespalten werden. Dann wurden 500 μ l eines Aliquots aus 10 ml Lysispuffer und 5 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung in jede Probe gegeben. Nach Zugabe eines TE-gesättigten Phenol-Chloroform-Gemisches gleichen Volumens wurde erneut mit 15300 g über 5 min zentrifugiert und die oberste wasserklare Phase abgenommen. Den Proben wurde einmal Volumen Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1 zugegeben. Sie wurden nochmals zentrifugiert, die oberste Phase wurde abgenommen und mit einmal Volumen Isopropanol versetzt. Durch Einfrieren dieses Gemisches über mindestens 1 h bei -70 °C kommt es zur Fällung der DNA. Nach erneutem Auftauen

wurde die gefällte DNA in 70 %igem Ethanol gewaschen, in DNase-freiem Wasser gelöst und 30 - 60 min bei 37 °C mit 5 µl RNase (DNase-frei) inkubiert.

2.6.1.2. Konzentrationsbestimmung der DNA

Mit Hilfe eines Photometers (Pharmacia Gene Quant DNA/RNA Calculator) wurde die DNA-Konzentration ermittelt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:50 verdünnt und die optische Dichte (OD) bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm (OD_{260}) bestimmt. Einer OD_{260} von 1 entsprechen etwa 50 µg/ml DNA.

2.6.1.3. Herstellung von Agarosegelen

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurde ein 1,0 %iges Agarosegel hergestellt. Dazu wird ein Gemisch aus 1,3 g Agarose und 130 ml TAE-Puffer erhitzt, bis eine klare Flüssigkeit ohne Schlieren vorliegt. Nach Zugabe von 6,5 µl Ethidiumbromid (EB) wird die Lösung in die vorgegebene Kammer gegossen und 1 h lang abgekühlt.

2.6.1.4. Gelelektrophorese

Das abgekühlte Gel wird in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt und mit TAE-Puffer vollständig bedeckt. Nach Entfernen des Kammes können die DNA-Proben und die Kontrollen mit 5x Ladepuffer in die Geltaschen pipettiert werden. Der Ladepuffer enthält einen Farbstoff, der das Pipettieren der DNA erleichtert und Glycerin, welches auf Grund seiner höheren Dichte die Proben schnell in die Slots absinken lässt. Nun kann das Gel über 1 - 2 h bei 50 V laufen und die DNA-Fragmente wandern abhängig von ihrer Größe, sodass sich später eine DNA-Leiter darstellt.

Da der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in die Nukleotidstränge interkaliert, wird die Auftrennung der DNA-Fragmente unter ultraviolettem (UV)-Licht (366 nm) sichtbar. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die Gele unter UV-Licht mit einer Polarisierbildkamera fotografiert.

2.6.2. Western Blotting

Die Western Blot-Analyse ist ein Verfahren, mit dem elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Blotmembran unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes transferiert und immobilisiert werden können (Towbin et al., 1979). Die aufgetrennten Proteine lassen sich nun mit Hilfe spezifischer Antikörper direkt auf der Membran quantitativ nachweisen.

2.6.2.1. Probenvorbereitung

Nach Inkubation der Zellen über 48 h mit den verschiedenen Substanzen wurden die Zellen zentrifugiert, die Zellpellets in 200 µl Western Blot Lyse-Puffer aufgenommen

und 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde erneut mit 10600 g bei 4 °C über 20 min zentrifugiert und der Überstand bei -20 °C aufbewahrt.

2.6.2.2. Bradford-Proteinbestimmung

Um die Expression bestimmter Proteine zu quantifizieren müssen gleiche Gesamtproteinmengen in die einzelnen Geltaschen pipettiert werden. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte colorimetrisch mit Serva Blau nach der von Bradford und Mitarbeitern erarbeiteten Methode (Bradford, 1976). Eine Stammlösung aus 1 mg/ml BSA wurde mit Aqua dest. zu verschiedenen konzentrierten (50, 100, 200, 400, 600, 800 und 1000 µg/ml) Standardlösungen verdünnt. Das Bradford-Reagenz (Bio-Rad-Protein-Assay) wurde zu vier Teilen mit Aqua dest. gemischt. Nun wurden jeweils 10 µl der Standardverdünnungen bzw. 10 µl der Proben auf eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert und mit 200 µl verdünntem Bradford-Reagenz vermischt. Nach 5 min wurden die Konzentrationen mit einem ELISA-Reader (OD 595 nm) bestimmt. Die Proben wurden entsprechend der vorliegenden Proteinkonzentrationen in bestimmten Mengen auf das Gel aufgetragen.

2.6.2.3. Proteinseparation mit Hilfe der HCl-Gel-Elektrophorese

Nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) wurden die Proteine durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt. Im elektrischen Feld erfolgt die Auftrennung der Proteine nur nach ihrer Größe durch den Zusatz von sodium-dodicyl-sulfat (SDS), das sich mit seinem hydrophoben Kettenende an die Proteine anlagert. Die Proteinladung wird hierbei durch das negativ geladene SDS neutralisiert. 2,5 µg Probenprotein bzw. 5 µl der Standard-Leiter wurden mit 5 µl Laemmli-Puffer gemischt, 2 min bei 70 °C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Für die Gelelektrophorese wurde eine Mini-Gel-Apparatur der Firma BioRad verwendet, bei der es sich um ein Vertikalsystem handelt, in dem zwei Gelläufe gleichzeitig durchführbar sind. Nach Auftragen von 20 µl Probe pro Slot mit Hilfe einer Hamilton Spritze liefen die Gele (Tris-HCL Ready Gels 4-20 %, Fa.Bio Rad) bei 30 mA und 120 V über ca. 120 min. Als Laufpuffer diente ein Tris-Glycin-SDS-Puffer. Im Vergleich mit den Standardproteinen der Leiter lässt sich das Molekulargewicht (MG) der zu untersuchenden Proteine abschätzen.

2.6.2.4. Blotvorgang auf eine Polymermembran

Nach der Auftrennung der Proteine durch die Gelelektrophorese wurden die Proteine auf Polyvinylidenfluorid-(PVDF-) Membran transferiert. Diese wurde nacheinander 10 Sekunden (s) in Methanol, 5 min in Aqua dest. und 10 min in Towbin-Puffer vorbehandelt. In diesen Puffer wurde auch das HCl-Gel nach Beendigung der Elektrophorese über 10 min gelegt. Danach wurde der Blot in folgender Reihenfolge zusammengesetzt: Schwamm, zweimal Blotting-Papier, Gel, PVDF-Membran, zweimal Blotting-Papier, Schwamm. Bei 75 V und 4 °C wurde nun das Protein während 90 min aus dem HCl-Gel auf die PVDF-Membran übertragen.

2.6.2.5. Blocken der Membran

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurde die PVDF-Membran mindestens 45 min in 5 % Blocking-Lösung (Magermilchpulver) bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend einmal über 5 min in PBS-Tween gewaschen.

2.6.2.6. Inkubation mit dem spezifischen Antikörper

Danach wurde die Membran über Nacht mit dem ersten Antikörper inkubiert. Sowohl anti-Bax als auch anti-Bcl-2 oder anti-p53 wurden in einer Konzentration von 1:1000 mit PBS-Tween verdünnt. Die Inkubation der PVDF-Membran erfolgte bei 4 °C auf einem Schüttler.

2.6.2.7. Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Antikörper

Es folgten drei Waschgänge mit PBS-Tween über jeweils 15 min, 5 min und 5 min. Zum Waschen wurden die Membranen wiederum leicht geschüttelt.

Als Meerrettichperoxidase-gekoppelten (Horseradish Peroxidase, HRP) Antikörper wurde entsprechend dem spezifischen Antikörper ein anti-Hase-Antikörper verwendet und in PBS-Tween 1:1000 verdünnt. Dieser Antikörper bindet an den ersten über Nacht inkubierten Antikörper, während die PVDF-Membran 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Membranen wie oben beschrieben erneut dreimal gewaschen um nicht gebundene HRP-Antikörper zu entfernen.

2.6.2.8. Proteinnachweis durch Chemilumineszenzreaktion

Die PVDF-Membran wurde nun in einer Folie 1 min vollständig mit einem 1:1 Gemisch aus ECL (enhanced chemiluminescence) Lösung A und B bedeckt. Hierbei kommt es an den Stellen, wo das gesuchte Protein an den ersten Antikörper bindet, zu einer Chemilumineszenz-Reaktion. Luminol (zyklisches Diacylhydrazin) wird, katalysiert durch antikörpergebundene Peroxidase und Wasserstoffperoxid (H_2O_2), oxidiert. Durch diese Reaktion wird das Luminol in einen angeregten Zustand angehoben und es kommt zu Emission von Licht, sobald das angeregte Luminol wieder in seinen Ruhezustand versetzt wird. Durch Anwesenheit eines Enhancers, wie zum Beispiel Phenol, kann die Lichtemission 1000fach verstärkt werden. Das Maximum der Lichtemission liegt bei 428 nm und kann auf einem für diese Wellenlänge sensitiven Film nachgewiesen werden. Der Blot wurde in Folie eingeschlagen und in einer Fotokammer befestigt. Der ECL-Hyperfilm wurde je nach benötigter Belichtungszeit in die Kammer eingelegt und anschließend automatisch entwickelt.

2.6.2.9. Quantitative Auswertung

Nach der Entwicklung wurden die Filme eingescannt und densitometrisch nach der Schwärze der Banden mit Hilfe von Quantity One ausgewertet.

2.7. Statistik

Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel im Säulendiagramm dargestellt und die Streuung der Werte wird als Standardfehler des Mittelwertes (standard error of mean, SEM) angegeben. Um zu überprüfen, ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen einzelnen Ergebnissen besteht, wurde der Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben als nichtparametrischer Test durchgeführt. Bei p-Werten $< 0,05$ wurde eine statistische Signifikanz angenommen (*). Die Berechnungen wurden mit SPSS 11.5 für Windows durchgeführt. Mit Excel und PowerPoint (Microsoft, USA) wurden die Ergebnisse grafisch dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Induktion von Apoptose durch cAMP-Erhöhung

3.1.1. Apoptoseinduktion durch das Prostacyclinanalogon Iloprost alleine und in Kombination mit dem PDE 4-Inhibitor Rolipram

Die B-CLL-Zellen wurden über 48 h mit ansteigenden Konzentrationen Iloprost (135 pg/ml, 270 pg/ml, 1350 pg/ml, 1485 pg/ml und 2700 pg/ml) inkubiert und anschließend wurde die Apoptoserate der zu 70 % CD5⁺/CD19⁺ PBMC mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. 2700 pg/ml Iloprost führen zu einem Anstieg der Apoptoserate auf $40,6 \pm 4,4$ % im Vergleich zur Mediumkontrolle $33,3 \pm 4,0$ % ($p=0,002$; $n=27$ Spender) und im Vergleich zu der dem Plasmaspiegel entsprechenden Konzentration von 135 pg/ml Iloprost $36,6 \pm 4,3$ % ($p=0,005$). 135 pg/ml Iloprost führen nicht zu einer signifikant erhöhten Apoptoserate ($p=0,239$) im Vergleich zur Kontrolle, erst bei der zehnfachen Konzentration mit einer Apoptoserate von $38,4 \pm 4,3$ Annexin V positive Zellen in Prozent ist der Unterschied zur Kontrolle signifikant ($p=0,008$, $n=27$ Spender). Für Iloprost wurde eine dosisabhängige Induktion von Apoptose nachgewiesen (Abbildung 4). Inkubation der B-CLL-Zellen mit dem Chemotherapeutikum Fludarabin ($1,7 \mu\text{M}$) bewirkte eine Steigerung der Apoptoserate auf $40,4 \pm 4,3$ % Annexin V positive Zellen ($p=0,001$).

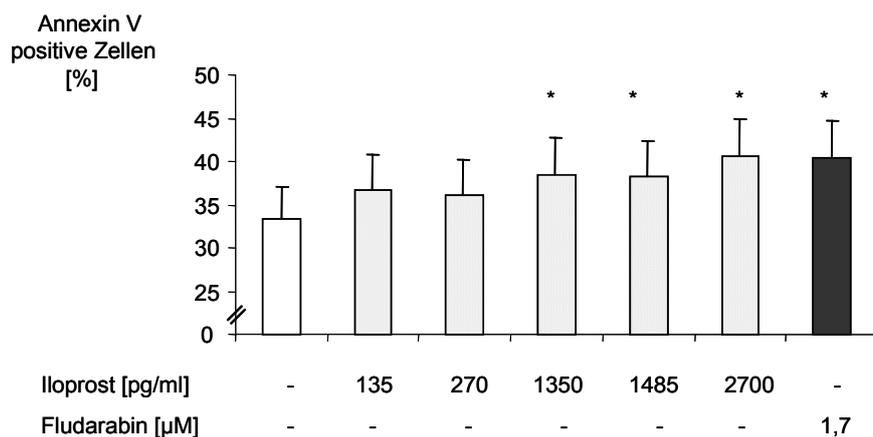


Abbildung 4: Dosisabhängiger Anstieg der Apoptoserate in Prozent durch das Prostacyclinanalogon Iloprost. Die B-CLL-Zellen ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden über 48 h mit verschiedenen Konzentrationen Iloprost (pg/ml) inkubiert und die Apoptoserate durchflusszytometrisch mit Annexin V/PI-Doppelfärbung bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte + SEM von 27 verschiedenen Spendern dargestellt.

Anschließend wurde bei 12 verschiedenen Patientenproben untersucht, ob bei der Kombination von Rolipram und Iloprost eine synergistische Wirkung vorliegt. Nach 48 h Inkubation der B-CLL-Zellen mit 135 pg/ml Iloprost und 1 μ M Rolipram konnte bei der Kombination beider Substanzen eine Steigerung der Apoptoserate ($55,1 \pm 6,5$ % Annexin V positive Zellen) gemessen werden im Vergleich zu Iloprost ($39,4 \pm 6,4$ % Annexin V positive Zellen, $p=0,004$) alleine, nicht jedoch im Vergleich zu Rolipram ($53,1 \pm 6,2$ % Annexin V positive Zellen, $p=0,347$). Daher liegt kein Synergismus der beiden Substanzen vor (Abbildung 5).

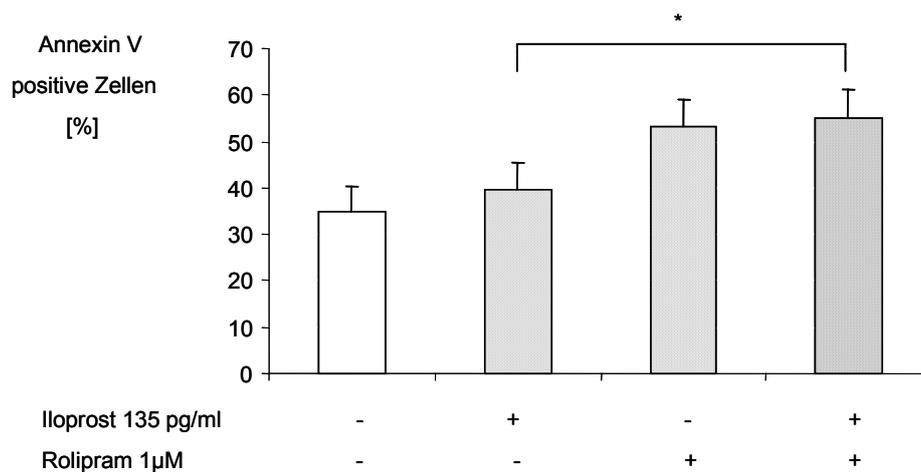


Abbildung 5: Keine signifikante Zunahme der Apoptoserate durch die Kombination von Rolipram und Iloprost. Nach Inkubation der B-CLL-Zellen (5×10^6 /ml) über 48 h zeigt die Kombination beider Substanzen eine Erhöhung der Annexin V positiven Zellen in Prozent im Vergleich zu 135 pg/ml Iloprost alleine ($p=0,004$), jedoch nicht im Vergleich zu 1 μ M Rolipram alleine. Die Werte sind als Mittelwerte + SEM von 12 verschiedenen Spendern dargestellt.

3.1.2. Apoptoseinduktion durch β_2 -adrenerge Substanzen alleine und in Kombination mit Rolipram

Nach Inkubation der PBMC mit den β_2 -Sympathomimetika Suprarenin und Terbutalin konnte eine dosisabhängige Erhöhung der Apoptoserate nachgewiesen werden. Die maximale Plasmakonzentration von Suprarenin (1 μ g/ml) führt zu einem Anstieg der Apoptoserate auf $40,7 \pm 5,5$ % Annexin positive Zellen im Vergleich zur Kontrolle $28,7 \pm 4,4$ % ($p<0,001$), die zehnfache maximale Plasmakonzentration (10 μ g/ml) zu einem weiteren Anstieg auf $52,7 \pm 5,2$ % Annexin V positive Zellen ($p<0,001$). Bei Inkubation der B-CLL-Zellen mit der maximalen Plasmakonzentration von Terbutalin (10 ng/ml) kommt es zu einer Induktion von Apoptose zu $36,6 \pm 5,2$ % ($p=0,001$), bei der zehnfachen Konzentration (100 ng/ml) zu $42,8 \pm 6,8$ % ($p=0,003$) Annexin V positiven Zellen. Im Vergleich dazu lässt sich unter Inkubation der Zellen mit Fludarabin eine Apoptoserate von $39,7 \pm 5,2$ % ($p<0,001$) erzielen (Abbildung 6).

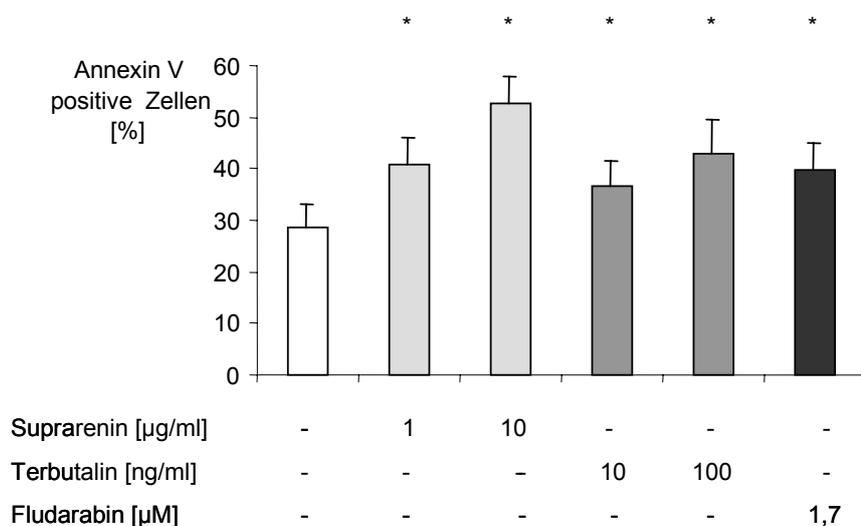


Abbildung 6: Dosisabhängige Erhöhung der Apoptoserate durch die β_2 -Sympathomimetika Suprarenin und Terbutalin. Die B-CLL-Zellen ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden über 48 h mit ansteigenden Konzentrationen Suprarenin (1 und 10 $\mu\text{g/ml}$) bzw. Terbutalin (10 und 100 ng/ml) inkubiert. Die Annexin V positiven Zellen in Prozent wurden mit Hilfe der FACS-Analyse bestimmt und als Mittelwerte + SEM von 20 verschiedenen Spendern bzw. bei Inkubation mit 100 ng/ml Terbutalin von 15 verschiedenen Spendern dargestellt.

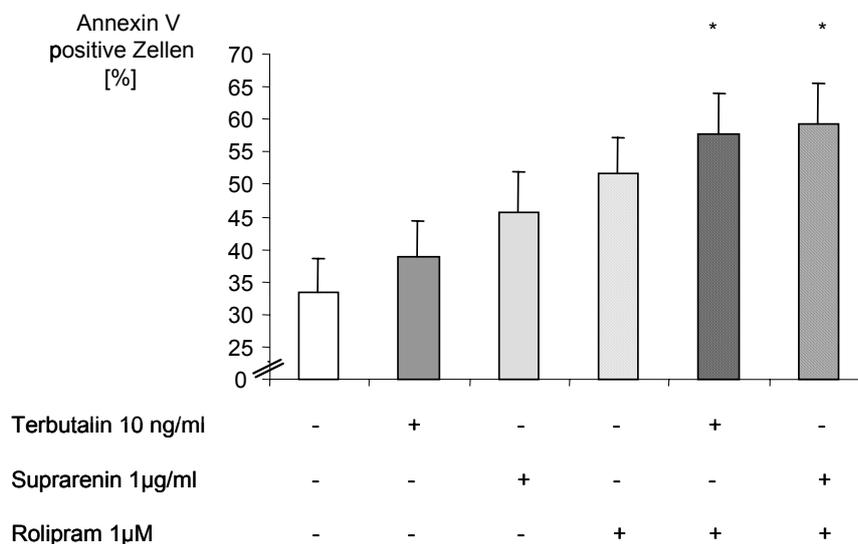


Abbildung 7: Signifikante Zunahme der Apoptoserate bei Zugabe der β_2 -Sympathomimetika zu Rolipram. Die Tumorzellen ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden über 48 h inkubiert. Die ermittelte Apoptoserate zeigte für die Kombination von 1 μM Rolipram mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Suprarenin bzw. mit 10 ng/ml Terbutalin eine signifikante Erhöhung der Annexin V positiven Zellen in Prozent im Vergleich zu den einzelnen Substanzen alleine. Die Werte sind als Mittelwerte + SEM von 13 verschiedenen Spendern dargestellt.

Des Weiteren wurden die Annexin V positiven B-CLL-Zellen auch nach Inkubation mit der Kombination aus Rolipram und β_2 -Sympathomimetika gemessen um eine synergistische Wirkung der Substanzen nachzuweisen. Die B-CLL-Zellen von 13 verschiedenen Spendern wurden mit 1 μ M Rolipram in Kombination mit 1 μ g/ml Suprarenin oder 10 ng/ml Terbutalin inkubiert. Nach 48 h konnte die Kombination aus beiden Substanzen ($59,2 \pm 6,8$ % Annexin V positive Zellen) vermehrt Apoptose induzieren im Vergleich zu Rolipram ($51,5 \pm 5,9$ % Annexin V positive Zellen; $p=0,002$) und zu Suprarenin ($45,7 \pm 6,5$ %; $p=0,002$) alleine. Auch die Zugabe von Terbutalin zu Rolipram erzielte eine höhere Apoptoserate ($57,7 \pm 6,6$ % Annexin V positive Zellen) als Rolipram ($p=0,003$) und Terbutalin ($38,8 \pm 5,7$ % Annexin positive Zellen; $p=0,001$) als alleiniger Stimulus (Abbildung 7).

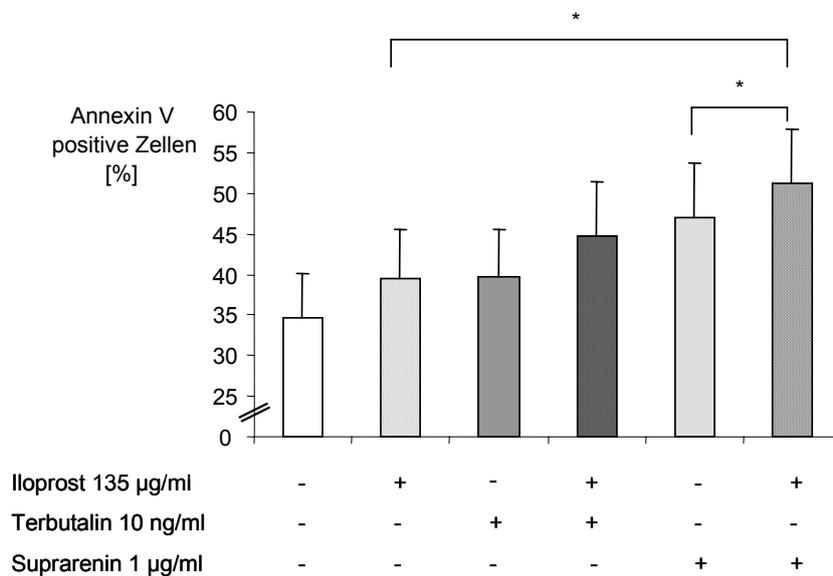


Abbildung 8: Signifikante Zunahme der Apoptoserate durch die Kombination von Iloprost mit Suprarenin, nicht jedoch mit Terbutalin. Die B-CLL-Zellen (5×10^6 /ml) wurden über 48 h inkubiert. Die anschließend gemessene Apoptoserate zeigte für die Kombination von Iloprost und Suprarenin im Vergleich zu Iloprost (135 μ g/ml) und für Suprarenin (1 μ g/ml) alleine einen signifikanten Unterschied. Die Kombination von Iloprost mit Terbutalin konnte im Vergleich zu Terbutalin (10 ng/ml) alleine nicht vermehrt Apoptose induzieren. Die Werte sind als Mittelwerte + SEM von 12 verschiedenen Spendern dargestellt.

