

**Therapeutische Oligonukleotide:
Beeinflussung der Apoptose maligner B-Lymphozyten durch
Antisense-Hemmung und CpG-abhängige Immunmodulation**

vorgelegt von
Ralf Jox
aus Weingarten
2003

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt
Klinikum der Universität
Ludwig-Maximilians-Universität München

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff

**Therapeutische Oligonukleotide:
Beeinflussung der Apoptose maligner B-Lymphozyten durch
Antisense-Hemmung und CpG-abhängige Immunmodulation**

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

vorgelegt von
Ralf Jox
aus Weingarten
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:Prof. Dr. med. S. Endres

Mitberichterstatter:Prof. Dr. med. R. Mocikat
Priv. Doz. Dr. med. v. Dreyling

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:.....Priv. Doz. Dr. med. G. Hartmann

Dekan:Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung:10. April 2003

**Gewidmet
Angela und Ingrid**

Dum spiro, spero.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Fragestellung	1
1.2	Apoptose	2
1.2.1	Biologisches Phänomen und morphologische Kennzeichen.....	2
1.2.2	Molekulare Mechanismen.....	3
1.2.3	Pathogenetische Bedeutung der Apoptose.....	8
1.2.4	Pathogenetische Bedeutung von Bcl-2.....	10
1.3	Chronische lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp (B-CLL)	13
1.3.1	Klinik der B-CLL.....	13
1.3.2	Biologie der B-CLL.....	16
1.4	Antisense-Oligonukleotide (Antisense-ODN)	19
1.4.1	Molekulare Grundlagen der Antisense-Technologie.....	19
1.4.2	Antisense-Oligonukleotide gegen Bcl-2.....	21
1.5	CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN)	25
1.5.1	Biologisches Konzept.....	25
1.5.2	Wirkungen auf das Immunsystem.....	26
1.5.3	Wirkungsweise auf subzellulärer Ebene.....	29
1.5.4	Therapeutische Strategien.....	31

2.	Material und Methoden	33
2.1	Experimente mit permanenten Zelllinien	33
2.1.1	Zellkultur.....	33
2.1.2	Induktion der Apoptose.....	33
2.1.3	Nachweis der Apoptose.....	35
2.1.4	Messung der Proteinexpression.....	37
2.1.5	Oligonukleotide und Transfektion.....	38
2.2	Experimente mit primären Zellen	42
2.2.1	Präparation mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC)....	42
2.2.2	Inkubation der PBMC mit Oligonukleotiden.....	43
2.2.3	Quantifizierung der mRNA.....	44
2.3	Durchflusszytometrie (FACS)	45
2.4	Statistik	46
3.	Ergebnisse	47
3.1	Etablierung eines Apoptosemodells	47
3.1.1	Annexin V und Propidiumiodid zum Nachweis von Apoptose.....	47
3.1.2	Bestimmung der Caspase-3 als alternativer Apoptosenachweis.....	51
3.1.3	Validierung des Modells durch Nachweis der DNA-Fragmentierung.....	53
3.2.	Untersuchung des Antisense-Effekts	55
3.2.1	Transfektion der Zellen mit Oligonukleotiden.....	55
3.2.2	Suppression von Bcl-2 durch das Antisense-Oligonukleotid G3139.....	61
3.2.3	Nicht-Antisense-vermittelte Effekte von G3139.....	65
3.3.	Untersuchung der CpG-Effekte	66
3.3.1	Patientendaten.....	68
3.3.2	Zellidentifizierung und Oligonukleotid-Aufnahme.....	70
3.3.3	Endpunkt Immunstimulation.....	71
3.3.4	Endpunkt Apoptose.....	75
3.3.5	Kombination von G3139 mit Mitoxantron.....	82

4.	Diskussion	83
4.1	Übersicht über die experimentellen Befunde	83
4.2	Diskussion der Methoden	85
4.2.1	Messung der Apoptose.....	85
4.2.2	Phosphorothioat-Modifikation der Oligonukleotide.....	88
4.2.3	Transfektion im allgemeinen.....	89
4.2.4	Transfektion mit Lipofektin und ExGen 500.....	91
4.2.5	Durchflusszytometrie.....	92
4.3	Diskussion der Ergebnisse im Horizont der Literatur	94
4.3.1	Antisense-Hemmung von Bcl-2.....	94
4.3.2	CpG-Effekte in GM697-Zellen und Burkitt-Lymphomzellen.....	97
4.3.3	CpG-Effekte in primären B-CLL-Zellen.....	99
4.4	Klinische Relevanz der Ergebnisse	111
5.	Zusammenfassung	113
6.	Literaturverzeichnis	116
	Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	134
	Danksagung	137
	Publikationen	138
	Curriculum vitae	139

1. Einleitung

1.1 Fragestellung

Auf der Suche nach neuen Therapien für maligne Erkrankungen der B-Lymphozyten, besonders für die chronische lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp, sind therapeutische Oligodesoxynukleotide (ODN, kurz „Oligonukleotide“) eine vielversprechende Option. Dabei können ODN sowohl über ihre Antisense-Eigenschaft gegenüber bestimmten mRNA-Sequenzen als auch über zellaktivierende und immunmodulatorische Eigenschaften sogenannter CpG-Motive innerhalb der ODN-Sequenz ihre therapeutische Wirksamkeit entfalten. Beide Effekte werden bereits in klinischen Studien an Tumorpatienten evaluiert.

Das in klinischen Studien am häufigsten und erfolgreichsten eingesetzte ODN G3139 hemmt die Synthese des Anti-Apoptose-Proteins Bcl-2 und begünstigt dadurch unter anderem den apoptotischen Zelltod von Tumorzellen. Allerdings enthält das als Bcl-2-Antisense-ODN konzipierte G3139 zwei CpG-Motive. Möglicherweise sind die therapeutischen Erfolge dieses ODN eher auf seine CpG-Motive als auf den Antisense-Mechanismus zurückzuführen. Tatsächlich wurde G3139 noch nie auf einen möglichen CpG-Effekt hin untersucht. Deshalb wurde in dieser Arbeit versucht, den Bcl-2-Antisense-Effekt und den CpG-Effekt von G3139 durch geeignete Kontrollexperimente und -sequenzen zu unterscheiden und ihre jeweilige Bedeutung in einem kliniknahen Modell der chronischen lymphatischen B-Zell-Leukämie zu bestimmen.

Zunächst sollten Methoden zum Apoptosenachweis im Labor etabliert werden. Diese sollten anschließend genutzt werden, den Bcl-2-Antisense-Effekt von G3139 in einem *In-vitro*-Modell an einer permanenten leukämischen Zelllinie nachzuweisen. Dabei stellten sich folgende Fragen: (1) Kann ein Antisense-Effekt, ohne oder mit der Hilfe eines ODN-Carriers, beobachtet werden? (2) Wenn ja, hat der Antisense-Effekt Auswirkungen auf die Apoptose der malignen Zellen? (3) Lassen sich Wirkungen von G3139 nachweisen, die nicht auf dem Antisense-Mechanismus beruhen? Schließlich wurde ein in der Literatur beschriebenes Modell der chronischen lymphatischen Leukämie studiert, das als Bcl-2-Antisense-Modell gilt [Pepper, 1999]. Es stellten sich als weitere Fragen, (4) ob sich die von Pepper et al. beschriebenen Effekte reproduzieren lassen, (5) ob und, wenn ja, welche CpG-Effekte identifiziert werden können, (6) ob eine Wirkung auf die Apoptose der Tumorzellen erreicht werden kann und (7) ob in dieser Hinsicht eine Synergie mit konventionellen Zytostatika besteht.

1.2 Apoptose

1.2.1 Biologisches Phänomen und morphologische Kennzeichen

Vielzellige Organismen sind darauf angewiesen, überzählige oder gefährliche Zellen eliminieren zu können. In besonderer Weise trifft dies auf den komplexen Organismus des Menschen mit seinen etwa 10^{14} Zellen zu, der nur dank einer fein regulierten Homöostase zwischen Zellproliferation und Zelltod Bestand hat. Schätzungen zufolge hätte ein Mensch im Alter von 80 Jahren zwei Tonnen Knochenmark und Lymphknoten sowie einen 16 km langen Darm, wenn die Zellteilungen nicht durch eine natürliche Absterberate der Zellen balanciert würden [Melino, 2001]. Zu diesem Zweck entstand früh in der Evolution der Vielzeller ein genetisch verankertes Programm des natürlichen Zelltodes, der daher auch als „programmierter Zelltod“ oder „Suizid der Zelle“ bezeichnet wird.

Obwohl der Embryologe Carl Vogt bereits 1842 das Phänomen des programmierten Zelltodes entdeckt hatte [Clarke, 1996], fand es erst in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhundert breites Interesse unter Forschern. John Kerr begann Anfang der siebziger Jahre mit elektronenoptischen Untersuchungen des programmierten Zelltodes. Er wollte die damals gängige Hypothese überprüfen, wonach der Zelltod durch einen „Suizidcocktail“ aus lysosomalen Enzymen herbeigeführt werde. Jedoch beobachtete er, dass die Lysosomen im Rahmen des Zelltodes intakt blieben und statt dessen andere Phänomene sichtbar wurden: Die Kernporen schlossen sich in Gruppen zusammen, Membranvesikel schnürten sich ab und die Zelle wurde schließlich von Phagozyten inkorporiert und in Heterophagosomen abgebaut [Kerr, 1972].

Im Gegensatz zur pathologischen Form des Zelltodes, der Nekrose, kam es bei dieser physiologischen Form nicht zu einer inflammatorischen Reaktion des umgebenden Gewebes. Kerr prägte für diesen Zelltod den Begriff „Apoptose“ in Anlehnung an die griechische Bezeichnung des herbstlichen Blätterfalls (ἀπόπτωσης, apoptosis). Die wesentlichen morphologischen Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose sind in **Tabelle 1.1** zusammengefasst.

Morphologische Phänomene	Apoptose	Nekrose
Membranöse Vesikel	+	-
Kondensation des Chromatins	+	-
DNA-Fragmentierung	+	-
Zytoplasmatische Vakuolen	-	+
Schwellung der Mitochondrien	-	+

Tab. 1.1: Synopsis morphologischer Unterschiede zwischen apoptotischem und nekrotischem Zelltod. Es sind nur die wichtigsten, klassischen Unterschiede genannt. DNA = Desoxyribonukleinsäure.

Der Vorgang der Apoptose läuft so rapide ab – etwa 20 mal schneller als die Mitose –, dass zu einem gegebenen Zeitpunkt bei mikroskopischer Untersuchung nur vereinzelte Zellen einer Kultur in Apoptose befindlich sind. Umso weniger darf die biologische Bedeutung dieses Phänomens unterschätzt werden. In den drei Dekaden seit Kerrs Entdeckung wurden apoptotische Zelluntergänge in einer Reihe physiologischer Vorgänge beschrieben. Zu diesen gehören die Organbildung in der Embryogenese (z.B. die Ausbildung der Interdigitalfalten, die Rekanalisation der primär atretischen Hohlorgane oder der Untergang von Orientierungszellen nach Aussprossung neuronaler Axone), die Zellmauserung von Geweben mit hohem Zellumsatz (z.B. Knochenmark, Haut, Epithel von Hohlorganen), die numerische Atrophie einiger endokriner Organe im Alter, die negative Selektion autoreaktiver B- und T-Lymphozyten sowie die zytotoxische Wirkung CD8-positiver T-Lymphozyten.

1.2.2 Molekulare Mechanismen

Jede Körperzelle besitzt die zur Apoptose erforderlichen Proteine. Damit der Zelltod bei Bedarf schnell vonstatten gehen kann, werden diese Proteine konstitutiv exprimiert. Eine spontane, unkontrollierte Apoptose wird dadurch verhindert, dass die Proteine entweder als inaktive Vorstufen vorliegen oder sich in zellulären Kompartimenten befinden, wo sie nicht wirksam werden. Es bedarf eines spezifischen Stimulus, um den apoptotischen Prozess zu induzieren. Die Apoptose kann schematisch in drei Schritte unterteilt werden: Induktion, Regulation und Termination. Dem Verständnis halber bietet es sich an, mit der gemeinsamen Endstrecke aller Apoptosewege, der Termination, zu beginnen.

a) Termination der Apoptose

Jede Apoptose endet in den oben aufgelisteten strukturellen Veränderungen der Zelle (s. Tab. 1.1). Sie werden durch spezifische Enzyme hervorgerufen, die Caspasen genannt werden [Earnshaw, 1999]. Die Familie der Caspasen umfasst derzeit 14 homologe Enzyme, die einen Cystein-Rest in ihrem aktiven Zentrum tragen und ihre Substrate am Carboxy-Terminus eines Aspartat-Rests hydrolysieren (daher der Name „C(ystein)asp(artat)ase“). Rein nomenklatorisch gehören zu dieser Familie auch die Caspasen 1, 4 und 5, die allerdings bei der Apoptose keine Rolle spielen, sondern als Zytokine die Reifung von Immunzellen fördern. Alle anderen Caspasen sind für die Apoptose relevant und lassen sich nach ihrer Funktion in zwei Klassen einteilen: in Initiator-Caspasen, die an der Induktion der Apoptose mitwirken (z.B. Caspase-8 und -9), und Effektor-Caspasen, welche die Termination einleiten. Die wichtigsten Effektor-Caspasen sind Caspase-3, -6 und -7. Eine Hemmung dieser Enzyme verhindert in den meisten Zellen die Apoptose [Earnshaw, 1999].

Die Effektor-Caspasen haben überwiegend Substrate, deren Spaltung direkt oder indirekt die strukturelle Integrität einer Zelle zerstören. Zu den über 100 bekannten Substraten gehören zytoskelettale Proteine wie Fodrin und Gelsolin [Kothakota, 1997], diverse DNasen, die dadurch aktiviert werden und DNA abbauen [Wyllie, 1980], aber auch DNA-Reparaturenzyme, die durch Caspasen blockiert werden [Lazebnik, 1994] sowie das Protein PAK 2, das die Abschnürung der Membranvesikel bewirkt [Rudel, 1997].

b) Induktion der Apoptose

Die Apoptose-Stimuli lassen sich schematisch in zwei Gruppen einteilen: (1) spezifische Liganden membranständiger Todesrezeptoren (*death receptor pathway* oder *extrinsic pathway*) und (2) Mangel an Überlebensfaktoren bzw. Überschuss an zytotoxischen Faktoren, was über vielfältige Mechanismen die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien bewirkt (*mitochondrial pathway* oder *intrinsic pathway*).

Der *death receptor pathway* wird durch Liganden der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor-Familie initiiert. Werden diese Rezeptoren aktiviert, so trimerisieren sie und aktivieren ihrerseits durch ihre zytoplasmatischen Domänen (*death domains*) intrazelluläre Adapterproteine. Diese wiederum aktivieren Caspase-8, die wichtigste Initiator-Caspase. Die aktive Caspase-8 setzt die Kaskade der Effek-

tormechanismen in Gang. Das bekannteste Beispiel für diesen Mechanismus ist die Bindung von Fas-Ligand (FasL) and den Fas-Rezeptor (CD95).

Der *mitochondrial pathway* ist dadurch gekennzeichnet, dass die Permeabilität der mitochondrialen Membranen zunimmt. Durch eine Konformationsänderung regulatorischer Proteine wird auf noch ungeklärte Weise bewirkt, dass bestimmte Proteine aus den Mitochondrien in das Zytosol diffundieren. Das entscheidende Protein in diesem Zusammenhang ist Cytochrom C, welches in gesunden Zellen die Funktion der oxidativen Energiegewinnung innehat [Shimizu, 1999]. Befindet sich Cytochrom C jedoch im Zytosol, wirkt es als Apoptosesignal und bindet an Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*), was zu einer ATP-abhängigen Aktivierung von Caspase-9 führt. Diese aktiviert ihrerseits die Effektor-Caspasen 3 und 7, womit die gemeinsame Endstrecke beider Apoptosewege erreicht ist. Die anderen Proteine, welche gemeinsam mit Cytochrom C aus dem mitochondrialen ins zytosolische Kompartiment diffundieren, scheinen den Prozess zu verstärken: AIF (*apoptosis inducing factor*) [Susin, 1999], Smac/DIABLO [Du, 2000; Verhagen, 2000] und die Endonuklease G, die bei der DNA-Spaltung mitwirkt [Li, 2001].

Über den *mitochondrial pathway* wirken wichtige Apoptoseinduktoren wie etwa freie Sauerstoffradikale, exzitatorische Neurotransmitter wie Glutamat, zytotoxische Chemotherapeutika, Kortikosteroide, Viren und ionisierende Strahlung (Übersicht bei Kaufmann 2000). Bei einigen Zytostatika ist inzwischen erwiesen, dass auch der Fas-Rezeptor und damit der *death receptor pathway* eine Rolle spielt [Kaufmann, 2000].

c) Regulation der Apoptose

In beiden oben skizzierten Apoptosewegen gibt es redundante Möglichkeiten der Regulation. Eine Proteinfamilie namens IAP (*inhibitor of apoptosis proteins*) vermag durch die Blockade der Effektor-Caspasen 3 und 7 beide Apoptosewege gleichermaßen zu hemmen [Deveraux, 1999]. Zusätzlich hat jeder der beiden Apoptosewege noch eigene Regulatoren. Der *death receptor pathway* wird z.B. durch cFLIP (*cellular FLICE like inhibiting protein*) kontrolliert, der *mitochondrial pathway* hauptsächlich durch die Proteine der Bcl-2-Familie, allen voran Bcl-2, Bcl-x_L und Bax [Adams, 1998].

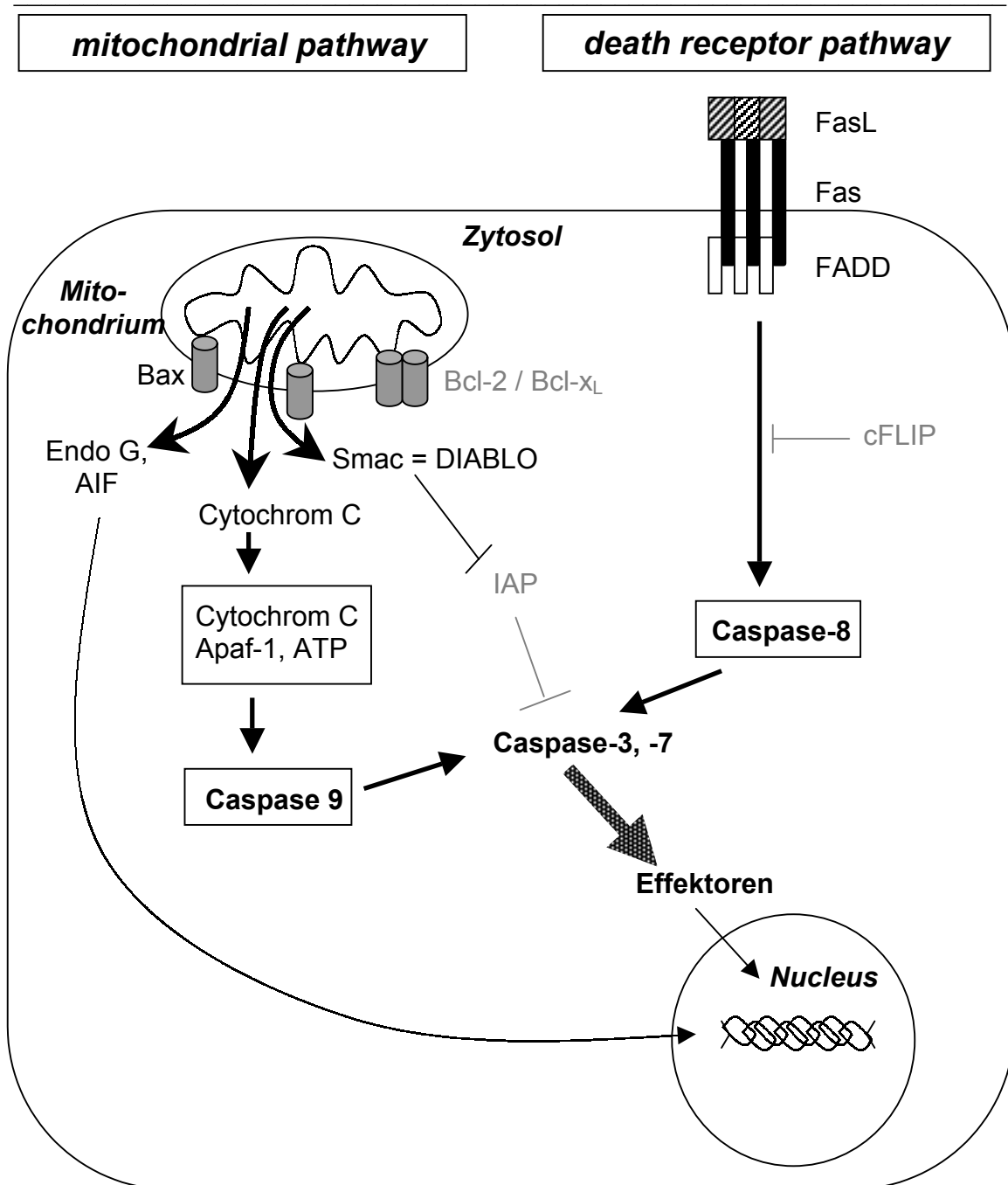


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen apoptotischen Zelltodes. Die dicken schwarzen Pfeile markieren die beiden Hauptwege der Apoptose, die in der Aktivierung der Caspasen 3 und 7 konvergieren. Die grauen Zylinder in der äußeren Mitochondrienmembran repräsentieren die als Mono- oder Dimere vorliegenden Proteine Bax, Bcl-2 und Bcl-x_L (Genauerer s. Seite 7f). Grau und kursiv gekennzeichnet sind die apoptosehemmenden Faktoren. AIF = *Apoptosis inducing factor*. Apaf-1 = *Apoptosis activating protease-1*. ATP = Adenosintriphosphat. cFLIP = *cellular FLICE like inhibiting protein*. DIABLO = *direct IAP binding protein with low pI* (= Smac). Fas = CD95. FasL = Fas-Ligand. FADD = *Fas death domain*. Smac = *Second mitochondria derived activator of caspases* (= DIABLO).

Bcl-2 ist das zentrale Regulationsprotein des *mitochondrial pathway*, aber auch der Apoptose im Ganzen. Die Bezeichnung geht darauf zurück, dass es erstmals in B-Zell-Lymphomen gefunden wurde (*b-cell lymphoma*) [Tsujiimoto, 1984]. Das Gen *bcl-2*, zur Unterscheidung vom dadurch kodierten Protein klein geschrieben, gilt als Protoonkogen.

Auf die Struktur und Funktion von Bcl-2 und seinen homologen Proteinen soll hier näher eingegangen werden, da es sich um die funktionell wichtigsten und am besten untersuchten Regulatoren der Apoptose handelt. Die Familie der nach Bcl-2 benannten Proteine umfasst zur Zeit 15 identifizierte Homologe, denen gemeinsam ist, dass sie mindestens eine von vier konservierten Domänen besitzen, die als „BH1“ bis „BH4“ (für *Bcl-2*-homologe Domänen) bezeichnet werden (s. **Abb 1.2**). Über die BH3-Domäne können alle Familienmitglieder aneinander binden und dadurch die funktionell aktiven Homo- und Heterodimere bilden.

Betrachtet man die Funktion der Proteine aus der Bcl-2-Familie, so kann man sie schematisch in eine anti-apoptotische und zwei pro-apoptotische Gruppen einteilen. Die anti-apoptotischen Proteine enthalten entweder alle vier BH-Domänen (z.B. Bcl-2 und Bcl-x_L) oder wenigstens BH1 und BH2 (z.B. Bcl-w, Mcl-1 und A1). Die pro-apoptotischen Proteine teilen sich auf in die Bax-Unterfamilie, deren Proteine BH1, BH2 und BH3 enthalten (z.B. Bax, Bak, Bok) und die *BH3-only*-Familie, deren Mitglieder nur die BH3-Domäne enthalten (z.B. Bik, Blk, Bad, Bim, Bid). BH3 scheint also eher für die pro-apoptotische Funktion, BH1 und BH2 dagegen für die anti-apoptotische Funktion relevant zu sein

Sämtliche Proteine der Bcl-2-Familie besitzen einen Membrananker, sind also membranassoziierte Proteine. Man findet sie überwiegend in der äußeren Membran des Mitochondriums, wo sie die Aufgabe haben, die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium zu kontrollieren. Damit regulieren sie einen entscheidenden Schritt im Ablauf der Apoptose, wie oben bereits erläutert. Wie genau die Proteine ihre Funktionen ausüben, ist unbekannt und Gegenstand intensiver Forschung [Finkel, 2001]. Am wahrscheinlichsten ist die Theorie, dass sie die Ionenpermeabilität der mitochondrialen Membran regulieren, indem sie den spannungsabhängigen Anionenkanal (VDAC, *voltage dependent anion channel*) öffnen und schließen [Shimizu, 1999]. Allerdings ist noch unklar, wie aus diesem normalerweise kleinen und nur für Ionen durchlässigen Kanal großmolekulare Proteine wie Cytochrom C diffundieren können [Hengartner, 2000]. Sicher ist nur, dass es die fein justierte Balance zwischen pro- und anti-

apoptotischen Proteinen ist, die über Leben und Tod der Zelle entscheidet. Dabei wird die Dominanz der einen oder anderen Fraktion sowohl über die Genexpression als auch über posttranslationale Modifikation – im wesentlichen Phosphorylierung – reguliert [Adams, 1998].

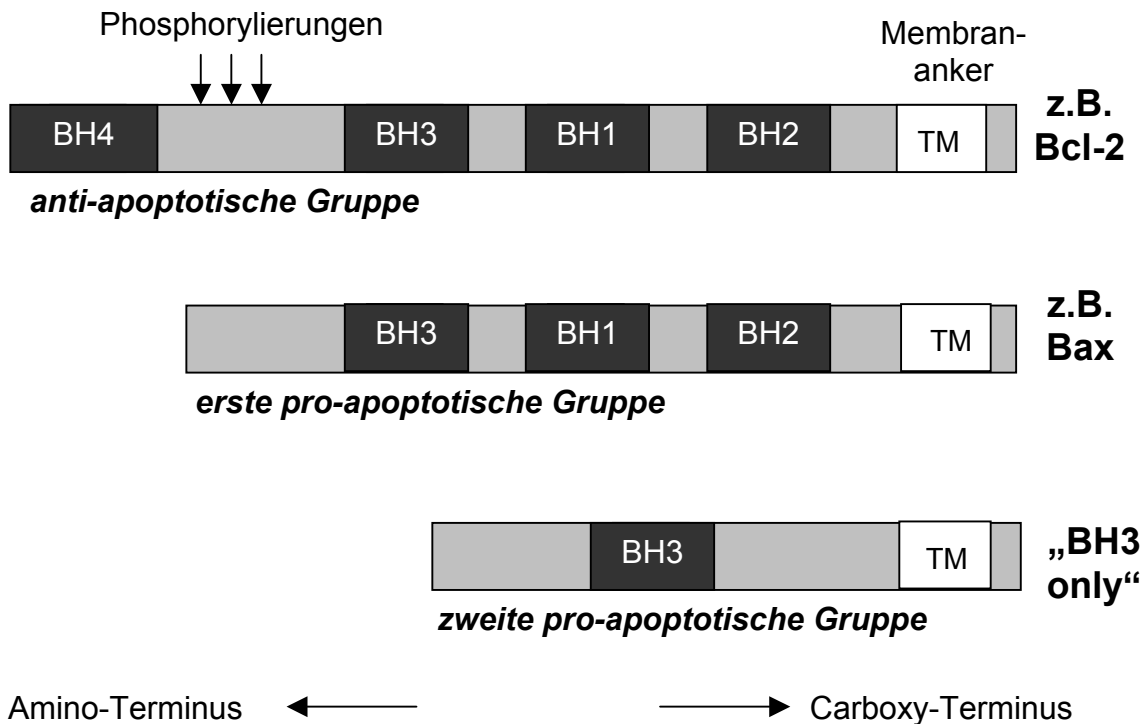


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der drei Hauptgruppen aus der homologen Bcl-2-Proteinfamilie, der anti-apoptischen Bcl-2-Gruppe, der pro-apoptischen Bax-Gruppe und der pro-apoptischen *BH3-only*-Gruppe. Schwarz unterlegt sind die evolutionär konservierten Homologie-Domänen (BH = Bcl-2-homologe Domänen). Weiß unterlegt ist die hydrophobe Transmembrandomäne. Für Bcl-2 sind auch die Phosphorylierungsdomänen mit Pfeilen gekennzeichnet. Eine kleine Untergruppe anti-apoptischer Proteine, die nur BH1 und BH2 enthalten (z.B. Bcl-w, A1), ist hier nicht dargestellt.

1.2.3 Pathogenetische Bedeutung der Apoptose

In den letzten Jahren wurde nicht nur entdeckt, wie komplex die molekularen Mechanismen der Apoptose sind, sondern auch mehr und mehr Anzeichen dafür gefunden, dass Fehler in der Apoptoseregulation eine wesentliche Rolle in der Pathogenese und Prognose von Krankheiten spielen können. Einerseits gibt es Krankheiten, die mit einer übermäßigen Apoptose bestimmter Zellen assoziiert sind – im folgenden „hyperapoptotische Krankheiten“ genannt. Hierzu gehören neurodegenerative, ischämische und hämatologisch-dysplastische Erkran-

kungen sowie die HIV-Infektion und die Ethanol-Toxikopathie. Andererseits sind viele Krankheiten mit einer verminderten Apoptoserate einzelner Zellen assoziiert – entsprechend „hypoapoptotische Krankheiten“ genannt. Dazu gehören viele Virusinfektionen, Autoimmunerkrankungen und Tumoren.

Hyperapoptotische Krankheiten	Hypoapoptotische Krankheiten
1. Neurodegenerative Erkrankungen	1. Manche Virusinfektionen (z.B. Adenoviren)
2. Ischämische Erkrankungen und Reperfusionssyndrom	2. Autoimmunerkrankungen (z.B. Multiple Sklerose)
3. Myelodysplastisches Syndrom und aplastische Anämie	3. Tumore/Neoplasien (z.B. die chronische lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp, B-CLL)
4. Ethanol-Toxikopathien (z.B. Ethanol-Hepathopathie)	
5. Humanes Immundefizienz- Virus (HIV)	

Tab. 1.2: Klassifikation wichtiger Krankheitsgruppen nach der pathogenetischen Bedeutung von Defekten im apoptotischen Zelltod. Hyperapoptotische Krankheiten sind durch eine übermäßige spontane Apoptoserate bestimmter Zellen gekennzeichnet, hypoapoptotische Krankheiten hingegen durch eine verminderte spontane und induzierbare Apoptoserate. Die Auflistung hat exemplarischen Charakter und beansprucht keine Vollständigkeit.

Die vorliegende Arbeit stellt die Rolle der Apoptose im Rahmen maligner Tumoren in den Mittelpunkt des Interesses. Tumore wurden lange Zeit nur als Erkrankungen des Zellzyklus angesehen, nämlich als Folgen einer unkontrollierten Zellproliferation. Inzwischen ist erkannt worden, dass Tumore sich auch oder sogar in erster Linie durch Immortalisierung und Resistenz gegenüber Apoptosestimuli auszeichnen.