3.1.3. Kombination von Iloprost mit β_2 -Sympathomimetika

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich bei der Kombination von Iloprost mit β_2 -Sympathomimetika eine erhöhte Apoptoserate erzielen lässt (Abbildung 8). Die malignen Zellen von 12 verschiedenen Patientenproben wurden über 48 h mit 135 μ g/ml Iloprost und 1 μ g/ml Suprarenin beziehungsweise 10 ng/ml Terbutalin inkubiert. Im Vergleich zu Suprarenin alleine ($47,1 \pm 6,9$ % Annexin V positive Zellen) ergab die Zu-

gabe von Iloprost eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate ($51,1 \pm 7,2$ % Annexin V positive Zellen, $p=0,012$). Die Kombination von Iloprost und Terbutalin ($44,7 \pm 7,0$ % Annexin V positive Zellen) erzielte keine signifikante Erhöhung der Annexin V positiven B-CLL-Zellen im Vergleich zu Terbutalin alleine ($39,6 \pm 6,1$ % Annexin V positive Zellen, $p=0,099$).

3.1.4. Abhängigkeit der Apoptoseinduktion durch cAMP-erhöhende Substanzen von Caspasen

Als nächstes wurde die Wirkung des Pancaspaseinhibitors z-VAD-fmk auf die Induktion von Apoptose durch cAMP-erhöhende Substanzen untersucht (Abbildung 9). Dazu wurden die B-CLL-Zellen unter Zugabe von ansteigenden Konzentrationen z-VAD-fmk über 24 h mit $10 \mu\text{g/ml}$ Suprarenin, 100 ng/ml Terbutalin und 1350 pg/ml Iloprost inkubiert. Die Zugabe von z-VAD-fmk beeinträchtigte die Induktion von Apoptose. Die Anzahl der apoptotischen Zellen verringerte sich bei den unbehandelten Zellen erst bei Zugabe von $200 \mu\text{M}$ z-VAD-fmk signifikant von $24,3 \pm 4,4$ auf $11,1 \pm 1,9$ Prozent.

Bei Inkubation mit Suprarenin führte die Zugabe von $50 \mu\text{M}$ z-VAD-fmk zu einer signifikanten Abnahme der Apoptoserate ($34,2 \pm 6,7$ %, $p=0,007$), die Zugabe von $200 \mu\text{M}$ zu einer weiteren Abnahme auf $20,7 \pm 2,8$ % ($p=0,022$) im Vergleich zu $39,1 \pm 6,4$ % Annexin V positive Zellen ohne Caspaseinhibition. Bei Inkubation mit Terbutalin kam es zu einer Reduktion der Apoptose auf $27,6 \pm 5,3$ % Annexin V positive Zellen unter $50 \mu\text{M}$ z-VAD-fmk ($p>0,05$) und auf $15,3 \pm 2,8$ % unter $200 \mu\text{M}$ z-VAD-fmk ($p=0,009$) im Vergleich zum Ansatz ohne Zusatz eines Caspaseinhibitors ($31,8 \pm 5,6$ %). Auch bei 1350 pg/ml Iloprost führte erst die Zugabe von $200 \mu\text{M}$ z-VAD-fmk zu einem signifikanten Unterschied der Apoptoserate ($14,8 \pm 2,6$ %, $p=0,008$) im Vergleich zum Ansatz ohne z-VAD-fmk ($35,4 \pm 6,8$ %); bei Anwesenheit von $50 \mu\text{M}$ z-VAD-fmk beträgt die Apoptoserate $31,2 \pm 6,2$ % Annexin V positive Zellen ($n=9$ Spender).

Die Inkubation mit $200 \mu\text{M}$ z-VAD-fmk führte bei diesen cAMP-erhöhenden Substanzen sogar zu einer Abnahme der Anzahl apoptotischer Zellen unterhalb der spontanen Apoptoserate der Kontrolle ($24,3 \pm 4,6$ % Annexin V positive Zellen).

Anschließend wurde auch die von β_2 -Sympathomimetika abhängige Caspase-3-Aktivität mit Hilfe eines colorimetrischen Assays bestimmt (Abbildung 10). Hier ist besonders auffallend, dass die Inkubation mit $10 \mu\text{g/ml}$ Suprarenin eine deutlich geringere Caspaseaktivität ($0,05 \pm 0,02$) induziert als der Kontrollansatz ($0,19 \pm 0,04$; $p=0,043$; $n=5$ Spender). Die Inkubation mit 100 ng/ml Terbutalin hat keine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle zur Folge ($0,19 \pm 0,05$). Die Anwesenheit von $50 \mu\text{M}$ des Pancaspase-Inhibitors z-VAD-fmk bewirkte eine signifikante Reduktion der Caspaseaktivität im Vergleich zur Inkubation ohne Caspaseinhibition ($p=0,043$; $n=5$ Spender; keine Abbildung). Eine weitere Abnahme der Aktivität bei Zugabe von $200 \mu\text{M}$ z-VAD-fmk im Vergleich zu $50 \mu\text{M}$ ($0,035 \pm 0,007$) gelang unter Inkubation mit Terbutalin ($0,028 \pm 0,007$).

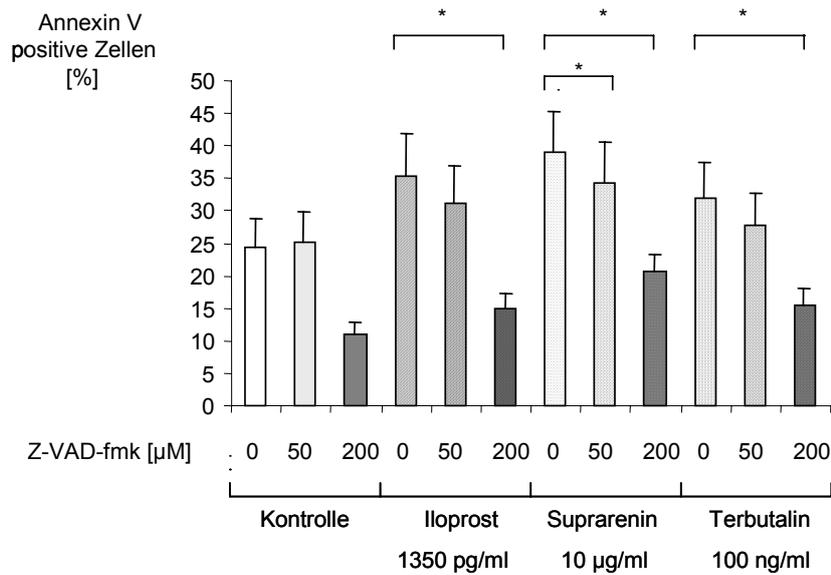


Abbildung 9: Wirkung des Pancaspaseinhibitors z-VAD-fmk auf die Induktion von Apoptose durch β_2 -Sympathomimetika und Iloprost. Die B-CLL-Zellen wurden über 24 h mit den cAMP-erhöhenden Substanzen und Zugabe von ansteigenden Konzentrationen z-VAD-fmk (0 μ M, 50 μ M und 200 μ M) inkubiert. Anschließend wurde die Apoptoserate mittels Annexin V/PI-Doppelfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte + SEM von 10 verschiedenen Spendern dargestellt (Iloprost: n=9 Spender).

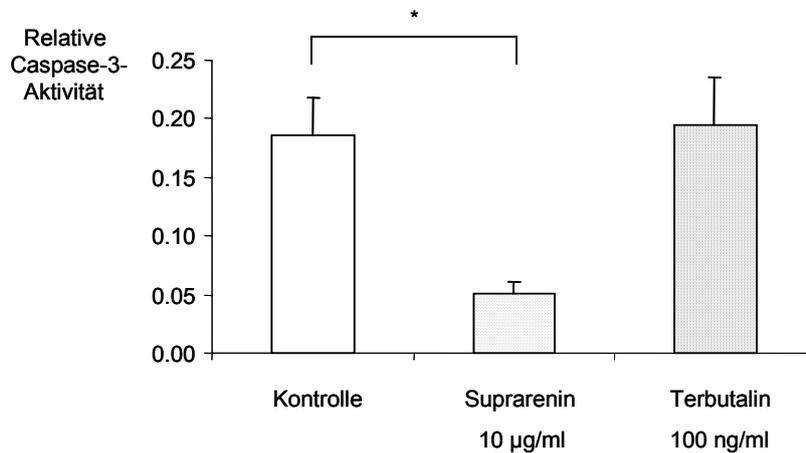
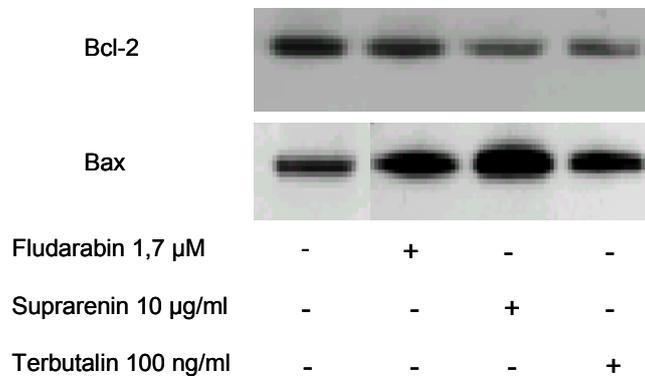


Abbildung 10: Keine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität durch β_2 -Sympathomimetika. Die B-CLL-Zellen wurden über 24 h mit den β_2 -Sympathomimetika Suprarenin und Terbutalin inkubiert. Mit einem colorimetrischen Assay wurde die Caspase-3-Aktivität gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte + SEM von 5 verschiedenen Spendern dargestellt.

3.1.5. Beeinflussung der Bcl-2/ Bax-Ratio durch β_2 -Sympathomimetika

Die B-CLL-Zellen wurden über 48 h mit den β_2 -Sympathomimetika in den während der durchflusszytometrischen Messungen maximal eingesetzten Konzentrationen inkubiert. Danach wurde ein Western Blot durchgeführt um intrazelluläres Bcl-2 und Bax zu bestimmen. Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet und das Verhältnis der Bcl-2 Proteine zueinander errechnet (Abbildung 11). Im Vergleich zur Kontrolle ($4,9 \pm 3,4$) konnte der Quotient Bcl-2/Bax durch Zugabe von $10 \mu\text{g/ml}$ Suprarenin auf $2,3 \pm 1,2$ und durch Zugabe von 100 ng/ml Terbutalin auf $2,8 \pm 1,7$ erniedrigt werden ($p > 0,05$). Inkubation mit $1,7 \mu\text{M}$ Fludarabin bewirkte eine Erniedrigung der Ratio auf $3,0 \pm 1,7$.

A)



B)

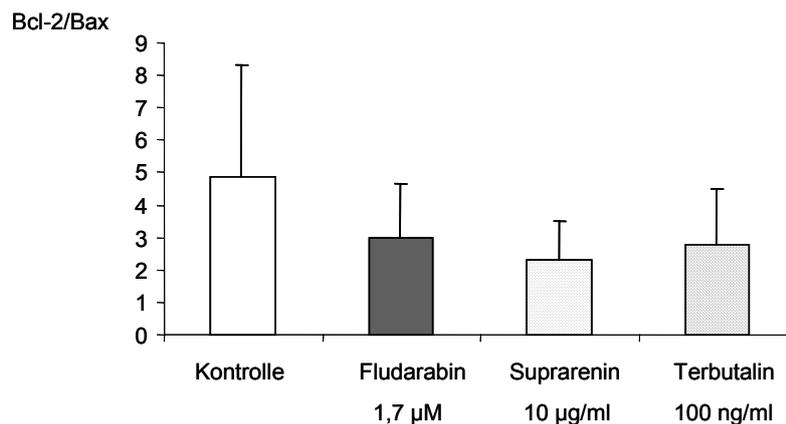


Abbildung 11: Reduktion der Bcl-2/Bax-Ratio durch β_2 -Sympathomimetika. Die B-CLL-Zellen wurden über 48 h mit $10 \mu\text{g/ml}$ Suprarenin und 100 ng/ml Terbutalin inkubiert. **A)** Dieses repräsentative Beispiel eines Western Blots zeigt die Abnahme der Bcl-2- und gleichzeitige Zunahme der Bax-Expression. **B)** In der Abbildung sind die Ergebnisse der densitometrischen Messung der Western Blot-Banden dargestellt. Es handelt sich um Mittelwerte + SEM von $n=6$ verschiedenen Spendern.

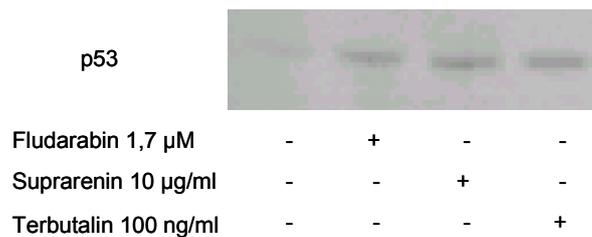
3.1.6. Beeinflussung des p53-Tumorsuppressorgens durch β_2 -Sympathomimetika

Anschließend wurde die Expression von p53 in den B-CLL-Zellen und deren Abhängigkeit von apoptoseinduzierenden Substanzen untersucht.

Das Tumorsuppressorgen p53 führt in manchen Zellen zu erniedrigter Bcl-2/Bax-Ratio und triggert den proapoptotischen Fas-Signalweg. Es gilt außerdem als prognostischer Faktor während einer Therapie mit dem Purinanalogen Fludarabin.

Nach 48 h Inkubation der B-CLL-Zellen wurde ein Western Blot zum Nachweis des Tumorsuppressorgens p53 durchgeführt. Bei der densitometrischen Auswertung der Western Blot-Banden von 7 verschiedenen Spendern ließ sich ein Anstieg der p53 Expression auf $3,2 \pm 0,6$ durch Zugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ Suprarenin und auf $3,1 \pm 0,8$ durch Zugabe von 100 ng/ml Terbutalin nachweisen ($p < 0,05$). Allein bei Inkubation der Zellen mit 1,7 μM Fludarabin ($2,7 \pm 0,5$) war der Unterschied zur Kontrolle ($1,9 \pm 0,4$) nicht signifikant (Abbildung 12).

A)



B)

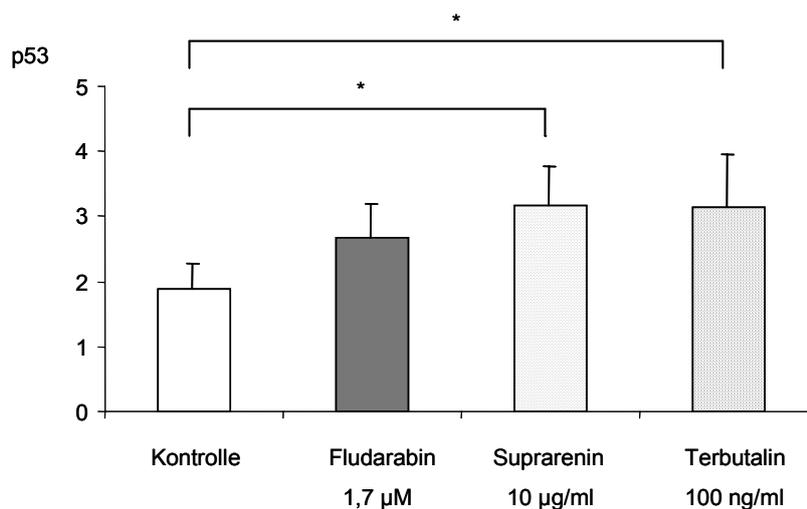


Abbildung 12: Erhöhte Expression von p53 durch Fludarabin und β_2 -Sympathomimetika. Die B-CLL-Zellen wurden über 48 h mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Suprarenin und 100 ng/ml Terbutalin inkubiert. **A)** Repräsentatives Beispiel eines p53-Western Blots. **B)** Darstellung der Ergebnisse einer densitometrischen Messung der Western Blot-Banden. Es handelt sich um Mittelwerte + SEM von $n=7$ verschiedenen Spendern.

3.1.7. Die Rolle von Interleukin-10 während Apoptoseinduktion durch β_2 -Sympathomimetika

Die Zugabe eines neutralisierenden IL-10-Antikörpers bewirkte eine signifikante Steigerung der Apoptoseinduktion durch β_2 -Sympathomimetika (Abbildung 13). Nach Inkubation der B-CLL-Zellen über 48 h nahm die Apoptoserate der Kontrolle von $24,9 \pm 4,6 \%$ auf $45,5 \pm 7,6 \%$ ($p=0,017$), die der mit $10 \mu\text{g/ml}$ Suprarenin inkubierten Zellen von $43,3 \pm 7,6 \%$ auf $76,1 \pm 7,6 \%$ ($p=0,017$) und die der mit 100 ng/ml Terbutalin inkubierten Zellen von $34,9 \pm 6,5 \%$ auf $54,2 \pm 6,4 \%$ ($p=0,012$) zu ($n=8$ Spender).

Um eine mögliche Veränderung der IL-10-Konzentration durch Inkubation der B-CLL-Zellen mit den cAMP-erhöhenden Substanzen nachzuweisen wurde mit Hilfe eines ELISA die IL-10-Konzentration im Überstand gemessen. Nach 24 h Inkubation der malignen Zellen ließ sich im Vergleich zur Kontrolle eine Erhöhung der IL-10-Konzentration im Zellüberstand nachweisen (Abbildung 14). Ein signifikanter Unterschied mit der Kontrolle ($21,0 \pm 7,8 \text{ pg/ml}$) ergab sich bei Inkubation der Zellen mit 100 ng/ml Terbutalin ($26,4 \pm 8,9 \text{ pg/ml}$; $p=0,025$) und mit 1350 pg/ml Iloprost ($29,5 \pm 12,4 \text{ pg/ml}$; $p=0,028$, $n=6$ Spender).

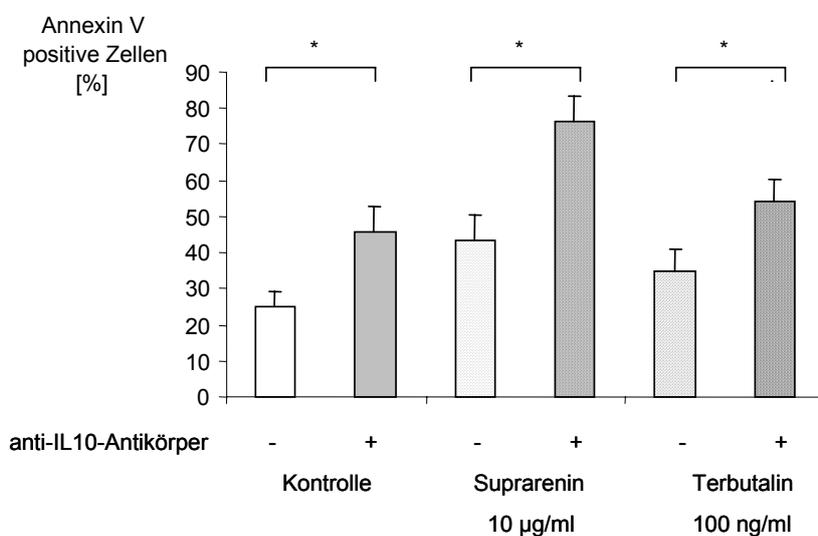


Abbildung 13: Zunahme der Induktion von Apoptose durch IL-10-Blockade. Die B-CLL-Zellen wurden mit β_2 -Sympathomimetika allein und in Kombination mit einem neutralisierenden IL-10-Antikörper inkubiert. Nach 48 h wurden die Annexin V positiven Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Die Werte sind als Mittelwerte + SEM von 8 verschiedenen Spendern dargestellt.

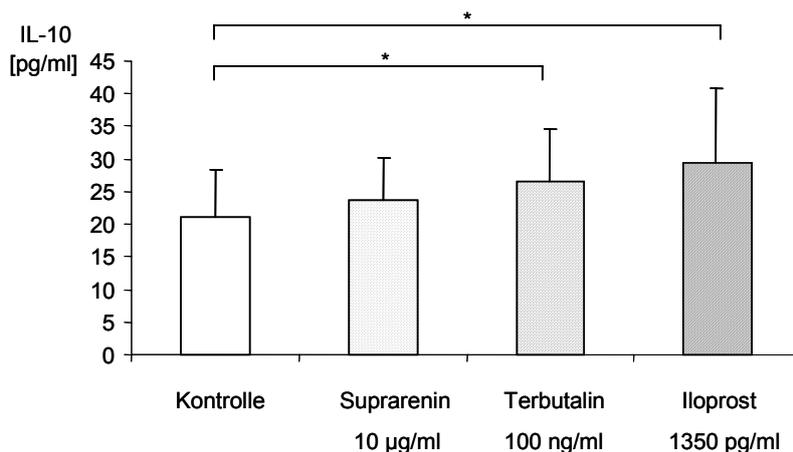


Abbildung 14: IL-10-Konzentration im Überstand nach Inkubation mit cAMP-erhöhenden Substanzen. 5×10^6 Zellen/ml wurden über 24 h mit 10 µg/ml Suprarenin, 100 ng/ml Terbutalin und 1350 pg/ml Iloprost inkubiert. Anschließend wurde mittels ELISA die Menge von IL-10 in pg/ml gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte + SEM von 8 verschiedenen Spendern bzw. die der Inkubation mit Iloprost von 6 Spendern dargestellt.

Die Inkubation der malignen B-Zellen mit β_2 -Sympathomimetika nach Zugabe eines neutralisierenden IL-10-Antikörpers zeigte keine signifikante Veränderung der Caspase-3-Aktivität durch IL-10-Blockade ($p > 0,05$; $n = 5$ Spender; keine Abbildung).

3.2. Induktion von Apoptose durch Antidepressiva

3.2.1. Apoptoseinduktion durch trizyklische Antidepressiva

Bei der Inkubation von B-CLL-Zellen über 48 h mit 0,5 µg/ml und 5 µg/ml Imipramin zeigte sich, dass dieses trizyklische Antidepressivum im Vergleich zur Kontrolle die Apoptoserate signifikant erhöht ($n = 13$ Spender; keine Abbildung). Die maximale therapeutische Konzentration 0,5 µg/ml Imipramin induzierte bei $39,6 \pm 6,0$ % der Zellen Apoptose ($p = 0,016$), 5 µg/ml der Substanz steigerten die Apoptoserate auf $49,5 \pm 6,6$ % Annexin V positive Zellen ($p = 0,003$) im Vergleich zur Kontrolle ($33,7 \pm 5,7$ %). Durch Inkubation mit 1,7 µM Fludarabin konnte eine Apoptoserate von $47,75 \pm 5,95$ % Annexin V positiven Zellen induziert werden ($p = 0,002$).

Auch das trizyklische Antidepressivum Clomipramin induziert dosisabhängig Apoptose bei B-CLL-Zellen (Abbildung 15). Die Inkubation der malignen Zellen über 48 h ergab im Vergleich zur Kontrolle mit $28,7 \pm 4,6$ % Annexin V positiven Zellen bei Zugabe von 0,5 µg/ml Clomipramin, entsprechend der maximalen Plasmakonzentration der Substanz, eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate auf $36,4 \pm 5,3$ % ($p = 0,002$), bei Zugabe der zehnfachen Konzentration (5 µg/ml) einen weiteren Anstieg auf $61,8 \pm 7,0$

% ($p=0,001$). 1,7 μM Fludarabin erhöhte die Apoptoserate auf $39,03 \pm 5,47$ % Annexin V positive Zellen ($p=0,001$).