Tumorzellen gewinnen einen Selektionsvorteil gegenüber gesunden Zellen, wenn sie durch Mutationen eine größere Apoptoseresistenz entwickeln [Thompson, 1995]. Folgende Phänomene weisen auf den hohen Selektionsdruck hin, dem Tumorzellen in dieser Hinsicht ausgesetzt sind: (1) Die beschleunigte Proliferation von Tumorzellen führt zu einer relativen Ischämie im gefäßfernen Tumorzentrum, was die Apoptose induziert; (2) Das zelluläre Immunsystem er-

kennt anfangs maligne entartete Zellen und lanciert eine zytotoxische T-Zellantwort gegen sie, die über Fas oder Granzyme B die Apoptose herbeiführt; (3) Metastatischen Tumorzellen fehlen die parakrinen Überlebensfaktoren ihres Ursprungsgewebes, wodurch die Schwelle zur Apoptose sinkt; (4) Durch die unkontrollierte Proliferation sowie durch Chemo- und Radiotherapie entstehen Zellschäden wie etwa DNA-Strangbrüche, die Apoptose-auslösend wirken können. Dieser Selektionsdruck in Verbindung mit der erhöhten Mutationsrate maligner Tumorzellen mag die Häufung genetischer Ereignisse erklären, die zu einer verstärkten Apoptoseresistenz bei diesen Zellen führen.

1.2.4 Pathogenetische Bedeutung von Bcl-2

Die vorliegende Arbeit fokussiert auf die Rolle von Bcl-2 in der Apoptose maligner Zellen, weil Bcl-2 das funktionell wichtigste und am genauesten charakterisierte regulatorische Protein der Apoptose darstellt. Bcl-2 wurde entdeckt, als die *breakpoint cluster region* der in 80 Prozent aller follikulären Lymphomen vorkommenden Translokation t(14;18) untersucht wurde: Das bcl-2-Gen transloziert hierbei von Chromosom 18 (18q21) auf Chromosom 14 (14q32) und gerät damit unter den Einfluss des dortigen Enhancers der schweren Immunglobulin-Kette E μ [Tsujiimoto, 1984]. Dadurch kommt es zu einer Überexpression von Bcl-2 mit resultierender Apoptoseresistenz der Lymphomzelle.

Bcl-2 ist ein 239 Aminosäuren umfassendes und 26 kDa schweres Protein, das vor allem in der äußeren Mitochondrienmembran, aber in geringerer Menge auch in den Membranen des Kerns und des glatten endoplasmatischen Retikulums lokalisiert wurde [Krajewski, 1993]. Neben seiner anti-apoptotischen Funktion blockiert es auch den Eintritt der Zelle in den Zellzyklus und arretiert die Zelle in der G0-Phase [Vairo, 2000]. Beide Effekte werden allerdings durch verschiedene Domänen des Bcl-2-Proteins ausgeführt [Huang, 1997].

Beim gesunden Erwachsenen wird Bcl-2 lediglich in solchen Zellen exprimiert, die durch eine lange Lebensdauer gekennzeichnet sind [Hockenbery, 1991]. Dazu gehören postmitotische Neurone, Regenerationszellen epithelialen Gewebes (z.B. in der Kryptenbasis des Darmepithels oder im Stratum germinale der Epidermis) und alle hämatologischen Stammzellen. Im Gegensatz zu letzteren sind ausdifferenzierte Blutzellen im allgemeinen Bcl-2-negativ [Blandino, 1997]. Ausnahmen bilden die langlebigen B-Gedächtniszellen [Nunez, 1991] sowie einige T-Lymphozyten im medullären Thymus. In den genannten Zellen eines ge-

sunden Menschen wird Bcl-2 zwar exprimiert, aber im Gegensatz zu seiner Expression in Tumorzellen nur schwach. Daher gilt die Bcl-2 als weitgehend tumorselektives Protein.

Wichtige Erkenntnisse zur physiologischen Funktion von Bcl-2 stammen von transgenen Mausmodellen. Bcl-2-Knockout-Mäuse erscheinen bei Geburt normal, entwickeln jedoch eine Hypopigmentierung der Haare, eine polyzystische Nierenerkrankung, neuronale Degenerationen und Darmdistorsionen [Veis, 1993]. Als Ursache hierfür konnte ein apoptotischen Zelluntergang der Melanozyten, Nierenepithelzellen, Neurone und Darmepithelzellen nachgewiesen werden. Das Immunsystem ist durch eine gesteigerte Apoptose T- und B-Zell-depletiert, was zur Involution von Thymus und Milz führt. Dennoch überleben Bcl-2-Knockout-Mäuse im Gegensatz zu Bcl-x_L-Knockout-Mäusen, die in utero durch exzessive Apoptose von Nervenzellen sterben [Motoyama, 1995].

Transgene Mäuse, die Bcl-2 überexprimieren, haben ein hyperplastisches lymphatisches Kompartiment mit Vergößerung der weißen Milzpulpa und der Follikelzentren in Lymphknoten [McDonnell, 1989]. Die Hyperplasie beruht auf einer Akkumulation kleiner, reifer B-Zellen mit verlängerter Überlebenszeit und Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Apoptosestimuli. Auch reaktive Plasmazellen und T-Zellen sind in diesen Mäusen vermehrt, was zu einem autoimmunen, dem Lupus erythematodes ähnelnden Krankheitsbild führt [O'Connor, 1999]. Bcl-2-transgene Mäuse entwickeln nur selten und erst nach einer längeren Zeit Lymphome [Strasser, 1990].

Während die physiologische Funktion von Bcl-2 durch transgene Mausmodelle nur indirekt erhellt werden kann, ist über die pathologische Rolle von Bcl-2 in menschlichen Tumoren mehr bekannt. Das Protein wird in den meisten humanen Non-Hodgkin-Lymphomen (z. B. großzelliges Lymphom, Mantelzelllymphom) und Leukämien (CLL, AML) überexprimiert, nicht jedoch im Hodgkin-Lymphom [Zutter, 1991]. Auch in zahlreichen soliden Tumoren (v.a. Mamma-, Prostata-, Magen-, Lungen-, kolorektales Karzinom und Melanom) wurde eine Überexpression von Bcl-2 festgestellt [Reed, 1995; Blandino, 1997]. Die Ursache der Bcl-2-Überexpression in Tumoren scheint nur in den oben erwähnten folliculären Lymphomen die klassische interchromosomale Translokation zu sein, in den anderen Fällen eher eine Induktion über den Bcl-2-Promotor [Blandino, 1997] oder eine pathologische Hypomethylierung des Promotors [Hanada, 1993]. Die Hochregulation von Bcl-2 kann je nach Tumor ein frühes [Bronner, 1995] oder spätes [Furuya, 1996] Ereignis im Mehrschrittprozess der Onkoge-

nese sein. Die Bcl-2-Überexpression als solche reicht in den wenigsten Fällen für die Entstehung eines Tumors aus. Untersuchungen an gesunden Probanden ergaben, dass t(14;18)-Translokationen mit Bcl-2-Überexpression sogar bei bei Gesunden vorkommen und mit dem Alter zunehmen [Yang, 1996]. Es müssen also weitere Faktoren hinzukommen, damit aus den Bcl-2 überexprimierenden Zellen Tumorzellen werden. Untersuchungen mit doppelt transgenen Mäuse haben gezeigt, dass erst die Kombination einer Überexpression von Bcl-2 und einem proliferationsstimulierenden Onkogen wie c-myc lymphatische Tumoren entstehen lässt [Strasser, 1990].

So umstritten die Rolle von Bcl-2 in der Tumorinitiation ist, so klar ist sie in der Tumorprogression. Ist die Zelle einmal maligne transformiert, schützt Bcl-2 sie vor der Apoptose [O'Connor, 1999]. Kein anderer Faktor wurde so oft mit Chemoresistenz assoziiert wie eine Bcl-2-Überexpression. Die Resistenz maligner Zellklone gegenüber Zytostatika ermöglicht es ihnen, neue genetische Aberrationen zu akkumulieren und somit noch aggressivere Klone hervorzubringen. Die Chemotherapie wird also durch Apoptosehemmer wie Bcl-2 gleichsam von einer zytotoxischen zu einer zytoreduktiven Therapie abgemildert, und das Resultat ist ein Rezidiv mit noch aggressiveren, multiresistenten Zellklonen [Reed, 1995]. Interessanterweise wurde erst durch die Entdeckung von Bcl-2 und dessen Fähigkeit, Zellen chemoresistent zu machen, erkannt, dass sämtliche Zytostatika und Strahlentherapien ihre Wirkung durch die Induktion von Apoptose und nicht Nekrose ausüben [Kaufmann, 2000]. In vielen Tumoren wurde Bcl-2 als prognostischer Indikator für das Ansprechen des Tumors auf eine Chemotherapie etabliert [Yang, 1996].

Auf Grund dieses experimentellen und klinischen Wissens stellt Bcl-2 ein attraktives Angriffsziel für neue Therapieformen von Tumoren dar. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ist gezeigt worden, dass eine experimentelle Bcl-2-Reduktion die spontane Apoptoserate einiger Tumorzellen steigern und ihre Sensitivität gegenüber Zytostatika erhöhen kann (s. Kapitel 1.4.2). Dies wurde insbesondere bei der chronischen lymphatischen Leukämie vom B-Zelltyp (B-CLL) gezeigt, die als Prototyp derjenigen Tumore gilt, in denen die Bcl-2-Überexpression und resultierende Apoptoseresistenz wesentlich zur Pathogenese und Progression beitragen. Warum gerade die B-CLL sich für diese Therapieform eignet, soll im nächsten Kapitel durch eine Einführung in die Klinik und Biologie dieser Erkrankung erläutert werden.

1.3 Chronische lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp (B-CLL)

1.3.1 Klinik der B-CLL

Die B-CLL ist in westlichen Ländern mit einer Inzidenz von 3 pro 100 000 Einwohner die häufigste Form der Leukämie bei Erwachsenen. Männer erkranken doppelt so häufig wie Frauen. Das mediane Alter bei der Erstdiagnose beträgt 65 Jahre, wobei der Anteil junger Patienten in den letzten Jahren gestiegen ist, was auf häufigere Blutbilduntersuchungen in diesem Kollektiv zurückgeführt wird [Hallek, 2001 b]. Die Ätiologie ist ungeklärt. Es gibt im Gegensatz zu anderen Leukämien keine Hinweise auf eine Rolle exogener Noxen. Eine genetische Prädisposition gilt als sicher, da das Erkrankungsrisiko bei Verwandten ersten Grades 2- bis 7-fach erhöht ist [Hamblin, 1998].

Die B-CLL wird oft inzidentell in einem symptomlosen Stadium entdeckt. Erste Symptome sind zumeist schmerzlose Lymphknotenschwellungen. In späteren Stadien leiden die Patienten unter den Folgen der Knochenmarkinfiltration, insbesondere unter Blutungsneigung, Anämie und Infekten. Eine B-Symptomatik kommt nur bei einem kleinen Teil der Patienten vor, zumeist erst in fortgeschrittenen Stadien und bei *bulky disease*. Oft entwickelt sich im Lauf der Erkrankung eine ausgeprägte Hypogammaglobulinämie, die zusammen mit der immunologischen Inkompetenz des malignen B-Zellklons die Infektneigung verstärkt. Häufige Komplikationen sind Autoimmunzytopenien – meist autoimmunhämolytische Anämien und Thrombozytopenien, seltener Neutropenien und Erythrozytopenien. Der Krankheitsverlauf ist äußerst heterogen und schwer vorherzusagen. In fünf Prozent der Fälle findet eine Transformation in eine Prolymphozyten-Leukämie oder ein hochmalignes Non-Hodgkin-Lymphom statt (Richter-Syndrom). Die Patienten haben ein erhöhtes Risiko, an Zweitneoplasien zu erkranken (v.a. Bronchialkarzinom, malignes Melanom, Karzinome des Gastrointestinaltrakts). Die Haupt-Todesursachen sind Blutungen, Infekte und Kachexie.

Für die Diagnose einer B-CLL müssen folgende Laborbefunde vorliegen:

1. Lymphozytose im peripheren Blut mit $\geq 5 \times 10^9$ Zellen/l
2. Vorherrschen kleiner, morphologisch reif wirkender Lymphozyten
3. Koexpression typischer B-Zellmarker (CD19, CD23) und des B-CLL-typischen Markers CD5, aber nur eine schwache Expression von CD20 und Oberflächenimmunglobulinen; klonale Restriktion auf einen Typ der Immunglobulinleichtketten (κ oder λ)

Die Biopsie befallener Lymphknoten ergibt ein charakteristisches histologisches Bild: Die normale Lymphknotenarchitektur ist aufgehoben, Keimzentren sind nicht mehr erkennbar und die Sinus sind durch Infiltrate kleiner lymphatischer Zellen mit verklumptem Chromatin obliteriert [Hallek, 2001 b]. In zehn Prozent aller Fälle zeigt sich ein diffuses, in 90 Prozent ein pseudofollikuläres Wachstumsmuster. In Europa wird die B-CLL in Binet-Stadien eingeteilt (s. **Tab 1.3**).

Stadium	Definition	medianes Überleben
A	Hb > 10 g/dl <i>und</i> Thrombozytenzahl \geq 100 000 <i>und</i> < 3 vergrößerte Lymphknotenregionen	> 10 Jahre
B	Hb > 10 g/dl <i>und</i> Thrombozytenzahl \geq 100 000 <i>und</i> \geq 3 vergrößerte Lymphknotenregionen	5 Jahre
C	Hb \leq 10 g/dl <i>oder</i> Thrombozytenzahl < 100 000/ μ l unabhängig von der Anzahl vergrößerter Lymphknotenregionen	2 Jahre

Tab. 1.3: Stadieneinteilung der chronischen lymphatischen Leukämie nach Binet [Binet, 1981]. Lymphknoten gelten ab > 1 cm als vergrößert. Zervikale, axilläre, inguinale Lymphknoten sowie eine vergrößerte Leber oder Milz gelten je als eine Lymphknotenregion. Hb = Hämoglobin.

Diese Einteilung hat prognostische und therapeutische Relevanz. Besondere Beachtung verdient die *smoldering CLL*, eine Sonderform des Stadiums Binet A, die etwa 30 Prozent dieses Stadiums ausmacht. Sie ist dadurch gekennzeichnet, dass die Patienten eine im Vergleich zur Normalbevölkerung kaum reduzierte Lebenserwartung haben. Neben den Binet-Stadien gibt es eine Reihe weiterer prognostisch bedeutsamer Faktoren. Folgende Parameter weisen auf einen ungünstigen Krankheitsverlauf hin:

- erhöhte Serum-Thymidinkinase (s-Tk)
- erhöhtes β_2 -Mikroglobulin im Serum (β_2 M)
- initiale Lymphozytenzahl > 50×10^9 Zellen/l
- Lymphozytenverdoppelungszeit < 12 Monaten
- diffuse Typ der Knochenmarksinfiltration
- erhöhte Laktatdehydrogenase im Serum
- erhöhte CD23-Spiegel im Serum

-
- zytogenetische Aberrationen: 11q23, 17p13, Trisomie 12
 - schlechter körperlicher Allgemeinzustand
 - fehlendes Ansprechen auf die initiale Chemotherapie mit Alkylantien

Die B-CLL ist eine bislang unheilbare Erkrankung. Der einzige kurative Ansatz ist die zur Zeit noch experimentelle myeloablative Hochdosis-Chemotherapie mit allogener Knochenmarks- oder autologer Stammzellentransplantation. Zwar können mit einer allogenen Transplantation hohe Remissionsraten erzielt werden, jedoch ist die therapieassoziierte Mortalität sehr hoch. Die Rate therapiebedingter Todesfälle ist bei der autologen Transplantation hingegen niedriger, dafür kann die Verunreinigung des autologen Transplantats durch Leukämiezellen nicht ganz ausgeschlossen werden und begründet eine höhere Rezidivgefahr. Aus diesen Gründen wird derzeit nur bei geeigneten, motivierten Patienten unter 60 Jahren eine autologe Transplantation im Rahmen klinischer Studien empfohlen. Die allogene Transplantation wird aus Gründen der Toxizität auf therapierefraktäre Patienten beschränkt [Hallek, 2001 a].

Die Chemotherapie verfolgt eine palliativen Zielsetzung. Das alkylierende Zytostatikum Chlorambucil wurde bisher am häufigsten eingesetzt. Damit werden bei 30 bis 70 Prozent aller nicht anbehandelten Patienten Remissionen erzielt, die jedoch nur in drei Prozent komplett sind [Hallek, 2001 a]. Chlorambucil eignet sich wegen der oralen Applikationsform zur ambulanten Therapie. Mit dem Purinanalogen Fludarabin hingegen lassen sich bei der Erst- und Rezidivbehandlung höhere Ansprechraten erzielen: Remissionen sind bei 70 bis 80 Prozent der unvorbehandelten und 13 bis 67 Prozent der vorbehandelten Patienten zu sehen, komplette Remissionen bei 23 bis 37 Prozent der nicht vorbehandelten und ebenfalls bis zu 37 Prozent bei vorbehandelten Patienten [Byrd, 1998; Hallek, 2001 a]. Fludarabin-haltige Kombinationen mit Mitoxantron und/oder Cyclophosphamid sind auch noch im Rezidiv gut wirksam. So zeigte die Kombination von Fludarabin und Mitoxantron in einer Phase-II-Studie bei rezidivierter B-CLL eine Ansprechraten von 81 Prozent und eine Häufigkeit kompletter Remissionen von 25 Prozent [Emmanouilides, 1998]. Rezidive stellen bei der B-CLL das Hauptproblem dar, da die Patienten nach der Primärtherapie oft eine Teil- oder Vollresistenz gegen Alkylantien und Purinanaloga entwickeln. Das mediane Überleben nach Primärtherapie beträgt deshalb nur zwei Jahre.

Noch im experimentellen Stadium befindet sich die Immuntherapie der B-CLL. Der Anti-CD20-Antikörper Rituximab (Mabthera[®]) scheint bei der B-CLL weniger effektiv zu sein als bei anderen Non-Hodgkin-Lymphomen und birgt zudem das

gefährliche Risiko eines Zytokin-Freisetzungssyndroms [Grillo-Lopez, 1999]. Der Anti-CD52-Antikörper CAMPATH-1H (Alemtuzumab) zeigt einen etwas stärkeren Effekt und könnte sich zur Therapie einer minimalen Residualerkrankung oder zum *In-vitro-Purging* bei Hochdosis-Chemotherapie eignen [Schulz, 2000]. Die große Herausforderung in der B-CLL-Therapie stellt zur Zeit also die Behandlung der chemoresistenten Rezidive dar. Will man diese frühzeitig und selektiv unterdrücken, wird eine immunologische oder molekulare Strategie notwendig, welche z.B. die für die Chemoresistenz verantwortliche Apoptosehemmung angreifen könnte. Hierzu bedarf es jedoch einer genauen Kenntnis der Biologie dieser Erkrankung.

1.3.2 Biologie der B-CLL

Die B-CLL ist eine klonale Erkrankung, bei der ausdifferenzierte, nicht proliferierende, aber langlebige und apoptoseresistente B-Lymphozyten im peripheren Blut und retikulo-endothelialen System (Knochenmark, Lymphknoten, Milz) akkumulieren. Die malignen Zellen der B-CLL exprimieren ähnliche Oberflächenmarker wie reife B-Zellen in der Mantelzone sekundärer Lymphfollikel. Typisch für B-CLL-Zellen ist eine starke Expression von CD5. Bei Gesunden findet man CD5-positive B-Zellen außer in Sekundärfollikeln im Epithel von Pleura und Peritoneum. Sie produzieren niedrigaffine, polyreaktive natürliche Auto-Antikörper, die mit zahlreichen Auto-Antigenen reagieren [Wortis, 2001]. Um diese Zellen von den normalen B-Zellen zu unterscheiden, wurden sie B-1-Zellen und die CD5-negativen Zellen B-2-Zellen genannt [Kantor, 1991]. B-1-Zellen haben mit den malignen B-CLL-Zellen außer der Expression von CD5 weitere Gemeinsamkeiten: eine schwache Expression von CD20, die Fähigkeit zur Bildung von Rosetten mit murinen Erythrozyten und die Expression myelomonozytärer Adhäsionsproteine. B-1-Zellen sind durch den Kontakt mit Auto-Antigenen anergisiert und exprimieren – wie B-CLL-Zellen – nur wenig sIgM. Darauf basiert die Hypothese, es handele sich bei der B-CLL um eine maligne Erkrankung anergischer, autoreaktiver, CD5-positiver B-1-Zellen [Caligaris-Cappio, 2000].

Da B-CLL-Zellen zwar MHC II besitzen, aber nur eine minimale Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 aufweisen, sind sie im Gegensatz zu gesunden B-Zellen schlechte antigenpräsentierende Zellen (APC). Sie sind nicht in der Lage, antigenspezifische T-Zellen effektiv zu stimulieren [Eris, 1994]. Darüber hinaus haben sie oftmals einen defekten B-Zell-Rezeptor, was ebenfalls eine T-Zell-Aktivierung verhindert [Caligaris-Cappio, 2000]. Durch diesen

Mechanismus umgehen sie die Immunüberwachung, die physiologischerweise entartete Zellen durch zytotoxische T-Zellen eliminieren würde.

Da die Interaktion von CD40 mit CD154 über den Transkriptionsfaktor NF- κ B zu einer Hochregulation der kostimulatorischen Proteine CD80 und CD86 in B-CLL führt [Furman, 2000], setzt eine neue therapeutische Strategie dort an: Mittels retroviralem Gentransfer werden die konstitutiv CD40 exprimierenden B-CLL-Zellen mit CD154 transfiziert, was über Zell-Zell-Kontakte zu einer Aktivierung von CD40, einer Induktion der kostimulatorischen Proteine und letztlich einer T-Zell-vermittelten Tumorlyse führen soll. Mit diesem Ansatz wurde bereits eine Phase-I-Studie durchgeführt, die eine Aktivierung B-CLL-spezifischer zytotoxischer T-Zellen und eine Reduktion der Lymphozytose und Lymphknotengröße ohne relevante Nebenwirkungen zeigte [Wierda, 2000]. Es wird spekuliert, dass ein ähnlicher Mechanismus *in vivo* die Autoimmunphänomene bei der B-CLL erklären könnte: Werden die zirkulierenden B-CLL-Zellen etwa in der Milz durch T-Helferzellen mittels CD154-CD40-Interaktion aktiviert, so präsentieren sie in diesem Milieu Antigene degradierter Erythrozyten oder Thrombozyten und veranlassen gesunde B-Zellen zur Produktion von Autoantikörpern gegen diese Antigene [Caligaris-Cappio, 2000].

B-CLL-Zellen weisen zu 82 Prozent chromosomale Aberrationen auf [Dohner, 2000]. Es gibt aber keine einzige karyotypische Abnormität, die sich konstant in allen B-CLL-Formen finden ließ und daher diagnostisch nützlich wäre. Am häufigsten ist die Deletion 13q14.3. Während diese Aberration jedoch mit einer günstigen Prognose assoziiert ist, zeigen die Trisomie 12 und die Deletion 6q21-q23 eine ungünstige Prognose an. Ebenfalls ungünstig sind Deletionen in der Region 11q22.3-q23.1, die bei ausgedehntem Lymphknotenbefall und aggressiver Verlaufsform gefunden werden und mit Mutationen des Ataxia teleangiectasia-Gens in Zusammenhang gebracht werden [Bullrich, 1999]. Beim Richter-Syndrom findet man sogar Mutationen von p53 in der Region 17p13.3 [Gaidano, 1991].

B-CLL-Zellen sind in der G₀-Phase des Zellzyklus arretiert. Die Akkumulation der Zellen kommt also nicht durch Proliferation, sondern durch die verlängerte Lebensdauer der Zellen zustande. Na⁺/H⁺-Antiporter, die in normalen B-Zellen für eine Lipopolysaccharid- oder Mitogen-induzierte Proliferation erforderlich sind, sind in B-CLL-Zellen deutlich reduziert. Der G₀-Block kann durch die üblichen B-Zell-Mitogene nicht überwunden werden [Caligaris-Cappio, 2000].

Die B-CLL ist der Prototyp einer malignen Erkrankung, die durch einen Defekt im Apoptose-Mechanismus geprägt ist [Caligaris-Cappio, 1999]. Die Balance der Proteine der Bcl-2-Familie ist zu Gunsten eines anti-apoptotischen Gesamteffekts verändert: Das anti-apoptotische Bcl-2 ist über- und das proapoptotische Bax unterexprimiert, der Bcl-2/Bax-Quotient damit deutlich erhöht. Das anti-apoptotische Bcl-x_L wird stark exprimiert, sein proapoptotisches Pendant Bcl-x_S dagegen schwach. Die Überexpression von Bcl-2 kann bei 76 Prozent aller Patienten bereits früh im Verlauf nachgewiesen werden [Lazaridou, 2000], ist aber auf molekularer Ebene noch nicht erklärt. Die klassische t(14;18)-Translokation findet sich im Gegensatz zum folliculären Lymphom bei der B-CLL selten [Jonveaux, 1992]. Nur in 7 bis 10 Prozent aller Fälle lässt sich mit dem *southern blot* ein Bcl-2-Genrearrangement nachweisen, wobei die Breakpoint-Region nicht in der *major breakpoint region* des Bcl-2-Gens, sondern am 5'-Ende liegt, und bcl-2 vorzugsweise vor die Leichtkettengene transloziert wird [Merup, 1996]. Andererseits gibt es einen Bericht, wonach mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese Bcl-2-Genrearrangements in neun von neun CLL-Patienten nachgewiesen wurden [Laytragoon-Lewin, 1998].

Das veränderte Expressionsmuster der Proteine aus der Bcl-2-Familie und eventuell noch weitere, bislang unbekannte Mechanismen erklären die lange Lebensdauer der B-CLL-Zellen sowie deren Chemoresistenz in der Rezidivtherapie. Eine selektive Apoptoseinduktion in B-CLL-Zellen stellt somit eine attraktive therapeutische Option dar und kann an verschiedenen Stellen ansetzen.

Eine der Strategien versucht, wie oben erwähnt, die Immunogenität maligner B-Zellen zu erhöhen und damit eine spezifische zytotoxische T-Zellreaktion zu bahnen. Eine andere Strategie verfolgt die selektive Hemmung der Expression von Bcl-2, das eine zentrale Stellung in der Apoptoseresistenz einnimmt und ein prognostischer Faktor für den Erkrankungsverlauf ist [Adams, 1998]. Eine Ausschaltung der Bcl-2-Funktion könnte entweder zur spontanen Apoptose führen oder aber die Zellen für zytotoxische Medikamente sensibilisieren. Bcl-2 eignet sich auch deshalb gut für diese Versuche, weil es – wie in Kapitel 1.1.4 bereits dargelegt – in gesunden Körperzellen kaum exprimiert wird und damit weitgehend tumorselektiv ist. Bcl-2 lässt sich jedoch als intrazelluläres, membrangebundenes Protein, das sich in seiner Konformation nur minimal von homologen Proteinen derselben Familie unterscheidet, kaum mit den proteinblockierenden Pharmaka angreifen. Es bedarf dazu einer subtileren Methode, wie sie auf paradigmatische Weise die Antisense-Technologie darstellt.

1.4 Antisense-Oligonukleotide (Antisense-ODN)

1.4.1 Molekulare Grundlagen der Antisense-Technologie

Die molekularbiologische Revolutionierung der modernen medizinischen Forschung bringt es mit sich, dass immer mehr Gene entdeckt werden, die an Krankheitsprozessen kausal beteiligt sind. In der Tumorforschung wurden auf diesem Weg Protoonkogene und Tumorsuppressorgene gefunden, deren Geneprodukte spezifisch für Krebszellen sind und in gesunden Zellen entweder nicht vorkommen oder konstitutiv supprimiert sind. Wenn es gelingen sollte, diese pathogenetisch entscheidenden Elemente selektiv in Tumorzellen und idealerweise bereits auf DNA- oder RNA-Ebene zu blockieren, stünde damit theoretisch eine Therapie mit minimalen Nebenwirkungen zur Verfügung. Vor diesem Hintergrund entstanden in den letzten Jahrzehnten neue pharmakotherapeutische Modelle wie die Gentherapie oder die Antisense-Therapie, Beispiele von *rational drug design*.

Im Gegensatz zur Gentherapie, bei der eine DNA-Sequenz mit Hilfe viraler Vektoren in das Wirts-Genom integriert und dadurch die Transkription eines Gens vermindert oder verstärkt wird, lässt die Antisense-Technologie das Genom unverändert, greift erst auf der Ebene der Translation ein und hemmt die Expression eines bestimmten Proteins durch Interaktion mit der protein-kodierenden RNA (s. **Abb. 1.3**). Antisense-Oligodesoxyribonukleotide – kurz Antisense-ODN – sind einzelsträngige DNA-Moleküle mit einer Länge von 16 bis 20 Basen [Tamm, 2001]. Sie sind so konstruiert, dass ihre Basen komplementär sind zur Basenabfolge einer definierten Ziel-RNA – entweder der heterogenen nukleären RNA (hnRNA) oder der Messenger-RNA (mRNA) – [Warzocha, 1999]. Statistische Berechnungen zeigen, dass eine 15-17mer-Nukleotidsequenz durchschnittlich nur einmal im Genom vorkommt, so dass ab dieser Länge theoretisch eine exquisite Spezifität für die Ziel-RNA gewährleistet ist [Lebedeva, 2001].

Die ODN binden an die Ziel-RNA über eine Watson-Crick-Basenpaarung und bilden eine sogenannte RNA-DNA-Heteroduplex. Wie Experimente zeigten, wird dadurch die Translation der RNA blockiert und die Neusynthese des Proteins verhindert. Dies hat zur Folge, dass die messbare intrazelluläre Menge des betroffenen Proteins mit der Rate seiner Halbwertszeit abnimmt. Wie genau die Translation blockiert wird, ist letztlich noch nicht restlos geklärt. Zu einem kleinen Teil ist der Effekt auf eine sterische Behinderung des ribosomalen Translationskomplexes und der posttranskriptionalen Modifikationsprozesse wie

5'Capping, 3'Polyadenylierung oder Splicing zurückzuführen [Crooke, 1999]. Praktisch bedeutsamer als diese Mechanismen ist jedoch die RNase H, ein ubiquitär vorkommendes Enzym, das RNA-DNA-Heteroduplexes so angreift, dass es den RNA-Anteil degradiert, jedoch den DNA-Anteil intakt lässt [Walder, 1988]. Damit kann ein Molekül der RNase H zahlreiche RNA-Moleküle degradieren.