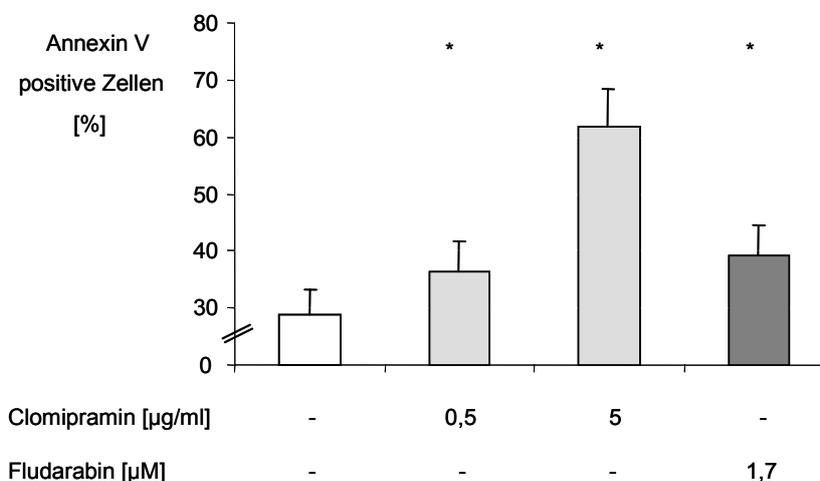


Abbildung 15: Dosisabhängige Erhöhung der Apoptoserate durch das trizyklische Antidepressivum Clomipramin. Die B-CLL-Zellen ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden 48 h mit ansteigenden Konzentrationen Clomipramin inkubiert. Die Apoptoserate wurde durchflusszytometrisch mit AnnexinV/PI-Doppelfärbung bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte + SEM von 19 verschiedenen Spendern, die Werte der Inkubation mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Clomipramin als Mittelwerte von 14 Proben dargestellt.

Als nächstes wurde untersucht, ob das trizyklische Antidepressivum Clomipramin einen synergistischen Effekt auf Apoptoseinduktion bei B-CLL mit dem Purinanalogon Fludarabin zeigt (Abbildung 16). Nach 48 h Inkubation der B-CLL-Zellen mit beiden Substanzen, zeigte sich, dass die Apoptoserate signifikant erhöht war ($51,4 \pm 6,7$ % Annexin V positive Zellen) im Vergleich zu 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Clomipramin ($39,9 \pm 6,2$ %, $p=0,005$) und 1,7 μM Fludarabin ($47,7 \pm 5,9$ %, $p=0,039$) alleine.

Ob sich wie bei Fludarabin auch bei Rolipram durch die Zugabe von Clomipramin ein Synergismus erzielen lässt, wurde im Folgenden überprüft (Abbildung 17). Die B-CLL-Zellen wurden 48 h mit 1 μM Rolipram und 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Clomipramin inkubiert. Im Vergleich zu Rolipram ($53,1 \pm 6,2$ % Annexin V positive Zellen, $p=0,041$) und Clomipramin alleine ($41,6 \pm 6,5$ %, $p=0,002$) steigerte die Kombination beider Substanzen die Apoptoserate signifikant ($58,5 \pm 7,1$ %, $n=12$ Spender).

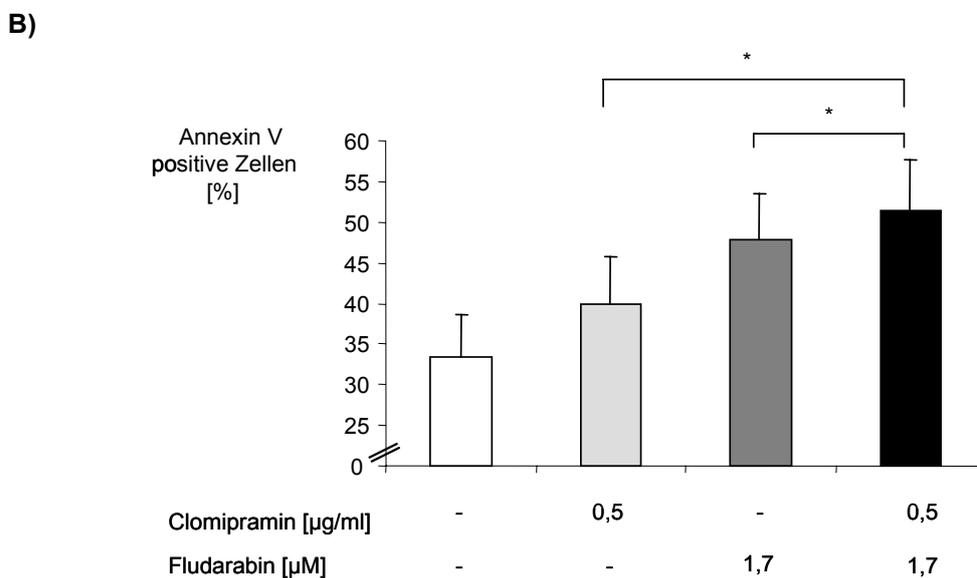
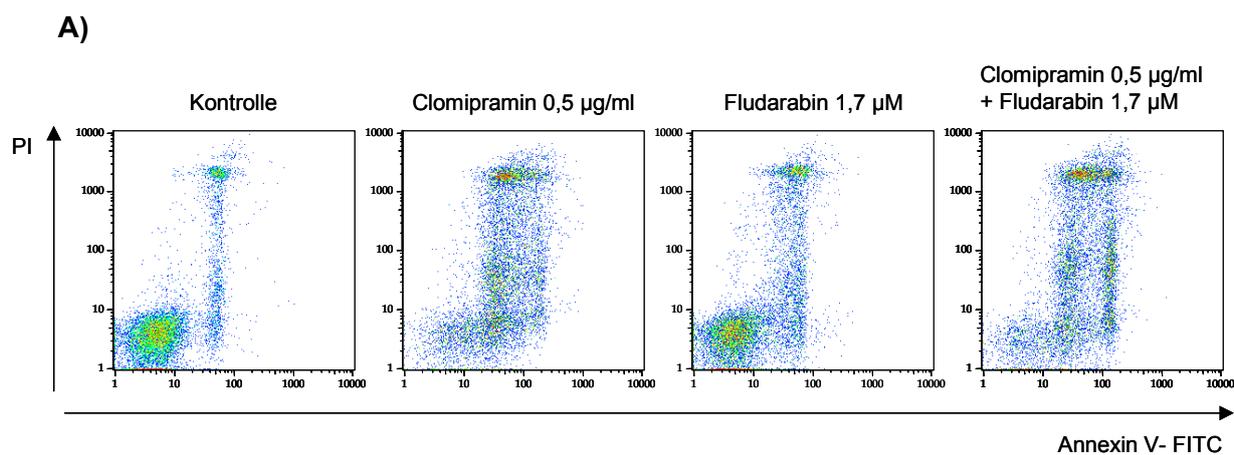


Abbildung 16: Signifikante Zunahme der Apoptoserate durch Kombination des Purinanalogons Fludarabin mit dem trizyklischem Antidepressivum Clomipramin. Die B-CLL-Zellen ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden 48 h inkubiert und anschließend die Apoptoserate mittels Annexin V/PI-Doppelfärbung bestimmt. **A)** Repräsentatives Beispiel von insgesamt 13 Patienten. Die x-Achse stellt die Annexin V-FITC-, die y-Achse die PI-Fluoreszenz dar. **B)** Im Vergleich zu 0,5 µg/ml Clomipramin und 1,7 µM Fludarabin alleine erhöht die Kombination beider Substanzen die Apoptoserate signifikant. Die Werte sind als Mittelwerte + SEM von 13 verschiedenen Spendern dargestellt.

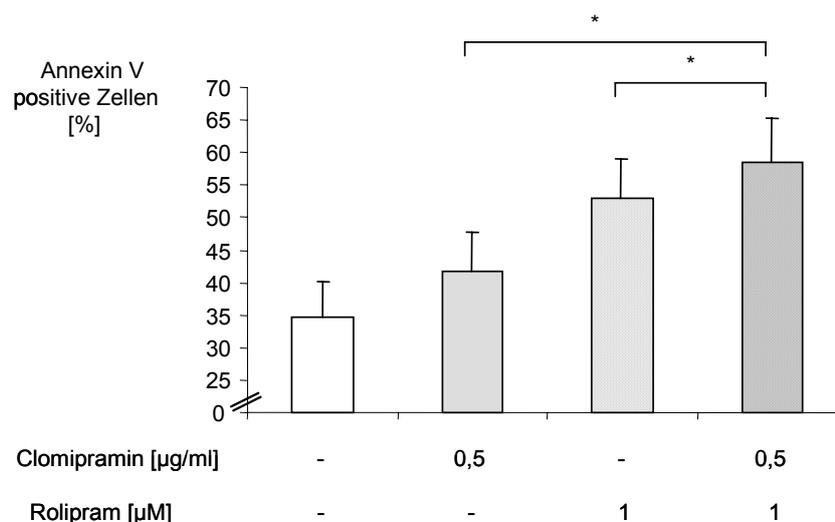


Abbildung 17: Signifikante Zunahme der Apoptoserate durch den synergistischen Effekt von Clomipramin und Rolipram. Die B-CLL-Zellen ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden 48 h inkubiert. Die anschließend berechnete Apoptoserate zeigte im Vergleich zu 0,5 µg/ml Clomipramin und 1 µM Rolipram alleine eine weitere Erhöhung durch Inkubation mit der Kombination beider Substanzen. Die Werte sind als Mittelwerte + SEM von 12 verschiedenen Spendern dargestellt.

3.2.2. Apoptoseinduktion durch das tetrazyklische Antidepressivum Maprotilin

Die B-CLL-Zellen wurden als nächstes mit ansteigenden Konzentrationen des tetrazyklischen Antidepressivums Maprotilin inkubiert ($n=13$ Spender; keine Abbildung). Nach 48 h Inkubation mit 400 ng/ml Maprotilin, entsprechend der therapeutisch wirksamen Gleichgewichtskonzentration, wurden $41,0 \pm 6,3$ % Annexin V positive Zellen ($p=0,011$) durchflusszytometrisch gemessen im Vergleich zur Apoptoserate der Kontrolle von $33,7 \pm 5,7$ %. Die zehnfache Konzentration Maprotilin (4 µg/ml) steigerte die Apoptoserate auf $65,1 \pm 4,7$ % Annexin V positive Zellen ($p=0,002$). Auch 1,7 µM Fludarabin ($47,7 \pm 5,9$ %, $p=0,002$) und 1 µM Rolipram ($51,5 \pm 5,9$ %, $p=0,001$) konnten im Vergleich zur Kontrolle die Apoptoserate signifikant steigern.

3.2.3. Apoptoseinduktion durch atypische Antidepressiva

Hier wurde untersucht, ob das nichttricyklische Antidepressivum Trazodon Apoptose bei B-CLL-Zellen dosisabhängig induzieren kann. Die malignen Zellen wurden über 48 h mit verschiedenen Konzentrationen Trazodon inkubiert. Die maximale therapeutische Konzentration 800 ng/ml Trazodon konnte im Vergleich zur Kontrolle ($33,7 \pm 5,67$ %) die Apoptoserate signifikant steigern ($41,4 \pm 6,4$ % Annexin V positive Zellen; $p=0,028$). Die zehnfache Konzentration von Trazodon konnte im Vergleich zu 800 ng/ml Trazodon die Anzahl der apoptotischen Zellen nur in geringem Ausmaß weiter erhöhen ($42,2 \pm 6,0$ %; $p=0,005$). Auch die durch den Serotonin-Wiederaufnahmehemmstoff Fluoxetin induzierte Apoptoserate wurde bestimmt. Nach 48 h wurde bei

Inkubation der B-CLL-Zellen mit 0,5 µg/ml Fluoxetin, der Menge der Substanz, die der therapeutischen Plasma-steady-state-Konzentration entspricht, $41,9 \pm 6,1$ % Annexin V positive Zellen gemessen ($p=0,016$). Die 10fache Konzentration Fluoxetin konnte eine noch höhere Apoptoserate induzieren ($55,8 \pm 4,4$ %; $p=0,003$). Verglichen mit der Kontrolle ($33,7 \pm 5,7$ % Annexin positive Zellen) kann Fluoxetin die Apoptoserate bei B-CLL-Zellen signifikant steigern ($n=13$ Spender).

Im Vergleich zu Trazodon und Fluoxetin induzierte 1,7 µM Fludarabin eine Apoptoserate von $47,75 \pm 5,95$ % ($p=0,002$; $n= 13$ Spender; keine Abbildung).

3.2.4. Apoptoseinduktion durch Lithium

Die B-CLL-Zellen wurden über 48 h mit der maximalen Plasmakonzentration von Lithiumchlorid inkubiert. Im Vergleich zur Kontrolle ($28,5 \pm 4,9$ % Annexin positive Zellen) konnte 1 mM Lithium die Apoptoserate der Zellen nicht signifikant erhöhen ($33,7 \pm 5,1$ %; $p=0,007$; $n=17$ Spender; keine Abbildung).

3.2.5. Abhängigkeit der Apoptoseinduktion durch Antidepressiva von Caspasen

Als nächstes wurde überprüft, ob die durch Antidepressiva induzierte Apoptose von B-CLL-Zellen abhängig von Caspaseaktivierung ist. Die malignen B-Zellen von 10 verschiedenen Spendern wurden über 24 h mit Antidepressiva und Zugabe des Pan-caspaseinhibitors z-VAD-fmk in ansteigenden Konzentrationen (0 µM, 50 µM und 200 µM) inkubiert und anschließend ihre Apoptoserate durchflusszytometrisch gemessen (Abbildung 18). Die Inkubation der Zellen mit Antidepressiva ohne Anwesenheit von z-VAD-fmk führte zu einer Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle. Durch 50 µM des Caspaseinhibitors konnte die spontane Apoptoserate der Kontrolle von $24,3 \pm 4,6$ % Annexin V positiven Zellen nicht reduziert werden. Inhibition der Caspasen mit 200 µM z-VAD-fmk führte zu einer signifikanten Abnahme der spontanen Apoptoserate auf $11,1 \pm 2,0$ % Annexin V positive Zellen im Vergleich zur Inkubation der Zellen ohne Caspaseinhibition ($p=0,022$).

Bei Inkubation der B-CLL-Zellen mit 5 µg/ml Clomipramin kam es unter Caspaseinhibition zu einer Abnahme der Apoptoseinduktion. Inkubation mit 5 µg/ml Clomipramin und 50 µM z-VAD-fmk reduzierten die Annexin V positiven Zellen auf $42,7 \pm 6,1$ % im Vergleich zu $43,5 \pm 5,9$ % ohne Anwesenheit von z-VAD-fmk.

Erst die Zugabe von 200 µM z-VAD-fmk ließ die Apoptoserate im Vergleich zum Ansatz ohne Zusatz von Caspaseinhibitoren signifikant abnehmen ($35,3 \pm 5,2$ % Annexin V positive Zellen; $p=0,037$), sie blieb dennoch höher als die Apoptoserate der Kontrolle.

Der durch z-VAD-fmk erzielte Effekt der Reduktion von Annexin V positiven Zellen ließ sich unter Induktion von Apoptose durch 4 µg/ml Maprotilin und 5 µg/ml Fluoxetin nicht nachweisen. Hier führte auch die Zugabe von 200 µM z-VAD-fmk nicht zu einem signi-

fikanten Unterschied der Apoptoserate im Vergleich zur Inkubation ohne Caspaseinhibition.

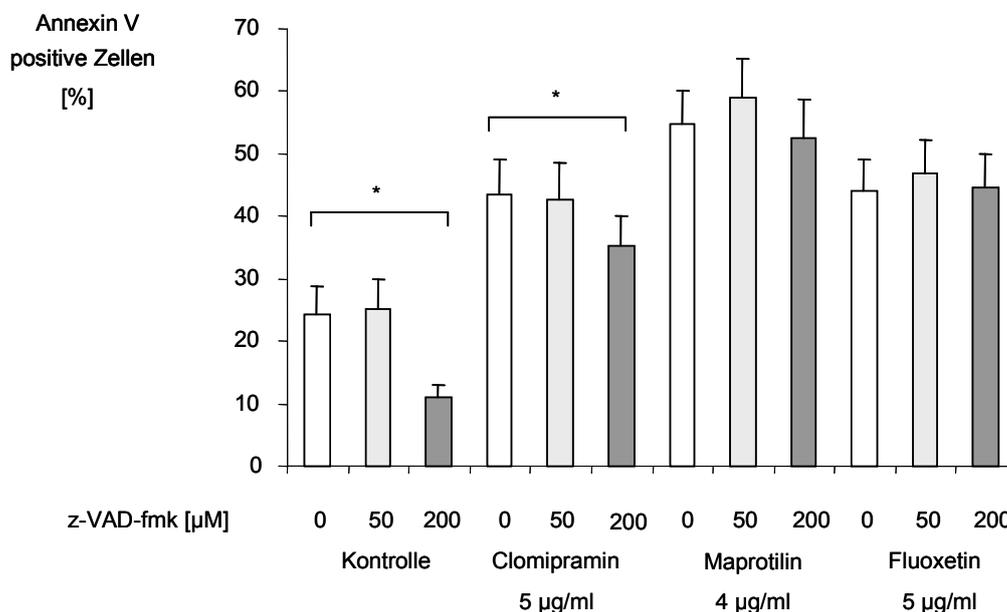


Abbildung 18: Wirkung des Pancaspaseinhibitors z-VAD-fmk auf die Induktion von Apoptose durch Antidepressiva. Die B-CLL-Zellen wurden über 24 h mit Antidepressiva unter Zugabe von ansteigenden Konzentrationen z-VAD-fmk (0 μM, 50 μM und 200 μM) inkubiert. Anschließend wurde die Apoptoserate mittels Annexin V/PI-Doppelfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte + SEM von 10 verschiedenen Spendern dargestellt.

Im Rahmen eines colorimetrischen Assays wurde nun untersucht, ob die verschiedenen Antidepressiva eine erhöhte Aktivität der Caspase-3 induzieren können (Abbildung 19). Die B-CLL-Zellen wurden über 24 h mit den verschiedenen Antidepressiva in Abwesenheit des Pancaspaseinhibitors z-VAD-fmk inkubiert. Die mit den Antidepressiva inkubierten Zellen zeigten keine statistisch signifikante Veränderung der relativen Caspase-3-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle ($0,2 \pm 0,04$; $p > 0,05$; $n = 5$ Spender).

Die Zugabe von 50 μM z-VAD-fmk bewirkte eine signifikante Abnahme der relativen Caspase-3-Aktivität sowohl bei den Antidepressiva als auch bei der Kontrolle ($p = 0,043$). Hier wurde unter Inkubation mit 5 μg/ml Clomipramin eine erhöhte Caspaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle beobachtet ($p > 0,05$). Unter Anwesenheit von 200 μM z-VAD-fmk zeigte sich bei dieser Substanz eine weitere Abnahme der Caspase-3-Aktivität im Vergleich zur Inkubation mit 50 μM Caspaseinhibitor, während sich die Aktivität bei der Kontrolle und bei Inkubation der Zellen mit Maprotilin und Fluoxetin nicht weiter absenken ließ (keine Abbildung).

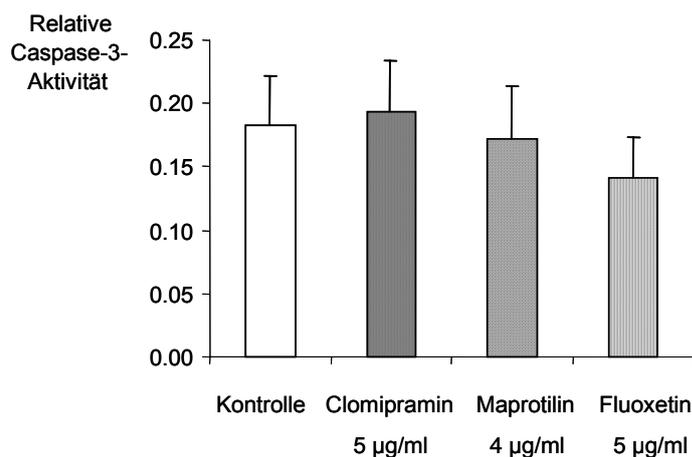
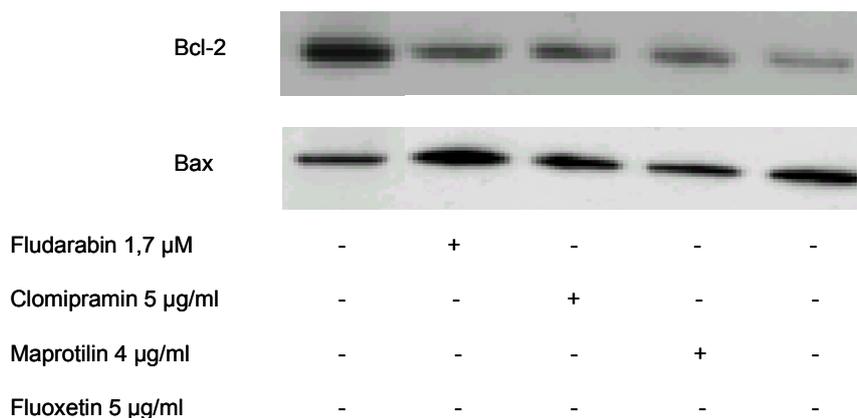


Abbildung 19: Keine Zunahme der Caspase-3-Aktivität durch Antidepressiva. Die B-CLL-Zellen wurden über 24 h mit den apoptoseinduzierenden Antidepressiva inkubiert. Mit einem Colorimetrischen Assay wurde die Caspase-3-Aktivität gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte + SEM von 5 verschiedenen Spendern dargestellt.

3.2.6. Beeinflussung der Bcl2/ Bax-Ratio durch Antidepressiva

Nach Inkubation der malignen Zellen über 48 h mit den apoptoseinduzierenden Substanzen wurde ein Western Blot durchgeführt um intrazelluläres Bcl-2 und Bax zu bestimmen. Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet und das Verhältnis der Bcl-2 Proteine zueinander errechnet. Im Vergleich zur Kontrolle ($4,9 \pm 3,4$) konnte der Quotient Bcl-2/Bax durch Zugabe von Antidepressiva nicht signifikant erniedrigt werden ($p > 0,05$). Inkubation der CLL-Zellen mit $1,7 \mu\text{M}$ Fludarabin reduzierte die Bcl-2/Bax-Ratio auf $2,97 \pm 1,71$, mit $5 \mu\text{g/ml}$ Clomipramin auf $2,05 \pm 0,83$, mit $4 \mu\text{g/ml}$ Maprotilin auf $1,96 \pm 0,82$ und mit $5 \mu\text{g/ml}$ Fluoxetin auf $3,02 \pm 2,18$ (Abbildung 20).

A)



B)

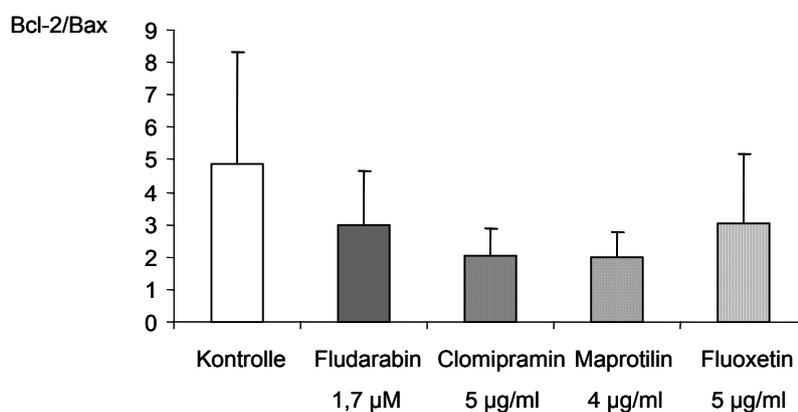
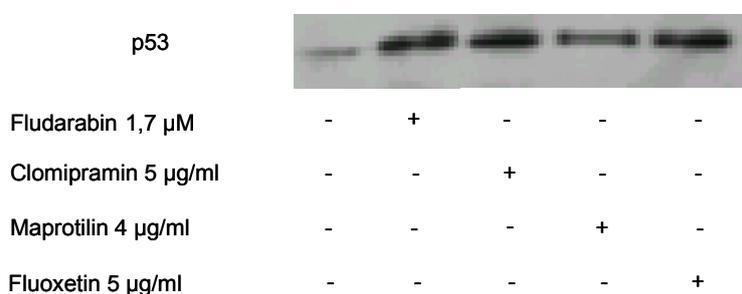


Abbildung 20: Reduktion der Bcl-2/Bax-Ratio durch Antidepressiva. Die B-CLL-Zellen wurden über 48 h mit den verschiedenen Antidepressiva inkubiert. **A)** Repräsentatives Beispiel eines Bcl-2/ Bax-Westernblots. **B)** Darstellung der Ergebnisse einer densitometrischen Messung der Western Blot-Banden. Es handelt sich um Mittelwerte + SEM von n=6 verschiedenen Spendern.

3.2.7. Beeinflussung des p53 Tumorsuppressorgens durch Antidepressiva

Nach 48 h Inkubation der B-CLL-Zellen wurde ein Western Blot zum Nachweis des Tumorsuppressorgens p53 durchgeführt (Abbildung 21). Bei der densitometrischen Auswertung der Western Blot-Banden von 7 verschiedenen Spendern ließ sich ein Anstieg der p53-Expression durch Zugabe von Antidepressiva nachweisen ($p < 0,05$). Allein bei Inkubation der Zellen mit $1,7 \mu\text{M}$ Fludarabin ($2,7 \pm 0,5$) und $4 \mu\text{g/ml}$ Maprotilin ($2,3 \pm 0,4$) war der Unterschied zur Kontrolle ($1,9 \pm 0,4$) nicht signifikant. $5 \mu\text{g/ml}$ Clomipramin erhöhte die p53 Expression auf $3,12 \pm 0,75$ ($p = 0,028$) und $5 \mu\text{g/ml}$ Fluoxetin bewirkte einen Anstieg auf $3,31 \pm 0,81$ ($p = 0,043$).

A)



B)

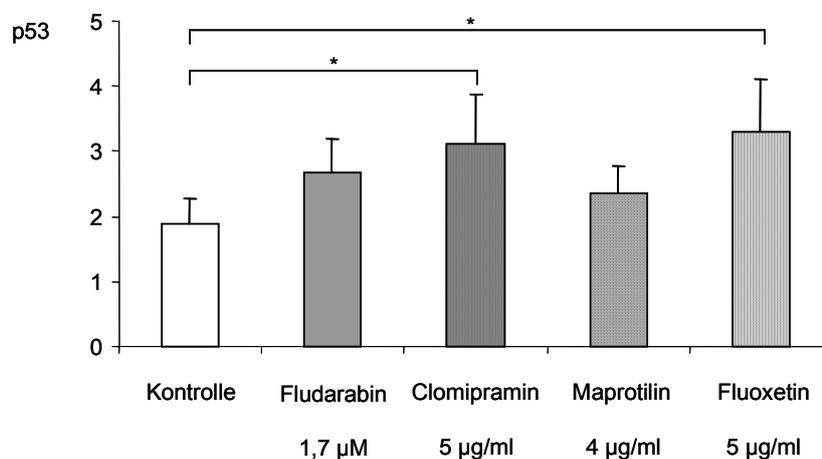


Abbildung 21: Erhöhte Expression von p53 sowohl durch Fludarabin als auch durch Antidepressiva. Die B-CLL-Zellen wurden über 48 h mit Fludarabin bzw. den verschiedenen Antidepressiva inkubiert. **A)** Repräsentatives Beispiel eines p53-Western Blots. **B)** Darstellung der Ergebnisse einer densitometrischen Messung der Western Blot-Banden. Es handelt sich um Mittelwerte + SEM von $n = 7$ verschiedenen Spendern.

3.2.8. Die Rolle von Interleukin-10 während Apoptoseinduktion durch Antidepressiva

Um eine Abhängigkeit der Induktion von Apoptose bei B-CLL-Zellen durch verschiedene Antidepressiva von IL-10 nachweisen zu können wurde die Messung der Apoptoserate nach Inkubation der B-CLL-Zellen mit einem neutralisierenden IL-10-Antikörper durchgeführt. Nach 48 h wurde eine Zunahme der Apoptoseinduktion durch IL-10-Blockade erkennbar. Durch Zugabe des neutralisierenden Antikörpers stieg die Apoptoserate der Kontrolle von $24,9 \pm 4,6$ % auf $45,5 \pm 7,6$ % ($p < 0,05$). Bei Inkubation mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ Clomipramin stieg die Anzahl der Annexin V positiven Zellen von $31,5 \pm 6,6$ % auf $44,4 \pm 5,9$ % ($p < 0,05$). Bei Inkubation mit anderen Antidepressiva zeigte sich kein signifikanter Anstieg der Apoptoserate durch IL-10-Blockade (Abbildung 22).

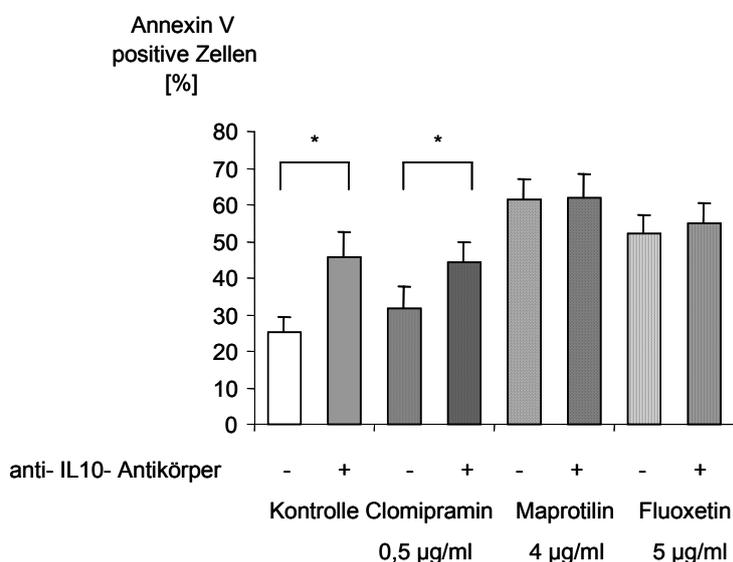


Abbildung 22: Zunahme der induzierten Apoptoserate durch IL-10-Blockade. Die B-CLL-Zellen wurden mit verschiedenen Antidepressiva allein und in Kombination mit einem neutralisierenden IL-10-Antikörper inkubiert. Nach 48 h wurden die Annexin V positiven Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Die Werte sind als Mittelwerte + SEM von 8 verschiedenen Spendern dargestellt.

Um eine mögliche Veränderung der IL-10-Konzentration durch Inkubation der B-CLL-Zellen mit den verschiedenen Antidepressiva nachzuweisen wurde mit Hilfe eines ELISA die IL-10-Konzentration im Überstand gemessen. Nach 24 h Inkubation der malignen Zellen ließ sich im Vergleich zur Kontrolle eine Erhöhung der IL-10-Konzentration im Zellüberstand nachweisen (Abbildung 23). Ein signifikanter Unterschied mit der Kontrolle ($21,0 \pm 7,8$ pg/ml) ergab sich nur bei Inkubation der Zellen mit $5 \mu\text{g/ml}$ Fluoxetin ($33,9 \pm 11,8$ pg/ml; $p = 0,035$).

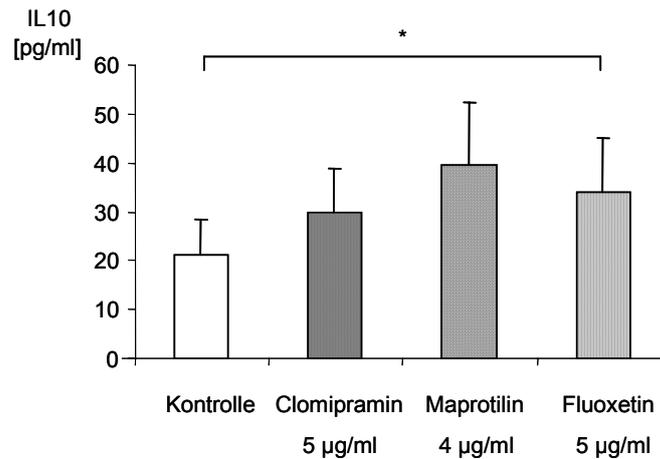


Abbildung 23: IL-10-Konzentration im Überstand nach Inkubation mit Antidepressiva. 5×10^6 Zellen/ml wurden über 24 h mit Antidepressiva inkubiert. Anschließend wurde mittels ELISA die Menge von IL-10 in pg/ml gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte + SEM von 8 verschiedenen Spendern dargestellt.

Anschließend wurde die Wirkung eines neutralisierenden IL-10-Antikörpers auf die Caspase-3-Aktivität der B-CLL-Zellen untersucht. 5×10^6 /ml B-CLL-Zellen wurden über 24 h mit verschiedenen Antidepressiva unter Gegenwart eines neutralisierenden IL-10-Antikörpers inkubiert. Die mit Hilfe eines colorimetrischen Assays gemessene Caspase-3-Aktivität zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Ansätzen mit oder ohne IL-10-Blockade ($p > 0,05$; $n = 5$ Spender; keine Abbildung).

3.3. Nachweis der induzierten Apoptose durch DNA-Fragmentation

Als weiterer qualitativer Nachweis der induzierten Apoptose wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt um eine für Apoptose charakteristische DNA-Fragmentation darzustellen. Die B-CLL-Zellen wurden über 72 h mit den apoptoseinduzierenden Substanzen inkubiert. Anschließend wurde die DNA isoliert und die Fragmente nach ihrer Größe mit Hilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Visualisierung der DNA-Leiter erfolgte nach Anfärbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht. Die DNA der Kontrolle, die aus unbehandelten CLL-Zellen isoliert wurde, zeigte keine für Apoptose typische Fragmentierung. Inkubation der Zellen mit cAMP-erhöhenden Substanzen und mit Antidepressiva induzierte dagegen eine für Apoptose beweisende DNA-Leiter (Abbildung 24).

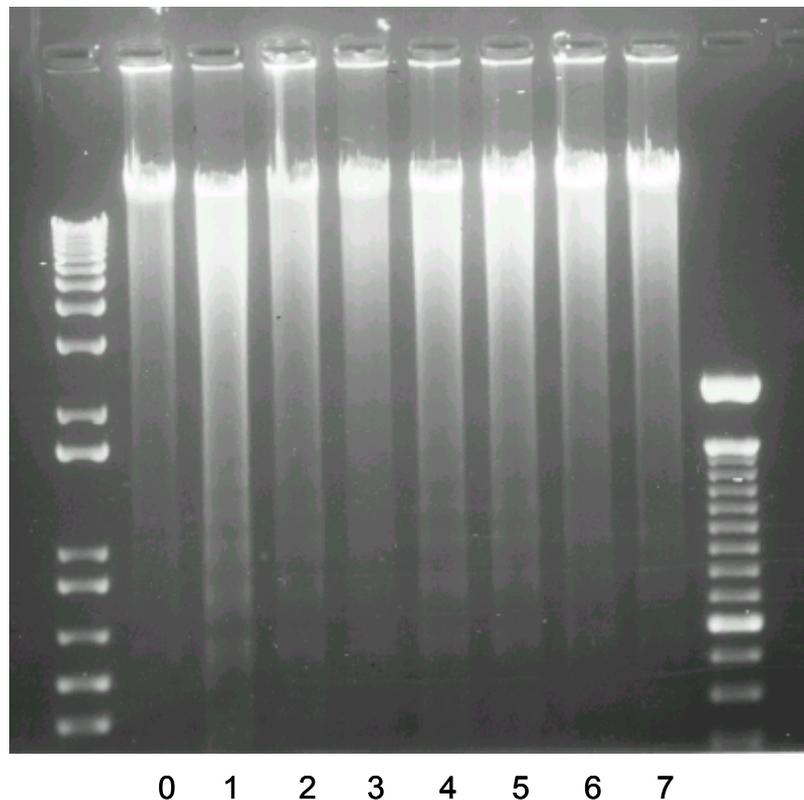


Abbildung 24: Induzierte DNA-Fragmentation durch Inkubation der CLL-Zellen über 72 h mit cAMP-erhöhenden Substanzen und mit Antidepressiva. Die Kontrolle zeigte keine charakteristische DNA-Leiter während Fludarabin und die zu untersuchenden Substanzen eine deutliche DNA-Fragmentierung induzierten. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel von insgesamt 10 untersuchten Patientenproben. **0)** Kontrolle, **1)** Fludarabin 1,7 μ M, **2)** Suprarenin 10 μ g/ml, **3)** Terbutalin 100 ng/ml, **4)** Iloprost 1350 pg/ml, **5)** Clomipramin 5 μ g/ml, **6)** Maprotilin 4 μ g/ml, **7)** Fluoxetin 5 μ g/ml

3.4. FACS-Kinetik

Frühapoptotische Zellen zeigten eine positive Annexin V-FITC Fluoreszenz, während spätapoptotische Zellen Annexin V- und PI-positiv zur Darstellung kommen. Bei den Auswertungen der durchflusszytometrischen Messung wurden sowohl die früh- als auch die spätapoptotischen Zellen, die als Annexin V- und PI-positiv zur Darstellung kommen, in die Messung miteinbezogen. Mit Hilfe mehrerer durchflusszytometrischen Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde nachgewiesen, dass die spätapoptotischen Zellen zu keinem Zeitpunkt PI aufnehmen, ohne vorher eine Annexin V-FITC-Fluoreszenz zu zeigen (Abbildung 25). Dargestellt wurde die Kinetik der durch Clomipramin (5 µg/ml) induzierten Apoptose (Patient 50). Die CLL-Zellen, die mit der Mediumkontrolle bzw. mit den weiteren untersuchten Substanzen inkubiert wurden, zeigen einen ähnlichen Verlauf der Messungen.

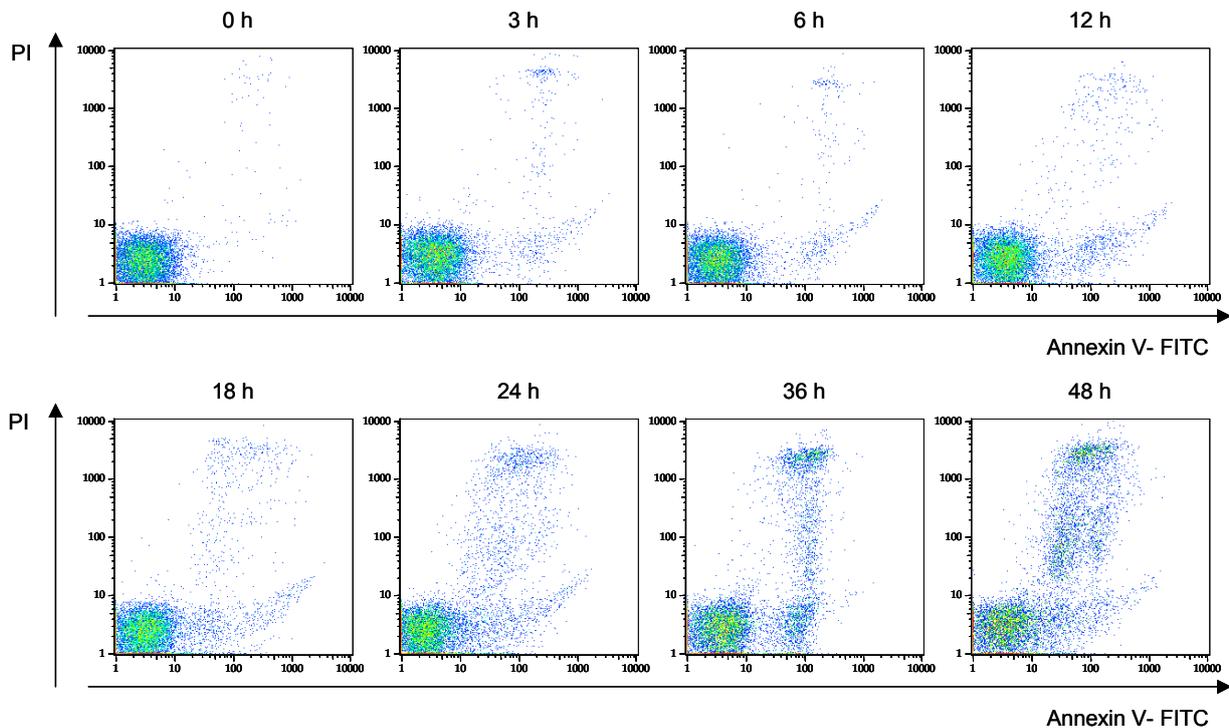


Abbildung 25: Durchflusszytometrische Messungen der durch Clomipramin induzierten Apoptose zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 3, 6, 12, 18, 24, 36 und 48 h). Die x-Achse stellt die Annexin V-FITC-, die y-Achse die PI-fluoreszierenden Zellen dar. Frühapoptotische Zellen sind allein mit Annexin V markiert und wandern im weiteren Verlauf in den Annexin V-/ PI-positiven Bereich.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die apoptoseinduzierende Wirkung von cAMP-erhöhenden Substanzen und von Antidepressiva auf B-CLL-Zellen *in vitro* untersucht. Die Apoptoserate der aus Patientenblut isolierten B-CLL-Zellen wurde mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Messung quantitativ bestimmt. Die vorliegenden Ergebnisse einer Induktion von Apoptose wurden durch die Darstellung einer DNA-Leiter während einer Gelelektrophorese untermauert. Um den Vorgang der Apoptoseaktivierung durch die verschiedenen Substanzen nachvollziehen zu können wurden eine Caspase-Abhängigkeit, die Expression apoptoseregulierender Proteine (Bcl-2, Bax und p53) mittels Western Blot sowie die Rolle von Interleukin-10 näher untersucht.

4.1.1. Apoptoseinduktion durch cAMP-erhöhende Substanzen

Die cAMP-erhöhenden Substanzen Iloprost, Suprarenin und Terbutalin können dosisabhängig Apoptose bei B-CLL-Zellen induzieren. Die Kombination von Iloprost mit dem β_2 -Sympathomimetikum Suprarenin erhöhte die Apoptoserate signifikant im Sinne einer synergistischen Wirkung. Dieser Effekt einer Steigerung der apoptotischen Zellzahl war bei der Zugabe von Terbutalin zu Iloprost nicht signifikant. Durch die Kombination von Iloprost mit Rolipram konnte ebenfalls ein nicht signifikanter Anstieg der Apoptoserate erreicht werden. Inkubation der Zellen mit den β_2 -Sympathomimetika unter Gegenwart von Rolipram führte dagegen zu einer signifikanten synergistischen Steigerung der Apoptoserate.

Des Weiteren wurde eine Abhängigkeit der durch die cAMP-erhöhenden Substanzen induzierten Apoptose von Caspasen untersucht. Durch die Zugabe des Pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk ließ sich die Apoptoserate dosisabhängig reduzieren. Die während eines colorimetrischen Assays gemessene Caspase-3-Aktivität wurde durch Inkubation der leukämischen Zellen mit den β_2 -Sympathomimetika nicht gesteigert. Bei Zugabe von Suprarenin ließ sich im Gegenteil sogar eine signifikante Abnahme der Caspase-3-Aktivität nachweisen. Schon bei Zugabe einer niedrigen Konzentration von z-VAD-fmk wurde die Caspase-3-Aktivität maximal gehemmt.

Um die Auswirkungen auf apoptoseregulierende Proteine zu überprüfen wurde die Bcl-2/Bax-Ratio und die Expression von p53 nach Inkubation der Zellen mit Suprarenin und Terbutalin bestimmt. Der Quotient konnte durch die Inkubation mit β_2 -Sympathomimetika oder Fludarabin nicht zu Gunsten der proapoptotischen Proteine signifikant gesenkt werden. Im Gegensatz zu Fludarabin bewirkte die Inkubation der Zellen mit β_2 -Sympathomimetika eine signifikante Erhöhung der p53-Expression.

Außerdem wurde der Einfluss von IL-10 auf Apoptoseinduktion durch cAMP-erhöhende Substanzen untersucht. Unter Anwesenheit von Suprarenin, Terbutalin und Iloprost ließ sich im Vergleich zur Kontrolle eine Erhöhung der IL-10-Konzentration im Überstand mit Hilfe eines ELISA messen. Unter Zugabe eines neutralisierenden IL-10-Antikörpers zum Inkubationsansatz mit β_2 -Sympathomimetika konnte eine signifikante Steigerung der Apoptoserate erreicht werden. Eine IL-10-Blockade hatte jedoch keinen Einfluss auf die Caspase-3-Aktivität der B-CLL-Zellen.

4.1.2. Apoptoseinduktion durch Antidepressiva

Auch die verschiedenen untersuchten Stoffgruppen mit antidepressiver Wirkung konnten bei B-CLL-Zellen vermehrt Apoptose induzieren. Allein Lithium zeigte keine Wirkung auf die malignen Zellen. Bei dem trizyklischen Antidepressivum Clomipramin wurde zusätzlich ein Synergismus mit dem Chemotherapeutikum Fludarabin als auch mit dem PDE4-Inhibitor Rolipram untersucht. Hier konnte im Vergleich zur Inkubation der Zellen mit den Substanzen alleine, durch die Kombination eine signifikante Steigerung von Apoptose erreicht werden.

Die Zugabe von z-VAD-fmk reduzierte die durch Clomipramin induzierte Apoptose deutlich. Dagegen wurde die Apoptoserate bei Inkubation der Zellen mit Maprotilin und Fluoxetin unter Caspasehemmung kaum erniedrigt. Hier lag die Anzahl der apoptotischen Zellen sogar unter Anwesenheit der maximalen Konzentration z-VAD-fmk noch über der spontanen Apoptoserate der B-CLL-Zellen. Bei Inkubation der Zellen mit Antidepressiva konnte keine Steigerung der Caspase-3-Aktivität erzielt werden. Die Caspase-3-Aktivität ließ sich jedoch unter Gegenwart des Pan-Caspase-Inhibitors schon in niedriger Konzentration signifikant hemmen.

Die Zugabe von Antidepressiva konnte die Bcl-2/Bax-Ratio nur in geringem Maße verringern. Im Western Blot zeigte sich jedoch eine gesteigerte Expression von p53 unter Inkubation mit Antidepressiva, bei Clomipramin und Fluoxetin war der Unterschied zur Kontrolle signifikant.

Inkubation mit Antidepressiva erhöhte die IL-10-Konzentration im Überstand der B-CLL-Zellen. Hier wurde im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Erhöhung der Konzentration bei Inkubation mit Fluoxetin gemessen. Eine Blockade von IL-10 bewirkte eine Steigerung der Apoptoserate im Vergleich zum Ansatz ohne neutralisierenden IL-10-Antikörper. Eine IL-10-Blockade hatte jedoch keinen Einfluss auf die Caspase-3-Aktivität.

4.2. Diskussion der Methoden

4.2.1. *In vitro*-Zellkultur von B-CLL-Zellen

Ein hoher Anteil der aus peripherem venösen Blut isolierten B-CLL-Zellen neigt *in vitro* trotz Inkubation mit FCS zu spontaner Apoptose. Collins und Mitarbeiter konnten nach 30 h spontane Apoptoseraten von bis zu 20 % messen, unabhängig von der Zellkonzentration der Kultur und T-Zell-Depletion (Collins et al., 1989). So wurden auch in der vorliegenden Arbeit spontane Apoptoseraten von bis zu 40 % nachgewiesen. Vermutlich führt der Verlust von parakrinen Faktoren unter *in vitro*-Kultur zu diesem apoptotischen Zelltod, wohingegen *in vivo* gerade diese extrinsischen Faktoren für die Akkumulation der malignen Zellen verantwortlich sind (McConkey et al., 1991; Robertson et al., 1993). Diese Hypothese eines protektiven Effekts durch antiapoptotische Faktoren *in vivo* konnte durch Bomstein und Mitarbeiter untermauert werden (Bomstein et al., 2003). Durch Zugabe von autologem Serum, bzw. autologen T-Zellen zu unfraktionierten B-CLL-Zellen, konnte die spontane Apoptoserate ($23,0 \pm 12,1$ % Annexin V positive Zellen) bis zu 35 % gesenkt werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Collins und Mitarbeitern führte eine Erhöhung der Zelldichte, sowie ein größerer Anteil von T-Lymphozyten zu einer erniedrigten Apoptoserate. Daher sind wohl neben extrinsischen Faktoren auch Interaktionen zwischen den B-CLL-Zellen und autokrine Sekretion von antiapoptotischen Faktoren verantwortlich für eine Akkumulation funktionsunfähiger B-CLL-Zellen *in vivo*.

Das von T-Zellen sezernierte Interleukin (IL)-4 schützt die B-CLL-Zellen vor Apoptose. Die Expression von IL-4-Rezeptoren ist auf den malignen Zellen im Vergleich zu normalen B-Zellen erhöht (Douglas et al., 1997). Auch IL-6 (Nilsson et al., 1992; Reittie et al., 1996), IL-8 (Francia di Celle et al., 1996), das von Th2-Helferzellen sezernierte IL-13 (Chaouchi et al., 1996) sowie die Interferone α (Panayiotidis et al., 1994) und γ (Buschle et al., 1993) gelten als antiapoptotische Faktoren *in vitro*. Die Wirkung von IL-10 auf Apoptose bei B-CLL-Zellen ist noch nicht vollständig geklärt. Vermutlich fördert auch dieses Zytokin das Überleben der malignen Zellen (Jurlander et al., 1997; Kitabayashi et al., 1995).

Dennoch hat sich die Isolation von mononukleären Zellen aus geringen Mengen peripheren venösen Blutes von B-CLL-Patienten für die *in vitro*-Zellkultur etabliert. Damit ist eine gute Reproduzierbarkeit gegeben und die Ergebnisse können mit denen anderer Arbeitsgruppen verglichen werden.