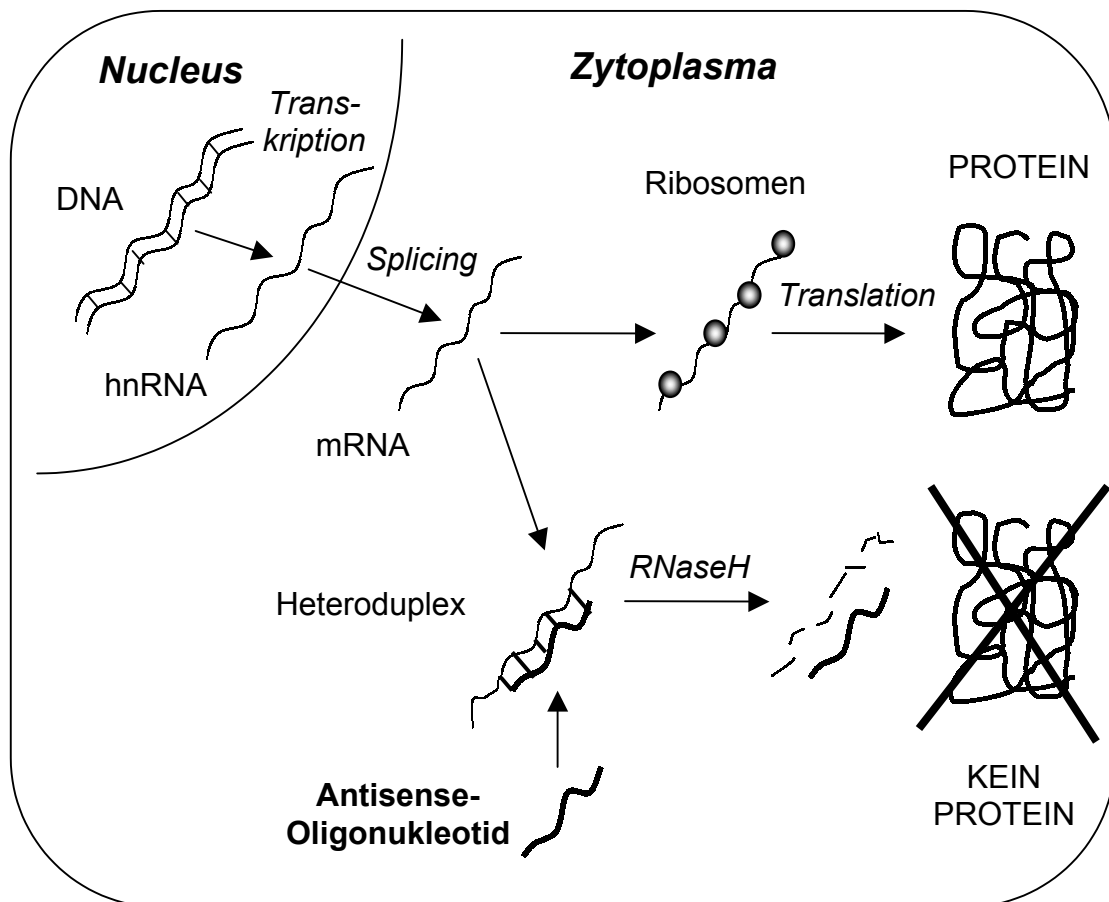


Abb. 1.3: Wirkungsweise von Antisense-ODN *in theoria*. Die Abbildung soll schematisch eine Zelle mit ihren Kompartimenten Nucleus und Zytoplasma darstellen. Die Expression eines Proteins wird auf der Ebene der heterogenen nukleären Ribonukleinsäure (hnRNA) oder der Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) durch die Hybridisierung der RNA mit einem Antisense-ODN und die anschließende enzymatische RNA-Degradation durch die RNase H verhindert. DNA = Desoxyribonukleinsäure.

Die Wirksamkeit eines Antisense-ODN wird durch geeignete Negativkontrollen empirisch bestimmt. Hierzu werden ODN verwendet, die zwar dieselben Basen enthalten wie das Antisense-ODN, jedoch nicht in derselben Reihenfolge. Werden sämtliche Basen randomisiert umverteilt, spricht man von einer *scrambled control*, tauschen zwei Basen analog einer Rochade ihre Plätze innerhalb der Sequenz, spricht man von einer *mismatch control* [Stein, 1998].

Der Antisense-Effekt kann durch Messung der Ziel-RNA oder des entsprechenden Proteins nachgewiesen werden. Zum Ausschluss einer unspezifischen Expressionshemmung muss eine Kontroll-RNA bzw. ein Kontrollprotein mitgemessen werden. Am besten wird dies mit einer homologen RNA bzw. einem homologen Protein durchgeführt, da hierdurch am ehesten intervenierende Variablen nivelliert und eventuelle Effekte auf die reine Sequenz reduzierbar werden.

Die Antisense-Technologie ermöglicht theoretisch eine spezifische Hemmung der Expression einzelner Gene und damit eine selektive Elimination einzelner Proteine. Dadurch wird die Technologie sowohl methodisch als auch therapeutisch attraktiv. Ein methodisches Hilfsmittel ist sie insofern, als durch die gezielte Eliminierung eines Proteins aus Zellen, Geweben und Organismen ähnlich wie in einem konditionalen Gen-Knock-out-Modell die Funktion eines bestimmten Proteins studiert werden kann. Die therapeutische Anwendung ist für die gesamte Medizin von Interesse, wird aber derzeit insbesondere für die Tumorthherapie untersucht. Hierbei wird versucht, die Expression von Protoonkogenen oder Anti-Apoptose-Genen wie des oben beschriebenen bcl-2 zu hemmen.

1.4.2 Antisense-Oligonukleotide gegen Bcl-2

Antisense-ODN gegen Bcl-2 waren eine der ersten Antisense-ODN, die überhaupt untersucht wurden. Die ersten Experimente wurden mit einem 18mer durchgeführt, das gegen die ersten sechs Kodone des offenen Leserasters der Bcl-2-mRNA gerichtet war [Reed, 1990]. Damit sollte die Bcl-2-Expression in der Bcl-2 überexprimierenden leukämischen Zelllinie GM697 [Tsujimoto, 1986] gehemmt werden. Tatsächlich zeigte sich nach drei Tagen Inkubation eine Verringerung der Zellvermehrung, eine Zunahme toter Zellen sowie eine Abnahme der Bcl-2-Expression. Diese ersten Experimente lieferten ein *proof of principle*, litten jedoch noch an methodischen Mängeln, was die Auswahl der Kontrollen und Konzentrationen betraf [Stein, 1998; Lebedeva, 2001].

In der Folgezeit wurde in verschiedensten Zelllinien eine spezifische Bcl-2-Antisense-Wirkung demonstriert, so z.B. in Lymphomlinien mit der t(14;18)-Translokation [Smith, 1995], in Bronchialkarzinom-Linien [Ziegler, 1997; Koty, 1999], Glioblastom-Linien [Julien, 2000] und Prostatakarzinom-Linien [Miayake, 2000]. In einem nächsten Schritt wurde der Mechanismus in primären humanen Tumorzellen aufgezeigt, z.B. in AML-Blasten [Keith, 1995] und B-CLL-Zellen [Pepper, 1999].

In einem Tiermodell wurde eine erfolgreiche Bcl-2-Antisense-Hemmung erstmals 1994 veröffentlicht [Cotter, 1994]. Immunologisch inkompetenten Mäusen mit einem schweren kombinierten Immundefizienzsyndrom (SCID) war ein humanes Xenograft aus t(14;18)-haltigen Lymphomzellen transplantiert worden. Die Mäuse entwickelten nach 28 Tagen ein t(14;18)-positives Lymphom. Wurde ihnen jedoch vor der Transplantation eine Dosis Anti-Bcl-2-ODN injiziert, war im Gegensatz zu dem Kontroll-ODN nach 28 Tagen kein Lymphom nachzuweisen. Mit demselben SCID-Mausmodell demonstrierten andere Forscher den Antisense-Effekt beim maligne Melanom [Jansen, 1998], Merkelzell-Karzinom [Schlagbauer-Wadl, 2000], Prostata-Karzinom [Miayake, 2000] und Magenkarzinom [Wacheck, 2001].

Sowohl die *in vitro*- als auch die *in vivo*-Experimente belegen, dass Anti-Bcl-2-ODN sequenzspezifisch und dosisabhängig zu einer Reduktion des messbaren Bcl-2-Levels auf RNA- und Proteinebene führen, die klonale Zellproliferation verlangsamen, die spontane Apoptoserate erhöhen, das Tumorstadium hemmen und das Überleben der Versuchstiere verlängern kann. Allerdings wurden die Experimente methodisch äußerst heterogen durchgeführt, wobei die Konzentrationen von 200 nM bis 200 μ M reichten. Eine Sensibilisierung der Tumorzellen gegenüber Zytostatika konnte in manchen Fällen gezeigt werden [Zangemeister-Wittke, 1998; Gleave, 1999], in anderen wiederum nicht [Chi, 2000; Duggan, 2001].

Die erste klinische Studie, die Anti-Bcl-2-ODN beim Menschen untersuchte, wurde mit dem ODN G3139 durchgeführt [Webb, 1997; Waters, 2000]. Insgesamt 21 Patienten mit rezidivierenden Non-Hodgkin-Lymphomen verschiedenen Malignitätsgrads und immunhistochemisch gesicherter Bcl-2-Überexpression in Lymphknoten bekamen 14 Tage lang das ODN G3139 über eine kontinuierliche subkutane Infusion. Die tägliche Dosis wurde von 4,6 mg/m² (0,1 mg/kg) sukzessive bis 195,8 mg/m² (5,4 mg/kg) erhöht. Dosislimitierend war eine Thrombozytopenie bei einer Dosis von 147,2 mg/m². Als häufigste unerwünschte Wir-

kung trat eine lokale Entzündungsreaktion an der Injektionsstelle auf, die einen gelegentlichen Wechsel des Injektionsortes notwendig machte, aber nur bei einem einzigen Patienten zum Abbruch der Studienteilnahme führte. Vereinzelt traten Fieber, Hypotension, Asthenie, Lymphopenie, transiente Hyperglykämie und eine leichte Erhöhung der Leber- und Nierenwerte auf.

Bei der computertomographischen Untersuchung vier Wochen nach Ende der Behandlung hatte ein Patient eine komplette Remission, die über die gesamte Nachbeobachtungszeit von drei Jahren anhielt. Weitere zwei Patienten hatten eine partielle Remission, neun Patienten hatten unveränderte Werte und die restlichen neun litten unter einer Progression. Die Bcl-2-Expression in den Lymphomzellen konnte allerdings nur in 16 der 21 Patienten bestimmt werden und war nur in sieben von diesen 16 Patienten erwartungsgemäß reduziert.

Eine zweite Phase-I-Studie untersuchte G3139 in Kombination mit Dacarbazin an 14 Patienten, die an einem fortgeschrittenen malignen Melanom litten [Jansen, 2000]. Das ODN wurde in 14 Tage dauernden Zyklen intravenös infundiert. Die Konzentrationen waren vergleichbar mit denen der oben zitierten Studie, ebenso die unerwünschten Wirkungen. Allerdings konnte nun Bcl-2 in seriellen Tumorbiopsien mittels eines *western blot* in allen Proben gemessen werden: Eine tägliche Dosis von 1,7 mg/kg führte zu einer Bcl-2-Reduktion um etwa 40 Prozent sowie einer Erhöhung der spontanen Apoptoserate der Tumorzellen. Von den 14 Patienten entwickelte einer eine komplette, zwei eine partielle und drei eine geringe Remission. Der Patient mit kompletter Remission hatte vor der Therapie eine *bulky disease* mit extensiver Hautinfiltration und pelvinen Lymphknoten von 5 cm Durchmesser. Nach vier Zyklen der Kombinatinstherapie war radiologisch und pathohistologisch bei diesem Patienten kein Tumor mehr festzustellen.

Die ersten beiden abgeschlossenen Pilotstudien mit G3139 demonstrieren die prinzipielle Möglichkeit therapeutischer Effektivität, ohne in den Bereich dosislimitierender Toxizität zu gelangen. Die klinischen und radiologischen Erfolge sind auf Grund der geringen Patientenzahlen nur schwer zu extrapolieren. Der molekulare Nachweis, dass G3139 *in vivo* über einen Antisense-Mechanismus wirkt, konnte *notabene* nicht erbracht werden. Die inflammatorischen Nebenwirkungen deuten auf eine Modulation des Immunsystems hin. In beiden Studien wurden immunologische Parameter nicht untersucht oder nicht veröffentlicht.

Warum sind immunologische Untersuchungen wichtig? Betrachtet man die Nukleotidsequenz des ODN G3139 (5'-TCTCCAGCGTGCCCAT-3'), so fällt auf, dass sie zwei sogenannte CpG-Motive besitzt – das sind CG-Dinukleotide innerhalb eines definierten Basenkontexts (s. **Abb. 1.4**) –, wovon seit kurzer Zeit bekannt ist, dass diese eine immunstimulatorische Wirkung entfalten können. Deshalb soll im folgenden Kapitel genauer auf die Frage eingegangen werden, was eigentlich CpG-Motive sind und welche Wirkungen sie hervorrufen.

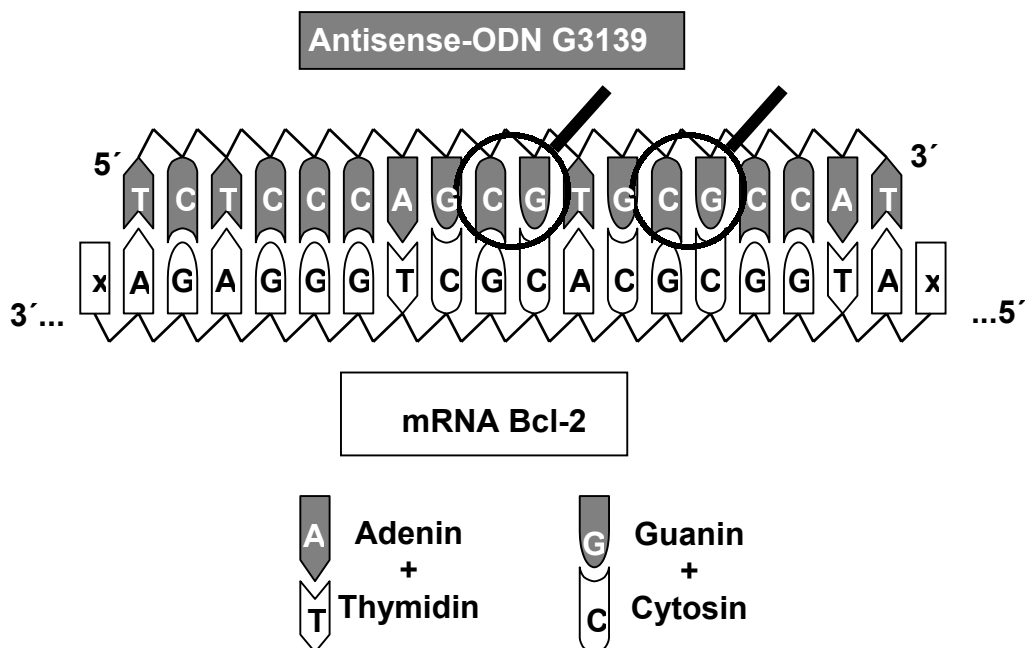


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Antisense-Oligonukleotids G3139 und seiner Ziel-RNA-Sequenz, der Bcl-2-mRNA an der Translationsinitiationsregion, dem Beginn des offenen Leserasters. Das grau dargestellte ODN (oben) hybridisiert über die antiparallele Basen-Komplementarität sequenzspezifisch mit der weiß dargestellten mRNA (unten). Die vier Basen sind mit ihren Initialen abgekürzt und unten erklärt. Die beiden CG-Dinukleotide im ODN G3139 sind durch zwei über sie gelegte Lupen hervorgehoben.

1.5 CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN)

1.5.1 Biologisches Konzept

Vor über 100 Jahren beobachtete der New Yorker Chirurg William Coley, dass sich ein Weichteilsarkom nach einer Erysipel-Infektion im Bereich des Tumors zurückbildete. Darauf hin behandelte er Sarkom-Patienten mit einer intratumoralen Injektion von Streptokokken-Lysaten – später *Coley's toxin* genannt –, die bei 45 Prozent seiner Patienten zur Rückbildung der Sarkome führte [Coley, 1991]. Sein Verfahren stellte die erste Form einer Immuntherapie von Tumoren dar. Jahrzehnte lang geriet dieser Therapieansatz in Vergessenheit, bis er gegen Ende des 20. Jahrhunderts wieder entdeckt wurde und zur Entstehung der experimentellen Tumorimmuntherapie beitrug. Bakterielle Lysate, wie Coley sie verwendet hatte, werden heute allerdings selten eingesetzt. Lediglich beim Harnblasen-Karzinom wird die lokale Instillation mitigierter Tuberkelbazillen (sogenannter „Bacille Calmette-Guérin“, BCG) mit Erfolg praktiziert.

Eine Auftrennung des BCG-Lysats in seine subzellulären Fraktionen zeigte, dass die höchste antitumorale Aktivität der DNA-Fraktion zukam [Tokunaga, 1984]. Wenig später wurde entdeckt, dass bakterielle DNA bei Mäusen antitumoral und immunmodulatorisch wirkt, nicht jedoch die DNA von Wirbeltieren [Yamamoto, 1992]. Diese Wirkung bakterieller DNA konnte bestimmten Nukleotidsequenzen mit einem zentralen CG-Dinukleotid zugeordnet und mittels synthetischer Oligonukleotide (ODN) imitiert werden [Yamamoto, 1994].

Gleichzeitig wurde beobachtet, dass ODN, die als Negativ-Kontrollen in Antisense-Experimenten eingesetzt wurden, B-Lymphozyten zur Proliferation anregen. Auch dieser Effekt konnte auf ein Sechs-Basen-Motiv mit zentralem CG-Dinukleotid zurückgeführt werden (5'...GACGTC...3'). Für das Basensextett wurde die Bezeichnung „CpG-Motiv“ eingeführt, wobei „p“ die Phosphatbindung zwischen Cytosin (C) und Guanin (G) bezeichnet. Synthetische ODN mit CpG-Motiven heißen demnach CpG-ODN [Krieg, 1995].

Der Austausch einer einzigen Base in diesem Sextett führt zum nahezu vollständigen Wirkungsverlust, ebenso wie die Methylierung der Base Cytosin. Mit der letztgenannten Entdeckung war eine Erklärung gefunden, warum Vertebraten-DNA im Gegensatz zu bakterieller und synthetischer DNA keine immunmodulatorischen Effekte aufwies: Bei Wirbeltieren sind nämlich die Cytosin-Basen in bis zu 80 Prozent methyliert, bei Bakterien nicht. Entsprechend können durch

eine experimentell herbeigeführte Cytosin-Methylierung die Effekte bakterieller DNA oder synthetischer ODN auf das Immunsystem blockiert werden [Stacey, 1996]. Für das unterschiedliche immunologische Verhalten von bakterieller (prokaryotischer) und vertebraler (eukaryotischer) DNA gibt es zudem noch einen zweiten Grund: CG-Dinukleotide sind in prokaryotischer DNA statistisch erwartungsgemäß verteilt (1:16), in eukaryotischer DNA jedoch auffallend unterrepräsentiert (1:60) [Karlin, 1994].

Damit liegt die Hypothese auf der Hand, dass unmethylierte CpG-Motive prokaryotischer Herkunft im Rahmen der Evolution von Vertebraten als Gefahrensignale benutzt wurden, an denen ihr Immunsystem das Eindringen potenziell pathogener Organismen identifiziert [Hoffmann, 1999]. Die Entdeckung der CpG-Motive lieferte zudem eine schlüssige Erklärung für die bis dato rätselhafte Wirkung von DNA-Vakzinen sowie den immunstimulatorischen Effekt mancher ODN im Rahmen von Antisense-Experimenten.

1.5.2 Wirkungen auf das Immunsystem

Die Immunologie unterscheidet schematisch zwischen dem angeborenen und dem erworbenen (besser: adaptiven) Immunsystem. Während das letztere (B-Zellen, T-Zellen) eine zwar verzögerte, aber hochspezifische Reaktion gegen individuelle Erregerstämme mit nur minimalen Antigenunterschieden hervorrufen kann, operiert das angeborene Immunsystem (z.B. Granulozyten, Monozyten, Komplementsystem) schneller, aber auch gröber: Es erkennt universale molekulare Muster, die vielen mikrobiellen Erregern gemeinsam sind. Dieses Phänomen wird deshalb als *pattern recognition* bezeichnet [Medzhitov, 2001]. Zwei Prototypen solcher Muster sind Lipopolysaccharid (LPS = Endotoxin) und DNA mit CpG-Motiven (CpG-DNA).

Diese mikrobiellen Muster besitzen mindestens drei funktionelle Gemeinsamkeiten: (1) Sie sind spezifisch für (prokaryote) Mikroorganismen und kommen im (eukaryoten) Wirtsorganismus nicht vor; (2) Man findet sie bei einer Großzahl pathogener Mikroorganismen auf identische Weise, so dass ein Minimum genetisch konservierter Wirts-Rezeptoren ein Maximum an Pathogenen erkennen kann; (3) Sie erfüllen für die Mikroorganismen selbst vitale Funktionen, weshalb die Ausbildung von Escape-Mutanten selten ist [Medzhitov, 2001].

Diese drei Eigenschaften treffen auch auf CpG-DNA zu. Welche genauen Effekte CpG-DNA im Immunsystem des Wirts auslöst, ist Gegenstand jüngster und aktueller Forschungen. In direkter Weise interagieren sie nur mit plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC) und B-Lymphozyten, fraglich auch mit Monozyten, Makrophagen und myeloiden dendritischen Zellen (MDC). Indirekt wirken sie auch auf T- und NK-Zellen und verändern das Milieu der Zytokine (s. **Abb 1.5**).

PDC (CD123⁺, CD11c⁻) werden von CpG-DNA stark aktiviert, was sich in der Hochregulation von MHC-II, CD40, CD54 (= *intracellular adhesion molecule*, ICAM-1), CD80 (= B7.1), CD86 (= B7.2) ausdrückt. Kürzlich wurde entdeckt, dass die Aktivierung von PDC je nach verwendetem CpG-ODN in zwei Richtungen tendieren kann: Die eine Klasse von CpG-ODN, z.B. ODN 2006 [Hartmann, 2000 a], veranlasst PDC zur Produktion von Interleukin(IL)-12, was zur Entstehung einer Antigen-spezifischen Th1-Antwort mit Bildung zytotoxischer T-Zellen führt [Hartmann, 2000 b; Vabulas, 2000]. Die zweite Klasse von CpG-ODN hingegen, z.B. ODN 2216, induziert in denselben Zellen Typ-I-Interferon (IFN- α und IFN- β), das Effektorzellen wie NK-Zellen und $\gamma\delta$ -Zellen aktiviert und außerdem kostimulatorische Moleküle auf Monozyten und myeloischen dendritischen Zellen (MDC; CD123⁻, CD11c⁺) hochreguliert [Krug, 2001 b]. Die zweite, IFN- α -basierte Immunlage entspricht derjenigen bei viralen Infektionen, während die erste, IL-12-gewichtete Immunreaktion eher bei Infektionen mit intrazellulären Bakterien und bei malignen Tumoren beobachtet wird [Krug, 2001 b]. Aus der zuletzt genannten Beobachtung wird unter anderem die Erwartung abgeleitet, dass CpG-DNA die Immunitätslage bei malignen Tumoren verbessern und daher tumortherapeutisch wirksam sein könnte (s. Kapitel 1.4.4).

Dass B-Lymphozyten durch CpG-DNA direkt aktiviert werden, wurde zunächst in Versuchen mit Mäusen [Krieg, 1995] und später in humanen mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) [Hartmann, 2000 b] gezeigt. Die Expression von MHC-II, CD54, CD80 und CD86 wird gesteigert, wodurch die Zelle ihre Kompetenz als antigenpräsentierende Zelle erlangt [Hartmann, 2000 b]. CD40 wird verstärkt exprimiert, und eine Koaktivierung durch CpG-DNA und CD40L (CD154) wirkt synergistisch auf die B-Zellaktivierung [Bauer, 1999]. Bei simultaner Stimulation mit einem Antigen steigert CpG-DNA die Produktion und Sekretion von Immunglobulinen [Krieg, 1995]. Dabei wird auch ein Wechsel der Immunglobulinklasse hin zu besonders effektiven Isotypen (bei der Maus IgG_{2a}) begünstigt. CpG-aktivierte B-Zellen steigern die Synthese der Zytokine IL-6 und IL-10. Außerdem beobachtet man einen Verlust der G₀-Arretierung des Zellzyklus und eine polyklonale Proliferation der Zellen. In reifen B-Zellen aus der Milz

konnte gezeigt werden, dass CpG-DNA der spontanen Apoptose entgegenwirkt [Yi, 1998]. Die durch Anti-IgM induzierte Apoptose in einer murinen B-Lymphom-Zelllinie wird durch CpG-DNA über eine Hochregulation von Bcl-x_L und c-Myc verhindert [Yi, 1996]. Das CpG-abhängige Aktivierungsmuster von B-Zellen scheint also so angelegt zu sein, dass möglichst viele reife B-Zellen und Plasmazellen überleben, die effektiv Antigene präsentieren und Immunglobuline sezernieren können. Interessanterweise vermögen CpG-ODN B-Zellen sogar ohne die Unterstützung von T-Helferzellen zu aktivieren. CpG-ODN wirken damit hauptsächlich auf das angeborene Immunsystem, greifen jedoch über die zwischen beiden Systemen vermittelnden PDC und B-Lymphozyten auch in das adaptive Immunsystem ein.

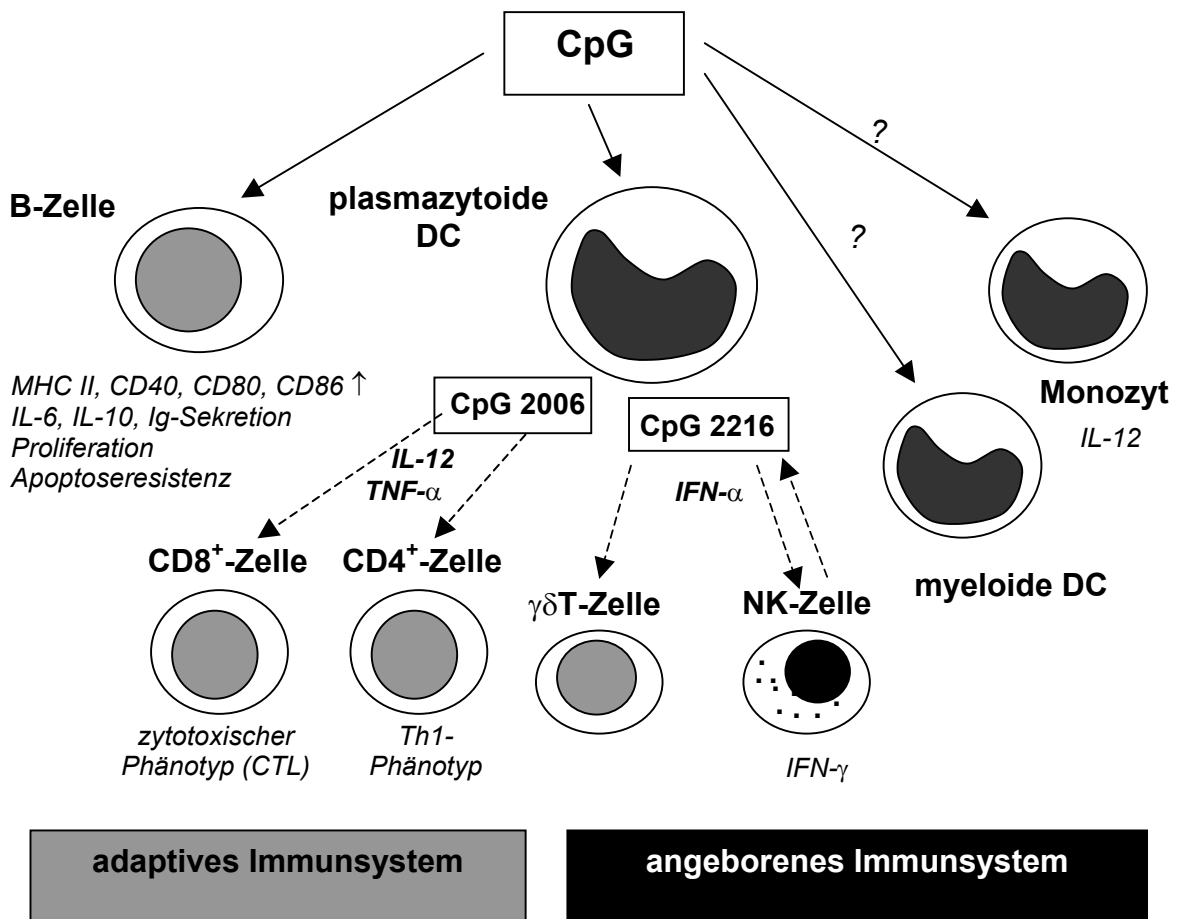


Abb. 1.5: Schematische Synopsis aller gesicherten CpG-Effekte auf das Immunsystem. Die direkte Wirkung auf B-Lymphozyten und plasmazytoide dendritische Zellen (PDC) ist nachgewiesen. Die anderen Effekte sind wahrscheinlich indirekt vermittelt. CTL = zytotoxischer T-Lymphozyt. DC = dendritische Zelle. NK-Zelle = natürliche Killerzelle. Ig = Immunglobuline. Die Fragezeichen symbolisieren die Fragwürdigkeit diese direkten Interaktionen.

1.5.3 Wirkungsweise auf subzellulärer Ebene

Die oben CpG-DNA beschriebene *pattern recognition* des angeborenen Immunsystems bedient sich sogenannter *pattern recognition receptors* (PRR) zur Identifikation der Pathogene. Die von den pathogenen Mikroorganismen stammenden Liganden werden *pathogen associated molecular patterns* (PAMP) genannt. Die Rezeptoren wurden auf Grund ihrer Ähnlichkeit mit dem Toll-Rezeptor der Fruchtfliege als *Toll-like receptors* (TLR) bezeichnet. Diese Familie transmembranärer Rezeptoren umfasst bisher zehn Mitglieder, wobei außer dem strukturell verwandten IL-1-Rezeptor zur Zeit fünf funktionell charakterisiert sind. TLR erkennen Lipopolysaccharide, Lipoproteine, Flagellin und Peptidoglykane von Bakterien, Zymosan von Hefepilzen und Doppelstrang-RNA von Viren [Alexopoulou, 2001; Aderem, 2000; Hayashi, 2001].

Dass auch CpG-DNA über einen TLR – nämlich TLR-9 – wirkt, wurde erst kürzlich entdeckt [Hemmi, 2000]. TLR-9-Knockout-Mäuse sind gegen jede Art von CpG-Aktivierung resistent. Ihre Makrophagen produzieren IL-6, IL-12 und TNF- α zwar nach Stimulation mit LPS und Peptidoglykan, aber nicht nach Stimulation mit CpG-DNA. Im Gegensatz zu den anderen TLR ist TLR-9 allerdings nicht in der Zellmembran lokalisiert. CpG-DNA muss erst endozytotisch aufgenommen werden, um im reifen Endolysosom an TLR-9 zu binden und seine Wirkung zu entfalten: Immobilisierte CpG-ODN zeigen daher keine Wirkung [Manzel, 1999] und Chloroquin als Inhibitor der endosomalen Azidifizierung blockiert ebenfalls den CpG-Effekt [Macfarlane, 1998]. Erst nach einer Azidifizierung des Milieus im endolysosomalen Kompartiment bindet CpG-DNA an TLR-9 [Hacker, 1998]. Inzwischen wurde erkannt, dass auch beim Menschen die Erkennung von CpG-Motiven über TLR-9 erfolgt [Krug, 2001 c; Takeshita, 2001].

Jeder TLR aktiviert letztlich zwar nicht identische, aber größtenteils überlappende Gene. Im wesentlichen sind dies Gene für inflammatorische Zytokine, Chemokine, antimikrobielle Peptide, MHC-Proteine, kostimulatorische Proteine und andere Effektoren, die für eine effektive immunologische Sofortabwehr und Aktivierung des adaptiven Immunsystems erforderlich sind.

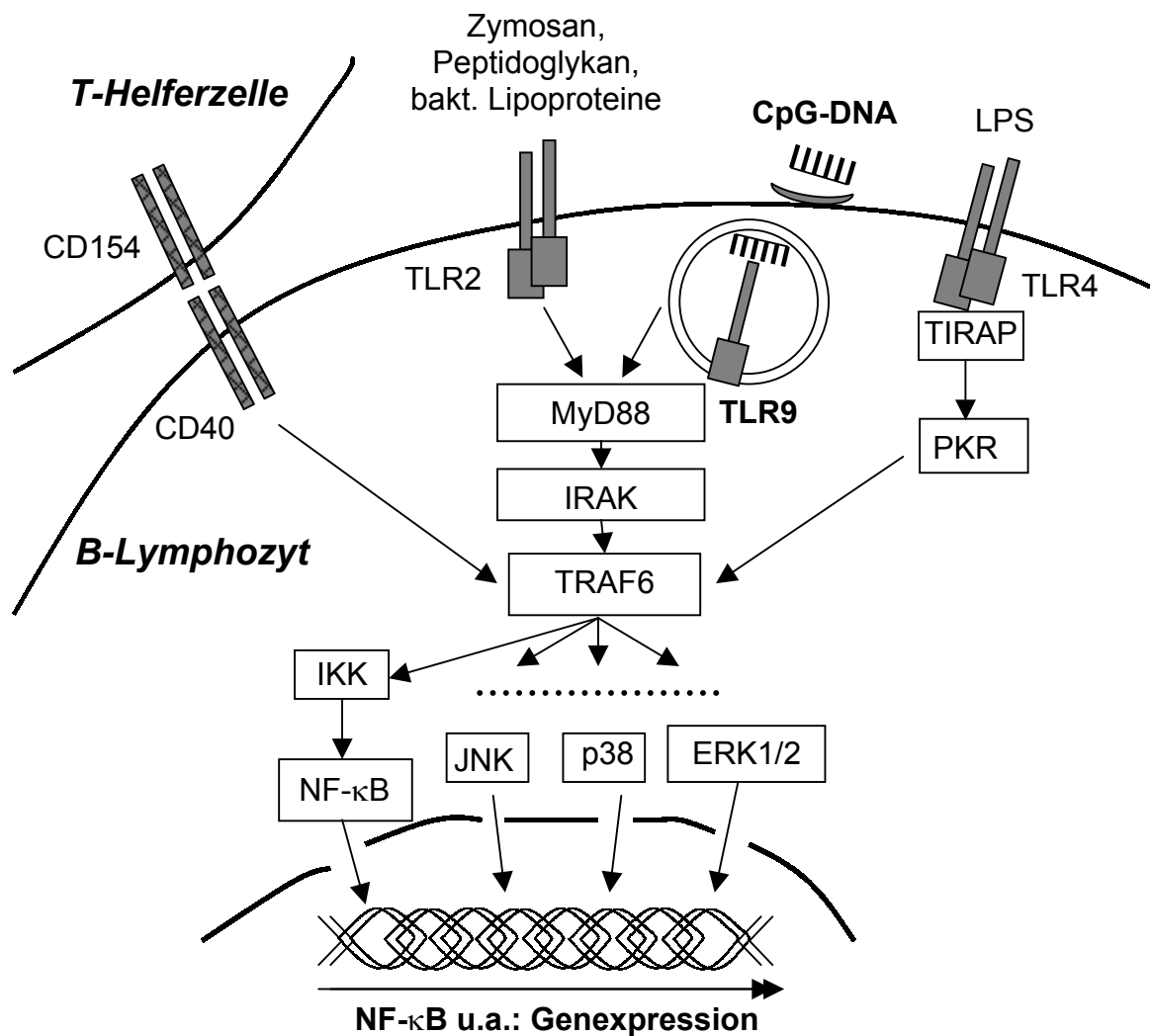


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege des angeborenen Immunsystems. CpG-DNA soll nach bisherigem Erkenntnisstand sequenzspezifisch in Endosomen aufgenommen werden und dort nach einer endosomalen Azidifizierung an den Toll-like-Rezeptor 9 (TLR-9) binden. TLR-9 rekrutiert das zytosolische Adapterprotein MyD88 (*myeloid differentiation marker 88*), welches die IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK) und diese wiederum den TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) aktiviert. Über noch nicht geklärte Wege werden letztendlich die Stresskinasen c-Jun-N-terminale Kinase (JNK), extrazelluläre Rezeptor-Kinase 1/2 (ERK 1/2), p38 und der IκB-Kinase-Komplex (IKK) aktiviert. Letzterer setzt aus IκB den Transkriptionsfaktor NF-κB frei, der in den Kern transloziert und dort, neben anderen Transkriptionsfaktoren, zur Expression bestimmter Gene führt. Die synergistische Wirkung der CD40-Aktivierung erklärt sich durch die Interaktion mit TRAF6. IL-1R = Interleukin-1-Rezeptor; PKR = Doppelstrang-RNA-aktivierte Proteinkinase; TIRAP = *TIR domain-containing adapter protein*.

1.5.4 Therapeutische Strategien

Synthetische CpG-Oligonukleotide stellen aus mehreren Gründen ein attraktives Therapeutikum dar: (1) CpG-ODN führen im Gegensatz zu einzelnen Zytokinen wie etwa IFN- α oder IL-1 zu einer koordinierten Immunreaktion, die der natürlichen Situation näher kommt; (2) Die Aktivierung antigenpräsentierender Zellen und die Förderung der Antikörperproduktion machen CpG-ODN zu einem geeigneten Adjuvans bei prophylaktischen und therapeutischen Impfungen; (3) Die Induktion einer Th1-Antwort mit Produktion von IFN- γ wehrt Infektionen mit intrazellulären Erregern ab und wirkt allergischen Reaktionen entgegen, die auf einem „switch“ von der Th1- zur Th2-gerichteten Immunlage basieren; (4) Die CpG-vermittelte Stimulation des angeborenen Immunsystems und der Th1-Immunlage unterstützt die immunologische Abwehr von Tumorzellen.

Tatsächlich zeigen erste Untersuchungen an Primaten, dass CpG-ODN ein potentes und sicheres Impf-Adjuvans darstellen [Davis, 2000; Gallichan, 2001; Jones, 2000]. Zur Zeit wird das CpG-ODN 7909 als Adjuvans bei der herkömmlichen Hepatitis-B-Impfung von Menschen untersucht: Die Zwischenanalyse von 20 Probanden zeigt, dass bereits zwei Wochen nach der ersten Impfung 92 Prozent der mit CpG-Adjuvans Geimpften spezifische Antikörper aufweisen, während noch kein einziger der herkömmlich Geimpften Antikörper hat. Die Titer sind nach vier Wochen bei der CpG-Gruppe 30fach höher als bei der Kontrollgruppe. Das ODN zeigt eine gute Verträglichkeit [Krug, 2001 a]. Auch bei bakteriellen Infektionen und allergischen Erkrankungen sind prophylaktische und therapeutische CpG-Strategien bereits erfolgreich verfolgt worden [Kline, 1998; Krieg, 1998; Parronchi, 1999; Walker, 1999].

Der für diese Arbeit relevante therapeutische Ansatzpunkt für CpG-ODN ist die Behandlung maligner Tumore und Leukämien. Variable Verwendungsmöglichkeiten werden untersucht. Zum einen können CpG-ODN bei der therapeutischen Vakzinierung gegen Tumorantigene erfolgreich als Adjuvans eingesetzt werden [Brunner, 2000; Weiner, 1997]. In einem Vergleich von 19 Vakzine-Adjuvanzen im Hinblick auf deren Potenz, gegen Tumorantigene eine Antikörper- und CTL-Antwort zu induzieren, wiesen CpG-ODN die stärkste Wirkung auf [Kim, 1999]. Zum anderen können CpG-ODN die Effektivität von Therapien mit adoptiven T-Zelltransfer unterstützen: Die Stimulation muriner T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen und syngenen Tumorzellen führt in Anwesenheit von CpG zu Th1-polarisierten T-Zellen, die im Mausmodell ein disseminiertes Lymphom kurieren [Egeter, 2000]. Durch die CpG-abhängige Aktivierung unspezifischer Ef-

fektorzellen (NK-Zellen, Makrophagen) kann auch die Antikörper-abhängige Zytotoxizität (ADCC, *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) gefördert werden, was in einem murinen Lymphommodell zur Reduktion des Tumorwachstums führte [Wooldridge, 1997]. Angesichts der zunehmenden Zahl onkologisch eingesetzter monoklonaler Antikörper (z.B. Rituximab = Anti-CD20-mAb) bieten CpG-ODN damit die Möglichkeit, die Potenz dieser Antikörpertherapie zu verstärken. Derzeit laufen 5 Phase I/II-Studien, die CpG-ODN bei der Therapie des rezidierten NHL, des Melanoms, Basalzellkarzinoms, Nierenzellkarzinoms und Mammakarzinoms (in Kombination mit Herceptin[®]) untersuchen.

Auch die chronische lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp (B-CLL) ist für eine Therapie mit CpG-ODN geeignet, zumal bei dieser nach wie vor unheilbaren, aber häufigen Erkrankung neue Therapieoptionen dringend erforderlich sind, wie in Kapitel 1.3 ausführlich dargelegt. Patienten mit B-CLL haben zwar funktionstüchtige T-Zellen, können allerdings keine zytotoxische Anti-Tumor-Reaktion lancieren, da die B-CLL-Zellen ihre kostimulatorischen Moleküle herunterreguliert haben und damit T-Zellen nicht mehr stimulieren können [Dazzi, 1995]. Deshalb wurde *in vitro* bereits erfolgreich versucht, über die Interaktion von CD40 und CD154 (= CD40L) die Immunogenität von B-CLL-Zellen zu verbessern und eine spezifische T-Zellantwort gegen die Leukämiezellen zu provozieren [Kato, 1998]. Jüngst wurde diese Strategie erfolgreich *in vivo* angewendet: B-CLL-Zellen wurden Patienten entnommen, *in vitro* mit CD154 transfiziert und den Patienten reinfundiert. Durch die Interaktion von CD154 auf transfizierten Zellen mit CD40 auf nicht-transfizierten B-CLL-Zellen kam es zur Hochregulation kostimulatorischer Moleküle auf den B-CLL-Zellen, zur Erhöhung von IL-12 im Plasma, zur Vermehrung der absoluten CD4⁺-T-Zellzahl sowie der B-CLL-spezifischen T-Zellen und schließlich zu klinischen Verbesserung [Wierda, 2000]. Legt man diese Studie zu Grunde und berücksichtigt, dass CpG-DNA nicht nur CD40 hochreguliert, sondern auch unabhängig von der CD40-CD154-Interaktion *eo ipso* bereits die kostimulatorischen Moleküle induziert und IL-12 erhöht [Krieg, 1995], so könnte mit CpG-DNA bei B-CLL-Patienten ein ähnlicher oder gar stärkerer Effekt als in der zitierten Studie möglich sein.

2. Material und Methoden

2.1 Experimente mit permanenten Zelllinien

2.1.1 Zellkultur

Die permanente Zelllinie GM697 ist abgeleitet von einer akuten lymphatischen Leukämie vom Prä-B-Zell-Typ (DSMZ, Braunschweig, BRD). GM697 exprimiert die Anti-Apoptose-Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L, den B-Zell-Marker CD19 sowie CD54 (= ICAM-1) und HLA-DR. Die Burkitt-Lymphom-Linien Daudi JP und DG 75 wurden freundlicherweise von Dr. K. Frisch von der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.B. zur Verfügung gestellt. Daudi JP und DG 75 exprimieren CD19, CD20 und Bcl-x_L, aber nicht Bcl-2.

Die Zellen wurden bei einer Konzentration von 0,3 - 3 x 10⁶ /ml in einem standardisierten Medium in Kultur gehalten. Das Medium bestand aus RPMI 1640 (Biochrom KG, Berlin, BRD), 10% hitzeinaktiviertem (56°C, 30 min) fetalen Kälberserum (= FCS; HyClone, Logan, UT, USA), 1% Penicillin, 1% Streptomycin (beide Sigma, München, BRD) und 2 mM L-Glutamin (GibcoBRL, Paisley, Schottland). Das selbst hergestellte Mischmedium wurde durch einen Membranfilter mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm steril filtriert. In diesem Medium wurden die Zellen bei einer Temperatur von 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% kultiviert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf Anzeichen von Zelluntergang oder mikrobieller Verunreinigung inspiziert. Das Medium wurde je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie alle zwei bis drei Tage dekantiert und durch frisches substituiert. Sämtliche Experimente und Manipulationen mit den Zellen wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen in einem Laminar-Air-Flow (LaminAir[®] HB 2448, Heraeus, München, BRD) durchgeführt.

2.1.2 Induktion der Apoptose

Zur Induktion von Apoptose wurden kommerziell erhältliche Zytostatika eingesetzt, die in der Literatur für experimentelle Apoptoseinduktion beschrieben sind.

a) Etoposid

Etoposid ist ein halbsynthetisches Podophyllotoxinderivat, das durch Interaktion mit dem nukleären Reparaturenzym Topoisomerase II Doppelstrangbrüche in der DNA induziert und deren Reparatur verhindert. Etoposid stabilisiert den In-

termediärkomplex der Tyrosintransesterbindung zwischen der Topoisomerase II und der DNA und verhindert dadurch die erneute Ligation der DNA-Fragmente [Hande, 1998]. Dies geschieht vorwiegend in den Zellzyklusphasen S und G₂ und betrifft deswegen besonders Zellen mit hoher Proliferationsrate, wie es die meisten Tumorzellen sind [Mutschler, 2001]. Außerdem fördert Etoposid die Bildung freier Radikale, was wiederum zur Epoxidbildung von DNA und Membranlipiden führt und damit toxische Auswirkungen auf die Zelle hat [Forth, 1996]. Die von Etoposid betroffenen Zellen gehen auf apoptotischem Wege zu Grunde. Das Medikament wird klinisch zur antineoplastischen Therapie folgender Malignome eingesetzt: Morbus Hodgkin, Non-Hodgkin-Lymphome, klein- und nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom, akute myeloische Leukämie, Melanome, Kaposi-Sarkome, Hodentumoren, Ovarialkarzinom und Chorionkarzinom der Frau [Hande, 1998]. In dieser Arbeit wurde Etoposid zur Apoptoseinduktion bei GM697 eingesetzt. Das in Aqua destillata adäquat verdünnte Etoposid (Vepe-sid[®], Bristol Arzneimittel, München, BRD) wurde mit der Zellsuspension vermischt und bis zur Analyse in Kultur gehalten.

b) Mitoxantron

Mitoxantron ist ein synthetisches Anthracendion. Es interkaliert mit der DNA und führt zu Quervernetzungen innerhalb und zwischen den DNA-Strängen. Dadurch werden die DNA- und RNA-Synthese gehemmt, Zellkern-Aberrationen mit chromosomalem *scattering* erzeugt, und die Zelle in die Apoptose getrieben. Darüber hinaus erzeugt Mitoxantron Quervernetzungen zwischen der DNA und zellulären Proteinen. Die Substanz wirkt sowohl auf proliferierende als auch ruhende Zellen toxisch. Klinische Indikationen für den Einsatz dieses Zytostatikums sind das Mammakarzinom, das Ovarialkarzinom, die Non-Hodgkin-Lymphome und akuten Leukämien des Erwachsenen, das hepatozelluläre Karzinom sowie die primär und sekundär progrediente Form der Multiplen Sklerose (Fachinfo Service, Bundesverband der deutschen pharmazeutischen Industrie e.V.). Eine Indikationsausweitung auf die CLL wird auf Grund experimenteller Wirksamkeit diskutiert [Bellosillo, 1998]. In der vorliegenden Arbeit wurde Mitoxantron verwendet, um in B-CLL-Zellen Apoptose zu induzieren und den Effekt der Oligonukleotide in Kombination mit diesem Zytostatikum zu untersuchen. Das in Aqua destillata verdünnte Mitoxantron (Novantron[®], Lederle Arzneimittel GmbH & Co, Wolfartshausen, BRD) wurde in einer Konzentration von 0,5 mg/dl mit der Zellsuspension bei Kulturbedingungen (s.o.) inkubiert.

2.1.3 Nachweis der Apoptose

a) Färbung mit Annexin V und Propidiumiodid

Der durchflusszytometrische Nachweis von Phosphatidylserin in der äußeren Schicht der Zellmembran mittels Annexin V (AnnV) ist ein etabliertes Verfahren, mit dem ein frühes Stadium der Apoptose erfasst werden kann [Clodi, 2000]. Für diese Arbeit wurde rekombinantes humanes AnnV verwendet, das mit dem fluoreszierenden Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt war (Bender MedSystems, Wien, Österreich). Die Zellen wurden zweimal in 4°C kaltem *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen und dann in 195 µl *annexin binding buffer* (10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂; Bender MedSystems, Wien, Österreich) resuspendiert. Dazu wurden 5 µl AnnV-FITC pipettiert. Nach Mischung und Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Zellen mit *annexin binding buffer* noch einmal gewaschen.

Propidiumiodid (PI) ist ein nicht membrangängiger Farbstoff, der DNA anfärbt. Mit PI lässt sich daher eine Desintegration der Zell- und Kernmembran, ein spätes Stadium des Zelltodes, nachweisen. Die Kombinationsfärbung mit AnnV-FITC und PI erlaubt eine Differenzierung zwischen vitalen Zellen (AnnV-negativ, PI-negativ), frühapoptotischen Zellen (AnnV-positiv, PI-negativ), spätapoptotischen Zellen (AnnV-positiv, PI-positiv) und nekrotischen Zellen (AnnV-negativ, PI-positiv). Zur PI-Färbung wurde die Zellsuspension nach der AnnV-FITC-Färbung mit 10 µl einer 20 µg/ml PI-Lösung (Becton Dickinson, Heidelberg, BRD) versetzt und unmittelbar danach im Durchflusszytometer (*fluorescence activated cell sorter*, FACS) analysiert.

b) Bestimmung der Caspase 3-Aktivität

Zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität wurden die Zellen zweimal in 4°C kaltem PBS gewaschen und mit 100 µl Paraformaldehyd 0,5% („Lösung A“ von Fix & Perm, An der Grub GmbH, Kaumberg, Österreich) fixiert. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für 15 min mit 100 µl Saponin-haltiger Lösung (Lösung B von Fix & Perm, An der Grub GmbH, Kaumberg, Österreich) permeabilisiert und mit 5 µl Phycoerythrin(PE)-konjugierter Caspase-3 im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in 300 µl PBS resuspendiert und im FACS analysiert.

c) Nachweis der DNA-Fragmentierung

Der Nachweis der DNA-Fragmentierung wurde mit Hilfe des „TACS DNA Laddering Kit“ (Nr. TA4630, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) geführt. Mindestens eine Million Zellen pro Ansatz wurde mit kaltem PBS (Boehringer Mannheim, BRD) aus den Kulturgefäßen gewaschen und in ein Polystyrolröhrchen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) aufgenommen. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 500 g und 4°C wurde der Überstand dekantiert und das Zellsediment in 4°C-kaltem PBS resuspendiert. Nach einer zweiten Zentrifugation mit denselben Konditionen wurden das Zellpellet in 100 µl Lysepuffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 0,1 M EDTA pH 8, 0,5% SDS in Aqua destillata) suspendiert. Nach Transfer des Lysats in ein Eppendorfröhrchen (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, BRD) wurde 154 mM sterile NaCl-Lösung (Baxter® Deutschland GmbH, Unterschleißheim, BRD) zu einer Konzentration von 50 mM hinzugegeben, um die DNA zu stabilisieren. Zur Loslösung der DNA-bindenden Proteine wurde Proteinase K (Sigma, München, BRD) in einer Konzentration von 0,1 mg/ml hinzupipettiert und die Lösung dann für 5 h bei 50°C auf einem Schüttler mit niedriger Rotationszahl (120/min) inkubiert.

Um die DNA zu extrahieren, wurde anschließend ein so großes Volumen eines mit TE-Puffer gesättigtes Phenol-Chloroform-Gemisches hinzugegeben, dass das Probenvolumen dadurch verdoppelt wurde. Nach einer sorgfältigen Vermischung der Phasen mit Hilfe eines Vortexgerätes (F. Schultheiß, München, BRD) wurde die Probe bei 12.000 rpm (*rounds per minute*) für 5 min zentrifugiert. Danach ließ sich die oberste, hydrophile Phase in ein frisches Eppendorfröhrchen transferieren. Zur Optimierung der DNA-Extraktion wurde ein Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (im Verhältnis 24:1) in der Menge hinzupipettiert, dass sich das Ausgangsvolumen dadurch verdoppelte, woran sich dasselbe Zentrifugationsprogramm wie oben anschloss. Nach Entnahme der hydrophilen Phase wurde die DNA gefällt, indem die Probe mit demselben Volumen Isopropanol versetzt und für 1 bis 6 h bei –70°C eingefroren wurde.

Die wiederaufgetaute Lösung wurde bei 12.000 rpm und 4°C für 30 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Nach Waschen der DNA mit 70% eiskaltem Ethanol und einer Zentrifugation mit denselben Bedingungen wurde das Zellsediment bei Raumtemperatur luftgetrocknet und in 30 bis 50 µl DNase-freier Aqua destillata (Boehringer Mannheim, BRD) steril aufgelöst. Zur Entfernung eventuell vorhandener RNA-Reste wurde die Probe mit 0,8 bis 8 µl DNase-freier RNase (Boehringer, Mannheim, BRD) versetzt und für 30 bis 60

min bei 37°C inkubiert. Die letztendlich erhaltene DNA-Menge wurde nach adäquater Verdünnung (meist 1:200) spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm quantifiziert. Die DNA wurde auf 0,1 µg/µl in steriler Aqua destillata verdünnt.

10µl dieser Verdünnung wurden zusammen mit 2 µl eines *gel loading buffer* auf ein in TAE-Puffer liegendes 1,5%-iges Agarosegel aufgetragen (50 X TAE-Puffer hergestellt aus: 242 g Tris Base, 67,1 ml Glacialacetat-Säure, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 1 Liter Aqua). Als Referenzen wurden standardisierte Molekulargewichtsmarker mit aufgetragen: ein 100 bp Standard, der von 100 bp bis 1500 bp in Schritten von 100 bp ging, sowie ein 1 kb Standard, der von 500 bp bis 12 kb in Schritten von 1018 bp ging. Das 15 cm lange Gel wurde für ca. 2 h bei 100 Volt „gefahren“ und gestoppt, sobald die Farbstofffront eines mitlaufenden Bromphenolblau-Ansatzes am Ende des Gels angelangt war. Das Gel wurde dann für 15 min mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und anschließend in einem UV Transilluminator visualisiert und fotografiert.

2.1.4 Messung der Proteinexpression

Die Expression der Oberflächenmarker und intrazellulären Proteine wurde durchflusszytometrisch gemessen. Zur Bestimmung der Oberflächenmarker wurden die Zellen zweimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen, dann in 100 µl PBS resuspendiert und mit 5 µl der jeweiligen Antikörperlösung für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension erneut mit PBS gewaschen und mit 300 µl PBS für die FACS-Analyse resuspendiert. Folgende Antikörper wurden verwendet: Anti-CD19-CyChrome, Anti-CD40-FITC, Anti-CD54-CyChrome, Anti-CD80-PE, Anti-CD86-FITC. Für jeden Antikörper wurde ein passender IgG-Isotyp im Kontrollansatz verwendet (alle von PharMingen Becton Dickinson, Heidelberg, BRD).

Zur Bestimmung der Expression intrazellulärer Proteine wurden die Zellen zweimal in 4°C kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl Paraformaldehyd (Lösung A von Fix & Perm[®], An der Grub GmbH, Kaumberg, Österreich) fixiert. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension mit PBS gewaschen. Danach wurden die fixierten Zellen für 15 min mit 100 µl Saponin-haltiger Lösung (Lösung B von Fix & Perm[®], An der Grub GmbH, Kaumberg, Österreich) permeabilisiert und gleichzeitig mit 5 µl der jeweiligen Antikörperlösung bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach nochmaligem

Waschen mit PBS wurden die Zellen in 300 µl PBS resuspendiert und im FACS analysiert. Folgende Antikörper gegen intrazelluläre Proteine wurden verwendet: Anti-Bcl-xL-FITC (Southern Biotechnology Inc., Birmingham, USA), Anti-Bcl-2-PE, Anti-Caspase-3-aktiv-PE (beide PharMingen Becton Dickinson, Heidelberg, BRD).

2.1.5 Oligonukleotide und Transfektion

a) Verwendete Oligonukleotide

Die verwendeten Oligodesoxynukleotide (ODN) wurden mit Ausnahme des ODN 2017 (Operon Technologies, Alameda, USA) von der Firma Byk Gulden Lomborg Chemische Fabrik (Konstanz, BRD) synthetisiert. Die Reinheit war vom Hersteller mittels *high pressure liquid chromatography* optimiert und validiert worden. Sämtliche ODN wurden Endotoxin-frei geliefert. Es wurden überwiegend Okto-dekamere und 20mere eingesetzt, die komplett phosphorothioat-modifiziert waren, d.h. das freie Sauerstoffatom jeder Phosphatgruppe war durch ein Schwefelatom substituiert.

Name	Sequenz	Länge	CS	CpG	Funktion
G3139	5'-TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3'	18mer	PT	2	Bcl-2 AS
G3139F1	5'-TCACCCTGGGTCCGCCAT-3'	18mer	PT	1	Bcl-2 AS-Kontrolle
ODN 2009	5'-AATCCTCCCCAGTTCACCC-3'	20mer	PT	0	Bcl-2 AS
ODN 2010	5'-ATTCCACCCCCTGTACACCC-3'	20mer	PT	0	Bcl-2 AS-Kontrolle
ODN 2006	5'-TCGTCTTTTGTCTTTTGTCTTT-3'	24mer	PT	4	CpG-ODN
ODN 2017	5'-CCCCCCCCCCCCCCCCCCC-3'	20mer	PT	0	CpG-Kontrolle
ODN-FITC	Fluo-5'-CGTACTATCAGACGACCT-3'	18mer	PT	1	Fluoreszenz

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten Oligodesoxynukleotide (ODN) mit Bezeichnung, Sequenz, Länge, chemischer Struktur, enthaltenen CpG-Dinukleotiden und Funktion. AS = Antisense, CS = Chemische Struktur, CpG = Anzahl der enthaltenen CpG-Dinukleotide, PT = Phosphorothioat. In den Sequenzen sind die CG-Dinukleotide zur Hervorhebung grau unterlegt.

b) Photometrische Quantifizierung

Die ODN wurden in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst, steril durch eine Membran mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm filtriert, aliquotiert und bei -70°C in Eppendorf-Röhrchen aufbewahrt. Vor jeder Versuchsreihe wurden die ODN photometrisch quantifiziert: Nach Eichung des Photometers mit Aqua destillata wurden 100 µl einer adäquat verdünnten ODN-Lösung (in Aqua destillata) in eine Küvette pipettiert, die in den Strahlengang des Photometers eingesetzt wurde. Bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde die spezifische Absorption der Lösung bestimmt und diese Messung anschließend aus Gründen der Reliabilität wiederholt. Die Molarität in µM lässt sich wie folgt berechnen:

$$\text{Molarität (}\mu\text{M)} = \frac{\text{Absorption (260 nm)} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 100}{(1,5 \times N_A + 0,71 \times N_C + 1,2 \times N_G + 0,84 \times N_T)},$$

wobei N die Anzahl der mit tiefergestellten Initialen bezeichneten vier Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T) bezeichnet.

Die Massenkonzentration wurde mit folgender Formel begerechnet:

$$\text{Massenkonzentration (}\mu\text{g/ml)} = \frac{\text{Absorption (260 nm)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{0,27}$$

Durch die Photometrie konnte auch sichergestellt werden, dass die ODN-Lösungen keine Protein-, DNA- oder RNA-Verunreinigungen aufwiesen.

c) Transfektion mit Lipofektin und ExGen

Zur Transfektion der Zelllinie GM697 mit Hilfe von Lipofektin (Gibco BRL, Paisley, Schottland) wurden die Zellen einige Zeit vor Versuchsbeginn so auf Kulturschalen ausgesät, dass sie zu höchstens 50 bis 75 Prozent auf dem Schalenboden konfluent waren. Es wurden pro Ansatz 500.000 Zellen verwendet.

Zunächst wurde das ODN-Lipofektin-Gemisch hergestellt. Hierzu wurde die benötigte Menge Lipofektin dem Originalröhrchen steril entnommen und in Polystyrolgefäßen auf die 20-fache Endkonzentration mit Aqua destillata verdünnt. Während die Verdünnung für 20 min stehen gelassen wurde, konnten die ODN-

Lösungen ebenfalls in sterilem Milieu mit Aqua destillata auf das 20-fache der Endkonzentration verdünnt werden. Anschließend wurden beide Verdünnungen (jeweils 22 μl) in einer 96-er Polystyrolplatte gemischt, wobei zuerst die ODN in die Grube pipettiert wurde und danach das Lipofektin. Die Mischung wurde vorsichtig mehrere Male auf- und abpipettiert, um eine optimale Durchmischung zu erzielen, und daraufhin für 30-45 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. In dieser Inkubationszeit sollten sich die stöchiometrisch passenden Komplexe zwischen den beiden verschiedenen Molekülen bilden.

Das ODN-Lipofektin-Gemisch (44 μl), das nun insgesamt das zehnfache der Endkonzentration betrug, wurde im Verhältnis 1:5 (mit 176 μl) auf die zweifache Endkonzentration verdünnt, wobei hierzu FCS-freies Zellkulturmedium (RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin) verwendet wurde. Kurz vor Zugabe der ODN-Lipofektin-Komplexe zu den Zellen wurde daher das FCS-haltige Medium gegen ein FCS-freies Medium (RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin, ohne Antibiotika) ausgetauscht, da die im Serum enthaltenen Proteine mit den Lipiden aggregieren und damit die Transfektion behindern würden [Felgner, 1993; Reed, 1990]. Hierzu wurde das alte Medium vorsichtig abpipettiert, die Zellen zweimal mit dem neuen Medium gewaschen und dann mit dem neuen FCS-freien Medium inkubiert. Nun wurde das ODN-Lipofektin-Gemisch (100 μl) vorsichtig zur Zellsuspension (100 μl) pipettiert, wodurch die optimale Endkonzentration erreicht wurde. Die Ansätze wurden als Duplikate hergestellt. In der Regel betrug die Endkonzentration der ODN 1 μM und die des Lipofektins 27,2 $\mu\text{g/ml}$. Die Kulturschale wurde für 4 h im Brutschrank (37°C, 5% CO_2) inkubiert. Je länger die Zellen mit dem ODN-Lipofektin-Komplex inkubiert werden, desto höher ist die Transfektionsrate [Bennett, 1992]. Da die Inkubation in FCS-freiem Medium jedoch nach einer gewissen Frist durch Mangel an Überlebensfaktoren zum Absterben der Zellen führt, ist die Transfektionsdauer limitiert. Empirisch ergab sich ein zeitliches Optimum von 4 h für die Inkubation.

Nach diesem Inkubationsschritt wurden die Zellen im einen Fall sofort im FACS analysiert, wenn es nur um den Nachweis der Transfektion ging. Im anderen Fall ging es um die Antisense-vermittelte Suppression von Bcl-2: Hier wurden die Zellen mit PBS zweimal gewaschen, um die ODN-Lipofektin-Komplexe zu entfernen. Die Zellen wurden wieder im FCS-haltigem Vollmedium suspendiert und bei denselben Bedingungen für zusätzliche 12 h in Kultur gehalten. Die anschließende Färbung für die FACS-Analyse ist in den Kapiteln 2.1.3 und 2.1.4 beschrieben.