4.2.2. Messung der Apoptose

Die durchflusszytometrische Messung von Apoptose ermöglicht im Gegensatz zu klassischen Analysemethoden, wie der mikroskopischen Analyse der Zellmorphologie die schnelle, sensitive und objektive Messung der Prozentzahl apoptotischer Zellen. Da die Methode leicht reproduzierbar ist und die Ergebnisse mit denen klassischer DNA-

Fragmentationsnachweise eng korrelieren (Nicoletti et al., 1991), wird die Technik der durchflusszytometrischen Messung bevorzugt zur quantitativen Analyse von Zellüberleben verwendet (Carbonari et al., 1995; Darzynkiewicz et al., 1992).

Um die quantitative Messung apoptotischer Zellen mit Annexin V- und PI-Doppelfärbung zu bestätigen wurde zusätzlich ein weiterer Nachweis für Apoptose, die Gelelektrophorese, erbracht. Die beiden Methoden basieren auf dem Aufzeigen unterschiedlicher morphologischer Veränderungen im Rahmen des programmierten Zelltodes.

Die durchflusszytometrische Messung von Apoptose beruht auf Veränderungen der Zusammensetzung der Zellhülle und ist unabhängig von dem apoptoseinduzierenden Stimulus (Martin et al., 1995). Die physiologische Zellmembranasymmetrie wird im frühen Stadium des apoptotischen Zelltodes aufgehoben und Phosphatidylserin wird an die Membranaussenseite exponiert (van Engeland et al., 1998). Annexin V kann nun spezifisch an dieses Phospholipid binden (Martin et al., 1995) und die apoptotische Zelle markieren. Spätapoptotische bzw. nekrotische Zellen, die auf Grund eines erschöpften ATP-Speichers ihre Membranintegrität verloren haben, werden mit dem Farbstoff PI gegengefärbt und können so differenziert werden. Die vorliegenden Ergebnisse sind Messwerte von Annexin V- und PI-doppeltpositiven Zellen, da diese Messung sich für die Gesamtheit der Zellen als repräsentativer herausstellte als die Messung der Annexin V einfach positiven Zellen. Daher wurde zusätzlich eine Kinetik der durchflusszytometrischen Messung durchgeführt um nachzuweisen, dass die Zellen zu keinem Zeitpunkt PI aufnehmen ohne sich vorher als Annexin V positiv darzustellen.

Der Apoptosenachweis durch die Darstellung einer typischen DNA-Leiter beruht dagegen auf spätapoptotischen morphologischen Veränderungen der Zelle und wird daher erst nach 72 h durchgeführt. Endonucleasen spalten die DNA einer apoptotischen Zelle in Fragmente von 180 Basenpaaren (Wyllie, 1980). Diese wandern im Gegensatz zu nativer DNA im elektrischen Feld und lassen sich mit Ethidiumbromid darstellen. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente gilt als qualitativ eindeutiger Nachweis für Apoptose. Eine quantitative Aussage ist jedoch nur eingeschränkt möglich. In den letzten Jahren wurde Apoptose auch ohne erkennbare DNA-Fragmentierung morphologisch nachgewiesen, sodass die Darstellung einer DNA-Leiter zur Sicherung von Apoptose nicht mehr unbedingt erfolgen muss (Tomei et al., 1993; Walker and Sikorska, 1997).

4.3. Bewertung der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur

4.3.1. Apoptoseinduktion durch intrazelluläre Erhöhung von cAMP

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppen um Daniel, Coffino und McConkey zeigen, dass cAMP-Erhöhung zu apoptotischen Zellveränderungen führen kann (Coffino et al., 1975; Daniel et al., 1973; McConkey et al., 1990). Jedoch kann die cAMP-abhängige Protein-

kinase A je nach Zelltyp sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirken. In normalen ruhenden B-Zellen führt eine Erhöhung des intrazellulären cAMP zu Apoptose, doch die Wirkung von cAMP auf B-CLL-Zellen ist ungeklärt (Franklin and McCubrey, 2000). Bei der CLL ist jedoch der cAMP-Spiegel in Plasma, Urin und intrazellulär erniedrigt (Peracchi et al., 1983). Dies ist wohl auf einen defekten β_2 -Adrenorezeptor-Adenylatzyklase-Komplex der Zellmembran der CLL-Zelle zurückzuführen (Hallek et al., 1991; Kamp et al., 1997; Paietta and Schwarzmeier, 1983; Sheppard et al., 1977).

Das PGI₂-Analogon Iloprost führt in glatten vaskulären Muskelzellen über Stimulation des IP-Rezeptors zu cAMP-Erhöhung und Vasodilatation (Breyer et al., 2001). Durch die Prostazyklinanaloge Cicaprost und Iloprost konnte über cAMP-Erhöhung eine Hemmung der TNF- α -Synthese erreicht werden (Eisenhut et al., 1993). Hatae und Mitarbeiter wiesen erstmals eine proapoptotische Wirkung von Prostazyklin (PGI₂) nach (Hatae et al., 2001). Stimulation des IP-Rezeptors durch Iloprost führt zu Adenylatzyklaseaktivierung und cAMP-abhängiger Phosphorylierung der Proteinkinase A (PKA). Dadurch werden die Ras (oncogene p21)-ERK (extracellular signal-regulated kinase)-Kaskade und die zelluläre Proliferation gehemmt (Cook and McCormick, 1993; Hayes et al., 1999). Li und Mitarbeiter zeigten, dass 1 μ mol/l Iloprost über PKA-Aktivierung die basale ERK-Phosphorylierung von glatten Muskelzellen hemmt (EC₅₀ ~10nmol/l). Außerdem induziert Iloprost cAMP-abhängig Apoptose durch Inaktivierung von MEK (Mitogen-activated protein kinase). Die durch Iloprost erhöhte Caspase-3-Aktivität (mit EC₅₀-Werten im niedrigen nanomolaren Konzentrationsbereich) wurde durch Adenylatzyklaseinhibitoren reduziert. Über Inhibition der MEK konnten die Effekte von Iloprost nachgeahmt werden. Dagegen zeigte Iloprost keine Wirkung auf die Proteinkinase C (PKC), SAPK (stress-activated protein kinase) oder p38 (Li et al., 2004). In dieser Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass Iloprost auch in B-CLL-Zellen dosisabhängig Apoptose induziert. Für das Prostazyklinanalogon Cicaprost wurde im Zusammenhang einer Suppression der TNF-Synthese eine synergistische Wirkung mit dem PDE-Inhibitor Rolipram nachgewiesen (Greten et al., 1996; Siegmund et al., 1997). Eine mögliche synergistische Wirkung von Iloprost mit Rolipram konnte jedoch im Hinblick auf eine Steigerung der Apoptoserate bei CLL nicht reproduziert werden. Bisher konnte eine Korrelation zwischen cAMP-Spiegel und Apoptoseinduktion noch nicht eindeutig nachgewiesen werden (Mentz et al., 1999; Sarfati et al., 2003) und die Arbeitsgruppe um Barragan zeigte, dass eine Hemmung der PDE unter anderem auch zu Akkumulation von cGMP und darauf folgender Aktivierung der Proteinkinase G führt (Barragan et al., 2003).

In dieser Arbeit wurde auch für Suprarenin und für das kurzwirksame β_2 -Sympathomimetikum Terbutalin eine dosisabhängige Apoptoseinduktion bei B-CLL nachgewiesen. Eine synergistische Wirkung auf eine Steigerung der Apoptoserate konnte durch die Kombination von Terbutalin mit Iloprost nicht nachgewiesen werden. Gu und Mitarbeiter induzierten durch Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen Terbutalin (100 μ M, 300 μ M und 1 mM) Apoptose cAMP-unabhängig in S49 T-Zellen (Gu et al., 2000). Eine andere Arbeitsgruppe wies dagegen nach, dass die cAMP-

abhängige PKA essentiell für Apoptoseinduktion durch Betarezeptorstimulation in S49 T-Zellen ist (Yan et al., 2000). Mamani-Matsuda und Kollegen wiesen für die langwirkenden β_2 -adrenergen Substanzen Formoterol und Salmeterol eine apoptoseinduzierende Wirkung auf B-CLL-Zellen nach, während das kurzwirksame β_2 -Sympathomimetikum Salbutamol keinen Effekt auf Apoptose zeigte. Auch hier wurde die Apoptoserate unabhängig von cAMP-Erhöhung oder Hemmung des β_2 -Rezeptors gesteigert. Es wurde angenommen, dass die lipophilen Substanzen Formoterol und Salmeterol in die Plasmamembran inserieren, die Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen beeinflussen und auf diese Weise Apoptose induzieren (Mamani-Matsuda et al., 2004).

In dieser Arbeit konnte sowohl für Suprarenin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) als auch für Terbutalin (2,7 nM, 27 nM) eine synergistische Wirkung mit Rolipram nachgewiesen werden.

4.3.2. Apoptoseinduktion durch Antidepressiva

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Antidepressiva von unterschiedlicher Struktur und Wirkung auf das Monoaminsystem in Hinblick auf eine mögliche Apoptoseinduktion bei CLL untersucht. Xia und Mitarbeiter konnten nach Inkubation von peripheren Lymphozyten mit den trizyklischen Antidepressiva Imipramin (50 μM) und Clomipramin (15 μM , 20 μM) eine Induktion von Apoptose mit verschiedenen Methoden nachweisen. Vor allem CD8-positive T-Zellen sind sensitiv gegenüber Apoptoseinduktion, während das Überleben normaler B-Zellen kaum beeinflusst wird (Xia et al., 1998; Xia et al., 1997). Trizyklische Antidepressiva vermindern die Überlebensrate von Monozyten und Lymphozyten. Die Arbeitsgruppe um Hansson konnte elektronenmikroskopisch eine für Apoptose typische Zellkernfragmentierung nachweisen (Xia et al., 1997). Martensson und Kollegen zeigten, dass trizyklische Antidepressiva die Transformation reifer Lymphozyten zu Blasten hemmen (Xia et al., 1997). Inkubation von peripheren Monozyten mit 40 $\mu\text{mol}/\text{l}$ Clomipramin oder 100 $\mu\text{mol}/\text{l}$ Imipramin hemmt auch die Differenzierung von humanen Monozyten zu phagozytierenden Zellen (Ying et al., 2002). Nun konnte bei CLL-Zellen eine proapoptotische Wirkung sowohl bei Inkubation mit trizyklischen Antidepressiva (0,17 μM und 1,7 μM Clomipramin, 0,15 μM und 1,5 μM Imipramin) als auch mit dem tetrazyklischen Antidepressivum Maprotilin (0,12 μM , 1,2 μM) nachgewiesen werden. Auch der SSRI (selective Serotonin-reuptake-inhibitor) Fluoxetin (0,17 μM , 1,7 μM) und das atypische Antidepressivum Trazodon mit dualserotoninerger Wirkung (0,32 μM , 3,2 μM) induzierten mit Konzentrationen im therapeutisch einsetzbarem Bereich potent Apoptose bei CLL-Zellen. Fluoxetin erhöht ab Konzentrationen von 20 μM die Apoptoserate von Burkitt-Lymphomzellen (Serafeim et al., 2003). Serafeim und Mitarbeiter wiesen eine vermehrte Annexin V-Bindung, die Spaltung des Caspase-Substrats PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase), vermehrte Chromatinkondensation und einen Verlust des Transmembranpotentials der Mitochondrien nach Inkubation mit verschiedenen SSRIs nach. Normale PBMCs waren dagegen resistent gegenüber SSRI-induzierter Apoptose. Auch in Jurkatzellen führt die Inkubation mit 20 μM Fluoxetin bzw. 100 μM Imipramin innerhalb 24h zu gesteigerter

Apoptoseinduktion (Koch et al., 2003). Die beiden Substanzen steigern die Expression von CREB (cyclic AMP response element-binding protein), einem Substrat von cAMP. Es wurde jedoch keine Korrelation zwischen induzierter Apoptoserate und cAMP-abhängiger Phosphorylierung von CREB festgestellt. Nässberger und Kollegen konnten eine Erhöhung des intrazellulären cAMP nach Inkubation der PBMC mit Clomipramin oder Imipramin über 24 Stunden unter Vorstimulation der T-Zellen mit Phytohämagglutinin (PHA) bzw. der Monozyten mit Lipopolysaccharid (LPS) nachweisen (Xia et al., 1996b).

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich ein synergistischer Effekt des trizyklischen Antidepressivums Clomipramin mit dem PDE-Inhibitor Rolipram, der über cAMP-Erhöhung Apoptose induziert. Der Mechanismus dieser durch trizyklische Antidepressiva ausgelösten cAMP-Erhöhung ist jedoch unbekannt (Kubera et al., 2001).

Die Wirkung des monovalenten Kations Lithium auf Zellviabilität und -wachstum ist abhängig von der eingesetzten Konzentration. In niedriger Konzentration stimuliert Lithium das Wachstum von HL-60-Zellen, während es in hoher Konzentration (>10 mM) zytotoxisch wirkt. 10 mM Lithium induzierten in HL-60-Zellen zeit- und konzentrationsabhängig Apoptose (Madiehe et al., 1995). Auch D`Mello und Mitarbeiter wiesen eine gesteigerte Apoptoserate von unreifen zerebellären Granulosazellen nach Inkubation mit Lithium nach (D`Mello et al., 1994). Eine proapoptotische Wirkung auf CLL-Zellen konnte in dieser Arbeit für 1 mM Lithium nicht nachgewiesen werden. Rapaport und Kollegen zeigten, dass Lithium den cAMP-Spiegel *in vivo* und *in vitro* erniedrigt (Rapaport and Manji, 2001).

4.3.3. Die Rolle der Caspasen im Rahmen von Apoptoseinduktion bei B-CLL

Obwohl eine Hemmung der Caspasen die klassischen Veränderungen während Apoptose verhindern kann, gibt es zahlreiche Fälle, die zeigen, dass Zellen durch Caspaseinhibition nicht unbedingt vor dem Zelltod bewahrt werden können und trotzdem absterben, wenn auch langsamer und ohne die morphologischen (Kerr et al., 1972) und biochemischen Marker (Savill and Fadok, 2000), durch die Apoptose bisher definiert wurde. Mehrere Beispiele zeigen, dass auch unter Caspaseinhibition und klassischen apoptoseauslösenden Bedingungen ein Zelltod in verschiedenen Zelllinien induziert werden kann (Amarante-Mendes et al., 1998; Brunet et al., 1998; De Maria et al., 1997; Hirsch et al., 1997; McCarthy et al., 1997; Ohta et al., 1997; Sarin et al., 1997; Xiang et al., 1996). Auch in „Yeast cells“, die defizient für Caspasen sind, führt eine erhöhte Expression von Bax zu Zytolyse, während Bcl-2 eine zytoprotektive Wirkung entfaltet (James et al., 1997; Jurgensmeier et al., 1997). Daher ist es unwahrscheinlich, dass diese Beobachtungen lediglich als Folge einer inkompletten Caspaseinaktivierung auftreten. Déas und Mitarbeiter konnten bei peripheren T-Zellen, die durch anti-CD2-Antikörper und Staurosporin zu caspaseunabhängiger Apoptose induziert worden sind, typische „caspaseabhängige“ morphologische Veränderungen im Zytoplasma nachweisen: Während eines Verlusts des Transmembranpotentials der Mitochondrien

schrumpfen die Zellen unter Ausbildung von Membranvesikeln und Exposition von Phosphatidylserin an der Außenseite der Zellmembran. Obwohl das Kernchromatin nur teilweise kondensiert und die DNA nicht zwischen den Nucleosomen, sondern in größere Fragmente gespalten wird, bleiben nekrotische Veränderungen, wie Zellschwellung und Ruptur der Zellmembran aus (Deas et al., 1998). Der Pan-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk kann weder die Produktion von Sauerstoffradikalen (Hildeman et al., 1999) noch die Wanderung von Bax zu den Mitochondrien (Fitch et al., 2000) unter proapoptotischer Triggerung verhindern. Auch der Verlust des Transmembranpotentials der Mitochondrien ($\Delta\psi_m$) während Apoptoseinduktion (Borner and Monney, 1999) und die Freisetzung von Cytochrom C (Bossy-Wetzel et al., 1998) und von AIF (apoptosis-inducing-factor) aus dem Intermembranraum bleiben nicht aus (Susin et al., 1999b).

Ob unter proapoptotischen Bedingungen Apoptose vollständig ausgeführt werden kann, hängt von dem Energiezustand der Zelle ab (Kroemer and Reed, 2000). Die erhöhte Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran unter Induktion von Apoptose beeinträchtigt die vitalen bioenergetischen Funktionen der Mitochondrien. Durch Cytochrom C-Freisetzung wird die Atmungskette entkoppelt und die Produktion von Superoxidanionen mit folgender Zellschädigung gefördert. Doch die Bildung eines Apoptosoms und Caspaseaktivierung ist bei ATP-Mangel nicht mehr möglich. Apoptotische Signale führen jedoch auch zur Freisetzung von apoptosis-inducing-factor (AIF) und katabolischen Enzymen wie Arginase, Sulfinoxidase, Epoxidhydrolase und dem Lysozymhomologon AT2 (Patterson et al., 2000). AIF wandert zum Zellkern und spaltet die DNA ATP-unabhängig in große Fragmente von 50 kBp. Rekombinantes AIF triggert auch unter Anwesenheit von z-VAD-fmk Apoptose und die Injektion ins Zytosol führt *in vitro* zu DNA-Fragmentation, peripherer Chromatinkondensation, Exposition von Phosphatidylserin und Verlust des $\Delta\psi_m$ (Susin et al., 1999b).

Pettitt und Mitarbeiter zeigten, dass Caspasen zwar die Art des durch Purinanaloga induzierten Zelltodes bei CLL beeinflussen, nicht jedoch das Ausmaß von Apoptose. Der Pan-Caspaseinhibitor inhibiert durch Purinanaloga ausgelöste DNA-Fragmentierung und Spaltung von PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase), nicht jedoch eine induzierte Depolarisation der Mitochondrienmembran und Exposition des Phosphatidylserins (Pettitt and Cawley, 2000).

Die getesteten cAMP-erhöhenden Substanzen Suprarenin, Terbutalin und Iloprost konnten keine erhöhte Caspase-3-Aktivität in B-CLL-Zellen induzieren. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch dazu, dass die PDE-Inhibitoren Rolipram, Sildenafil und Vardenafil über cAMP-Erhöhung die Caspase-3-Aktivität steigern (Sarfati et al., 2003; Siegmund et al., 2001). Li und Mitarbeiter stellten eine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität in glatten Gefäßmuskelzellen durch Iloprost fest (Li et al., 2004).

Die Apoptoserate wurde durch Inkubation der Zellen mit dem Pan-Caspaseinhibitor z-VAD-fmk dosisabhängig erniedrigt. Daher triggern Suprarenin, Terbutalin und Iloprost Apoptose wohl nicht über Caspase-3-Aktivierung sondern über andere Effektorcaspasen. Eine cAMP-Erhöhung könnte zu proapoptotischen Veränderungen in den Mito-

chondrien führen, die dann eine Caspaseaktivierung einleiten. Dass cAMP-erhöhende Substanzen Apoptose über den internen Signalweg induzieren, zeigte die Arbeitsgruppe von Moon und Mitarbeitern. Apoptose durch den PDE-4-Inhibitor Rolipram oder durch den Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin wurde durch Caspase-9-Inhibition blockiert, nicht jedoch durch Anwesenheit eines Caspase-8-Inhibitors (Moon and Lerner, 2003).

Auch die verschiedenen Antidepressiva können keine erhöhte Caspase-3-Aktivität induzieren. Nur die mit Clomipramin induzierte Apoptoserate lässt sich durch z-VAD-fmk dosisabhängig reduzieren, während Maprotilin und Fluoxetin Apoptose wohl caspase-unabhängig induzieren. Xia und Mitarbeiter konnten dagegen eine erhöhte Caspase-3-Aktivität in humanen AML (akute myeloische Leukämie) -Zellen nach Inkubation der Zellen mit 80 μ M Imipramin und 35 μ M Clomipramin nachweisen. Caspase-3-Aktivierung führte zu einer vermehrten Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffradikalen. Die Zugabe von z-VAD-fmk reduzierte die durch die trizyklischen Antidepressiva induzierte Apoptose und Caspase-3-Aktivität (Xia et al., 1999).

Der Pan-Caspaseinhibitor z-VAD-fmk wird häufig zur Untersuchung von Caspaseabhängigkeit bei Apoptoseinduktion verwendet und wurde in der vorliegenden Arbeit in der bewährten Konzentration eingesetzt (Bellosillo et al., 2002; Marzo et al., 2001; Matteo et al., 1999; Stahnke et al., 2001; Stoetzer et al., 1999). Daher kann auch hier eine unvollständige Inhibition der Caspasen ausgeschlossen werden.

4.3.4. Expression der Proteine Bcl-2 und Bax nach Inkubation der CLL-Zellen mit apoptoseinduzierenden Substanzen

Bei der Induktion von Apoptose scheint die Interaktion zwischen Bcl-2 und Bax eine größere Rolle zu spielen als die absolute Konzentration von Bcl-2 in den malignen Zellen. In chemosensitiven B-CLL-Zellen induziert das Standardchemotherapeutikum Chlorambucil die Bax-Expression deutlich (Pepper et al., 1998). In chemoresistenten B-CLL-Zellen wiesen Pepper und Mitarbeiter dagegen einen erhöhten Bcl-2/Bax-Quotient nach (Pepper et al., 1996; Pepper et al., 1997). Die von der Arbeitsgruppe bestimmte LC_{50} von Chlorambucil, der Konzentration, bei der die Hälfte der Zellen sterben, korrelierte mit der Bcl-2/Bax-Ratio. Auch *in vitro*-Studien mit Fludarabin konnten zeigen, dass sich die Bcl-2/Bax-Ratio proportional zur Chemosensitivität und Apoptoserate der malignen Zellen verhält (Thomas et al., 1996). Inkubation der leukämischen Zellen mit Fludarabin führt *in vitro* zu einer gesteigerten Expression von Bax und einem erniedrigten Bcl-2-Spiegel (Siegmond et al., 2001). Zwischen Patienten, deren CLL-Zellen sensitiv oder resistent gegenüber Chlorambucil, Fludarabin oder 2-Chlorodeoxyadenosin sind, kann jedoch kein signifikanter Unterschied in der Bcl-2 Expression alleine nachgewiesen werden (Morabito et al., 1997).

Diese Ergebnisse widersprechen der Aussage von Johnston und Mitarbeitern, die keine Korrelation zwischen der Chemosensitivität von B-CLL-Zellen und der Expression

von Bcl-2 und Bax alleine bzw. der Bcl-2/Bax-Ratio nach Apoptoseinduktion durch Fludarabin, Cladribin und Fludarabinphosphat nachweisen konnten (Johnston et al., 1997). Kitada und Mitarbeiter konnten keine Korrelation zwischen der Expression Apoptose-regulierender Proteine und Erkrankungsstadien erkennen (Kitada et al., 1998).

Auch andere Arbeitsgruppen stellten in CLL-Zellen keine Induktion von Bax und Reduktion von Bcl-2 durch Fludarabin oder durch die Kombination von Fludarabin mit Cyclophosphamid und Mitoxantron fest (Bellosillo et al., 1999; Kitada et al., 1998). Die Chemotherapeutika führen nicht zu einer Steigerung der Gesamtzahl von Bax-Molekülen innerhalb der Zelle sondern zu caspaseunabhängiger Konformationsänderung des proapoptotischen Bax-Proteins und zu dessen Integration in die äußere Mitochondrienmembran (Bellosillo et al., 2002).

Auch in dieser Arbeit senkte keine der untersuchten Substanzen die Bcl-2/Bax-Ratio signifikant, es war lediglich eine Tendenz zu erhöhtem Bax- und erniedrigtem Bcl-2-Spiegel festzustellen.

4.3.5. Erhöhte Expression des Tumorsuppressorgens p53 durch apoptoseinduzierende Substanzen

In den letzten Jahren wurde der Mechanismus der p53-induzierten Apoptose näher untersucht (Burns and El-Deiry, 1999; Lowe, 1995). Das Tumorsuppressorgen p53 triggert Apoptose abhängig von Apaf-1 und Caspase-9 über Transkriptionsaktivierung von verschiedenen Zielgenen (Soengas et al., 1999) und kann so die Sensibilität von malignen Zellen gegenüber Chemotherapie erhöhen. Zu diesen Zielgenen zählen Proteine der TNF-Rezeptorfamilie, wie Fas/Apo-1 (Owen-Schaub et al., 1995) oder auch TRAIL (Sheikh et al., 1998; Wu et al., 1997), die über den externen Signalweg Apoptose induzieren, sowie die Proteine der Bcl-2 Familie, die den internen proapoptotischen Signalweg regulieren. p53 erhöht die Expression von Bax und erniedrigt die Transkriptionsaktivierung von Bcl-2 (Miyashita and Reed, 1995; Pearson et al., 2000). Oda und Mitarbeiter identifizierten das BH3-only-Protein Noxa, dessen Expression auch durch p53 induziert wird und das die Wirkung von Bcl-2 antagonisiert (Oda et al., 2000). In Bax-defizienten Mäusethymozyten verläuft eine durch DNA-Schädigung induzierte Apoptose normal, während p53-knockout-Mäuse auch bei Expression eines Bax-Transgens resistent gegenüber Apoptoseinduktion bleiben (Knudson et al., 1995). Das Tumorsuppressorgen p53 wird *in vitro* nach Inkubation mit verschiedenen Chemotherapeutika stabilisiert und vermehrt exprimiert. So können Chlorambucil und das Purinanalogon Fludarabin (Bellosillo et al., 1999; de la Fuente et al., 2003; Johnston et al., 1997) als auch die Kombination aus Fludarabin, Cyclophosphamid und Mitoxantron (Bellosillo et al., 1999) p53 potent induzieren. Achanta und Mitarbeiter zeigten, dass Purinanaloge p53 durch Interaktion mit dem p53/DNA-PK-Komplex aktivieren (Achanta et al., 2001). Caspaseinhibition verhindert die Stabilisierung des p53-Proteins nicht, daher geht die Induktion von p53 wohl einer Caspaseaktivierung voraus. Inkubation von CLL-Zellen mit dem Kortikoid Dexamethason konnte jedoch das p53-Protein nicht

aktivieren, sodass p53 wohl nicht essentiell für Apoptoseinduktion ist und auch p53-unabhängige Signalwege existieren müssen (Bellosillo et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde eine signifikante Induktion von p53 in B-CLL-Zellen durch die β_2 -Sympathomimetika Suprarenin und Terbutalin gezeigt.

Trizyklische Antidepressiva erniedrigen die Expression von Bcl-2 und erhöhen die Anzahl von Fas/Apo-1 Rezeptoren auf der Oberfläche von Lymphozyten (Xia et al., 1996a). In der vorliegenden Arbeit führt die Inkubation der malignen CLL-Zellen mit dem trizyklischen Antidepressivum Clomipramin und mit Fluoxetin zu einer signifikant erhöhten Expression von p53.

Für das Purinanalogon Fludarabin und das Antidepressivum Maprotilin konnte vermutlich auf Grund der geringen Fallzahl nur ein Trend in Richtung erhöhter p53-Expression nachgewiesen werden.

4.3.6. Die Rolle von Interleukin-10 im Rahmen der B-CLL

Das überwiegend von Th2-Helferzellen sezernierte Zytokin Interleukin-10 hemmt die Funktionen von Monozyten und Makrophagen (de Waal Malefyt et al., 1991) und fördert als autokriner Wachstumsfaktor das Wachstum und die Differenzierung von normalen B-Zellen (Burdin et al., 1995; Defrance et al., 1992; Rousset et al., 1992). Plate wies die autokrine Produktion von IL-10 auch durch B-CLL-Zellen nach (Plate et al., 1993). Im Serum von B-CLL-Patienten ist der IL-10-Spiegel im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht (Kitabayashi et al., 1995). Hinsichtlich der Wirkung von IL-10 auf das Überleben von B-CLL-Zellen liegen jedoch widersprüchliche Studienergebnisse vor. Fluckinger und Mitarbeiter zeigten 1993, dass IL-10 bei CD40-aktivierten B-CLL-Zellen Proliferation und Differenzierung induziert, während es bei nicht stimulierten B-CLL-Zellen Apoptose fördert (Fluckiger et al., 1993). Ein Jahr später wies die gleiche Arbeitsgruppe eine verminderte Überlebensrate und DNA-Synthese nicht stimulierter B-CLL-Zellen durch IL-10 *in vitro* nach (Fluckiger et al., 1994). Die Expression von IL-10-mRNA isolierter B-CLL-Zellen korreliert negativ mit Krankheitsprogression, wobei ausgeschlossen werden kann, dass eine mögliche Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion für diesen Unterschied zwischen frühen und fortgeschrittenen Erkrankungsstadien verantwortlich ist (Sjoberg et al., 1996). Die Arbeitsgruppe weist jedoch auf die Möglichkeit hin, dass gerade IL-10-positive B-CLL-Zellen sensitiv gegenüber einer Chemotherapie sein könnten, sodass in Patientenproben späterer Krankheitsstadien kaum noch IL-10-positive Zellen enthalten sind. Doch Castejon und Mitarbeiter zeigten, dass die Inkubation isolierter B-CLL-Zellen von Patienten früher Krankheitsstadien mit IL-10 zur Induktion von Apoptose führt, während IL-10 bei Zellen fortgeschrittener Krankheitsstadien keine Wirkung auf die Überlebensfähigkeit hat (Castejon et al., 1999). So ist wohl bestätigt, dass der Verlust der IL10-mRNA-Expression bei B-CLL-Zellen ein Zeichen für Krankheitsprogression darstellt, mit begleitender Abnahme der durch IL-10 induzierten Apoptoserate.

Jurlander und Kollegen konnten dagegen keine signifikante Wirkung von IL-10 auf die Induktion von Apoptose nach Inkubation frisch isolierter PBMC von B-CLL-Patienten nachweisen. Eher zeigte sich ein Trend in Richtung eines antiapoptotischen Effekts von IL-10 auf B-CLL-Zellen. Auch hemmte IL-10, ähnlich wie Interferon (IFN)- γ , eine durch Hydrocortison induzierte Apoptose signifikant (Jurlander et al., 1997). Der IL-10-Rezeptor gehört zu der gleichen Rezeptorfamilie wie auch die Rezeptoren von IFN- α und - γ (Schindler and Darnell, 1995). Rezeptorbindung führt zu Phosphorylierung von STAT-Proteinen genauso wie bei Stimulation mit den antiapoptotisch wirksamen Zytokinen IFN- α (Jewell et al., 1994) und IFN- γ (Buschle et al., 1993).

Versuche mit murinen CD5-positiven B-Zellen zeigten im Gegensatz zu normalen murinen B-Zellen eine Hemmung der Entwicklung durch Inkubation mit einem neutralisierenden IL-10-Antikörper (Ishida et al., 1992). Auch Kitabayashi konnte eine dosisabhängige antiapoptotische Wirkung von IL-10 bei B-CLL-Zellen nachweisen (Kitabayashi et al., 1995). Bei dieser Studie schützt IL-10 die leukämischen Zellen Bcl-2-unabhängig vor apoptotischem Zelltod und DNA-Fragmentation. Im Transmissionselektronenmikroskop bleiben die für Apoptose typischen morphologischen Veränderungen nach Inkubation der B-CLL-Zellen mit IL-10 aus. Die Zellgröße bleibt erhalten und eine Zellkernkondensation wird nicht sichtbar. Da die IL-10-Konzentration im Überstand von B-CLL-Zellen erhöht ist, wird vermutet, dass dieses Zytokin den B-CLL-Zellen als autokriner Wachstumsfaktor dient.

In der vorliegenden Arbeit wird die antiapoptotische Wirkung von IL-10 auf B-CLL-Zellen bestätigt. Inkubation der B-CLL-Zellen mit einem neutralisierenden IL-10-Antikörper führt zu einer Steigerung der Apoptoserate. Nur bei Inkubation der Zellen mit Maprotilin und Fluoxetin wurde kein signifikanter Unterschied sichtbar. IL-10 hatte keinen Einfluss auf die Caspase-3-Aktivität. Daher bleibt der genaue Wirkungsmechanismus der Inhibition von Apoptose weiterhin unklar.

Der antiapoptotische Effekt von IL-10 steht im Widerspruch dazu, dass die IL-10-Konzentration im Überstand der malignen Zellen nach Inkubation mit Iloprost und Terbutalin im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant erhöht war. Auch die Inkubation mit Fluoxetin erhöhte die IL-10-Konzentration. Andere Arbeitsgruppen konnten nach Inkubation mit trizyklischen Antidepressiva eine erhöhte intrazelluläre IL-10-Konzentration feststellen (Kubera et al., 2001; Maes et al., 1999; Szuster-Ciesielska et al., 2003). Die hier untersuchten trizyklischen Antidepressiva steigern dagegen die Synthese von IL-10 nicht signifikant. Die Synthese von Zytokinen ist allerdings unter dynamischen Bedingungen besser zu quantifizieren, daher wären nach Vorstimulation der B-CLL-Zellen mit polyklonalen Aktivatoren, wie LPS (Lipopolysaccharid) Veränderungen der IL-10-Produktion stärker zum Ausdruck gekommen (Cavaillon et al., 1990; Ocklind, 1986).

5. Zusammenfassung

Die chronische lymphatische Leukämie zählt mit 25 % aller Leukämien zu den häufigsten lymphatischen Erkrankungen der westlichen Welt. Die Erkrankung ist charakterisiert durch Akkumulation der CLL-Zellen auf Grund eines fehlerhaften Apoptosemechanismus. Trotz des Einsatzes von Purinanaloga oder von monoklonalen Antikörpern ist dieses niedrig maligne Non-Hodgkin-Lymphom weiterhin unheilbar. Im Mittelpunkt dieser experimentellen Arbeit steht die Untersuchung der apoptoseinduzierenden Wirkung von klinisch eingesetzten Substanzen gegenüber CLL-Zellen *in vitro*, um neue Therapieansätze zu überprüfen. Hintergrund der Arbeit ist die Beobachtung, dass eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels beispielsweise durch den spezifischen PDE-4-Inhibitor Rolipram Apoptose in CLL-Zellen induzieren kann. In dieser Arbeit wurden das Prostazyklinanalogon Iloprost und die β_2 -Sympathomimetika Suprarenin und Terbutalin eingesetzt um zu überprüfen, ob über diesen Wirkmechanismus die Apoptoserate von CLL-Zellen gesteigert werden kann.

Des Weiteren wurden die trizyklischen Antidepressiva Clomipramin und Imipramin, das tetrazyklische Antidepressivum Maprotilin, die atypischen Antidepressiva Trazodon und Fluoxetin sowie Lithium eingesetzt, da Untersuchungen zeigten, dass Antidepressiva eine regulierende Wirkung auf die Leukozytenfunktion ausüben.

Die induzierte Apoptoserate von isolierten humanen B-CLL-Zellen wurde nach Inkubation mit den cAMP-erhöhenden Substanzen und den Antidepressiva durchflusszytometrisch gemessen. Der Mechanismus der Apoptoseinduktion wurde in Abhängigkeit von Caspasen, von der Expression apoptoseregulierender Bcl-2-Proteine, von dem Tumorsuppressorgen p53 sowie von Interleukin-10 untersucht.

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

1. Das Prostazyklinanalogon Iloprost konnte die Apoptoserate von B-CLL-Zellen dosisabhängig steigern. Jedoch induzierte erst die der 10fachen therapeutischen Plasmakonzentration entsprechende Dosierung Apoptose signifikant. Auch die β_2 -Sympathomimetika Suprarenin und Terbutalin steigerten die Apoptoserate der CLL-Zellen signifikant.
2. Durch Zugabe von Suprarenin zu Iloprost konnte eine signifikante Steigerung der Apoptoserate beobachtet werden. Die Zugabe von Terbutalin oder dem PDE-4-Inhibitor Rolipram bewirkte dagegen keine gesteigerte Apoptoserate im Sinne einer synergistischen Wirkung der cAMP-erhöhenden Substanzen. Die Kombination aus Rolipram mit Suprarenin bzw. Terbutalin zeigte dagegen einen synergistischen Effekt auf die Induktion von Apoptose.

3. Es wurde ein dosisabhängiger Anstieg der Apoptoserate durch Inkubation der CLL-Zellen mit den trizyklischen Antidepressiva Clomipramin und Imipramin, dem tetrazyklischen Antidepressivum Maprotilin, dem atypischen Antidepressivum Trazodon und dem selektiven Serotoninwiederaufnahme-Hemmstoff Fluoxetin nachgewiesen. Kein Einfluss auf die Apoptoserate fand sich nach Inkubation mit Lithium.

4. Clomipramin zeigte sowohl in Kombination mit dem Purinanalogen Fludarabin als auch mit dem PDE-Inhibitor Rolipram eine signifikant gesteigerte Apoptoseinduktion.

5. Durch Inkubation der CLL-Zellen mit den geprüften Substanzen ließ sich keine Induktion der Caspase-3-Aktivität nachweisen. Die Apoptoserate konnte durch Zugabe eines Pancaspaseinhibitors dosisabhängig reduziert werden. Allein die durch Maprotilin und Fluoxetin induzierte Apoptose blieb unter Caspaseinhibition unverändert.

6. Nach Inkubation der CLL-Zellen mit den β_2 -adrenergen Substanzen bzw. den untersuchten Antidepressiva wurde ein Trend zu Verschiebung der Expression der pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteine gezeigt. Jedoch konnte keine signifikante Reduktion der Bcl-2/Bax-Ratio nachgewiesen werden. Die Expression des Tumorsuppressorgens p53 wurde durch die β_2 -adrenergen Agonisten und die Antidepressiva Clomipramin und Fluoxetin signifikant gesteigert.

7. Die antiapoptotische Wirkung von Interleukin-10 wurde durchflusszytometrisch bestätigt. Die Zugabe eines neutralisierenden IL-10-Antikörpers hatte jedoch keinen Einfluss auf die gemessene Caspase-3-Aktivität. Nach Inkubation der CLL-Zellen mit Terbutalin, Iloprost oder Fluoxetin wurde eine erhöhte IL-10-Konzentration im Überstand gemessen.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse eine Steigerung der Apoptoserate von CLL-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen cAMP-erhöhenden Substanzen und Antidepressiva. Dieser Effekt wird begleitet von einer erhöhten Expression des Tumorsuppressorgens p53 und von einer tendenziellen Reduktion der Bcl-2/Bax-Ratio zu Gunsten der proapoptotischen Proteine. Es liegen Hinweise vor, dass die cAMP-erhöhenden Substanzen und Antidepressiva Apoptose unabhängig von der Effektorcaspase-3 über den internen proapoptotischen Signalweg triggern. Caspaseunabhängige Signalwege sind bei Apoptoseinduktion durch Maprotilin und Fluoxetin möglich. Interleukin-10 übt eine antiapoptotische Wirkung auf CLL-Zellen aus.

Insgesamt können die untersuchten Wirkungen als Basis für eine therapeutische Steigerung der Apoptoserate bei Patienten mit CLL dienen. Dieser neue pharmakologische Ansatz könnte sich mit etablierten zytostatischen Therapieverfahren ergänzen.

6. Abkürzungen

$\Delta\psi_m$	Transmembranpotential
AIF	apoptosis inducing factor
AIHA	autoimmunhämolytische Anämie
AML	akute myeloische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
Apaf	apoptotic peptidase activating factor
Apo-1	CD 95, Fas-Rezeptor
Ara-A	Vidarabine, 9- β -D-arabinosyl-2-Fluoroadenin
ATP	Adenosintriphosphat
Av-HRP	Avidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat
Bax	bcl-2-associated X proteine
Bcl	B-cell lymphoma gene
BH	Bcl-homologe Domäne
BSA	Bovines Serumalbumin
CAD	caspase activated Dnase
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
CD	cluster of differentiation
CED-3	Caenorhabditis elegans Protein
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CREB	cyclic AMP response element binding protein
CRP	C-reaktives Protein
CSIF	cytokine synthesis inhibiting factor
dbcAMP	dibutyryl-cAMP
DED	death effector domain
dest.	destilliert
DEVD-p-NA	DEVD-p-Nitroanilin
DIABLO	direct IAP binding protein with low pI
DISC	death inducing signaling complex
DMSO	Dimethyl-sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EB	Ethidiumbromid
EC50	Effektive Konzentration, die 50 % der maximalen Wirkung auslöst oder bei der in 50 % der Fälle der erwartete Effekt eintritt
ECL	enhanced chemiluminescence
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
ERK	extracellular signal regulated kinase
FACS	fluorescence activated cell sorter
FADD	Fas-associated death domain protein
Fas	CD95, Apo-1, Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 6
FCS	Fötale Kälberserum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isozyanat
FLIP	FADD-like ICE-Inhibitorprotein
g	Zentripetalbeschleunigung der Erde
GADD	growth arrest and DNA damage
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-Ethanoesulfonsäure)
HRP	horseradish peroxidase

IAP	inhibitor of apoptosis protein
ICE	interleukin-1 β -converting enzyme
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
INN	international non-proprietary name
Jak	Janus kinase
LC50	Letale Konzentration, bei der 50 % der Zellen sterben
MEK	mitogen activated protein kinase
MFI	mean fluorescence intensity
MG	Molekulargewicht
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten
n	Anzahl
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
OD	optische Dichte
p	statistische Wahrscheinlichkeitskonstante
PAK 2	p21-aktivierte Kinase 2
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDE	Phosphodiesterase
PE	Phycoerithrin
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PI	Propidiumiodid
PKA/B	Proteinkinase A/B
PTP	permeability transition pore
PVDF	polyvinylidene fluoride
RAC	Proto-onkogen RAC
Rapl	regulator for cell adhesion and polarization enhanced in lymphoid tissues
Ras	retrovirus associated sequences
RNA	Ribonucleinsäure
s	Sekunden
SAPK	stress activated protein kinase
SDS	sodium-dodicyl-sulfat
SEM	standard error of mean
Smac	second mitochondria derived activator of caspases
SSRI	selective serotonin reuptake inhibitor
STAT	signal transducer and activator of transcription
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Elektrophorese-Puffer
Th	T-Helfer-Lymphozyten
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-R1	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand
TRAMP	TNF-receptor related apoptosis mediated protein
Tyk2	tyrosine kinase 2
UV	ultraviolett
VDAC	voltage dependent anion channel
z-VAD-fmk	Carbobenzoxymethyl-L-valyl-L-alanyl-L-aspartyl-L-[O-methyl]-fluoromethylketone

7. Literatur

Achanta, G., Pelicano, H., Feng, L., Plunkett, W., and Huang, P. (2001). Interaction of p53 and DNA-PK in response to nucleoside analogues: potential role as a sensor complex for DNA damage. *Cancer Res* 61, 8723-8729.

Adachi, M., Tefferi, A., Greipp, P. R., Kipps, T. J., and Tsujimoto, Y. (1990). Preferential linkage of bcl-2 to immunoglobulin light chain gene in chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 171, 559-564.

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

Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.

Amarante-Mendes, G. P., Finucane, D. M., Martin, S. J., Cotter, T. G., Salvesen, G. S., and Green, D. R. (1998). Anti-apoptotic oncogenes prevent caspase-dependent and independent commitment for cell death. *Cell Death Differ* 5, 298-306.

Angelopoulou, M. K., Kontopidou, F. N., and Pangalis, G. A. (1999). Adhesion molecules in B-chronic lymphoproliferative disorders. *Semin Hematol* 36, 178-197.

Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermoud, J. J., Mazzei, G., *et al.* (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277, 370-372.

Bannerji, R., and Byrd, J. C. (2000). Update on the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Oncol* 12, 22-29.

Barragan, M., Campas, C., Bellosillo, B., and Gil, J. (2003). Protein kinases in the regulation of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 44, 1865-1870.

Beavo, J. A. (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 75, 725-748.

Begleiter, A., Lee, K., Israels, L. G., Mowat, M. R., and Johnston, J. B. (1994). Chlorambucil induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and its relationship to clinical efficacy. *Leukemia* 8 *Suppl* 1, S103-106.

Bellosillo, B., Villamor, N., Colomer, D., Pons, G., Montserrat, E., and Gil, J. (1999). In vitro evaluation of fludarabine in combination with cyclophosphamide and/or mitoxantrone in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94, 2836-2843.

- Bellosillo, B., Villamor, N., Lopez-Guillermo, A., Marce, S., Bosch, F., Campo, E., Montserrat, E., and Colomer, D. (2002). Spontaneous and drug-induced apoptosis is mediated by conformational changes of Bax and Bak in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100, 1810-1816.
- Binet, J. L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Pigué, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., *et al.* (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48, 198-206.
- Boise, L. H., Minn, A. J., Noel, P. J., June, C. H., Accavitti, M. A., Lindsten, T., and Thompson, C. B. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3, 87-98.
- Bomstein, Y., Yuklea, M., Radnay, J., Shapiro, H., Afanasyev, F., Yarkoni, S., and Lishner, M. (2003). The antiapoptotic effects of blood constituents in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 70, 290-295.
- Boogaerts, M. A., Van Hoof, A., Catovsky, D., Kovacs, M., Montillo, M., Zinzani, P. L., Binet, J. L., Feremans, W., Marcus, R., Bosch, F., *et al.* (2001). Activity of oral fludarabine phosphate in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 19, 4252-4258.
- Borner, C., and Monney, L. (1999). Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ* 6, 497-507.
- Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, D. D., and Green, D. R. (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J* 17, 37-49.
- Boyd, J. M., Gallo, G. J., Elangovan, B., Houghton, A. B., Malstrom, S., Avery, B. J., Ebb, R. G., Subramanian, T., Chittenden, T., Lutz, R. J., and *et al.* (1995). Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* 11, 1921-1928.
- Boyum, A. (1968). Isolation of leucocytes from human blood. A two-phase system for removal of red cells with methylcellulose as erythrocyte-aggregating agent. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97, 9-29.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brady, L. S., Whitfield, H. J., Jr., Fox, R. J., Gold, P. W., and Herkenham, M. (1991). Long-term antidepressant administration alters corticotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase, and mineralocorticoid receptor gene expression in rat brain. Therapeutic implications. *J Clin Invest* 87, 831-837.
- Breyer, R. M., Bagdassarian, C. K., Myers, S. A., and Breyer, M. D. (2001). Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 661-690.

Brodde, O. E., Engel, G., Hoyer, D., Bock, K. D., and Weber, F. (1981). The beta-adrenergic receptor in human lymphocytes: subclassification by the use of a new radio-ligand, (+/-)-125 Iodocyanopindolol. *Life Sci* 29, 2189-2198.

Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J. I., Beach, D., Jacks, T., and Hannon, G. J. (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377, 552-557.

Brunet, C. L., Gunby, R. H., Benson, R. S., Hickman, J. A., Watson, A. J., and Brady, G. (1998). Commitment to cell death measured by loss of clonogenicity is separable from the appearance of apoptotic markers. *Cell Death Differ* 5, 107-115.

Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., and Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 269-290.

Buendia, B., Santa-Maria, A., and Courvalin, J. C. (1999). Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci* 112 (Pt 11), 1743-1753.

Bump, N. J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., Ferez, C., Franklin, S., Ghayur, T., Li, P., and et al. (1995). Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 269, 1885-1888.

Burdin, N., Van Kooten, C., Galibert, L., Abrams, J. S., Wijdenes, J., Banchereau, J., and Rousset, F. (1995). Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes. *J Immunol* 154, 2533-2544.

Burns, T. F., and El-Deiry, W. S. (1999). The p53 pathway and apoptosis. *J Cell Physiol* 181, 231-239.

Buschle, M., Campana, D., Carding, S. R., Richard, C., Hoffbrand, A. V., and Brenner, M. K. (1993). Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 177, 213-218.

Byrd, J. C., Peterson, B. L., Morrison, V. A., Park, K., Jacobson, R., Hoke, E., Vardiman, J. W., Rai, K., Schiffer, C. A., and Larson, R. A. (2003). Randomized phase 2 study of fludarabine with concurrent versus sequential treatment with rituximab in symptomatic, untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 9712 (CALGB 9712). *Blood* 101, 6-14.

Byrd, J. C., Waselenko, J. K., Keating, M., Rai, K., and Grever, M. R. (2000). Novel therapies for chronic lymphocytic leukemia in the 21st century. *Semin Oncol* 27, 587-597.

Cain, K., Bratton, S. B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D. G., Sun, X. M., and Cohen, G. M. (2000). Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* 275, 6067-6070.