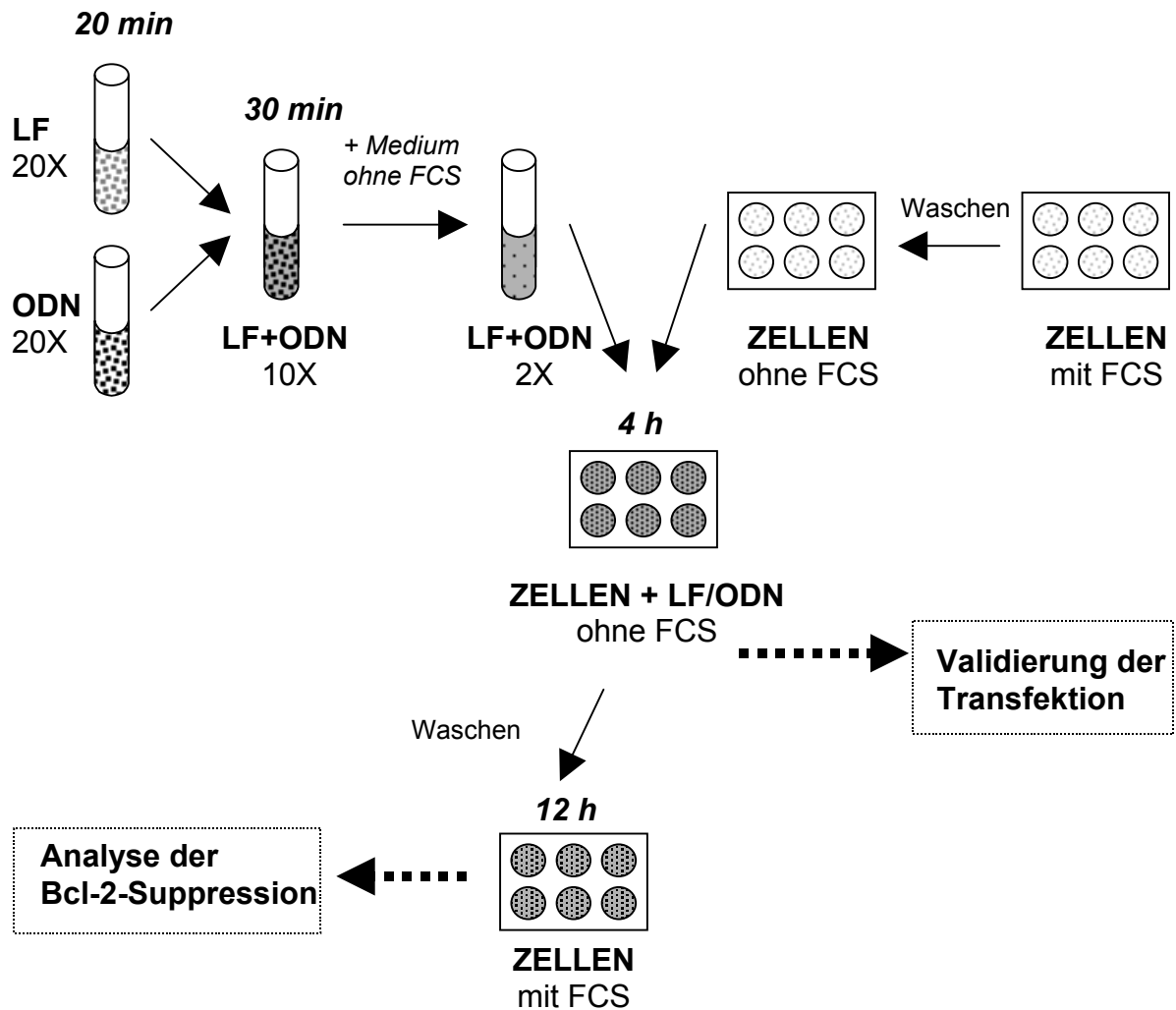


Abb. 2.1: Flussdiagramm zur Erklärung der Antisense-Versuche mit Lipofektin als Carrier. FCS = Fetales Kälberserum. LF = Lipofektin. ODN = Oligonukleotide. 20X = 20-fache Endkonzentration.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde Lipofektin mit dem relativ neuen Transfektionsreagenz ExGen 500 (Byk Gulden Lomberg Chemische Fabrik, Konstanz, BRD) verglichen. Das Protokoll bei den Versuchen mit ExGen 500 entsprach dem oben beschriebenen mit Lipofektin.

2.2 Experimente mit primären Zellen

2.2.1 Isolation mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC)

Ambulanten Patienten mit der Diagnose einer chronischen lymphatischen Leukämie vom B-Zelltyp, die zur Verlaufskontrolle in die Tagesklinik der Medizinischen Klinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München einbestellt waren, wurde nach informierter Einwilligung (*informed consent*) 20 ml Blut in eine heparinisierte Spritze abgenommen (pro 10 ml Blut 100 µl Heparin-Natrium, Braun, Melsungen, BRD). Es wurden nur Patienten berücksichtigt, die mindestens seit einem Jahr keine Chemotherapie bekommen hatten. Dies waren im Zeitraum zwischen Januar und August 2000 insgesamt 13 Patienten. Von diesen hatten zwölf noch nie eine chemotherapeutische Behandlung ihrer B-CLL. Ein Patient (*B1107h*) hatte neun Zyklen Chlorambucil bekommen, die jedoch eineinhalb Jahre vor Beginn der Blutentnahme abgeschlossen waren.

Werte für die Leukozytenzahl im peripheren Blut, die Serum-Thymidinkinase (s-Tk) sowie das Beta-2-Mikroglobulin (β_2M) wurden der Patientenakte entnommen und stammten vom Tag der Blutentnahme oder von der zeitlich am nächsten liegenden Blutentnahme. Das aktuelle Binet-Stadium war vom behandelnden Arzt schriftlich dokumentiert worden. Die Patientendaten wurden aus Gründen des Datenschutzes anonymisiert und mit Identifikationsnummern versehen.

Das Blut stand bei Raumtemperatur maximal 2 h, bevor daraus die Fraktion der mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) präpariert wurden. Diese Fraktion der PBMC, die im wesentlichen aus Lymphozyten und Monozyten besteht, wurde durch Dichtegradientenzentrifugation (1000 g, 20°C, 15 min) mit Hilfe der „Ficoll-Hypaque“-Lösung (Biochrom KG, Berlin, BRD) gewonnen. Das Blut wurde hierzu auf vier 50 ml-Röhrchen (*blue caps*) verteilt, die zuvor mit je 15 ml Ficoll-Hypaque gefüllt worden waren. Anschließend wurde mit sterilem 0,9% NaCl auf 50 ml aufgefüllt, ohne dass sich dabei die drei Phasen vermischten. Nach einer Zentrifugation (1000 g, 20°C, 15 min, Beschleunigung 1, Bremsung 1) fand man in jedem *blue cap* von oben nach unten die folgende Schichtung vor: Plasma, mononukleäre Zellen (PBMC), Ficoll, Erythrozyten und andere Zellen (Thrombozyten, Granulozyten). Der PBMC-Ring wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues *blue cap* gegeben, mit NaCl auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (1590 rpm, 20°C, 15 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Es folgten ein zweiter und dritter Waschschrift (1200 rpm, 4°C, 10 min) mit ste-

riler physiologischer Kochsalzlösung (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, BRD), um vor allem Verunreinigungen durch Erythrozyten auszuwaschen.

Anschließend wurden die Zellen im Standardmedium resuspendiert (RPMI 1640-Zellmedium, 10% FCS, 1% Penicillin, 1% Streptomycin und 2 mM L-Glutamin), mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und, auf die gewünschte Konzentration verdünnt, bei 37°C in 5%-iger CO₂-Atmosphäre in Kultur gehalten. Alle verwendeten Substanzen wurden vom Hersteller endotoxinfrei geliefert. Die Vitalität der Zellen wurde lichtmikroskopisch durch Trypanblaufärbung eines Aliquots überprüft. Nur Zellfraktionen, von denen über 95 Prozent aller Zellen den Supravitalfarbstoff Trypanblau dank intakter Zellmembranen ausschlossen, wurden weiter verwendet.

2.2.2 Inkubation der PBMC mit Oligonukleotiden

Die PBMC wurden in einer Konzentration von 1.000.000/ml auf Zellkulturplatten ausgesät (*24 well plates*, Costar Inc., Corning, NY, USA). Die in PBS gewaschenen ODN wurden so hinzupipettiert, dass sie in einer Endkonzentration von 5 µM vorlagen. Nach 48 h Kultur bei den oben genannten Standardbedingungen wurden die Zellen lichtmikroskopisch beurteilt und mit 4°C-kaltem PBS aus den Platten gespült. Die Zellen wurden in 5 ml-Röhrchen pipettiert, mit PBS versetzt und bei 500 g für 5 min abzentrifugiert. Nach einem nochmaligen Waschschrift mit PBS wurde die Zellsuspension in 4 Aliquots unterteilt.

Das erste Aliquot diente der Dreifachfärbung der Oberflächenmarker CD19, CD40 und CD80. Hierzu wurde das Aliquot mit je 5 µl Anti-CD40-FITC-, Anti-CD80-PE- und Anti-CD19-CyChrome-Antikörperlösungen respektive deren jeweilige Isotyp-Kontrollen (alle Pharmingen, Hamburg, BRD) versetzt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Zellsuspensionen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend im FACS untersucht. Das zweite Aliquot diente der Zweifachfärbung der intrazellulären Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L. Hierzu wurde nach dem unter 2.1.4 beschriebenen Verfahren vorgegangen (mittels Fix & Perm[®], An der Grub GmbH, Kaumberg, Österreich). Das dritte Aliquot wurde für die Apoptosemessung verwendet, wobei das Protokoll dem unter 2.1.3 beschriebenen entsprach (mittels des „AnnV-FITC-Kits“ (Bender MedSystems, Wien, Österreich).

Das vierte Aliquot diente dem Nachweis der Oligonukleotidaufnahme in die Zellen. Hierzu wurden FITC-markierte, nicht sequenzspezifische ODN eingesetzt, die ebenfalls 48 h lang bei denselben Konditionen inkubiert wurden. Nach dieser Zeit wurden die Zellen mit kaltem PBS von der Kulturplatte abgelöst. Um eine unspezifische Bindung der FITC-markierten ODN auf der Zelloberfläche zu verhindern, wurden die Zellen dreimal mit 4°C-kaltem PBS gewaschen, bevor sie im FACS untersucht wurden. In Vorversuchen mit Lymphozyten und FITC-markierten ODN in unserer Arbeitsgruppe wurde mittels konfokaler Laser-Scanningmikroskopie nachgewiesen, dass die ODN nicht an der Oberfläche haften, sondern tatsächlich im Zytoplasma sowie Karyoplasma lokalisiert sind.

2.2.3 Quantifizierung der mRNA

Zur Messung der Proteinexpression auf RNA-Ebene wurden zunächst PBMC wie oben beschrieben aus dem peripheren Blut gewonnen, wobei pro Ansatz 5×10^6 Zellen (entspricht etwa 50 μg RNA) verwendet wurden, um genügend Material für die RNA-Messung zu haben. Die Zellen wurden in einem Lysepuffer homogenisiert, der aus RLT-Puffer und β -Mercaptoethanol in einem Verhältnis von 100:1 jeweils frisch angesetzt wurde. 5×10^6 Zellen wurden pro Ansatz in 350 μl Lysepuffer für 2 min bei 14 000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Eluat wurde bei -80°C eingefroren und an die Firma Byk Gulden nach Konstanz zur Durchführung einer *real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) geschickt. Das dort angewendete Verfahren war ein TaqMan®-System (Applied Biosystems, Foster City, CA) und enthielt einen integrierten DNase-Verdau auf der Säule.

2.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Das für diese Arbeit verwendete Durchflusszytometer (FACS Calibur[®], Becton Dickinson Company, Heidelberg, BRD) besitzt zwei Laser unterschiedlicher Wellenlänge: einen Argonlaser, der monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm emittiert, und einen Diodenlaser, der Licht bei 635 nm emittiert. Es wurde bei den Experimenten zu dieser Arbeit lediglich der Argonlaser verwendet. Bandpassfilter ermöglichten bei der Mehrfarbenanalyse die Differenzierung der von den angeregten Fluorochromen emittierten Fluoreszenz in drei Farben: Der Farbstoff Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) emittierte grünes Licht mit einem Maximum bei 515 nm (Bandpassfilter 530 ± 30 nm), der Farbstoff Phycoerythrin (PE) emittierte im roten Spektralbereich mit einem Maximum bei 580 nm (Bandpassfilter 585 ± 42 nm) und der Farbstoff CyChrome im violetten Bereich mit einem Maximum bei 650 nm (Bandpassfilter 655 ± 30 nm). Propidiumiodid (PI) emittierte ebenfalls im violetten Spektralbereich bei 650 nm. Die einzelnen Fluoreszenzsignale konnte aus Prinzip nicht vollständig voneinander getrennt werden, da sich die Fluoreszenzspektren der Farbstoffe minimal überlappten. Diese Überlappung musste durch Kompensation korrigiert werden. Hierbei wurde rechnerisch der jeweils durch Überlappung entstandene Fluoreszenzanteil vom ursprünglichen Fluoreszenzsignal abgezogen.

In den hier vorgestellten Versuchen wurden die Parameter der Kompensation und der Signalverstärkung für jede Zellart zu Anfang optimal eingestellt und dann über die gesamte Dauer der Versuchsreihe hindurch konstant gehalten, so dass die einzelnen Versuche untereinander vergleichbar waren. In wöchentlichen Abständen wurde das Gerät auch mit Hilfe von definierten Eichpartikeln (Becton Dickinson Company, Heidelberg, BRD) nach dem Herstellerprotokoll kalibriert. Mit Hilfe von Isotyp-Kontrollen – Fluoreszenz-markierten Antikörpern, die nur unspezifische Bindungen mit der Zelle eingehen – wurde die Verstärkung der Fluorochromkanäle in der Regel so eingestellt, dass die Isotyp-Signale unter 1 lagen. Um Zelldebris aus der Analyse auszublenden, wurde im *forward scatter* eine Schwelle gesetzt. Dadurch wurden erst Partikel ab einer bestimmten Mindestgröße als Zellen gemessen und alle kleineren Partikel (Vesikel, Verunreinigungen etc.) ausgeblendet.

Die rechnerische und grafische Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit Hilfe einer speziellen Software, dem Programm FlowJo (Version 3.1.1, Tree Star, Stanford, CA, USA).

2.4 Statistik

Bei multiplen identischen Versuchen sind die Ergebnisse als arithmetische Mittelwerte angegeben. Ab $n = 3$ Versuchen ist der Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of means*, SEM) hinzugefügt. Um die statistische Signifikanz der Unterschiede einzelner Ergebnisse zu berechnen, wurde der zweiseitige Student-t-Test für paarige Stichproben parametrischer Verteilungen angewendet. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten $< 0,05$ (*) bzw. $p < 0,01$ (**) angenommen. Der Pearson'sche Korrelationskoeffizient r wurde als Maß für die Korrelation zweier Wertereihen angegeben. Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe der Software StatView D-4.5 (Abacus Concepts, CA, USA) durchgeführt. Die rechnerische Auswertung und grafische Darstellung der Daten erfolgte mittels der Programme Excel und PowerPoint (Microsoft, USA).

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Apoptosemodells

3.1.1 Annexin V und Propidiumiodid zum Nachweis von Apoptose

Bevor die Effekte von Oligonukleotiden auf die Apoptose maligner B-Lymphozyten untersucht werden konnten, musste zunächst ein Apoptosemodell *in vitro* etabliert werden. Es sollten (1) ein Apoptose-induzierendes Agens in geeigneter Dosierung gefunden, (2) die Kinetik dieser Apoptoseinduktion empirisch bestimmt und (3) Methoden zum Nachweis verschiedener Stadien der Apoptose ermittelt werden. Hierzu wurde die leukämische Zelllinie GM697 verwendet, die von einem 12-jährigen Kind mit akuter lymphatischer Leukämie vom Prä-B-Zell-Typ stammt. Diese Zelllinie wurde ausgewählt, da sie für Apoptoseexperimente in der Literatur vielfach beschrieben ist [Zhang, 1996] und sich außerdem auf Grund einer Überexpression von Bcl-2 für die anschließend geplante Antisense-Hemmung von Bcl-2 eignet [Tsuji moto, 1986; Reed, 1990]. Als Induktor der Apoptose wurde das Zytostatikum Etoposid untersucht, dessen Apoptose auslösende Eigenschaft bereits für zahlreiche Zelllinien inklusive GM697 beschrieben wurde [Miyashita, 1993].

Als Methode zum Nachweis der Apoptose wurde zuerst die Färbung mit Annexin V (AnnV) und Propidiumiodid (PI) untersucht. GM697-Zellen wurden in einer Konzentration von $0,9 \times 10^6/\mu\text{l}$ mit $17 \mu\text{M}$ Etoposid bei Standardbedingungen inkubiert (s. Material und Methoden). Nach 0, 2, 4, 6 und 8 h wurde jeweils ein Aliquot gewaschen, mit AnnV-FITC oder PI gefärbt und schließlich im FACS ausgewertet (**Abb. 3.1**). Es zeigte sich schon ohne Etoposid ein hoher Ausgangswert für den Prozentsatz AnnV-positiver als auch PI-positiver Zellen, der jedoch innerhalb der ersten 4 h konstant blieb (25-30 Prozent AnnV-positive Zellen und 20 Prozent PI-positive Zellen). Bei späteren Versuchen lagen diese Werte deutlich niedriger. Zwischen 4 und 6 h zeigte sich eine deutliche Erhöhung der AnnV-positiven Zellzahl auf über 45 Prozent. Verzögert kam es nach 6 bis 8 h zu einer Vermehrung der PI-positive Zellfraktion auf etwa 40 Prozent. Dies lässt vermuten, dass GM697-Zellen in diesem Modell nach etwa 4 h in ein frühes Apoptosestadium eintreten und mit einer zeitlichen Verzögerung von etwa 2 h ihre Membranintegrität einbüßen.

AnnV-positive bzw.
PI-positive Zellen [%]

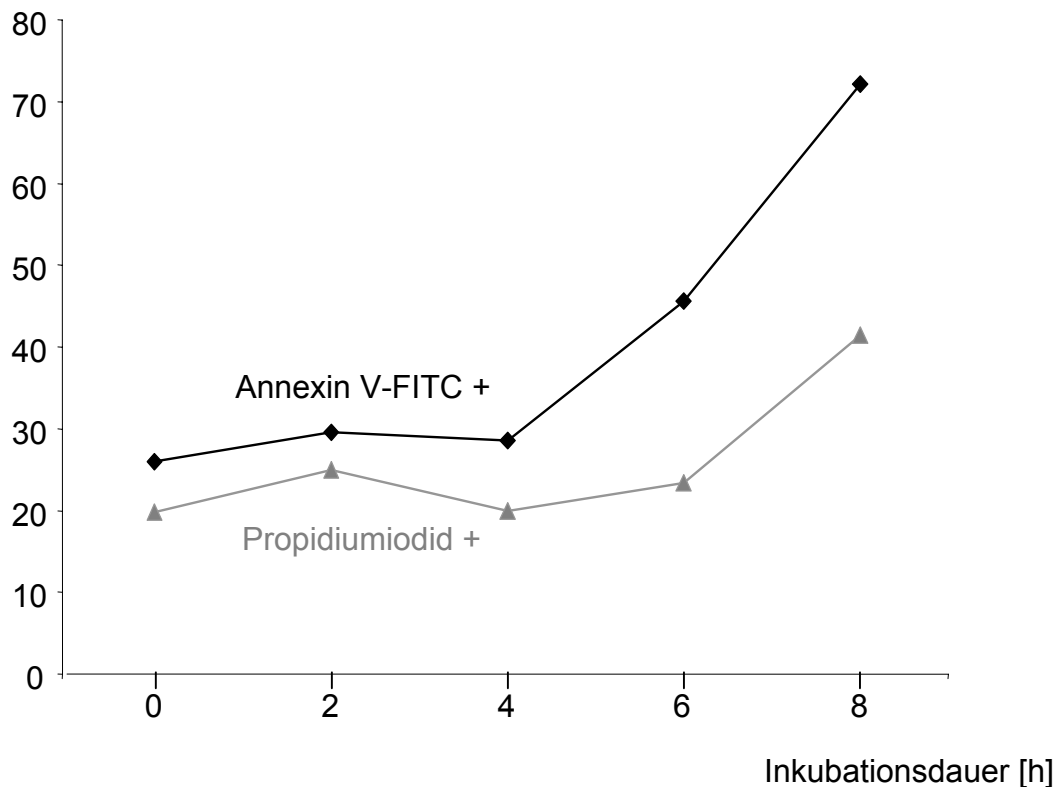


Abb. 3.1: Etoposid induziert Apoptose in der Prä-B-ALL-Zelllinie GM697, nachgewiesen durch eine seriell durchgeführte Färbung mit AnnV-FITC (AnnV-FITC) oder Propidiumiodid (PI). Zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6 und 8 h nach Beginn der Inkubation mit 17 μ M Etoposid wurde der Prozentsatz apoptotischer Zellen bestimmt. Dazu wurden die Zellen gewaschen, mit AnnV-FITC oder PI gefärbt und im FACS analysiert. Grafisch dargestellt ist der Prozentsatz AnnV-positiver bzw. PI-positiver Zellen, gemessen an der Gesamtzahl der inkubierten Zellen.

Diese Vermutung wurde durch eine Doppelfärbung überprüft, bei der jede einzelne Zelle simultan mit AnnV-FITC und PI angefärbt wurde. Hierbei ergeben sich vier permutatorisch mögliche Zellfraktionen: Vitale Zellen sind AnnV-/PI-, frühapoptotische Zellen AnnV+/PI-, spätapoptotische Zellen AnnV+/PI+ und nekrotische Zellen oder mechanisch bedingte Zelltrümmer AnnV-/PI+. In **Abbildung 3.2** sind die Ergebnisse einer Etoposid-Konzentrationsreihe bei GM697-Zellen wiedergegeben. Die Zellen wurden für 6 h mit logarithmisch aufsteigenden Konzentrationen von Etoposid inkubiert, um dadurch die zur Induktion der Apoptose optimale Dosis Etoposid empirisch zu bestimmen. Nach Inkubation wurde eine AnnV-PI-Doppelfärbung durchgeführt und im FACS analysiert.

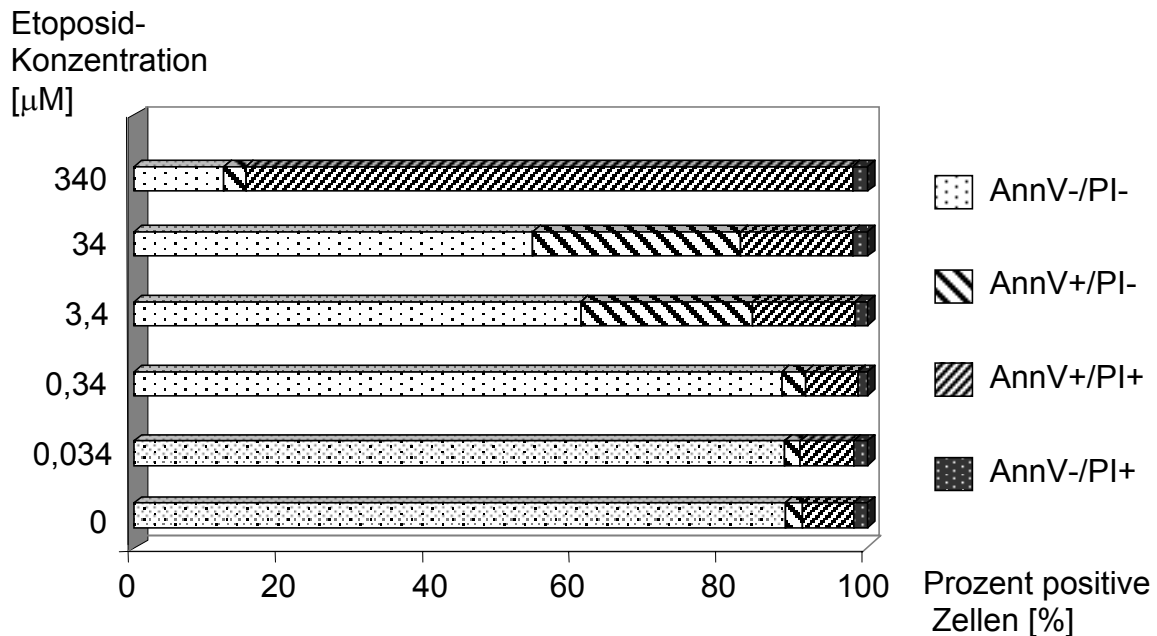


Abb. 3.2: Dosis-Findungs-Untersuchung zur Apoptose induzierenden Wirkung von Etoposid auf leukämische B-Zellen. GM697-Zellen wurden für 6 h jeweils mit exponentiell ansteigenden Dosen von Etoposid (0,034 – 340 μM) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in einer Doppelfärbung mit AnnV-FITC und PI gefärbt und im FACS analysiert. Dargestellt ist der Prozentsatz vitaler (AnnV-/PI-), frühapoptotischer (AnnV+/PI-), spätapoptotischer (AnnV+/PI+) und nekrotischer (AnnV-/PI+) Zellen.

Die Kontrollzellen ohne Etoposid waren zu 90 Prozent vital (AnnV-/PI-). Die restlichen zehn Prozent sind ein Gemisch aus apoptotischen, nekrotischen und mechanisch zerstörten Zellen. Die Inkubation der Zellen mit einer Dosis von 0,034 μM Etoposid bot ein vergleichbares Bild, führte also noch nicht zur Induktion der Apoptose. Bei 0,34 μM Etoposid zeigte sich bereits eine leichte Vermehrung der frühapoptotischen Zellfraktion (AnnV+/PI-). Deutlicher war der Effekt bei der zehnfachen Dosis: 3,4 μM Etoposid führte nach 6 h zu 20 Prozent frühapoptotischen (AnnV+/PI-) und etwa 10 Prozent spätapoptotischen (AnnV+/PI+) Zellen. Durch 34 μM Etoposid ließen sich diese Zellfraktionen noch geringfügig erhöhen (AnnV+/PI- etwa 30 Prozent, Ann+/PI+ etwa 15 Prozent). Bei der hohen Dosis von 340 μM Etoposid setzte sich dieser Trend nicht mehr fort, sondern es fiel eine andere Verteilung der Zellfraktionen auf: Beinahe 90 Prozent aller Zellen waren AnnV+/PI+, aber nur etwa fünf Prozent AnnV+/PI-. Damit ist der Anteil frühapoptotischer Zellen vergleichbar mit der Situation bei der Leerkontrolle und die meisten der AnnV+/PI+ Zellen repräsentieren bereits spätapoptotische Zellen. In **Abbildung 3.3** sind die originalen FACS-Grafiken des Experiments wiedergegeben.

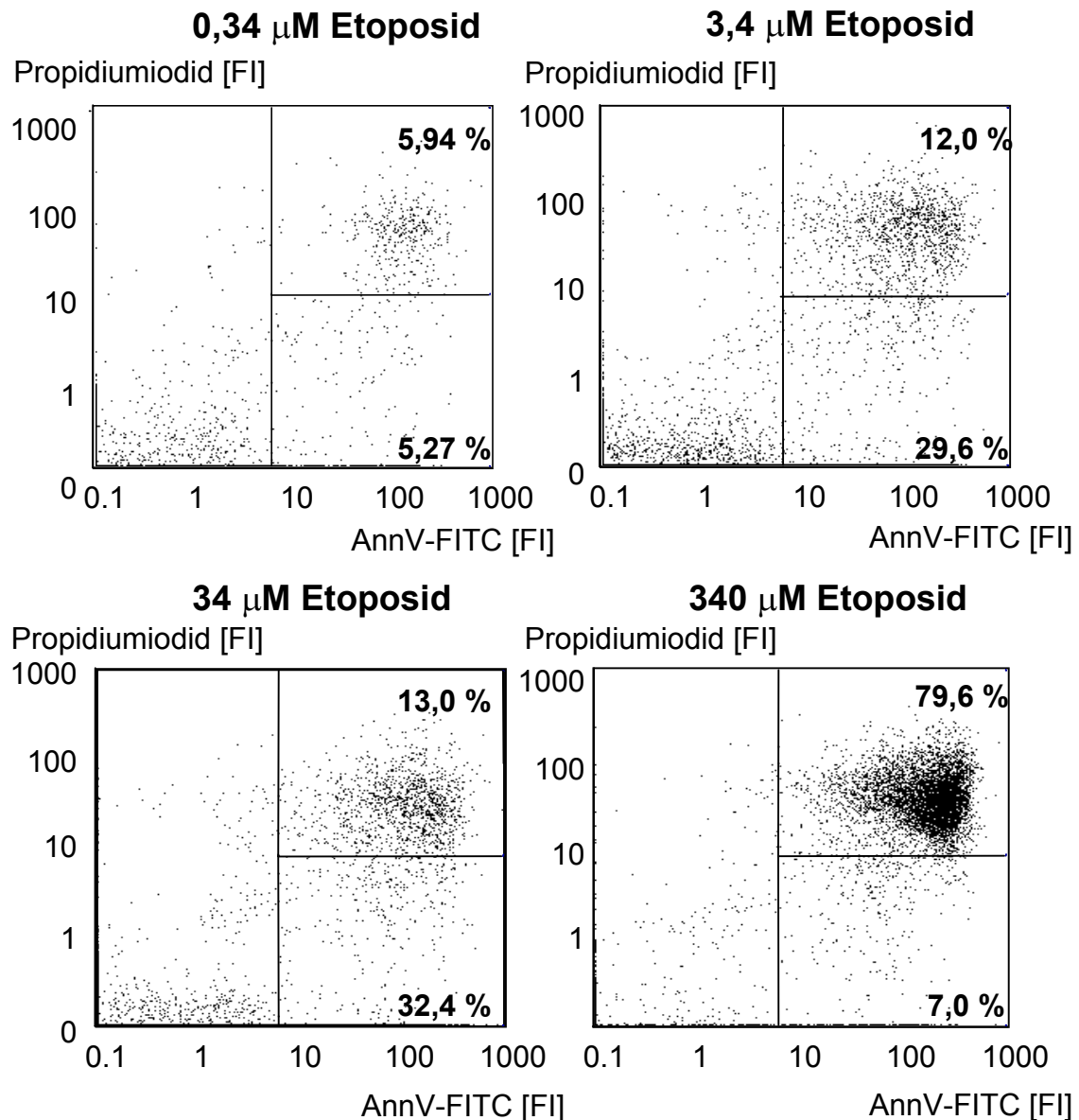


Abb. 3.3: Die Apoptoseinduktion in GM697-Zellen mit Etoposid ist ein dosisabhängiger Prozess. Die Zellen wurden für 6 h mit Etoposid inkubiert, bevor im FACS die Zellpopulationen AnnV+/PI- sowie AnnV+/PI+ bestimmt wurden. Die Abbildung zeigt *dot plots*, bei denen die Fluoreszenzintensität (FI) von AnnV-FITC gegen die von PI in exponentieller Skalierung aufgetragen ist. Die Prozentzahlen in den Quadranten geben die Zellfraktionen AnnV+/PI- und AnnV+/PI+ wider. Die AnnV+/PI- Zellen sind grafisch schwer zu erkennen, da sie fast allesamt auf die Abszissenlinie projiziert werden. Daher scheint die Zunahme der frühapoptotischen Zellfraktion (AnnV+/PI-) optisch nicht der rechnerischen Analyse zu entsprechen. Dafür wird die Zunahme der spätapoptotischen Zellfraktion (AnnV+/PI+) deutlich: Die Punktvolke im rechten oberen Quadranten repräsentiert die Fraktion spätapoptotischer Zellen.