- Callet-Bauchu, E., Salles, G., Gazzo, S., Poncet, C., Morel, D., Pages, J., Coiffier, B., Coeur, P., and Felman, P. (1999). Translocations involving the short arm of chromosome 17 in chronic B-lymphoid disorders: frequent occurrence of dicentric rearrangements and possible association with adverse outcome. *Leukemia* 13, 460-468.
- Capalbo, S., Trerotoli, P., Ciancio, A., Battista, C., Serio, G., and Liso, V. (2000). Increased risk of lymphoproliferative disorders in relatives of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: relevance of the degree of familial linkage. *Eur J Haematol* 65, 114-117.
- Carbonari, M., Cibati, M., and Fiorilli, M. (1995). Measurement of apoptotic cells in peripheral blood. *Cytometry* 22, 161-167.
- Casciola-Rosen, L., Nicholson, D. W., Chong, T., Rowan, K. R., Thornberry, N. A., Miller, D. K., and Rosen, A. (1996). Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J Exp Med* 183, 1957-1964.
- Castejon, R., Vargas, J. A., Romero, Y., Briz, M., Munoz, R. M., and Durantez, A. (1999). Modulation of apoptosis by cytokines in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry* 38, 224-230.
- Cavaillon, J. M., Fitting, C., Haeffner-Cavaillon, N., Kirsch, S. J., and Warren, H. S. (1990). Cytokine response by monocytes and macrophages to free and lipoprotein-bound lipopolysaccharide. *Infect Immun* 58, 2375-2382.
- Chao, D. T., Linette, G. P., Boise, L. H., White, L. S., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (1995). Bcl-XL and Bcl-2 repress a common pathway of cell death. *J Exp Med* 182, 821-828.
- Chaouchi, N., Wallon, C., Goujard, C., Tertian, G., Rudent, A., Caput, D., Ferrera, P., Minty, A., Vazquez, A., and Delfraissy, J. F. (1996). Interleukin-13 inhibits interleukin-2-induced proliferation and protects chronic lymphocytic leukemia B cells from in vitro apoptosis. *Blood* 87, 1022-1029.
- Chen-Levy, Z., and Cleary, M. L. (1990). Membrane topology of the Bcl-2 proto-oncogenic protein demonstrated in vitro. *J Biol Chem* 265, 4929-4933.
- Chen-Levy, Z., Nourse, J., and Cleary, M. L. (1989). The bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t(14;18) translocation. *Mol Cell Biol* 9, 701-710.
- Cheson, B. D., Bennett, J. M., Grever, M., Kay, N., Keating, M. J., O'Brien, S., and Rai, K. R. (1996). National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 87, 4990-4997.
- Chittenden, T., Harrington, E. A., O'Connor, R., Flemington, C., Lutz, R. J., Evan, G. I., and Guild, B. C. (1995). Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374, 733-736.
- Ciardiello, F., Caputo, R., Bianco, R., Damiano, V., Pomatico, G., Pepe, S., Bianco, A. R., Agrawal, S., Mendelsohn, J., and Tortora, G. (1998). Cooperative inhibition of renal cancer

growth by anti-epidermal growth factor receptor antibody and protein kinase A antisense oligonucleotide. *J Natl Cancer Inst* 90, 1087-1094.

Clem, R. J., Cheng, E. H., Karp, C. L., Kirsch, D. G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M. B., Griffin, D. E., Earnshaw, W. C., Veluona, M. A., and Hardwick, J. M. (1998). Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 554-559.

Coffey, R. G., and Hadden, J. W. (1985). Neurotransmitters, hormones, and cyclic nucleotides in lymphocyte regulation. *Fed Proc* 44, 112-117.

Coffino, P., Bourne, H. R., and Tomkins, G. M. (1975). Mechanism of lymphoma cell death induced by cyclic AMP. *Am J Pathol* 81, 199-204.

Collins, R. J., Verschuer, L. A., Harmon, B. V., Prentice, R. L., Pope, J. H., and Kerr, J. F. (1989). Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol* 71, 343-350.

Consoli, U., El-Tounsi, I., Sandoval, A., Snell, V., Kleine, H. D., Brown, W., Robinson, J. R., DiRaimondo, F., Plunkett, W., and Andreeff, M. (1998). Differential induction of apoptosis by fludarabine monophosphate in leukemic B and normal T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 91, 1742-1748.

Cook, S. J., and McCormick, F. (1993). Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* 262, 1069-1072.

Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341 (Pt 2), 233-249.

Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S. L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., *et al.* (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94, 1840-1847.

Daniel, V., Litwack, G., and Tomkins, G. M. (1973). Induction of cytolysis of cultured lymphoma cells by adenosine 3':5'-cyclic monophosphate and the isolation of resistant variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 76-79.

Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M. A., Lassota, P., and Traganos, F. (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13, 795-808.

Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.

de Jong, D., Prins, F. A., Mason, D. Y., Reed, J. C., van Ommen, G. B., and Kluin, P. M. (1994). Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells. *Cancer Res* 54, 256-260.

de la Fuente, M. T., Casanova, B., Cantero, E., Hernandez del Cerro, M., Garcia-Marco, J., Silva, A., and Garcia-Pardo, A. (2003). Involvement of p53 in alpha4beta1 integrin-mediated resistance of B-CLL cells to fludarabine. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 708-712.

De Maria, R., Lenti, L., Malisan, F., d'Agostino, F., Tomassini, B., Zeuner, A., Rippo, M. R., and Testi, R. (1997). Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Science* 277, 1652-1655.

de Rooij, J., Zwartkruis, F. J., Verheijen, M. H., Cool, R. H., Nijman, S. M., Wittinghofer, A., and Bos, J. L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396, 474-477.

De Rossi, G., Zarcone, D., Mauro, F., Cerruti, G., Tenca, C., Puccetti, A., Mandelli, F., and Grossi, C. E. (1993). Adhesion molecule expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: malignant cell phenotypes define distinct disease subsets. *Blood* 81, 2679-2687.

de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M. G., te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H., and de Vries, J. E. (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 174, 915-924.

Deas, O., Dumont, C., MacFarlane, M., Rouleau, M., Hebib, C., Harper, F., Hirsch, F., Charpentier, B., Cohen, G. M., and Senik, A. (1998). Caspase-independent cell death induced by anti-CD2 or staurosporine in activated human peripheral T lymphocytes. *J Immunol* 161, 3375-3383.

Defrance, T., Vanbervliet, B., Briere, F., Durand, I., Rousset, F., and Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J Exp Med* 175, 671-682.

del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., and Nunez, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-689.

Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 144, 891-901.

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

D'Mello, S. R., Anelli, R., and Calissano, P. (1994). Lithium induces apoptosis in immature cerebellar granule cells but promotes survival of mature neurons. *Exp Cell Res* 211, 332-338.

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

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

Dohner, H., Stilgenbauer, S., Dohner, K., Bentz, M., and Lichter, P. (1999). Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med* 77, 266-281.

Dormer, P., Theml, H., and Lau, B. (1983). Chronic lymphocytic leukemia: a proliferative or accumulative disorder? *Leuk Res* 7, 1-10.

Douglas, R. S., Capocasale, R. J., Lamb, R. J., Nowell, P. C., and Moore, J. S. (1997). Chronic lymphocytic leukemia B cells are resistant to the apoptotic effects of transforming growth factor-beta. *Blood* 89, 941-947.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.

Earnshaw, W. C., Martins, L. M., and Kaufmann, S. H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383-424.

Eisenhut, T., Sinha, B., Grottrup-Wolfers, E., Semmler, J., Siess, W., and Endres, S. (1993). Prostacyclin analogs suppress the synthesis of tumor necrosis factor-alpha in LPS-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Immunopharmacology* 26, 259-264.

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

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.

Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20, 929-935.

Fadok, V. A., Xue, D., and Henson, P. (2001). If phosphatidylserine is the death knell, a new phosphatidylserine-specific receptor is the bellringer. *Cell Death Differ* 8, 582-587.

Farrow, S. N., White, J. H., Martinou, I., Raven, T., Pun, K. T., Grinham, C. J., Martinou, J. C., and Brown, R. (1995). Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 374, 731-733.

Fenaux, P., Preudhomme, C., Lai, J. L., Quiquandon, I., Jonveaux, P., Vanrumbeke, M., Sarti-aux, C., Morel, P., Loucheux-Lefebvre, M. H., Bauters, F., and et al. (1992). Mutations of the

p53 gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a report on 39 cases with cytogenetic analysis. *Leukemia* 6, 246-250.

Finbloom, D. S., and Winestock, K. D. (1995). IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol* 155, 1079-1090.

Fiorentino, D. F., Bond, M. W., and Mosmann, T. R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170, 2081-2095.

Fitch, M. E., Chang, C. M., and Parslow, T. G. (2000). The BH3 domain is required for caspase-independent cell death induced by Bax and oligomycin. *Cell Death Differ* 7, 338-349.

Fluckiger, A. C., Durand, I., and Banchereau, J. (1994). Interleukin 10 induces apoptotic cell death of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *J Exp Med* 179, 91-99.

Fluckiger, A. C., Garrone, P., Durand, I., Galizzi, J. P., and Banchereau, J. (1993). Interleukin 10 (IL-10) upregulates functional high affinity IL-2 receptors on normal and leukemic B lymphocytes. *J Exp Med* 178, 1473-1481.

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

Frank, D. A., Mahajan, S., and Ritz, J. (1997). 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, 3140-3148.

Franklin, R. A., and McCubrey, J. A. (2000). Kinases: positive and negative regulators of apoptosis. *Leukemia* 14, 2019-2034.

Gandhi, V., and Plunkett, W. (2002). Cellular and clinical pharmacology of fludarabine. *Clin Pharmacokinet* 41, 93-103.

Gibbons, J. L. (1964). Cortisol Secretion Rate in Depressive Illness. *Arch Gen Psychiatry* 10, 572-575.

Gilman, A. G. (1984). G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell* 36, 577-579.

Glucksmann, A. (1965). Cell death in normal development. *Arch Biol (Liege)* 76, 419-437.

Greten, T. F., Sinha, B., Haslberger, C., Eigler, A., and Endres, S. (1996). Cicaprost and the type IV phosphodiesterase inhibitor, rolipram, synergize in suppression of tumor necrosis factor-alpha synthesis. *Eur J Pharmacol* 299, 229-233.

Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C., and Korsmeyer, S. J. (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Embo J* 17, 3878-3885.

Gross, A., McDonnell, J. M., and Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13, 1899-1911.

Gu, C., Ma, Y. C., Benjamin, J., Littman, D., Chao, M. V., and Huang, X. Y. (2000). Apoptotic signaling through the beta -adrenergic receptor. A new Gs effector pathway. *J Biol Chem* 275, 20726-20733.

Hallek, M., Kamp, T., Haen, E., Gohly, U., Emmerich, B., and Remien, J. (1991). Reduced responsiveness of adenylate cyclase to forskolin in human lymphoma cells. *Biochem Pharmacol* 42, 1329-1334.

Hallek, M., Langenmayer, I., Nerl, C., Knauf, W., Dietzfelbinger, H., Adorf, D., Ostwald, M., Busch, R., Kuhn-Hallek, I., Thiel, E., and Emmerich, B. (1999). Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 93, 1732-1737.

Hallek, M., Wanders, L., Ostwald, M., Busch, R., Senekowitsch, R., Stern, S., Schick, H. D., Kuhn-Hallek, I., and Emmerich, B. (1996). Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* 22, 439-447.

Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G., and Stevenson, F. K. (1999). Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94, 1848-1854.

Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E., and Reed, J. C. (1993). bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 82, 1820-1828.

Harada, H., Becknell, B., Wilm, M., Mann, M., Huang, L. J., Taylor, S. S., Scott, J. D., and Korsmeyer, S. J. (1999). Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell* 3, 413-422.

Hatae, T., Wada, M., Yokoyama, C., Shimonishi, M., and Tanabe, T. (2001). Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR delta. *J Biol Chem* 276, 46260-46267.

Hayes, J. S., Lawler, O. A., Walsh, M. T., and Kinsella, B. T. (1999). The prostacyclin receptor is isoprenylated. Isoprenylation is required for efficient receptor-effector coupling. *J Biol Chem* 274, 23707-23718.

Heiskanen, K. M., Bhat, M. B., Wang, H. W., Ma, J., and Nieminen, A. L. (1999). Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells. *J Biol Chem* 274, 5654-5658.

- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Hengartner, M. O., and Horvitz, H. R. (1994). Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* 4, 581-586.
- Hildeman, D. A., Mitchell, T., Teague, T. K., Henson, P., Day, B. J., Kappler, J., and Marrack, P. C. (1999). Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis. *Immunity* 10, 735-744.
- Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S. A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M., and Kroemer, G. (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 15, 1573-1581.
- Houslay, M. D., and Milligan, G. (1997). Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem Sci* 22, 217-224.
- Hu, Y., Benedict, M. A., Wu, D., Inohara, N., and Nunez, G. (1998). Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4386-4391.
- Huang, D. C., Cory, S., and Strasser, A. (1997). Bcl-2, Bcl-XL and adenovirus protein E1B19kD are functionally equivalent in their ability to inhibit cell death. *Oncogene* 14, 405-414.
- Ichikawa, A., Hotta, T., and Saito, H. (1993). Mutations of the p53 gene in B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 11, 21-25.
- Imler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.
- Ishida, H., Hastings, R., Kearney, J., and Howard, M. (1992). Continuous anti-interleukin 10 antibody administration depletes mice of Ly-1 B cells but not conventional B cells. *J Exp Med* 175, 1213-1220.
- Ito, T., Deng, X., Carr, B., and May, W. S. (1997). Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J Biol Chem* 272, 11671-11673.
- Itoh, K., and Hirohata, S. (1995). The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *J Immunol* 154, 4341-4350.
- Itoh, N., and Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 268, 10932-10937.
- Jaffe, E. S. (1999). Hematopathology: integration of morphologic features and biologic markers for diagnosis. *Mod Pathol* 12, 109-115.

James, C., Gschmeissner, S., Fraser, A., and Evan, G. I. (1997). CED-4 induces chromatin condensation in *Schizosaccharomyces pombe* and is inhibited by direct physical association with CED-9. *Curr Biol* 7, 246-252.

Jewell, A. P., Worman, C. P., Lydyard, P. M., Yong, K. L., Giles, F. J., and Goldstone, A. H. (1994). Interferon-alpha up-regulates bcl-2 expression and protects B-CLL cells from apoptosis in vitro and in vivo. *Br J Haematol* 88, 268-274.

Johnston, J. B., Daeninck, P., Verburg, L., Lee, K., Williams, G., Israels, L. G., Mowat, M. R., and Begleiter, A. (1997). P53, MDM-2, BAX and BCL-2 and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 26, 435-449.

Jurgensmeier, J. M., Krajewski, S., Armstrong, R. C., Wilson, G. M., Oltersdorf, T., Fritz, L. C., Reed, J. C., and Otilie, S. (1997). Bax- and Bak-induced cell death in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 8, 325-339.

Jurlander, J., Lai, C. F., Tan, J., Chou, C. C., Geisler, C. H., Schriber, J., Blumenson, L. E., Narula, S. K., Baumann, H., and Caligiuri, M. A. (1997). Characterization of interleukin-10 receptor expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 89, 4146-4152.

Kalachikov, S., Migliazza, A., Cayanis, E., Fracchiolla, N. S., Bonaldo, M. F., Lawton, L., Jelenc, P., Ye, X., Qu, X., Chien, M., *et al.* (1997). Cloning and gene mapping of the chromosome 13q14 region deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Genomics* 42, 369-377.

Kamp, T., Liebl, B., Haen, E., Emmerich, B., and Hallek, M. (1997). Defects of beta 2-adrenergic signal transduction in chronic lymphocytic leukaemia: relationship to disease progression. *Eur J Clin Invest* 27, 121-127.

Kastan, M. B., Zhan, Q., el-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., and Fornace, A. J., Jr. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71, 587-597.

Keating, M. J., Flinn, I., Jain, V., Binet, J. L., Hillmen, P., Byrd, J., Albitar, M., Brettman, L., Santabarbara, P., Wacker, B., and Rai, K. R. (2002). Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood* 99, 3554-3561.

Keating, M. J., O'Brien, S., Lerner, S., Koller, C., Beran, M., Robertson, L. E., Freireich, E. J., Estey, E., and Kantarjian, H. (1998). Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood* 92, 1165-1171.

Kemp, B. E., Graves, D. J., Benjamini, E., and Krebs, E. G. (1977). Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 252, 4888-4894.

Kennedy, B., Rawstron, A., Carter, C., Ryan, M., Speed, K., Lucas, G., and Hillmen, P. (2002). Campath-1H and fludarabine in combination are highly active in refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 99, 2245-2247.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.

Khaled, A. R., Kim, K., Hofmeister, R., Muegge, K., and Durum, S. K. (1999). Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14476-14481.

Kiefer, M. C., Brauer, M. J., Powers, V. C., Wu, J. J., Umansky, S. R., Tomei, L. D., and Barr, P. J. (1995). Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374, 736-739.

Kim, D. H., and Lerner, A. (1998). Type 4 cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 92, 2484-2494.

Kim, J. M., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Khan, T. A., and Moore, K. W. (1992). Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J Immunol* 148, 3618-3623.

Kitabayashi, A., Hirokawa, M., and Miura, A. B. (1995). The role of interleukin-10 (IL-10) in chronic B-lymphocytic leukemia: IL-10 prevents leukemic cells from apoptotic cell death. *Int J Hematol* 62, 99-106.

Kitada, S., Andersen, J., Akar, S., Zapata, J. M., Takayama, S., Krajewski, S., Wang, H. G., Zhang, X., Bullrich, F., Croce, C. M., *et al.* (1998). Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with *In vitro* and *In vivo* chemoresponses. *Blood* 91, 3379-3389.

Kitson, J., Raven, T., Jiang, Y. P., Goeddel, D. V., Giles, K. M., Pun, K. T., Grinham, C. J., Brown, R., and Farrow, S. N. (1996). A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature* 384, 372-375.

Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136.

Knauf, W. U., Langenmayer, I., Ehlers, B., Mohr, B., Adorf, D., Nerl, C. H., Hallek, M., Zwingers, T. H., Emmerich, B., and Thiel, E. (1997). Serum levels of soluble CD23, but not soluble CD25, predict disease progression in early stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 27, 523-532.

Knox, K. A., Johnson, G. D., and Gordon, J. (1993). Distribution of cAMP in secondary follicles and its expression in B cell apoptosis and CD40-mediated survival. *Int Immunol* 5, 1085-1091.

Knudson, C. M., Tung, K. S., Tourtellotte, W. G., Brown, G. A., and Korsmeyer, S. J. (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 270, 96-99.

Koch, J. M., Kell, S., and Aldenhoff, J. B. (2003). Differential effects of fluoxetine and imipramine on the phosphorylation of the transcription factor CREB and cell-viability. *J Psychiatr Res* 37, 53-59.

Korner, I., Weber-Nordt, R., Pfaff, P., and Finke, J. (1997). Analysis of a regulatory element in the 5'-untranslated region of the bcl-2 gene. *FEBS Lett* 406, 31-32.

Korsmeyer, S. J., Shutter, J. R., Veis, D. J., Merry, D. E., and Oltvai, Z. N. (1993). Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 4, 327-332.

Kotenko, S. V., Krause, C. D., Izotova, L. S., Pollack, B. P., Wu, W., and Pestka, S. (1997). Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *Embo J* 16, 5894-5903.

Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T. J., Kirschner, M. W., Koths, K., Kwiatkowski, D. J., and Williams, L. T. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278, 294-298.

Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M. J., Fenton, W., and Reed, J. C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53, 4701-4714.

Krammer, P. H., Behrmann, I., Daniel, P., Dhein, J., and Debatin, K. M. (1994). Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Opin Immunol* 6, 279-289.

Kroemer, G. (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 3, 614-620.

Kroemer, G., and Reed, J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6, 513-519.

Kubera, M., Lin, A. H., Kenis, G., Bosmans, E., van Bockstaele, D., and Maes, M. (2001). Anti-Inflammatory effects of antidepressants through suppression of the interferon-gamma/interleukin-10 production ratio. *J Clin Psychopharmacol* 21, 199-206.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lee, R., Wolda, S., Moon, E., Esselstyn, J., Hertel, C., and Lerner, A. (2002). PDE7A is expressed in human B-lymphocytes and is up-regulated by elevation of intracellular cAMP. *Cell Signal* 14, 277-284.

Leporrier, M. (2004). Role of fludarabine as monotherapy in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematol J* 5 *Suppl* 1, S10-19.

Leporrier, M., Chevret, S., Cazin, B., Boudjerra, N., Feugier, P., Desablens, B., Rapp, M. J., Jaubert, J., Autrand, C., Divine, M., *et al.* (2001). Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood* 98, 2319-2325.

Lerner, A., Kim, D. H., and Lee, R. (2000). The cAMP signaling pathway as a therapeutic target in lymphoid malignancies. *Leuk Lymphoma* 37, 39-51.

Levine, A. J., Momand, J., and Finlay, C. A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351, 453-456.

Levy, Y., and Brouet, J. C. (1994). Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J Clin Invest* 93, 424-428.

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

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

Li, R. C., Cindrova-Davies, T., Skepper, J. N., and Sellers, L. A. (2004). Prostacyclin induces apoptosis of vascular smooth muscle cells by a cAMP-mediated inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity and can counteract the mitogenic activity of endothelin-1 or basic fibroblast growth factor. *Circ Res* 94, 759-767.

Linnet, M. S., and Cartwright, R. A. (1988). Chronic lymphocytic leukemia: epidemiology and etiologic findings. *Nouv Rev Fr Hematol* 30, 353-357.

Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.

Liu, Y., Wei, S. H., Ho, A. S., de Waal Malefyt, R., and Moore, K. W. (1994). Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Immunol* 152, 1821-1829.

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

Lomo, J., Blomhoff, H. K., Beiske, K., Stokke, T., and Smeland, E. B. (1995). TGF-beta 1 and cyclic AMP promote apoptosis in resting human B lymphocytes. *J Immunol* 154, 1634-1643.

Lorenzo, H. K., Susin, S. A., Penninger, J., and Kroemer, G. (1999). Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 6, 516-524.

Lowe, S. W. (1995). Cancer therapy and p53. *Curr Opin Oncol* 7, 547-553.

- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.
- Madiehe, A. M., Mampuru, L. J., and Tyobeka, E. M. (1995). Induction of apoptosis in HL-60 cells by lithium. *Biochem Biophys Res Commun* 209, 768-774.
- Maes, M., Song, C., Lin, A. H., Pioli, R., Kenis, G., Kubera, M., and Bosmans, E. (1999). In vitro immunoregulatory effects of lithium in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* 143, 401-407.
- Maloum, K., Davi, F., Merle-Beral, H., Pritsch, O., Magnac, C., Vuillier, F., Dighiero, G., Troussard, X., Mauro, F. F., and Benichou, J. (2000). Expression of unmutated VH genes is a detrimental prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 96, 377-379.
- Mamani-Matsuda, M., Moynet, D., Molimard, M., Ferry-Dumazet, H., Marit, G., Reiffers, J., and Mossalayi, M. D. (2004). Long-acting beta2-adrenergic formoterol and salmeterol induce the apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 124, 141-150.
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., and Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182, 1545-1556.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S. A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z. H., Reed, J. C., and Kroemer, G. (1998). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 187, 1261-1271.
- Marzo, I., Perez-Galan, P., Giraldo, P., Rubio-Felix, D., Anel, A., and Naval, J. (2001). Cladribine induces apoptosis in human leukaemia cells by caspase-dependent and -independent pathways acting on mitochondria. *Biochem J* 359, 537-546.
- Mateo, V., Lagneaux, L., Bron, D., Biron, G., Armant, M., Delespesse, G., and Sarfati, M. (1999). CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med* 5, 1277-1284.
- Matutes, E., Owusu-Ankomah, K., Morilla, R., Garcia Marco, J., Houlihan, A., Que, T. H., and Catovsky, D. (1994). The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 8, 1640-1645.
- Maudrell, K., Antonsson, B., Magnenat, E., Camps, M., Muda, M., Chabert, C., Gillieron, C., Boschert, U., Vial-Knecht, E., Martinou, J. C., and Arkinstall, S. (1997). Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1. *J Biol Chem* 272, 25238-25242.
- McCarthy, N. J., Whyte, M. K., Gilbert, C. S., and Evan, G. I. (1997). Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol* 136, 215-227.

McConkey, D. J., Aguilar-Santelises, M., Hartzell, P., Eriksson, I., Mellstedt, H., Orrenius, S., and Jondal, M. (1991). Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *J Immunol* *146*, 1072-1076.

McConkey, D. J., Orrenius, S., and Jondal, M. (1990). Agents that elevate cAMP stimulate DNA fragmentation in thymocytes. *J Immunol* *145*, 1227-1230.

McKnight, G. S. (1991). Cyclic AMP second messenger systems. *Curr Opin Cell Biol* *3*, 213-217.

Mentz, F., Merle-Beral, H., and Dalloul, A. H. (1999). Theophylline-induced B-CLL apoptosis is partly dependent on cyclic AMP production but independent of CD38 expression and endogenous IL-10 production. *Leukemia* *13*, 78-84.

Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B., and Reed, J. C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* *9*, 1799-1805.

Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* *80*, 293-299.