Diese Versuche wurden mehrmals durchgeführt und erbrachten konsistent dieselben Ergebnisse. Damit konnte gezeigt werden, dass in vorliegendem Modell die Apoptose der GM697-Zellen durch das Zytostatikum Etoposid konzentrationsabhängig induziert werden kann. Es konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Etoposid und der Apoptose nachgewiesen werden.

3.1.2 Bestimmung der Caspase-3 als alternativer Apoptosenachweis

Obwohl die Färbung mit AnnV und PI eine leicht durchführbare, gut reproduzierbare, sensitive und spezifische Methode zur Erfassung eines frühen Apoptosestadiums darstellt, wurde als alternative Nachweismethode die Bestimmung der Caspase-3 untersucht, um hiermit eventuell ein noch früheres Apoptosestadium detektieren zu können, als dies mit AnnV der Fall ist. Caspase-3 gilt als zentrale Effektorprotease der Apoptose, da alle Apoptosestimuli letztendlich in der Aktivierung dieses Enzyms kulminieren [Earnshaw, 1999]. Caspase-3 ist die enzymatisch aktive Form, die durch proteolytische Abspaltung aus Procaspase-3 entsteht. Seit kurzem gibt es einen FACS-Antikörper, der gegen ein Epitop der aktiven Form gerichtet ist und nur zu einem vernachlässigbaren Prozentsatz an homologe Caspasen bindet.

Für diese Versuche wurden GM697-Zellen mit 17 μM Etoposid über verschiedene Zeitintervalle hinweg inkubiert. In **Abbildung 3.4** sind die Ergebnisse des Experiments dargestellt. Es zeigte sich einerseits eine Subpopulation, in der keine aktive Caspase-3 angefärbt werden konnte. Diese Population Caspase-3-negativer Zellen machte in der Kontrolle ohne Etoposid beinahe 100 Prozent aus und wurde nach 6 h Inkubation mit Etoposid deutlich geringer. Bereits nach 2 und 3 h Inkubation mit Etoposid konnte zudem eine Caspase-3-positive Zellfraktion ausgemacht werden, die aber noch im Bereich unter 5 Prozent lag. Nach 6 h erreichte die Caspase-3-positive Fraktion annähernd 30 Prozent und nach 8 h etwa 50 Prozent aller vitalen Zellen.

Damit ist gezeigt, dass die aktive Caspase-3 durchflusszytometrisch nachgewiesen werden kann und im vorliegenden Apoptosemodell ein frühes Apoptosestadium anzeigt. Da jedoch ein eindeutiger Nachweis Caspase-3-positiver Zellen noch nicht nach 3 h, sondern erst nach 4-6 h erfolgt, besitzt diese Methode keinen zeitlichen Vorteil gegenüber der etablierten AnnV-PI-Färbung, die leichter durchzuführen ist und eine höhere Spezifität besitzt.

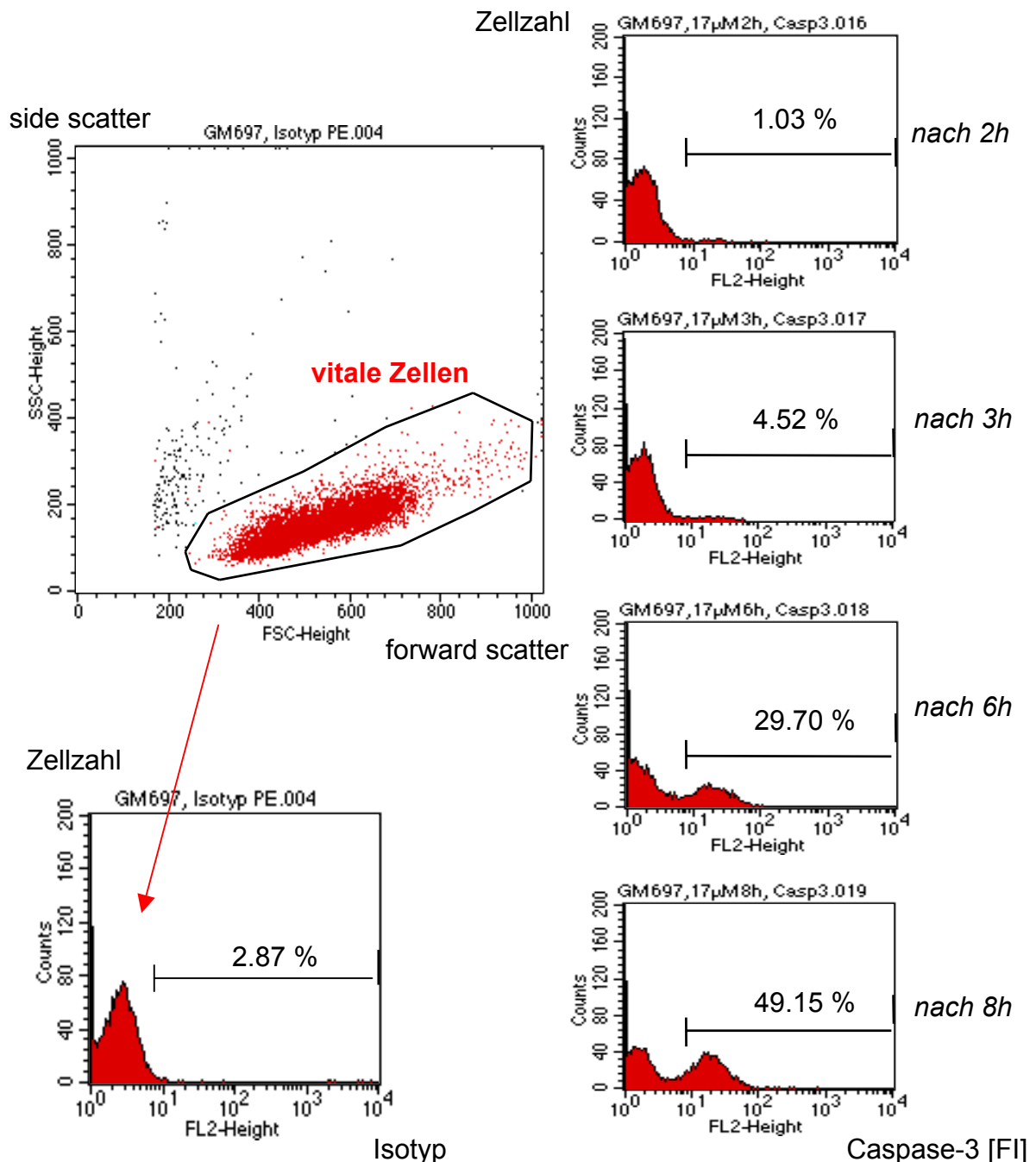


Abb. 3.4: Durch den Nachweis der Caspase-3-Aktivität lässt sich ein frühes Apoptosestadium identifizieren. GM697-Zellen wurden über variable Zeitintervalle hinweg mit 17 μ M Etoposid inkubiert. Danach wurde die aktive Form der Caspase-3 unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers durchflusszytometrisch gemessen. In die Auswertung wurden nur Zellen eingeschlossen, die den morphologischen Kriterien normaler Zellen entsprachen, d.h. Zelldetritus wurde ausgeschlossen (großes Bild links oben). Die Histogramme zeigen die Isotyp-Kontrolle (links unten) sowie die Caspase-3-Färbung zu vier verschiedenen Zeitpunkten (kleine Histogramme rechts). Der rechnerisch ermittelte Prozentsatz Caspase-3-positiver Zellen ist jeweils in das Histogramm eingetragen.

3.1.3 Validierung des Modells durch Nachweis der DNA-Fragmentierung

In einem letzten Schritt wurde die für Apoptose typische internukleosomale Fragmentierung der DNA demonstriert, um das Etoposid-Modell der Apoptose in GM697-Zellen durch diesen qualitativen Goldstandard zu validieren. GM697-Zellen wurden über 24, 48 und 72 h mit 17 μM Etoposid inkubiert. Anschließend wurde die DNA extrahiert und im Rahmen einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (**Abb. 3.5**). Während die Negativkontrolle einer intakten DNA in voller Länge nicht weit migrierte, zeigte die DNA der mit Etoposid inkubierten Zellen eine deutliche Fragmentierung in DNA-Bruchstücke, welche im Gel durch ihre verschieden weite Migration den Aspekt einer Stufenleiter hervorriefen (die charakteristische *apoptotic ladder*). Dies ist bei einer Inkubationsdauer von 24 als auch von 48 h jeweils gut nachweisbar, bei der Inkubation über 72 h zeigt sich allerdings ein undeutliches, verwaschenes Bild: Die DNA ist zu diesem späten Zeitpunkt bereits so weit durch ubiquitäre Nukleasen zersetzt, dass die meisten Fragmente zu klein sind, um noch im Gel als Leiter sichtbar zu werden.

Mit diesem qualitativen Apoptosenachweis ist gezeigt, dass Etoposid in GM697-Zellen bei der verwendeten Konzentration tatsächlich Apoptose induziert. Damit ist die Validität der AnnV-PI-Färbung als auch der Caspase-3-Bestimmung in diesem Modell gesichert.

Mit den beschriebenen Experimenten wurde ein Apoptosemodell am Beispiel von GM697-Zellen etabliert. Es wurde mit Etoposid ein induzierendes Agens gefunden und durch Dosisfindungsversuche sowie kinetische Untersuchungen charakterisiert. Valide Nachweismethoden wurden etabliert, wobei sich die Anwendung von AnnV und PI als Methode der Wahl bestätigte und die Messung der aktiven Caspase-3 als mögliche Alternative darstellte. Mit der DNA-Elektrophorese gelang der eindeutige qualitative Nachweis der Apoptose in diesem Modell. Somit stand ein methodisches Arsenal zur Verfügung, mit dessen Hilfe die Wirkung von Bcl-2-Antisense-Oligonukleotiden auf die Apoptose studiert werden konnte.

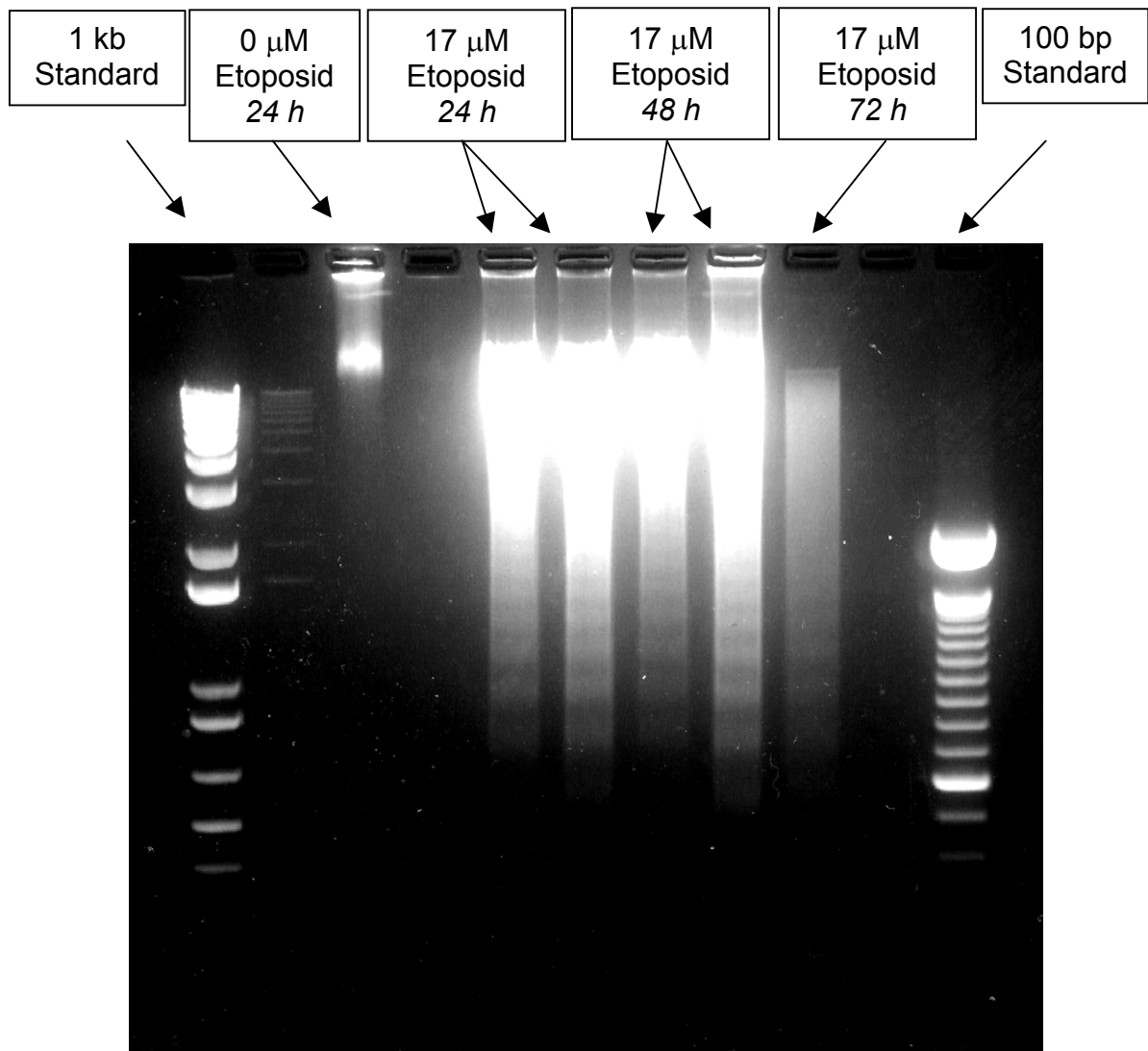


Abb. 3.5: Nachweis der charakteristischen internukleosomalen DNA-Fragmentierung zur Validierung des Apoptosemodells. GM697-Zellen wurden ohne Etoposid über 24 h bzw. mit 17 μM Etoposid über 24, 48 und 72 h inkubiert. Anschließend wurde die DNA nach dem im Methodenteil beschriebenen Protokoll extrahiert und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Referenzen dienten Molekulargewichts-Standards der Größen 1 Kilobase (kb) und 100 Basenpaare (bp). Die Proben „17 μM Etoposid über 24h“ und „17 μM Etoposid über 48 h“ wurden als Duplikate gemessen.

3.2 Antisense-Experimente

3.2.1 Transfektion der Oligonukleotide mit Lipofektin und ExGen 500

Um eine antisense-vermittelte Hemmung von RNA zu erzielen, müssen die Antisense-Oligonukleotide (Antisense-ODN) in die Zelle und dort vorzugsweise in das nukleäre Kompartiment gelangen. Die Größe und negative Gesamtladung der ODN erschwert deren intrazelluläre Aufnahme. Deshalb sind bei Versuchen mit permanenten Zelllinien Carrier nötig, welche die ODN in die Zelle transfizieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Carrier Lipofektin, ein kationisches Lipidgemisch, und ExGen 500, ein lineares Polyethylenimin, untersucht.

a) Effizienz der Transfektion

Zunächst wurde untersucht, wie effizient GM697-Zellen mit ODN transfiziert werden können. Hierbei wurden FITC-markierte ODN (ODN-FITC, 18-mer) verwendet, die auf Grund ihrer Fluoreszenz durchflusszytomerisch identifiziert werden können. Durch mehrmaliges Waschen der Zellen nach Inkubation wurde sicher gestellt, dass nicht unspezifisch auf der Zelloberfläche haftende ODN fälschlicherweise im FACS mitgemessen wurden. Die Korrelation von durchflusszytometrischer ODN-FITC-Messung und ODN-FITC-Anreicherung in Zytoplasma und Kern war in unserem Labor bereits mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie nachgewiesen worden [Hartmann, 1998 b]. Somit konnte von der Messung FITC-markierter ODN auf die Effizienz der Transfektion rückgeschlossen werden.

Lipofektion gilt als etablierte Methode zur intrazellulären ODN-Transfektion und wurde deshalb zuerst untersucht (**Abb. 3.6**). GM697-Zellen wurden für 4 h mit einem 20 min lang präinkubierten Gemisch aus 1 μ M FITC-markierten ODN und verschiedenen Konzentrationen Lipofektin inkubiert, anschließend dreimal gewaschen und im FACS analysiert. Die Konzentration des kationischen Lipofektin wurde so gewählt, dass das molare Ladungsverhältnis zu den anionischen ODN zwischen 0,9 : 1 (Kation : Anion) und 1,3 : 1 betrug. In diesen Grenzen ist die optimale Mischung bei Monozyten und B-Zellen beschrieben worden [Hartmann, 1998 b]. Die Spontanaufnahme von ODN-FITC war gering: Abbildung 3.6 zeigt den Anschnitt einer rechtsschiefen Gauß-Kurve mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von 2,31 bzw. 1,98 (Experimentalduplikat). Die Komplexierung von ODN mit Lipofektin erhöhte die zelluläre Aufnahme deutlich: Selbst auf der logarithmischen Skala sieht man eine Rechtsverlagerung der Kurve zu höheren

Fluoreszenzwerten hin. Mit MFI-Werten von 165, 200 und 158 (jeweils bei den molaren Ladungsquotienten 0,9, 1,1 und 1,3) wurde eine 200-fache Steigerung der zellulären Aufnahme erreicht. Die Kurvenform veranschaulicht auch, dass die Zellen relativ homogen den ODN-Lipofektin-Komplex aufnahmen und nur wenige Zellen eine schlechte Aufnahme zeigten.

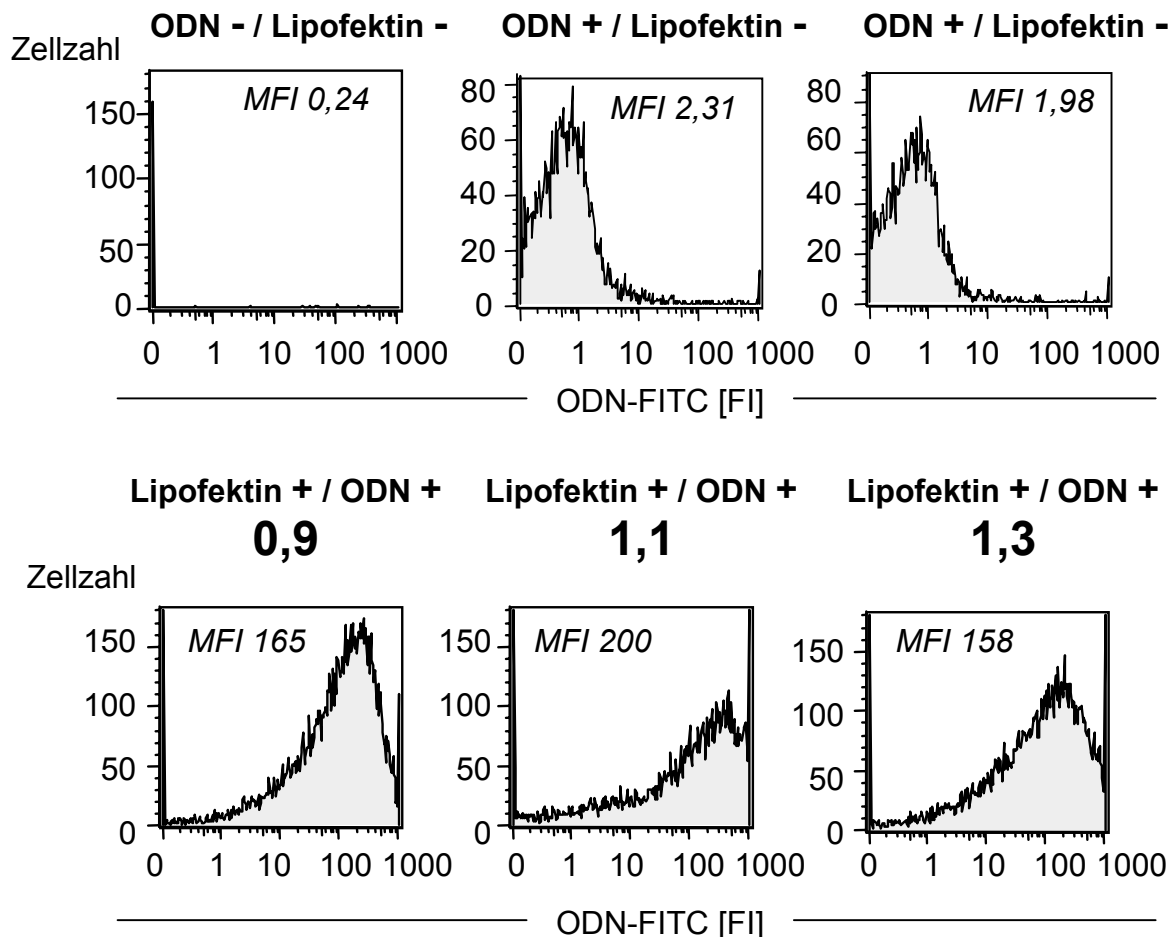


Abb. 3.6: GM697-Zellen lassen sich mittels Lipofektin gut mit ODN transfizieren. Die Zellen wurden für 4 h mit einem 20 min lang präinkubierten Gemisch aus 1 μ M fluoreszenzmarkierten ODN (ODN-FITC) und Lipofektin inkubiert, dann gewaschen und im FACS analysiert. In den Histogrammen ist die Fluoreszenzintensität (FI) auf der Abszisse gegen die Zellzahl auf der Ordinate aufgetragen. Zusätzlich sind in den Grafiken die Werte der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) kursiv eingetragen. Die obere Reihe stellt die Eigenfluoreszenz der Zellen und die als Duplikat gemessene Spontanaufnahme von ODN dar. Die untere Reihe repräsentiert die Lipofektin-vermittelte ODN-Aufnahme, wobei die Lipofektin-ODN-Komplexe in verschiedenen molaren Ladungsverhältnissen getestet wurden: 0,9, 1,1 und 1,3 (jeweils über den Histogrammen angegeben). „0,9“ bedeutet ein Verhältnis von Kationen zu Anionen von 9 : 10.

500-Konzentration wurde so gewählt, dass auf jede Phosphatgruppe im ODN neun Äquivalente ExGen 500-Stickstoffatome kamen. Damit soll laut Literatur die höchste Transfektionseffizienz erreicht werden [Boussif, 1995].

In **Abbildung 3.8** ist das Ergebnis dieses Versuchs in einem Balkendiagramm dargestellt. Während mit Lipofektin annähernd 100 Prozent der Zellen transfiziert werden, sind es bei ExGen 500 maximal 15 Prozent. Die geringe Transfektionseffizienz von ExGen war unabhängig davon, ob 150 mM NaCl oder 5% Glucose als Verdünnungsmedium verwendet wurde. Auch die Variation des Trägermaterials (Polypropylen- versus Polystyrolröhrchen) hatte keinen Einfluss auf die geringe Transfektionseffizienz von ExGen 500 (Daten nicht gezeigt).

Prozent transfizierte Zellen [%]

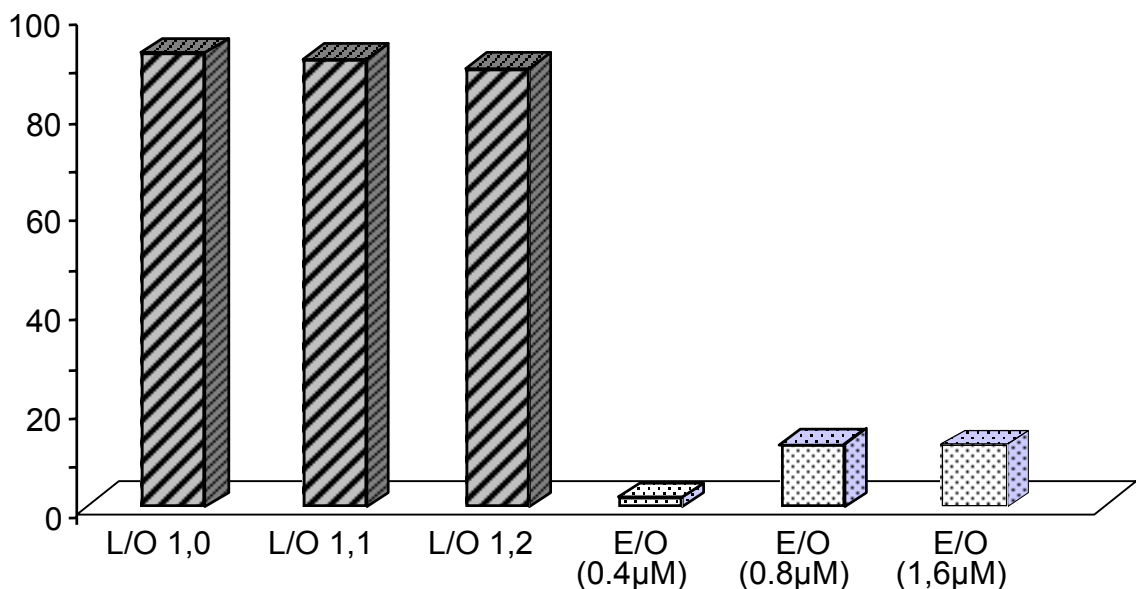


Abb. 3.8: Effizienz der Transfektion von GM697-Zellen mit ODN und den beiden Carriern Lipofektin und ExGen 500 im Vergleich. Das Versuchsprotokoll ist wie im Methodenteil beschrieben. Auf der Ordinate ist der Prozentsatz transfizierter Zellen angegeben, auf der Abszisse sind die Konditionen verzeichnet: „L/O 1,1“ steht für ein Lipofektin/ODN-Gemisch im molaren Ladungsverhältnis 1,1 : 1; „E/O (0,8 µM)“ steht für ein ExGen 500/ODN-Gemisch mit einer ExGen 500-Konzentration von 0,8 µM. Die ODN-Konzentration betrug konstant 1 µM.

b) Toxizität der Transfektionscarrier

Um die *In vitro*-Toxizität der Carrier Lipofektin und ExGen 500 beurteilen zu können, beinhaltete das oben beschriebene Experiment eine Färbung mit PI. Wie in **Abbildung 3.9** dargestellt, kam es mit Lipofektin nur bei maximal zehn Prozent aller GM697-Zellen zur PI-Anfärbung, d.h. zur toxisch bedingten Zerstörung der Membranintegrität. ExGen 500 zeigte dieses Phänomen relativ unabhängig von der verwendeten Konzentration bei 70-80 Prozent aller Zellen.

PI-positive Zellen [%]

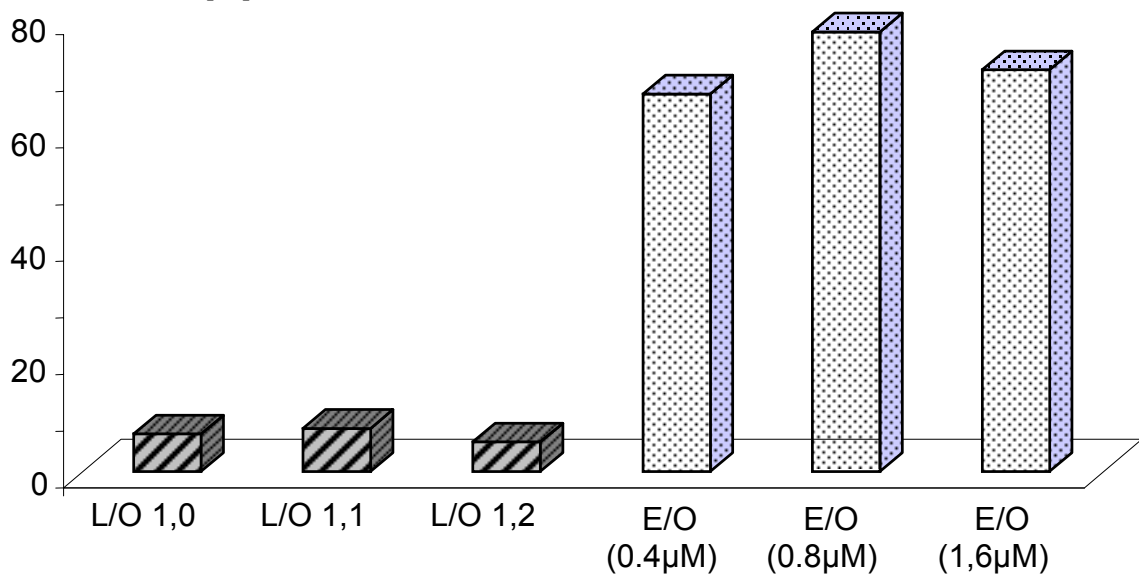


Abb. 3.9: Toxizität der Carrier Lipofektin und ExGen 500 im Vergleich. GM697-Zellen wurden im beschriebenen Modell mit ODN transfiziert, wobei je drei Konditionen von Lipofektin und ExGen 500 getestet wurden. „L/O 1,1“ steht für ein Lipofektin/ODN-Gemisch mit molarem Ladungsverhältnis 1,1 : 1; „E/O (0,8 μM)“ für ein ExGen 500-ODN-Gemisch mit einer ExGen 500-Konzentration von 0,8 μM. Die Ordinate zeigt den Prozentsatz von Zellen, die mit PI anfärbbar waren.

Die Toxizität von ExGen 500 ließ sich durch methodische Veränderungen am Versuchsprotokoll nicht signifikant vermindern. Wie **Abbildung 3.10** zeigt, machte es keinen Unterschied, ob als Verdünnungsmedium 5%-ige Glucose-Lösung statt 150 mM NaCl-Lösung verwendet wurde. Da manche Oberflächen mit ExGen 500 interagieren können, wurde auch der Einfluss des Versuchsmaterials (Röhrchen, Kulturplatten) untersucht: Die Verwendung von Polystyrol-Materialien, welche für Experimente mit ExGen 500 oft empfohlen werden, zeigte gegenüber Polypropylen-Materialien keine Reduktion der Toxizität (Daten nicht gezeigt).

PI-positive Zellen [%]

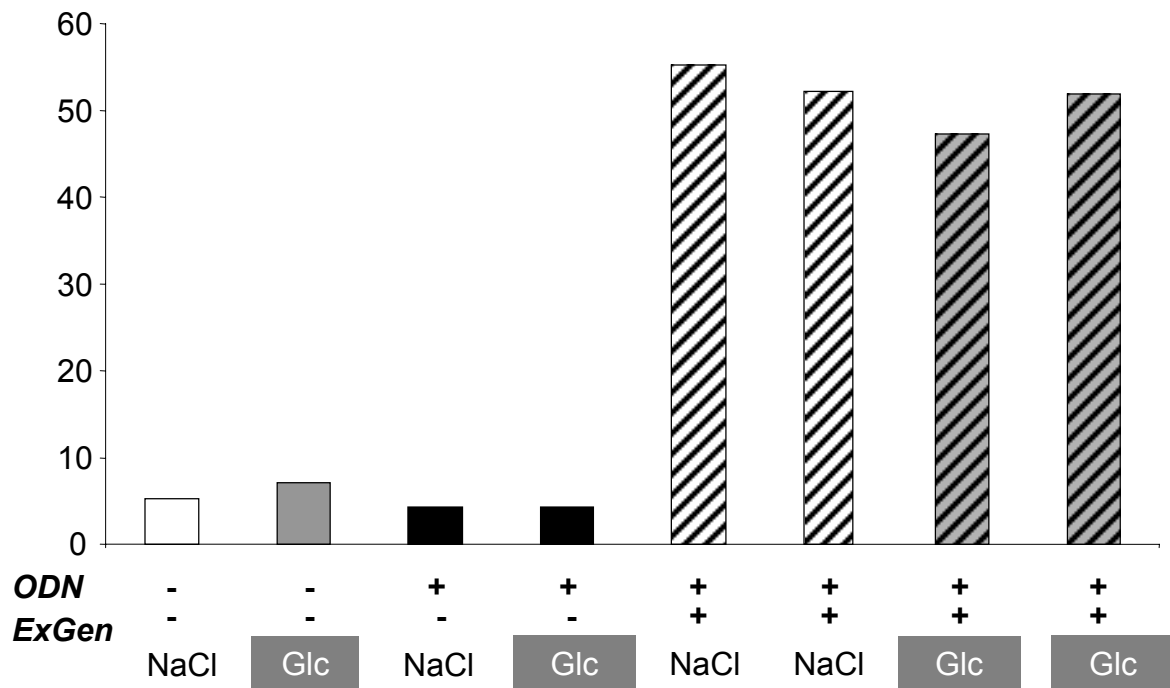


Abb. 3.10: Vergleichende Untersuchung der Toxizität von ExGen 500 bei Verwendung der beiden Lösungsmedien NaCl 0,9% („NaCl“) und Glucose 5% („Glc“). GM697-Zellen wurden nach dem im Methodenteil beschriebenen Protokoll mit 1 μ M ODN in Komplex mit ExGen 500 inkubiert und anschließend im FACS untersucht. Die Toxizität wurde durch eine Färbung mit PI bestimmt.

Durch die Experimente zur Transfektion von GM697-Zellen ergaben sich folgende Erkenntnisse:

- (1) Lipofektin ist zur Transfektion von GM697-Zellen ideal geeignet.
- (2) Bei richtiger Komplexierung von Lipofektin und ODN ist die Toxizität dieses Carriers gering.
- (3) ExGen 500 ist sowohl im Hinblick auf die Effektivität der Transfektion als auch die Zytotoxizität kein geeigneter Carrier für GM697-Zellen.

Damit wurde die Basis für die nachfolgenden Bcl-2-Antisense-Experimente gelegt.

3.2.2 Suppression von Bcl-2 durch das Antisense-Oligonukleotid G3139

Nach Etablierung eines Apoptosemodells und eines Systems der ODN-Transfektion wurde untersucht, ob Antisense-ODN die Expression von Bcl-2 in GM697-Zellen hemmen und die Apoptose beeinflussen können. Als Carrier wurde Lipofektin verwendet. Zunächst wurden Kinetikuntersuchungen durchgeführt (**Abb. 3.11**). Die Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^6 /ml mit einem präinkubierten Gemisch von $1 \mu\text{M}$ ODN und $27,2 \mu\text{g/ml}$ Lipofektin (molares Ladungsverhältnis 1,2 : 1) für 4 h inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal gewaschen und erneut in Kultur gebracht. Nach einer variablen Zeitspanne wurde im FACS die Expression von Bcl-2 bestimmt. Es zeigte sich 12 h nach Ende der Inkubation mit dem ODN-Lipofektin-Gemisch (bzw. 16 h nach Beginn der Inkubation) eine Bcl-2-Reduktion auf 60 Prozent des Kontrollwerts.

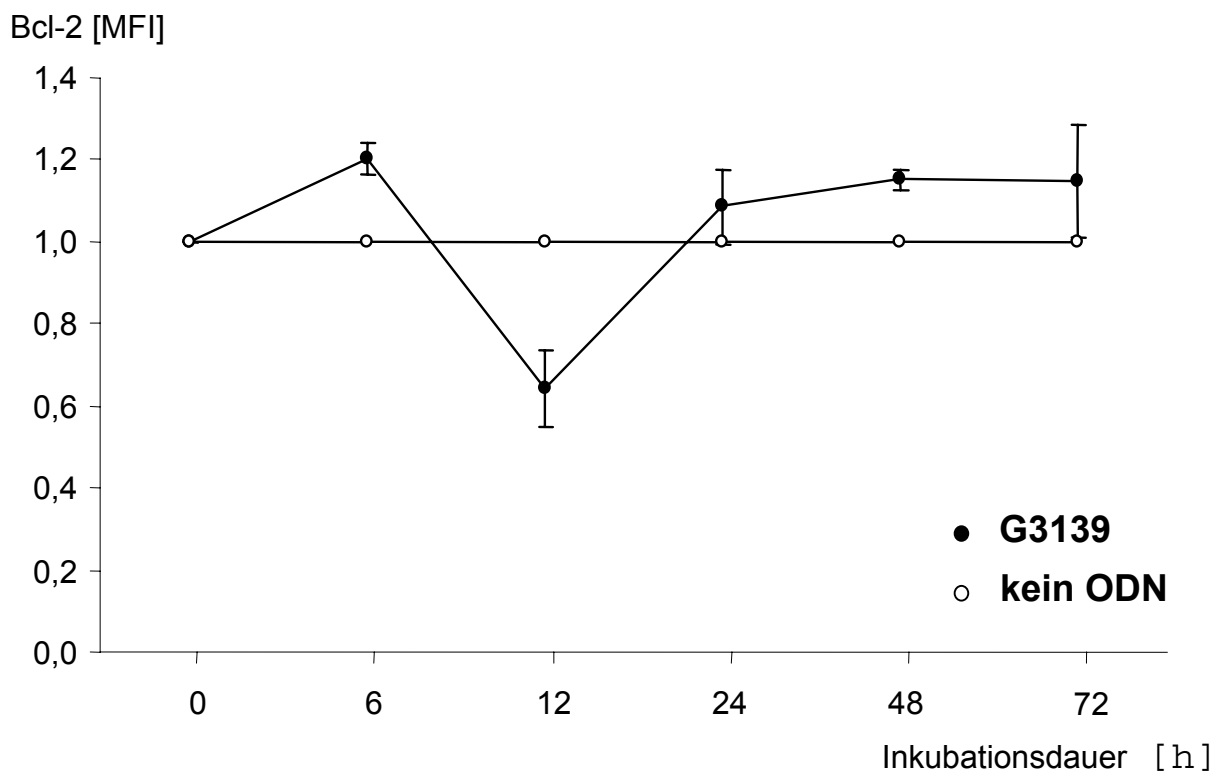


Abb. 3.11: Kinetik der Bcl-2-Reduktion durch das Antisense-ODN G3139 in GM697-Zellen. Die Zellen wurden für 4 h entweder mit $1 \mu\text{M}$ G3139 im Komplex mit Lipofektin (volle Kreise) oder nur mit Medium (leere Kreise) inkubiert. Das G3139-Lipofektin-Gemisch war in einem Präinkubationsschritt gebildet worden ($1 \mu\text{M}$ G3139 + $27,2 \mu\text{g/ml}$ Lipofektin für 20 min inkubiert). 0, 6, 12, 24, 48 und 72 h nach Inkubationsende wurden Aliquots gewaschen und eine intrazelluläre Bcl-2-Färbung durchgeführt. Die Grafik zeigt die durchflusszytometrischen MFI-Werte von Bcl-2 als Relativwerte gemessen an der Kontrolle ohne ODN. Die Punkte sind Mittelwerte + SEM aus $n = 2$ unabhängigen Experimenten.

Nach der Bestimmung des optimalen Zeitpunktes zur antisense-vermittelten Bcl-2-Hemmung in GM697 wurde die Bcl-2-Expression 12 h nach Inkubation mit Antisense-ODN und verschiedenen Kontrollen untersucht. Als Bcl-2-Antisense-ODN wurden G3139 und ODN 2009 – mit und ohne Lipofektin – verwendet, als Negativkontrolle zu den Antisense-ODN diente ODN 2010, das aus denselben Basen besteht wie ODN 2009, aber an vier Stellen Adenosin und Thymidin vertauscht hat (4-mismatch-ODN). In **Abbildung 3.12** ist ersichtlich, dass G3139 und ODN 2009 ohne Lipofektin die Bcl-2-Expression nicht veränderten. Mit Lipofektin kam es jedoch zu einer Bcl-2-Reduktion, die bei G3139 um 50 Prozent und bei ODN 2009 etwa 25 Prozent betrug. Das Kontroll-ODN 2010 führte mit Lipofektin nur zu einer minimalen Bcl-2-Reduktion, was mit einem unspezifischen Effekt des Phosphorothioat-Gerüsts vereinbar war. Ein 4-mismatch-Kontroll-ODN zu G3139, nämlich G3139F1, konnte aus logistischen Gründen nur in einem der drei Versuche verwendet werden und ist daher im Diagramm nicht aufgeführt. Es zeigte einen mit ODN 2010 vergleichbaren Bcl-2-Level.

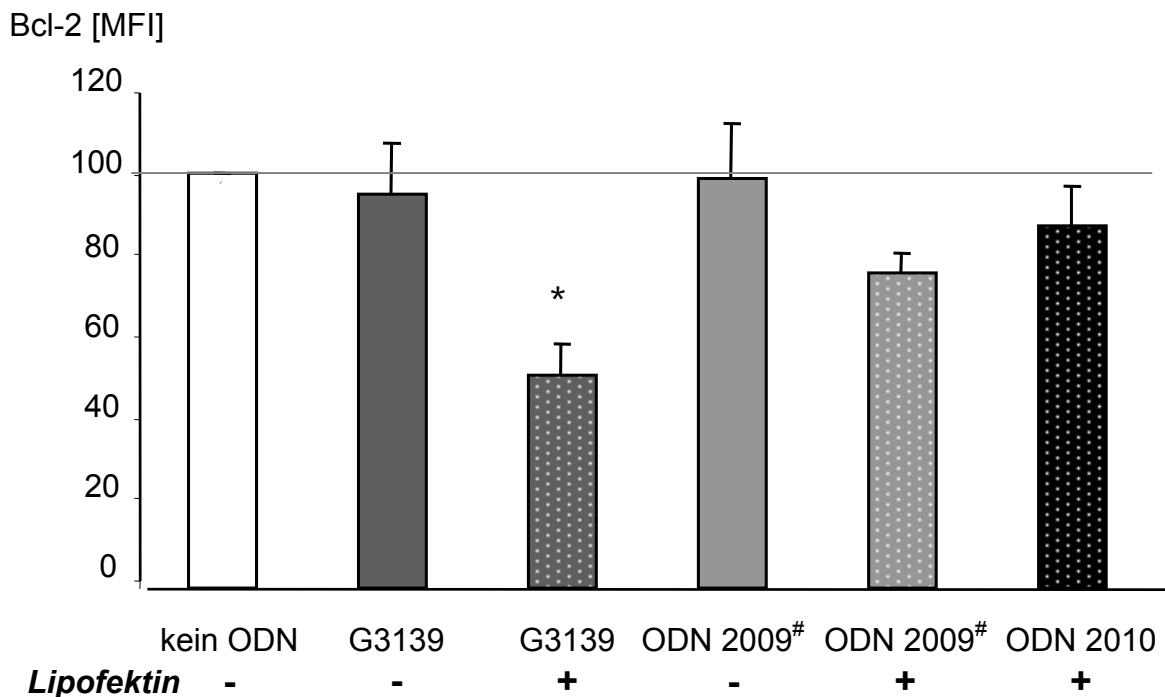


Abb. 3.12: Hemmung der Bcl-2-Synthese in GM697-Zellen durch die Bcl-2-Antisense-ODN G3139 und ODN 2009. Die Zellen wurden für 4 h ohne ODN, mit G3139 (+/- Lipofektin), ODN 2009 (+/- Lipofektin) oder ODN 2010 (+ Lipofektin) inkubiert. Die ODN-Konzentrationen waren stets 1 μ M. Der Komplex mit Lipofektin war durch 20 min Präinkubation gebildet worden (1 μ M ODN + 27,2 μ g/ml Lipofektin). 12 h nach Ende der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und die Bcl-2-Expression im FACS gemessen. Die MFI von Bcl-2 ist als Prozentangabe relativ zur Mediumkontrolle dargestellt. Die Säulen zeigen Mittelwerte + SEM aus n = 3 unabhängigen Experimenten (Ausnahme # n = 2). * = p < 0,05 als Signifikanzniveau gegenüber der Negativkontrolle („kein ODN“).

Um zu untersuchen, ob sich die antisense-vermittelte Hemmung von Bcl-2 auf die spontane Apoptoserate auswirkte, wurde nun bei derselben Versuchsanordnung der frühe Apoptosemarker Caspase-3 mitgemessen (s. **Abb. 3.13**). Die beiden Antisense-ODN G3139 und ODN 2009 zeigten ohne Lipofektin keine Aktivierung der Caspase-3. Im Komplex mit Lipofektin führte G3139 jedoch zu einer über zehnfachen Erhöhung des messbaren Levels der aktiven Caspase-3, ODN 2009 lediglich zu einer etwa zweifachen Erhöhung. Auch das Kontroll-ODN 2010 zeigte in Verbindung mit Lipofektin eine leichte Aktivierung der Caspase-3, die mit derjenigen des ODN 2009 vergleichbar war und als unspezifischer Hintergrundeffekt eingeordnet wurde.

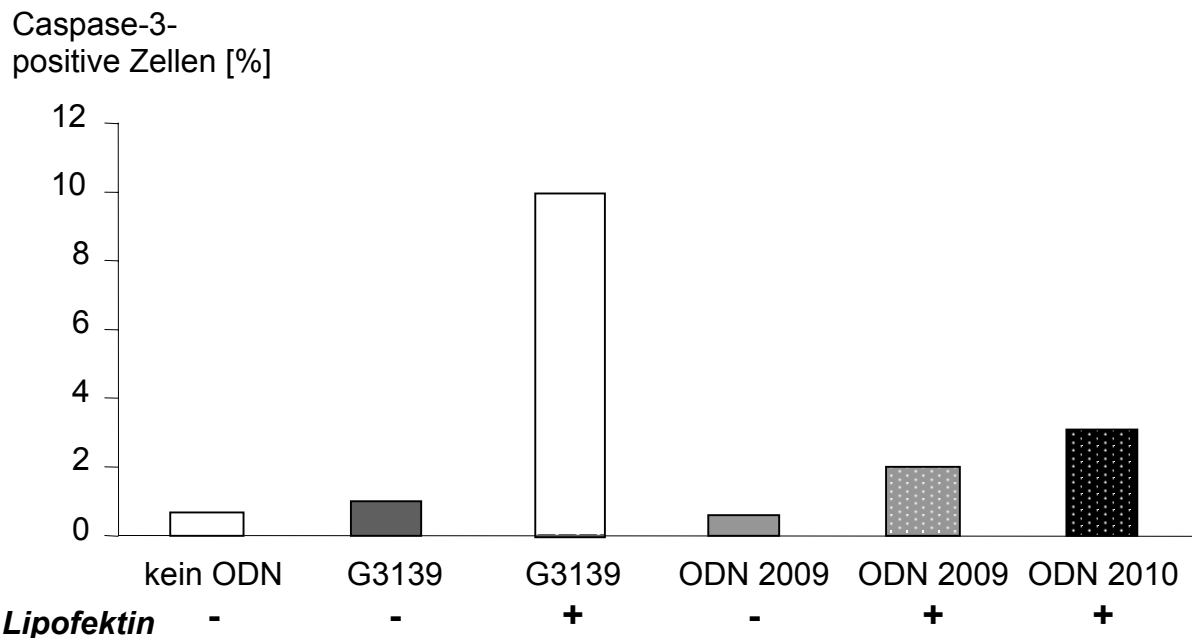


Abb. 3.13: Erhöhung der spontane Apoptoserate von GM697-Zellen bei Lipofektin-vermittelter Transfektion mit dem Anti-Bcl-2-ODN G3139. Die Zellen wurden für 4 h unter den angegebenen Bedingungen inkubiert (s. Legende zu Abb. 3.12). Der Komplex mit Lipofektin war in einem Präinkubationsschritt gebildet worden. 12 h nach Ende der Inkubation wurden die Zellen gewaschen, permeabilisiert, mit fluoreszenzmarkierten Anti-Caspase-3-Antikörpern inkubiert und schließlich im FACS analysiert. Dargestellt ist der Prozentsatz Caspase-3-positiver Zellen.

In einem weiteren Experiment wurde das Bcl-2-homologe Protein Bcl-x_L quantifiziert, um die Spezifität der Antisense-Wirkung sicherzustellen (**Abb. 3.14**). Anders als bei Bcl-2 wurde die Expression von Bcl-x_L durch das Antisense-ODN nicht reduziert, sondern nahm durch die Inkubation der Zellen mit Lipofektin-komplexiertem ODN G3139 sogar zu (MFI 9,1 bei Inkubation mit G3139 gegen-

über 7,7 mit dem Kontroll-ODN). Der Effekt konnte in dieser Deutlichkeit nur bei G3139, nicht bei dem Kontroll-ODN G3139F1 beobachtet werden. Die Sequenz G3139F1 zeigte allerdings auch eine leichte Erhöhung von Bcl-x_L (um zehn Prozent), was nicht verwundern muss, wenn man berücksichtigt, dass G3139 ein CpG-Motiv enthält (s. Tab. 2.1).

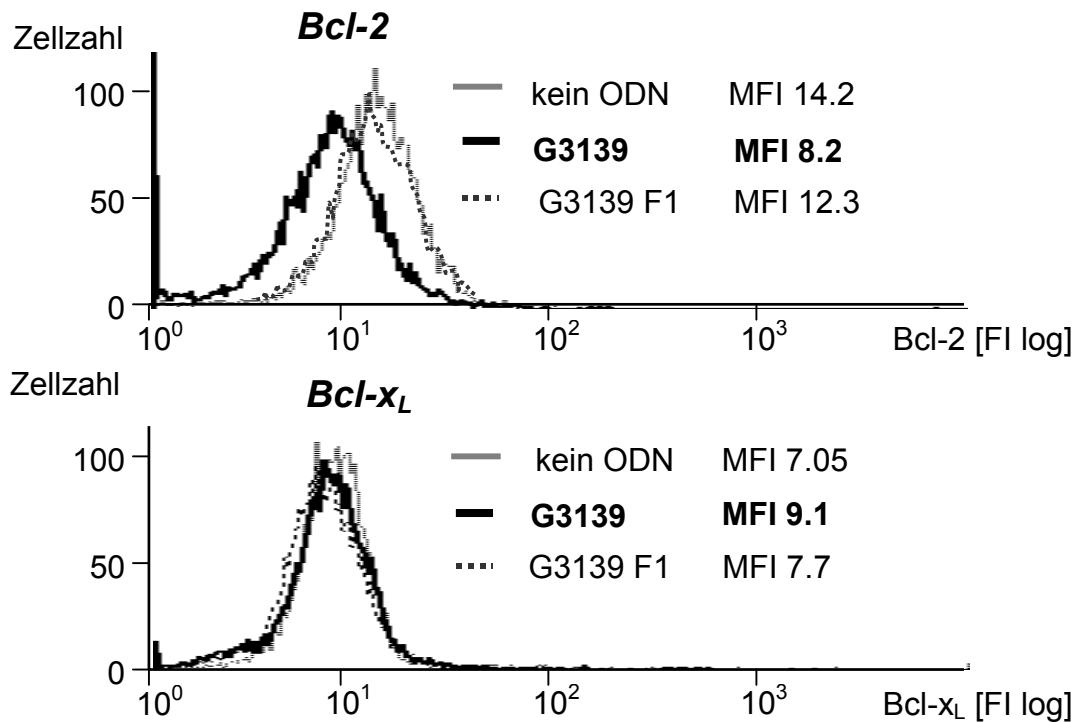


Abb. 3.14: Die Expression des Kontrollproteins Bcl-x_L wird im Gegensatz zur Expression von Bcl-2 durch das Antisense-ODN G3139 nicht vermindert. Das Versuchsprotokoll entsprach dem in der Legende zu Abb. 3.12 beschriebenen. Die Expression von Bcl-x_L wurde analog zu der von Bcl-2 mittels eines fluoreszenzmarkierten Anti-Bcl-x_L-Antikörpers im FACS bestimmt. Die abgebildeten Original-Grafiken zeigen die logarithmisch aufgetragenen Fluoreszenzintensitäten (FI) von Bcl-2 resp. Bcl-x_L, jeweils für G3139, das Kontroll-ODN G3139F1 und die Mediumkontrolle übereinanderprojiziert.

Dieses Ergebnis warf die Frage auf, ob die G3139-abhängige, leichte Erhöhung der Bcl-x_L-Expression nur ein unspezifisches Epiphänomen der spezifischen Bcl-2-Hemmung war oder als Ausdruck eines eigenständigen, nicht-antisense-vermittelten Effekts von G3139 auf Bcl-x_L gedeutet werden konnte. Für die zweite Option sprach die Tatsache, dass G3139 zwei CpG-Motive enthält, die für ihre direkten Effekte auf B-Lymphozyten bekannt sind (s. Einleitung). Deshalb wurden ergänzende Experimente mit GM697-Zellen durchgeführt, um einen eventuellen CpG-Effekt von G3139 aufzudecken.

Diese Experimente wurden ohne Lipofektin und mit höheren Konzentrationen an G3139 durchgeführt, da CpG-Effekte bei ausreichender Konzentration des ODN über die membranständige Rezeptoren vermittelt werden und eine Transfektion mittels Carrier eher hinderlich ist, weil die ODN dadurch überwiegend in das Zytosol anstatt in das Endolysosom gelangen (s. Kapitel 1.5.3). Tatsächlich zeigten die Experimente, dass G3139 bei einer Konzentration von 4 μM in GM697-Zellen immunologische Aktivierungsmarker induzierte. Hierbei kam es 24 h nach Beginn der Inkubation mit G3139 zu einer zehnfachen Erhöhung von CD80 (= B7.1) und einer dreifachen Zunahme von CD86 (= B7.2), die im Laufe der nächsten zwei Tage wieder abnahmen (s. **Abb 3.15**). Beide Effekte ließen sich nicht durch das Antisense-Kontroll-Oligonukleotid ODN 2010 induzieren, das keine CpG-Motive enthält.

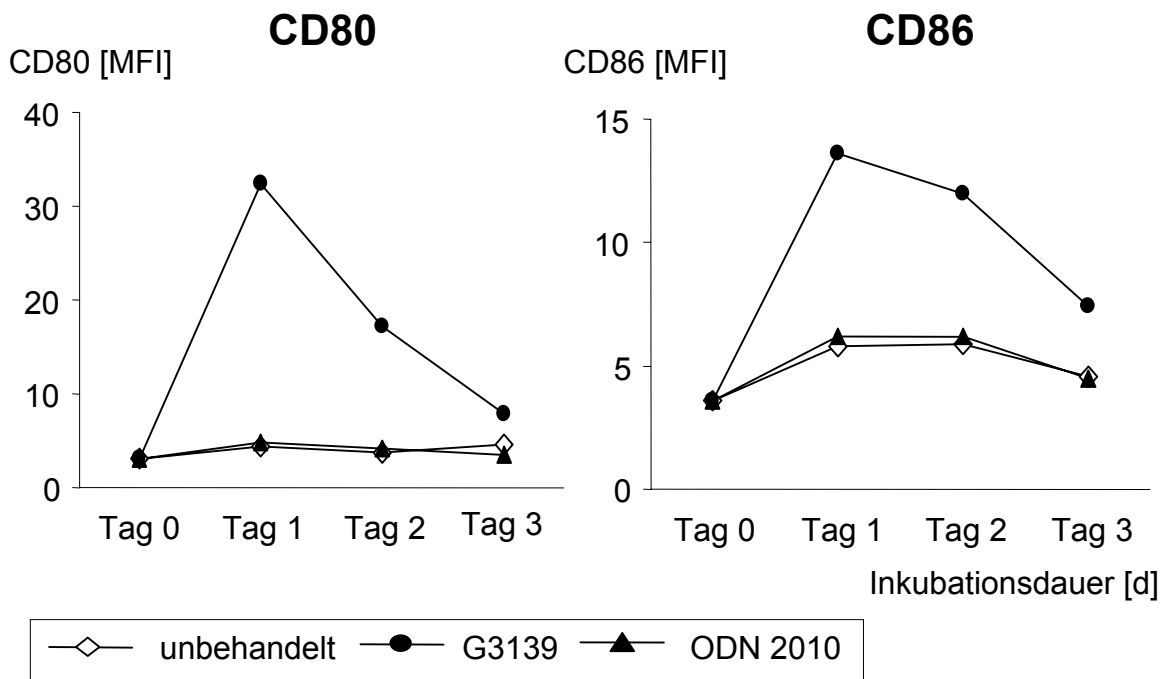


Abb. 3.15: Hochregulation der Aktivierungsmarker CD80 und CD86 durch Inkubation von GM697-Zellen mit G3139. GM697-Zellen wurden mit 4 μM G3139 (enthält CpG-Motive) oder dem Kontroll-ODN 2010 (enthält keine CpG-Motive) ohne Lipofektin-Komplexierung inkubiert. Nach 0, 24, 48 und 72 h (Tag 0, 1, 2, 3) wurde die Expression von CD80 (= B7.1) und CD86 (= B7.2) auf den Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Antikörpern gegen CD80 und CD86 gefärbt und im FACS analysiert. Auf der Ordinate sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) dargestellt.

3.2.3 Nicht-Antisense-vermittelte Effekte von G3139

Um den durch die oben vorgestellten Experimente begründeten Verdacht auf einen CpG-Effekt von G3139 zu erhärten, wurden Versuche mit Burkitt-Lymphom-Linien durchgeführt. Die Zelllinien Daudi JP und DG 75 haben den Vorteil, dass sie zwar Bcl-x_L exprimieren, nicht aber Bcl-2. Daher kann es in diesen Zelllinien keinen Bcl-2-Antisense-Effekt und somit auch keine sekundären Epiphänomene wie etwa eine kompensatorische Bcl-x_L-Erhöhung geben. Eine Veränderung der Bcl-x_L-Expression müsste damit unabhängig von den Antisense-Eigenschaften des ODN erklärt werden. Versuche mit Daudi JP- und DG 75-Zellen stellen also eine Negativkontrolle für den Antisense-Effekt selbst dar.

Daudi JP- bzw. DG 75-Zellen wurden mit 5 µM G3139 für 24 h inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur im Medium inkubiert wurden. Um eine Positivkontrolle für den CpG-Effekt zu haben, wurden Aliquots mit dem immunstimulatorischen ODN 2006 inkubiert, das als potentes, B-Zell-aktivierendes CpG-ODN im humanen System gilt [Hartmann, 2000 b]. Anschließend wurden die beiden kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, das Adhäsionsmolekül CD54 (= ICAM-1) sowie Bcl-x_L im FACS bestimmt (s. **Abb. 3.16**).

Das CpG-ODN 2006 führte bei Daudi JP-Zellen zu einer signifikanten Verdoppelung der Aktivierungsmarker CD54, CD80 und CD86 sowie einer geringeren, aber signifikanten Erhöhung von Bcl-x_L. Die Ergebnisse der Inkubation mit G3139 waren analog. Auch hier erreichte die Induktion der Aktivierungsmarker und des Bcl-x_L Signifikanzniveau. Anders verhielt es sich DG 75-Zellen. Hier zeigte zwar ODN 2006 wieder – ähnlich wie Daudi JP-Zellen – eine starke Induktion von CD54 und CD86 sowie eine mäßige Erhöhung von CD80 und Bcl-x_L. Jedoch entwickelte G3139 bei DG 75 einen geringeren Induktionseffekt als bei Daudi JP-Zellen. Verglichen mit ODN 2006 zeigte G3139 nahezu keinen Induktionseffekt auf CD54 und CD80. Die Marker CD86 und Bcl-x_L wurden zwar etwas induziert, aber deutlich geringer als durch ODN 2006.

Durch die Experimente mit GM697-Zellen und Burkitt-Lymphom-Linien wurde klar, dass G3139 zwar im verwendeten Experimentalmodell einen Antisense-Effekt haben kann, aber zusätzlich auch immunologische Aktivitätsmarker in verschiedenen malignen B-Zellen hochreguliert. Letztere Wirkung schien mit den in G3139 vorhandenen CpG-Motiven zusammenzuhängen, da CpG-negative Kontrollen den Effekt nicht zeigten, aber ein definiertes CpG-ODN ein analoges Wirkprofil aufwies. Die Untersuchungen wurden allerdings *in vitro* an

Zelllinien gemacht und haben deshalb einen artefiziellen Charakter. Um die Ergebnisse in einem ein realistischeren und der klinischen Praxis näheren Modell zu überprüfen, wurden Studien an primären humanen Lymphomzellen angeschlossen.

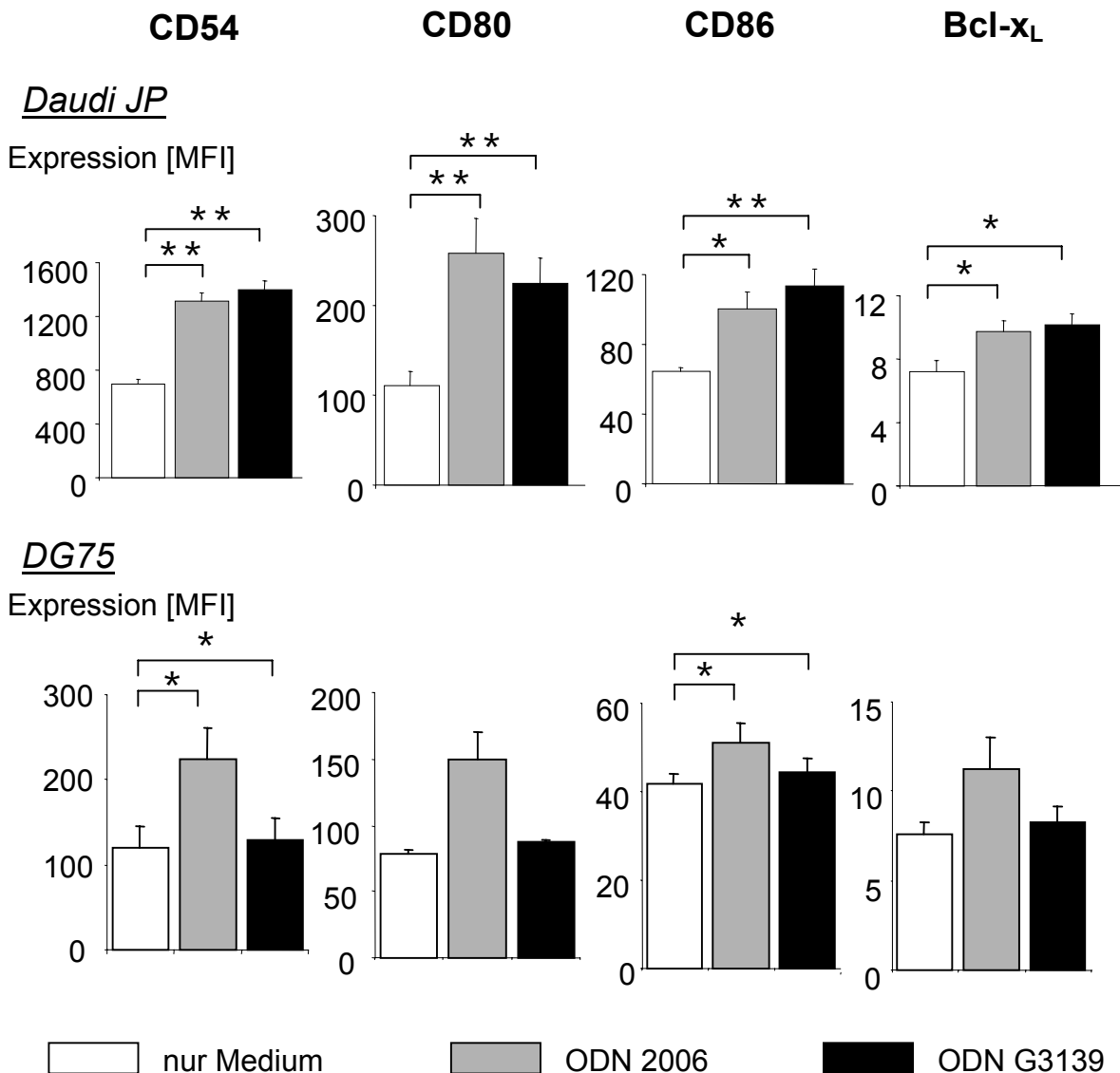


Abb. 3.16: Wirkungen der CpG-haltigen ODN 2006 und G3139 auf die Burkitt-Lymphomlinien Daudi JP und DG 75. In getrennten Experimenten wurden Daudi JP-Zellen (obere Reihe) bzw. DG 75-Zellen (untere Reihe) für 24 h mit drei Konditionen inkubiert: nur Medium, 5 μ M ODN 2006, 5 μ M ODN G3139. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und im FACS auf die Expression von CD54 (= ICAM-1), CD80 (= B7.1), CD86 (B7.2) und Bcl-x_L hin untersucht. Die Ordinaten geben die absoluten MFI-Werte an. Die Säulen stellen Mittelwerte + SEM aus n = 4 (Daudi JP) bzw. n = 3 (DG 75) unabhängigen Experimenten da. * p < 0,05, ** p < 0,01 Signifikanzniveaus gegenüber „nur Medium“.