Molica, S., Mannella, A., Dattilo, A., Levato, D., Iuliano, F., Peta, A., Consarino, C., and Magro, S. (1996). Differential expression of BCL-2 oncoprotein and Fas antigen on normal peripheral blood and leukemic bone marrow cells. A flow cytometric analysis. *Haematologica* *81*, 302-309.

Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., and Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* *69*, 1237-1245.

Monahan, T. M., Marchand, N. W., Fritz, R. R., and Abell, C. W. (1975). Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate levels and activities of related enzymes in normal and leukemic lymphocytes. *Cancer Res* *35*, 2540-2547.

Moncada, S. (1982). Prostacyclin and arterial wall biology. *Arteriosclerosis* *2*, 193-207.

Moncada, S., and Vane, J. R. (1978). Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. *Pharmacol Rev* *30*, 293-331.

Montserrat, E., and Rozman, C. (1995). Chronic lymphocytic leukemia: present status. *Ann Oncol* *6*, 219-235.

Moon, E. Y., and Lerner, A. (2003). PDE4 inhibitors activate a mitochondrial apoptotic pathway in chronic lymphocytic leukemia cells that is regulated by protein phosphatase 2A. *Blood* *101*, 4122-4130.

Morabito, F., Filangeri, M., Callea, I., Sculli, G., Callea, V., Fracchiolla, N. S., Neri, A., and Brugiattelli, M. (1997). Bcl-2 protein expression and p53 gene mutation in chronic lymphocytic leukemia: correlation with in vitro sensitivity to chlorambucil and purine analogs. *Haematologica* 82, 16-20.

Morrison, V. A., Rai, K. R., Peterson, B. L., Kolitz, J. E., Elias, L., Appelbaum, F. R., Hines, J. D., Shepherd, L., Martell, R. E., Larson, R. A., and Schiffer, C. A. (2001). Impact of therapy With chlorambucil, fludarabine, or fludarabine plus chlorambucil on infections in patients with chronic lymphocytic leukemia: Intergroup Study Cancer and Leukemia Group B 9011. *J Clin Oncol* 19, 3611-3621.

Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., *et al.* (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335-341.

Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273, 2926-2930.

Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.

Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 256, 12-18.

Nesterova, M., and Cho-Chung, Y. S. (1995). A single-injection protein kinase A-directed antisense treatment to inhibit tumour growth. *Nat Med* 1, 528-533.

Nguyen, M., Branton, P. E., Walton, P. A., Oltvai, Z. N., Korsmeyer, S. J., and Shore, G. C. (1994). Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-defective adenovirus. *J Biol Chem* 269, 16521-16524.

Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., and Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139, 271-279.

Nilsson, K., Larsson, L. G., Soderberg, O., Schena, M., Gottardi, D., Caligaris-Cappio, F., and Carlsson, M. (1992). On the role of endogenously produced TNF-alpha and IL-6 as regulators of growth and differentiation of B-type chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Curr Top Microbiol Immunol* 182, 271-277.

Nishiyama, H., Mokuno, J., and Inoue, T. (1969). Relative frequency and mortality rate of various types of leukemia in Japan. *Gann* 60, 71-81.

Nomura, M., Shimizu, S., Ito, T., Narita, M., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1999). Apoptotic cytosol facilitates Bax translocation to mitochondria that involves cytosolic factor regulated by Bcl-2. *Cancer Res* 59, 5542-5548.

O'Brien, S. M., Kantarjian, H. M., Cortes, J., Beran, M., Koller, C. A., Giles, F. J., Lerner, S., and Keating, M. (2001). Results of the fludarabine and cyclophosphamide combination regimen in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 19, 1414-1420.

Ocklind, G. (1986). Stimulation of human lymphocytes by phytohemagglutinin (PHA) in a new ultra-microtest plate. *Immunobiology* 171, 339-344.

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-1058.

Ohta, T., Kinoshita, T., Naito, M., Nozaki, T., Masutani, M., Tsuruo, T., and Miyajima, A. (1997). Requirement of the caspase-3/CPP32 protease cascade for apoptotic death following cytokine deprivation in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 272, 23111-23116.

Olsson, I. L., and Breitman, T. R. (1982). Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937 by retinoic acid and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-inducing agents. *Cancer Res* 42, 3924-3927.

Oltvai, Z. N., Millman, C. L., and Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619.

Owen-Schaub, L. B., Zhang, W., Cusack, J. C., Angelo, L. S., Santee, S. M., Fujiwara, T., Roth, J. A., Deisseroth, A. B., Zhang, W. W., Kruzel, E., and et al. (1995). Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* 15, 3032-3040.

Paietta, E., and Schwarzmeier, J. D. (1983). Differences in beta-adrenergic receptor density and adenylate cyclase activity between normal and leukaemic leukocytes. *Eur J Clin Invest* 13, 339-346.

Pan, G., O'Rourke, K., and Dixit, V. M. (1998). Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 273, 5841-5845.

Panayiotidis, P., Ganeshaguru, K., Jabbar, S. A., and Hoffbrand, A. V. (1994). Alpha-interferon (alpha-IFN) protects B-chronic lymphocytic leukaemia cells from apoptotic cell death in vitro. *Br J Haematol* 86, 169-173.

Pangalis, G. A., Vassilakopoulos, T. P., Dimopoulou, M. N., Siakantaris, M. P., Kontopidou, F. N., and Angelopoulou, M. K. (2002). B-chronic lymphocytic leukemia: practical aspects. *Hematol Oncol* 20, 103-146.

Patterson, S. D., Spahr, C. S., Daugas, E., Susin, S. A., Irinopoulou, T., Koehler, C., and Kroemer, G. (2000). Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. *Cell Death Differ* 7, 137-144.

Pearson, A. S., Spitz, F. R., Swisher, S. G., Kataoka, M., Sarkiss, M. G., Meyn, R. E., McDonnell, T. J., Cristiano, R. J., and Roth, J. A. (2000). Up-regulation of the proapoptotic mediators

Bax and Bak after adenovirus-mediated p53 gene transfer in lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 6, 887-890.

Pepper, C., Bentley, P., and Hoy, T. (1996). Regulation of clinical chemoresistance by bcl-2 and bax oncoproteins in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 95, 513-517.

Pepper, C., Hoy, T., and Bentley, D. P. (1997). Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance. *Br J Cancer* 76, 935-938.

Pepper, C., Hoy, T., and Bentley, P. (1998). Elevated Bcl-2/Bax are a consistent feature of apoptosis resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia and are correlated with in vivo chemoresistance. *Leuk Lymphoma* 28, 355-361.

Peracchi, M., Lombardi, L., Maiolo, A. T., Bamonti-Catena, F., Toschi, V., Chiorboli, O., Mozzana, R., and Polli, E. E. (1983). Plasma and urine cyclic nucleotide levels in patients with acute and chronic leukemia. *Blood* 61, 429-434.

Pettitt, A. R. (2003). Mechanism of action of purine analogues in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 121, 692-702.

Pettitt, A. R., and Cawley, J. C. (2000). Caspases influence the mode but not the extent of cell death induced by purine analogues in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 109, 800-804.

Plate, J. M., Knospe, W. H., Harris, J. E., and Gregory, S. A. (1993). Normal and aberrant expression of cytokines in neoplastic cells from chronic lymphocytic leukemias. *Hum Immunol* 36, 249-258.

Platt, N., da Silva, R. P., and Gordon, S. (1998). Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol* 8, 365-372.

Powell, M. J., Thompson, S. A., Tone, Y., Waldmann, H., and Tone, M. (2000). Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region. *J Immunol* 165, 292-296.

Puthalakath, H., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., King, S. M., and Strasser, A. (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 3, 287-296.

Raghoebier, S., van Krieken, J. H., Kluin-Nelemans, J. C., Gillis, A., van Ommen, G. J., Ginsberg, A. M., Raffeld, M., and Kluin, P. M. (1991). Oncogene rearrangements in chronic B-cell leukemia. *Blood* 77, 1560-1564.

Rai, K. R., Peterson, B. L., Appelbaum, F. R., Kolitz, J., Elias, L., Shepherd, L., Hines, J., Threatte, G. A., Larson, R. A., Cheson, B. D., and Schiffer, C. A. (2000). Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343, 1750-1757.

Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A. D., Levy, R. N., and Pasternack, B. S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46, 219-234.

Rao, L., Perez, D., and White, E. (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 135, 1441-1455.

Rapaport, M. H., and Manji, H. K. (2001). The effects of lithium on ex vivo cytokine production. *Biol Psychiatry* 50, 217-224.

Reed, J. C. (1998). Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 25, 11-18.

Reittie, J. E., Yong, K. L., Panayiotidis, P., and Hoffbrand, A. V. (1996). Interleukin-6 inhibits apoptosis and tumour necrosis factor induced proliferation of B-chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma* 22, 83-90, follow 186, color plate VI.

Riley, J. K., Takeda, K., Akira, S., and Schreiber, R. D. (1999). Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem* 274, 16513-16521.

Robertson, L. E., Chubb, S., Meyn, R. E., Story, M., Ford, R., Hittelman, W. N., and Plunkett, W. (1993). Induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia by 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 9-beta-D-arabinosyl-2-fluoroadenine. *Blood* 81, 143-150.

Robertson, L. E., Plunkett, W., McConnell, K., Keating, M. J., and McDonnell, T. J. (1996). Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia* 10, 456-459.

Robertson, M. J., Manley, T. J., Pichert, G., Cameron, C., Cochran, K. J., Levine, H., and Ritz, J. (1995). Functional consequences of APO-1/Fas (CD95) antigen expression by normal and neoplastic hematopoietic cells. *Leuk Lymphoma* 17, 51-61.

Rodriguez, J., and Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 13, 3179-3184.

Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., and Borner, C. (1998). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 391, 496-499.

Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Peronne, C., Vezzio, N., Hsu, D. H., Kastelein, R., Moore, K. W., and Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1890-1893.

Roy, S., and Nicholson, D. W. (2000). Cross-talk in cell death signaling. *J Exp Med* 192, 21-26.

Rozman, C., Montserrat, E., Rodriguez-Fernandez, J. M., Ayats, R., Vallespi, T., Parody, R., Rios, A., Prados, D., Morey, M., Gomis, F., and et al. (1984). Bone marrow histologic pattern--

the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases. *Blood* 64, 642-648.

Rudel, T., and Bokoch, G. M. (1997). Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276, 1571-1574.

Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-99.

Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10964-10967.

Sarfati, M., Mateo, V., Baudet, S., Rubio, M., Fernandez, C., Davi, F., Binet, J. L., Delic, J., and Merle-Beral, H. (2003). Sildenafil and vardenafil, types 5 and 6 phosphodiesterase inhibitors, induce caspase-dependent apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 101, 265-269.

Sarin, A., Williams, M. S., Alexander-Miller, M. A., Berzofsky, J. A., Zacharchuk, C. M., and Henkart, P. A. (1997). Target cell lysis by CTL granule exocytosis is independent of ICE/Ced-3 family proteases. *Immunity* 6, 209-215.

Saunders, J. W., Jr. (1966). Death in embryonic systems. *Science* 154, 604-612.

Savill, J., and Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-788.

Schindler, C., and Darnell, J. E., Jr. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 64, 621-651.

Schneider, P., Holler, N., Bodmer, J. L., Hahne, M., Frei, K., Fontana, A., and Tschopp, J. (1998). Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* 187, 1205-1213.

Schriever, F., and Huhn, D. (2003). New directions in the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* 63, 953-969.

Seckl, J. R., and Fink, G. (1992). Antidepressants increase glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in rat hippocampus in vivo. *Neuroendocrinology* 55, 621-626.

Serafeim, A., Holder, M. J., Grafton, G., Chamba, A., Drayson, M. T., Luong, Q. T., Bunce, C. M., Gregory, C. D., Barnes, N. M., and Gordon, J. (2003). Selective serotonin reuptake inhibitors directly signal for apoptosis in biopsy-like Burkitt lymphoma cells. *Blood* 101, 3212-3219.

Seuwen, K., and Pouyssegur, J. (1992). G protein-controlled signal transduction pathways and the regulation of cell proliferation. *Adv Cancer Res* 58, 75-94.

Shaw, P., Bovey, R., Tardy, S., Sahli, R., Sordat, B., and Costa, J. (1992). Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4495-4499.

Sheikh, M. S., Burns, T. F., Huang, Y., Wu, G. S., Amundson, S., Brooks, K. S., Fornace, A. J., Jr., and el-Deiry, W. S. (1998). p53-dependent and -independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res* 58, 1593-1598.

Sheppard, J. R., Gormus, R., and Moldow, C. F. (1977). Catecholamine hormone receptors are reduced on chronic lymphocytic leukaemic lymphocytes. *Nature* 269, 693-695.

Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325-334.

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

Siegmund, B., Eigler, A., Moeller, J., Greten, T. F., Hartmann, G., and Endres, S. (1997). Suppression of tumor necrosis factor-alpha production by interleukin-10 is enhanced by cAMP-elevating agents. *Eur J Pharmacol* 321, 231-239.

Siegmund, B., Welsch, J., Loher, F., Meinhardt, G., Emmerich, B., Endres, S., and Eigler, A. (2001). Phosphodiesterase type 4 inhibitor suppresses expression of anti-apoptotic members of the Bcl-2 family in B-CLL cells and induces caspase-dependent apoptosis. *Leukemia* 15, 1564-1571.

Sjoberg, J., Aguilar-Santelises, M., Sjogren, A. M., Pisa, E. K., Ljungdahl, A., Bjorkholm, M., Jondal, M., Mellstedt, H., and Pisa, P. (1996). Interleukin-10 mRNA expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia inversely correlates with progression of disease. *Br J Haematol* 92, 393-400.

Smit, M. J., and Iyengar, R. (1998). Mammalian adenylyl cyclases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 32, 1-21.

Smith, K. G., Strasser, A., and Vaux, D. L. (1996). CrmA expression in T lymphocytes of transgenic mice inhibits CD95 (Fas/APO-1)-transduced apoptosis, but does not cause lymphadenopathy or autoimmune disease. *Embo J* 15, 5167-5176.

Soengas, M. S., Alarcon, R. M., Yoshida, H., Giaccia, A. J., Hakem, R., Mak, T. W., and Lowe, S. W. (1999). Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science* 284, 156-159.

Sorensen, J. M., Vena, D. A., Fallavollita, A., Chun, H. G., and Cheson, B. D. (1997). Treatment of refractory chronic lymphocytic leukemia with fludarabine phosphate via the group C protocol mechanism of the National Cancer Institute: five-year follow-up report. *J Clin Oncol* 15, 458-465.

Spencer, S. D., Di Marco, F., Hooley, J., Pitts-Meek, S., Bauer, M., Ryan, A. M., Sordat, B., Gibbs, V. C., and Aguet, M. (1998). The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *J Exp Med* 187, 571-578.

Stahnke, K., Fulda, S., Friesen, C., Strauss, G., and Debatin, K. M. (2001). Activation of apoptosis pathways in peripheral blood lymphocytes by in vivo chemotherapy. *Blood* 98, 3066-3073.

Stennicke, H. R., Deveraux, Q. L., Humke, E. W., Reed, J. C., Dixit, V. M., and Salvesen, G. S. (1999). Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* 274, 8359-8362.

Stilgenbauer, S., Lichter, P., and Dohner, H. (2000). Genetic features of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 4, 48-72.

Stoetzer, O. J., Pogrebniak, A., Scholz, M., Pelka-Fleischer, R., Gullis, E., Darsow, M., Nussler, V., and Wilmanns, W. (1999). Drug-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 13, 1873-1880.

Strasser, A., and O'Connor, L. (1998). Fas ligand--caught between Scylla and Charybdis. *Nat Med* 4, 21-22.

Strasser, A., O'Connor, L., and Dixit, V. M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69, 217-245.

Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M. C., Alzari, P. M., and Kroemer, G. (1999a). Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 189, 381-394.

Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., *et al.* (1999b). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.

Sutherland, E. W. (1970). On the biological role of cyclic AMP. *Jama* 214, 1281-1288.

Szuster-Ciesielska, A., Tustanowska-Stachura, A., Slotwinska, M., Marmurowska-Michalowska, H., and Kandefler-Szerszen, M. (2003). In vitro immunoregulatory effects of antidepressants in healthy volunteers. *Pol J Pharmacol* 55, 353-362.

Tang, W. J., and Gilman, A. G. (1992). Adenylyl cyclases. *Cell* 70, 869-872.

Taylor, S. S., Buechler, J. A., and Yonemoto, W. (1990). cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* 59, 971-1005.

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

Thomas, A., El Rouby, S., Reed, J. C., Krajewski, S., Silber, R., Potmesil, M., and Newcomb, E. W. (1996). Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance. *Oncogene* 12, 1055-1062.

Thornberry, N. A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.

Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., *et al.* (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17907-17911.

Tomei, L. D., Shapiro, J. P., and Cope, F. O. (1993). Apoptosis in C3H/10T1/2 mouse embryonic cells: evidence for internucleosomal DNA modification in the absence of double-strand cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 853-857.

Tone, M., Powell, M. J., Tone, Y., Thompson, S. A., and Waldmann, H. (2000). IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. *J Immunol* 165, 286-291.

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

Travis, L. B., Curtis, R. E., Hankey, B. F., and Fraumeni, J. F., Jr. (1992). Second cancers in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 84, 1422-1427.

Tsujimoto, Y., Finger, L. R., Yunis, J., Nowell, P. C., and Croce, C. M. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226, 1097-1099.

van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., and Reutelingsperger, C. P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31, 1-9.

van Kooten, C., Rensink, I., Aarden, L., and van Oers, R. (1993). Cytokines and intracellular signals involved in the regulation of B-CLL proliferation. *Leuk Lymphoma* 12, 27-33.

Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Schumacker, P. T., and Thompson, C. B. (1999). Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell* 3, 159-167.

Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Williamson, E. K., Schumacker, P. T., and Thompson, C. B. (1997). Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91, 627-637.

Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., Brodianski, V. M., Kemper, O. C., Kollet, O., *et al.* (1998). Targeted disruption of

the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9, 267-276.

Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., and Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43-53.

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

Vieira, P., de Waal-Malefyt, R., Dang, M. N., Johnson, K. E., Kastelein, R., Fiorentino, D. F., deVries, J. E., Roncarolo, M. G., Mosmann, T. R., and Moore, K. W. (1991). Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1172-1176.

Villa, P., Kaufmann, S. H., and Earnshaw, W. C. (1997). Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* 22, 388-393.

von Freeden-Jeffry, U., Solvason, N., Howard, M., and Murray, R. (1997). The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* 7, 147-154.

Walker, P. R., and Sikorska, M. (1997). New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis. *Biochem Cell Biol* 75, 287-299.

Wallach, D., Kovalenko, A. V., Varfolomeev, E. E., and Boldin, M. P. (1998). Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict. *Curr Opin Immunol* 10, 279-288.

Walsh, D. A., Perkins, J. P., and Krebs, E. G. (1968). An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* 243, 3763-3765.

Walter, M. R., Windsor, W. T., Nagabhushan, T. L., Lundell, D. J., Lunn, C. A., Zauodny, P. J., and Narula, S. K. (1995). Crystal structure of a complex between interferon-gamma and its soluble high-affinity receptor. *Nature* 376, 230-235.

Wang, H. G., Pathan, N., Ethell, I. M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T. F., and Reed, J. C. (1999). Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284, 339-343.

Wang, K., Yin, X. M., Chao, D. T., Milliman, C. L., and Korsmeyer, S. J. (1996). BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* 10, 2859-2869.

Wattel, E., Preudhomme, C., Hecquet, B., Vanrumbeke, M., Quesnel, B., Dervite, I., Morel, P., and Fenaux, P. (1994). p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood* 84, 3148-3157.

Weber-Nordt, R. M., Riley, J. K., Greenlund, A. C., Moore, K. W., Darnell, J. E., and Schreiber, R. D. (1996). Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the interleukin-10 receptor intracellular domain. *J Biol Chem* 271, 27954-27961.

Wehinger, J., Gouilleux, F., Groner, B., Finke, J., Mertelsmann, R., and Weber-Nordt, R. M. (1996). IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. *FEBS Lett* 394, 365-370.

Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, E. R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I. D., Kao, G., Gan, D. D., Zhou, J. Y., Muschel, R., *et al.* (1997). KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet* 17, 141-143.

Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.

Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.

Xia, Z., Bergstrand, A., DePierre, J. W., and Nassberger, L. (1999). The antidepressants imipramine, clomipramine, and citalopram induce apoptosis in human acute myeloid leukemia HL-60 cells via caspase-3 activation. *J Biochem Mol Toxicol* 13, 338-347.

Xia, Z., DePierre, J. W., and Nassberger, L. (1996a). Dysregulation of bcl-2, c-myc, and Fas expression during tricyclic antidepressant-induced apoptosis in human peripheral lymphocytes. *J Biochem Toxicol* 11, 203-204.

Xia, Z., DePierre, J. W., and Nassberger, L. (1996b). Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1 beta and TNF-alpha release in human blood monocytes and IL-2 and interferon-gamma in T cells. *Immunopharmacology* 34, 27-37.

Xia, Z., DePierre, J. W., and Nassberger, L. (1998). Modulation of apoptosis induced by tricyclic antidepressants in human peripheral lymphocytes. *J Biochem Mol Toxicol* 12, 115-123.

Xia, Z., Karlsson, H., DePierre, J. W., and Nassberger, L. (1997). Tricyclic antidepressants induce apoptosis in human T lymphocytes. *Int J Immunopharmacol* 19, 645-654.

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

Yan, L., Herrmann, V., Hofer, J. K., and Insel, P. A. (2000). beta-adrenergic receptor/cAMP-mediated signaling and apoptosis of S49 lymphoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C1665-1674.

Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* *80*, 285-291.

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P., and Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* *275*, 1129-1132.

Yin, X. M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K. A., and Korsmeyer, S. J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* *400*, 886-891.

Ying, G., Karlsson, H., DePierre, J. W., and Nassberger, L. (2002). Tricyclic antidepressants prevent the differentiation of monocytes into macrophage-like cells in vitro. *Cell Biol Toxicol* *18*, 425-437.

Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., and Oren, M. (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* *352*, 345-347.

Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N. H., and Winoto, A. (1998). Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* *392*, 296-300.

Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Brustugun, O. T., and Doskeland, S. O. (1998). Injected cytochrome c induces apoptosis. *Nature* *391*, 449-450.

8. Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. Stefan Endres möchte ich mich für die Überlassung des Themas, sowie für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe bedanken.

Für die hervorragende Betreuung und Anleitung zum eigenständig wissenschaftlichen Arbeiten geht mein spezieller Dank an meine Betreuer Dr. Florian Loher und Roland Hallwachs. Weiterhin möchte ich mich bei PD Dr. Andreas Eigler bedanken, der bei wissenschaftlichen Fragen stets eine große Hilfe war. Herr PD Dr. G. Meinhardt hat freundlicherweise die Patientenproben zur Verfügung gestellt.

Für ihre außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und grenzenlose Geduld danke ich Frau Rosemarie Kiefl, MTA, die mir bei der Ausübung der experimentellen Techniken eine große Unterstützung war.

Für die gute Zusammenarbeit und schöne Arbeitsatmosphäre danke ich allen Mitdoktoranden der Abteilung für Klinische Pharmakologie der LMU München.

9. Lebenslauf

04.06.1976	Monika Ulrike Patz, geboren in München als Tochter von Gabriele und Dr.-Ing. Manfred Patz
1982 - 1986	Besuch der Grundschule an der Manzostraße, München
1986 - 1995	Besuch des Louise-Schroeder-Gymnasiums, München
1995	Abitur am Louise-Schroeder-Gymnasium, München
1995 - 1996	Freiwilliges Soziales Jahr Paritätischer Wohlfahrtsverband, München
1996	Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
August 1998	Ärztliche Vorprüfung
August 1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2000	Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. med. S. Endres, Abteilung für Klinische Pharmakologie, Medizinische Klinik-Innenstadt, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität, München
August 2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002 - 2003	Praktisches Jahr: <ol style="list-style-type: none"> 1. Terial: Pädiatrische Abteilung des Klinikums Traunstein 2. Terial: 4. Medizinische Abteilung des Städt. Krankenhauses München-Harlaching 3. Terial: Abdominalchirurgische Abteilung des Hôpital l'Archet, Universität Nice-Sophia-Antipolis, Nizza, Frankreich
November 2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Teilapprobation
Oktober 2004	Erhalt der Vollapprobation
Okt.2004 - Nov.04	Hospitation als Assistenzärztin in der Chirurgischen Klinik-Innenstadt, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität, München
Nov.2004 - Feb.05	Assistenzärztin in der Theralago-Klinik für kardiologische Frührehabilitation, Ambach
Seit Februar 2005	Assistenzärztin in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Klinikum Großhadern, München