3.3 Versuche mit primären B-CLL-Zellen

Primäre humane B-CLL-Zellen sind ein geeignetes Modell, um sowohl die Antisense-Effekte als auch die immunologischen, CpG-vermittelten Wirkungen von G3139 zu untersuchen (s. Kapitel 1.3). Die auf einer Überexpression von Bcl-2 basierende Apoptoseresistenz bietet einen idealen Ansatzpunkt für eine Reduktion der Bcl-2-Expression mittels Antisense-Technik. Pepper et al. veröffentlichten die ersten Experimente mit Antisense-ODN in humanen B-CLL-Zellen und berichteten über eine antisense-vermittelte Bcl-2-Reduktion sowie eine gesteigerte Apoptose mit dem Oligonukleotid 2009 [Pepper, 1999]. Gleichzeitig eignen sich B-CLL-Zellen auch zum Studium von CpG-Effekten, da B-Lymphozyten und ihre malignen Varianten durch CpG-ODN direkt stimulierbar sind.

3.3.1 Patientendaten

Von insgesamt 13 an B-CLL erkrankten Patienten, die in den 12 Monaten zuvor keine Chemotherapie erhalten hatten, wurde Blut entnommen (zu den Daten siehe **Tab. 3.1**). Unter den 13 Patienten waren zwei Frauen und elf Männer. Das mittlere Alter bei Blutentnahme betrug 67,9 Jahre ($\sigma = 11,5$ Jahre). Es wurden Patienten aus jedem Stadium der Erkrankung eingeschlossen (Binet A, B, C). Die durchschnittliche Leukozytenzahl im peripheren Blut betrug 51,4 G/l ($\sigma = 46,5$ G/l), die Mittelwerte der Serum-Thymidinkinase (s-Tk) sowie des Beta-2-Mikroglobulin (β_2M) waren 22,6 U/l ($\sigma = 26,8$ U/l) bzw. 3,6 mg/l ($\sigma = 1,2$ mg/l).

Aus dem peripheren Blut wurden die mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) isoliert. Die isolierten PBMC wurden für 48 h in verschiedenen Ansätzen mit unterschiedlichen Oligonukleotiden in einer Konzentration von 5 μ M inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mehrfach gewaschen und die CD19⁺ Zellen (= B-Lymphozyten) durchflusszytometrisch analysiert.

Patienten- Nummer	Geschlecht	Alter	Stadium (Binet)	Leukozyten (G/l)	s-TK (U/l)	β_2 M (mg/l)
B0802	m	56	C	76,0	5,3	4,1
B2802	m	53	C	108,3	92,0	3,6
B0603	m	68	A	34,8	16,0	2,0
B0903	m	71	A/B	93,6	45,9	4,2
B1003	f	71	A/B	22,0	27,2	5,9
B1703	m	59	A	12,5	2,6	3,0
B2303	m	67	A	83,2	4,0	2,2
B2703	f	76	n.e.	124,9	31,5	5,0
B1107b	m	86	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
B1107h	m	62	A	85,0	7,9	4,3
B2407	m	59	A	15,2	5,9	2,2
B0808b	m	63	A	46,4	10,2	3,3
B0808f	m	92	B	78,0	n.e.	n.e.
Mittelwert μ		67,9		51,4	22,6	3,6
Standardabweichung σ		11,5		46,5	26,8	1,2

Tabelle 3.1: Relevante persönliche und klinische Daten der 13 an B-CLL erkrankten Patienten, deren PBMC experimentell untersucht wurden. Die Daten wurden nach der Auswertung der Experimente den ärztlichen Akten der Klinik entnommen. Aus Datenschutzgründen sind die Patienten mit Nummern codiert. Das Alter entspricht dem Alter zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Das Binet-Stadium war von dem behandelnden Hämatologen am Tag der Blutentnahme klinisch diagnostiziert worden. Die Laborwerte stammen vom Tag der Blutentnahme. Die Leukozytenzahl wurde routinemäßig im peripheren Blut bestimmt. Serum-Thymidinkinase (s-Tk) und Beta-2-Mikroglobulin (β_2 M) wurden im Serum bestimmt. N.e. = Daten nicht eruierbar. Für das Alter und die Laborwerte sind arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

3.3.2 Zellidentifizierung und Oligonukleotid-Aufnahme

Um sicher zu stellen, dass die untersuchten PBMC überwiegend aus Leukämiezellen bestanden und nur in geringem Prozentsatz normale B-Lymphozyten enthielten, wurde einmalig nachgewiesen, dass in allen Ansätzen zwischen 85 und 95 Prozent aller PBMC CD5 und CD19 koexprimierten und damit als maligne B-CLL-Zellen identifiziert waren. Beispielhaft zeigt **Abbildung 3.17** eine Messung, bei der 87,1 Prozent aller vitalen Zellen CD5+/CD19+ und somit B-CLL-Zellen waren. Die 5,1 Prozent CD5+/CD19- Zellen repräsentieren T-Zellen.

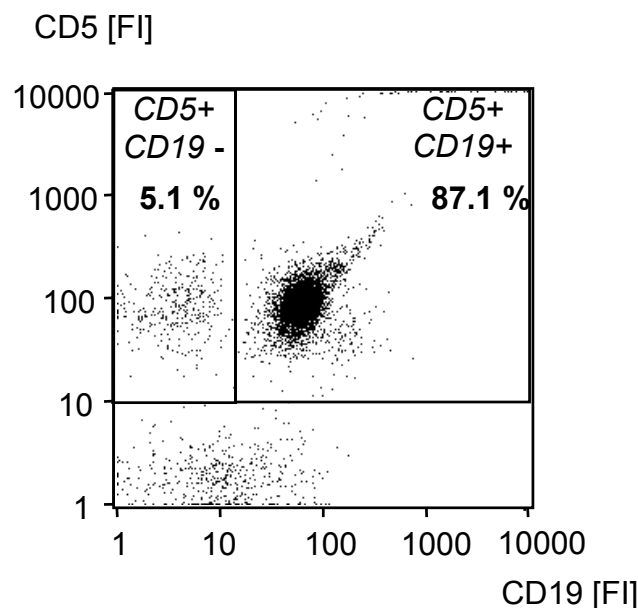


Abb. 3.17: Durchflusszytometrische Identifizierung der malignen B-CLL-Zellen an Hand der Koexpression von CD5 und CD19. Es wurde eine Doppelfärbung der beiden Oberflächenmarker CD5 und CD19 durchgeführt und im FACS ausgewertet. Dargestellt sind nur die vitalen Zellen, nachdem avitale Zellen auf Grund ihres morphologischen Bildes aus der Auswertung ausgeschlossen wurden.

In den ersten vier Patientenproben wurde mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten ODN überprüft, ob die B-CLL-Zellen – wie es von primären Zellen im Gegensatz zu permanenten Zelllinien erwartet werden kann – spontan (ohne Carrier) ODN aufnehmen. Wie **Abbildung 3.18** zeigt, war dies tatsächlich der Fall. Zwar war die Varianz beträchtlich, aber selbst die Probe mit der geringsten ODN-Aufnahme zeigte eine ausreichende Anreicherung mit ODN.

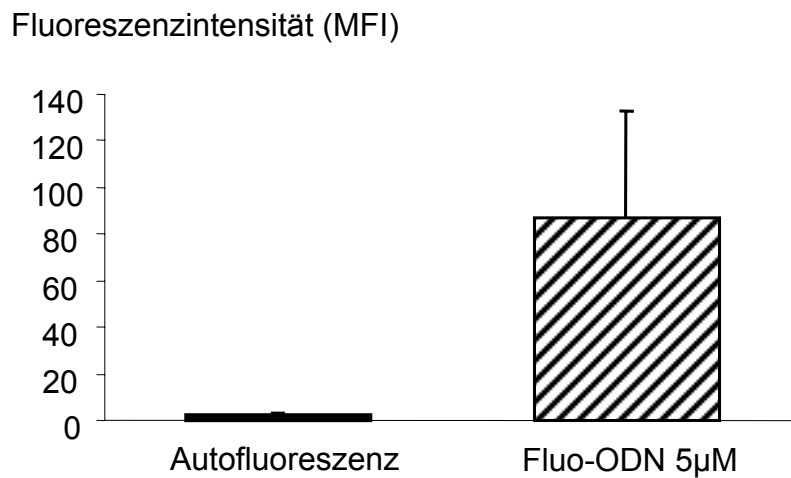


Abb. 3.18: Spontane Aufnahme von ODN in die primären PBMC der Patienten *in vitro*. Die gereinigten PBMC wurden für 48 h mit fluoreszenzmarkierten ODN (ODN-FITC) in einer Konzentration von 5 µM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und im FACS die Menge aufgenommener ODN über deren mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte + SEM von n = 4 Experimenten.

3.3.3 Endpunkt Immunstimulation

Um der Frage nachzugehen, ob und welche ODN die B-CLL-Zellen immunologisch zu aktivieren imstande sind, wurde die Expression geeigneter Aktivierungsmarker durchflusszytometrisch bestimmt. Für B-Lymphozyten wie auch für B-CLL-Zellen gelten CD40, CD80 und CD86 als immunologische Aktivierungsmarker [Jahrsdorfer, 2001]. **Abbildung 3.19** stellt die Ergebnisse der CD40- und CD80-Messungen dar. Der B-Zell-Aktivierungs- und Differenzierungsmarker CD40 wurde um das fünf- bis neunfache hochreguliert, wenn die Zellen für 48 h mit den CpG-haltigen ODN 2006 (vier CpG-Motive), G3139 (zwei CpG-Motive) und G3139F1 (ein CpG-Motiv) inkubiert wurden. Diese Erhöhung der Expression war für jedes der drei ODN signifikant gegenüber den beiden Kontrollansätzen mit unbehandelten Zellen bzw. mit dem Poly-C-Oligonukleotid 2017, das als Negativkontrolle für den CpG-Effekt verwendet wurde. Das Oligonukleotid 2009, das keine CpG-Motive enthält, aber ebenso wie G3139 eine Antisense-ODN gegen Bcl-2 ist, zeigte nur eine leichte, nicht signifikante CD40-Erhöhung.

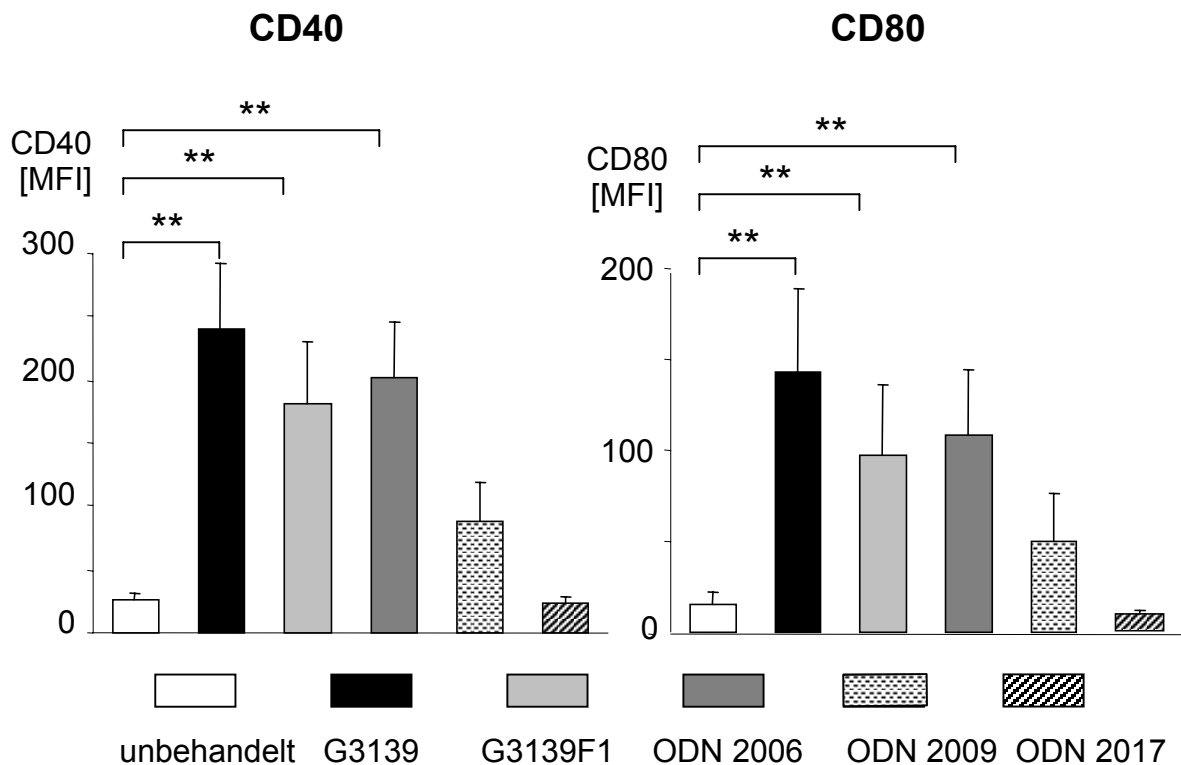


Abb. 3.19: Hochregulation der immunologischen Differenzierungs- und Aktivierungsmarker CD40 und CD80 auf der Oberfläche von B-CLL-Zellen in Reaktion auf bestimmte ODN. Die PBMC der Patienten wurden für 48 h mit verschiedenen ODN (G3139, G3139F1, 2006, 2009, 2017, Konzentration je 5 μ M) inkubiert und danach durchflusszytometrisch analysiert, wobei nur die CD19+ Zellen (B-Lymphozyten) in die Auswertung aufgenommen wurden. Die Grafik stellt die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) als Surrogatmarker für die Expression der beiden Proteine dar. Die Säulen geben Mittelwerte + SEM von n = 13 Versuchen an. ** = p < 0,01 gegenüber der Probe „unbehandelt“.

Während die Induktion von CD40 hauptsächlich eine Zelldifferenzierung ausdrückt, verweist eine Hochregulation des kostimulatorischen Moleküls CD80 (B7.1) auf eine funktionelle Aktivierung der B-Zellen. Die Expression von CD86 wurde ebenfalls um ein Vielfaches verstärkt, sofern die Zellen für 48 h mit den CpG-haltigen ODN 2006, G3139 und G3139F1 inkubiert wurden. Auch hier erwies sich diese Expressionssteigerung als hochsignifikant gegenüber den beiden Negativkontrollen. Das nicht CpG-haltige ODN 2009 führte wiederum nur zu einer schwachen, nicht signifikanten Erhöhung der CD80-Expression. Sowohl die CD40- als auch die CD80-Induktion wurde in der untersuchten Konzentration von 5 μ M am stärksten durch G3139 gefördert, gefolgt von ODN 2006 und G3139F1. Damit erweist sich G3139 in diesem Modell als das potenteste der drei CpG-haltigen ODN. Durch die Inkubation mit CpG-ODN veränderte sich die auch Morphologie der Zellen. **Abbildung 3.20** zeigt das

Originalbild einer FACS-Untersuchung. Die durch den *forward scatter* repräsentierte Zellgröße als auch die durch den *side scatter* dargestellte Granularität nahmen deutlich zu, allerdings so, dass auch die Varianz sich vergrößerte.

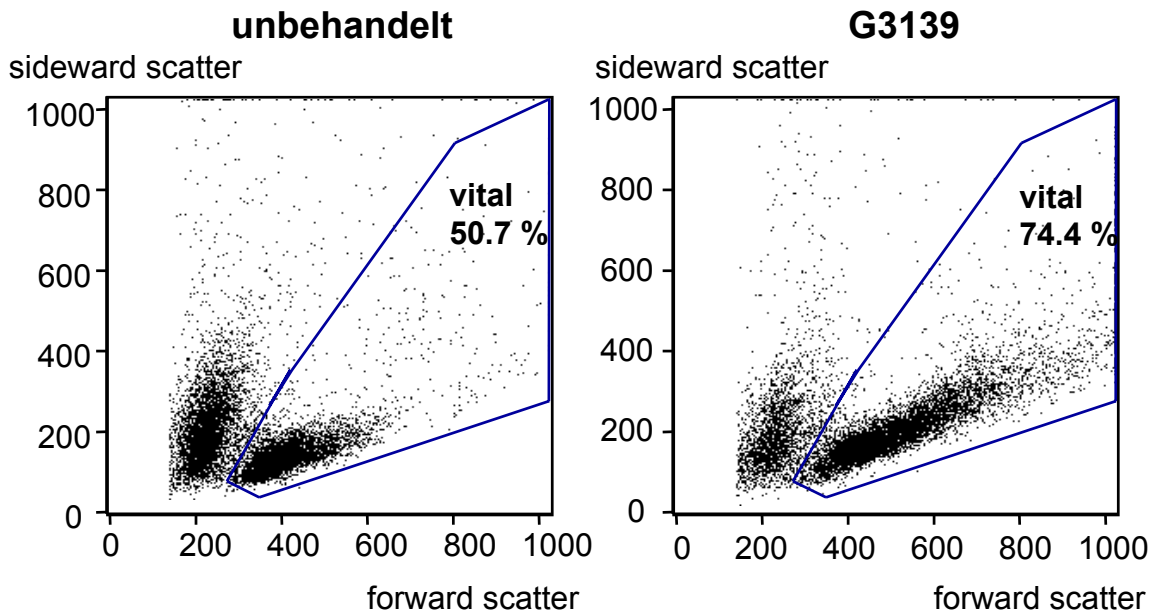


Abb. 3.20: Veränderung der zellulären Morphologie als Reaktion auf das Oligonukleotid G3139. Nach 48 h Inkubation der PBMC mit 5 μ M G3139 wurden die Zellen im FACS auf ihre Größe (*forward scatter*) und Granularität (*side scatter*) hin untersucht. Die im *dot plot* eingegrenzte Population (mit Prozentangabe gemessen an allen Zellen) stellt die nach morphologischen Gesichtspunkten vitalen Zellen dar. Die Grafik bezieht sich auf ein repräsentatives Experiment aus einer Serie.

Um die Frage zu beantworten, ob die Zunahme an Größe und Granularität einer immunologischen Aktivierung der Zellen gleichkommt, wurden die morphologischen Veränderungen mit den Aktivierungsmarkern korreliert (s. **Abb. 3.21**). Im Histogramm, welches die CD40-Expression aller PBMC nach G3139-Stimulation darstellt, sieht man eine große Varianz mit distinkten Populationen variabler Expression von CD40. Stellt man diejenigen Zellen mit einer starken CD40-Expression selektiv im morphologischen Bild dar, so erkennt man, dass diese Zellen den großen und granulären Zellen entsprechen. Berechnungen zeigten, dass die Zunahme der CD40-Expression überproportional zur Größenzunahme war. Dieselbe Situation konnte auch mit der Expression von CD80 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

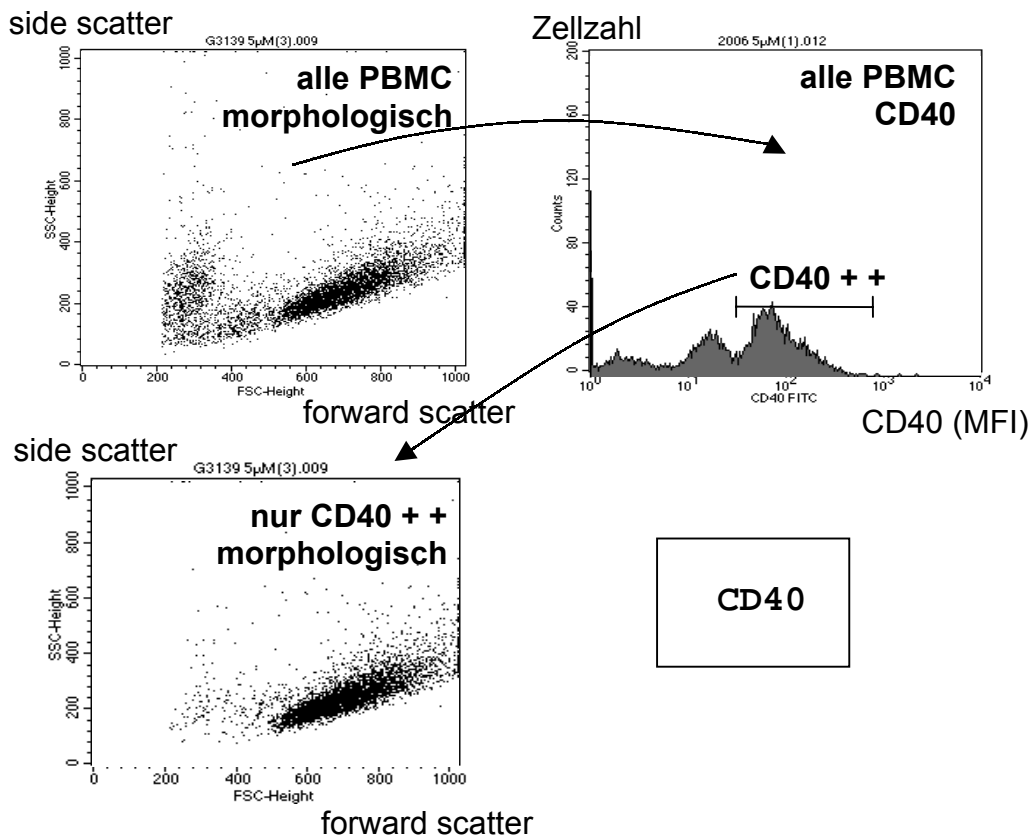


Abb. 3.21: Die durch G3139 aktivierten, CD40-reichen Zellen sind mit denjenigen Zellen identisch, deren Größe und Granularität zugenommen haben. Nach 48 h Inkubation der PBMC mit 5 μ M G3139 wurden die Zellen auf die bereits beschriebene Weise morphologisch und immunologisch analysiert. Dem morphologische Bild aller PBMC links oben entspricht das Histogramm der CD40-Expression rechts daneben. Die hierin eingegrenzte Subpopulation mit starker Expression (CD40++) ist dann noch einmal selektiv im morphologischen Bild links unten dargestellt. Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

In **Abbildung 3.22** sind die Ergebnisse einer Dosis-Wirkungs-Untersuchung für die einzelnen ODN wiedergegeben. Die CpG-Negativkontrollen ODN 2017 und ODN 2009 können CD86 auch bei hohen Konzentrationen nicht induzieren. ODN 2006 und G3139 führen beide zu einer dosisabhängigen Erhöhung von CD86. Allerdings zeigt ODN 2006 eine stärkere Maximalinduktion (V_{max}) sowie eine halbmaximale Wirkung bei geringerer Dosis (ED_{50}) als G3139. Ähnlich verhielt es sich mit anderen Aktivierungsmarkern (nicht gezeigt). Damit ist ODN 2006 in seiner Wirkung auf B-CLL-Zellen ein potenteres CpG-ODN als G3139.

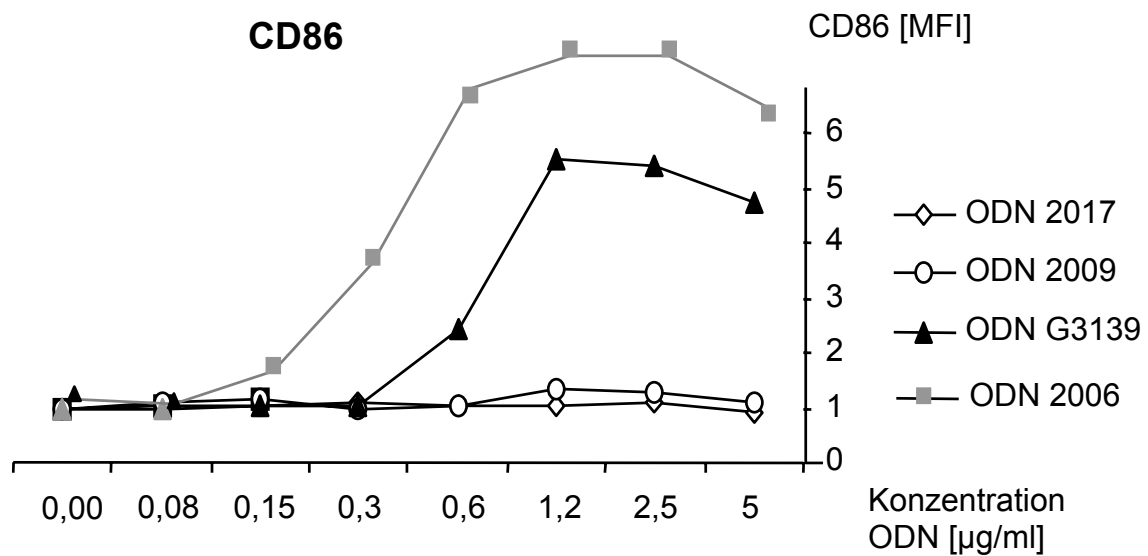


Abb. 3.22: Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen G3139 bzw. ODN 2006 und der Induktion von CD86 auf B-CLL-Zellen. PBMC wurden mit den in der Legende benannten ODN in ansteigenden Dosierungen für 48 h inkubiert. Anschließend wurde die Expression von CD86 im FACS bestimmt. Die Ordinate zeigt die Expression von CD86, die Abszisse die ODN-Konzentrationen.

3.3.4 Endpunkt Apoptose

Um die Wirkung der einzelnen ODN auf den Apoptosezustand der CLL-Zellen zu untersuchen, wurde neben einer Färbung mit AnnV und PI zur Darstellung apoptotischer Zellen auch die Expression der antiapoptotisch wirksamen Proteine Bcl-x_L und Bcl-2 gemessen (**Abb. 3.23**). Die Expression von Bcl-2 wurde von keinem ODN signifikant verändert, wenn der Durchschnitt aller Proben betrachtet wurde. Damit konnte weder für G3139 noch für 2009 ein Bcl-2-Antisense-Effekt auf Proteinebene nachgewiesen werden. Auch auf RNA-Ebene war kein Antisense-Effekt zu beobachten. Es kam vielmehr zu einer leichten Induktion der Bcl-2-mRNA durch G3139 und ODN 2006. Das Protein Bcl-x_L konnte durch die CpG-haltigen ODN 2006, G3139 und G3139F1 um etwa 50 Prozent signifikant erhöht werden. ODN 2009, welches keine CpG-Sequenzen enthält, veränderte die Bcl-x_L-Expression nicht. Auf RNA-Ebene stellte sich dieser Effekt noch drastischer dar: Hier führten G3139 und ODN 2006 zu einer vierfachen, G3139F1 zu einer dreifachen Vermehrung der messbaren mRNA. Die Kontrollen ODN 2009 und ODN 2017 veränderten auch den RNA-Level nicht wesentlich.

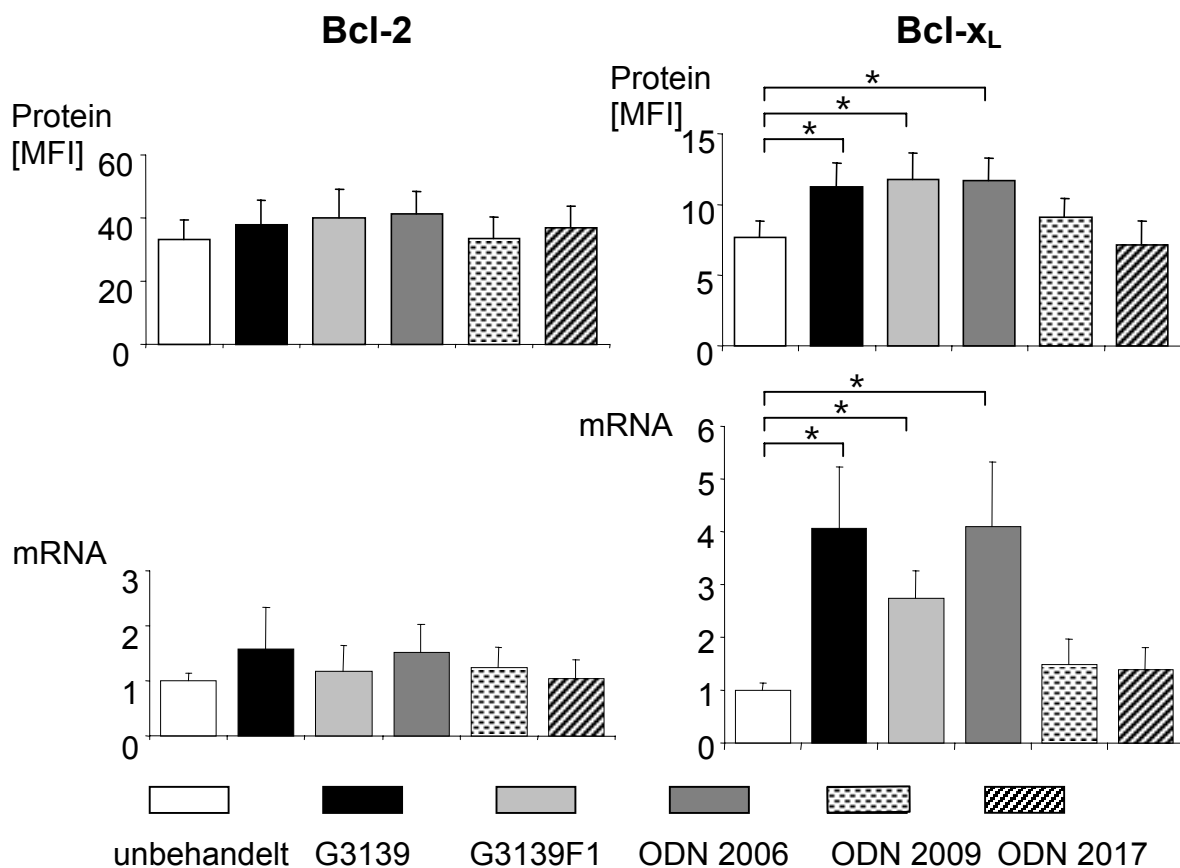


Abb. 3.23: Wirkungen CpG-haltiger ODN auf die Expression von Bcl-2 und Bcl-x_L. PBMC von Patienten mit B-CLL wurden für 48 h mit verschiedenen ODN (5 µM) inkubiert. Die Expression wurde auf Proteinebene durchflusszytometrisch und auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR bestimmt. Für die Proteinmessung gilt: Die Säulen repräsentieren Mittelwerte + SEM von n = 13 unabhängigen Experimenten (Ausnahmen: n = 11 für G3139F1 und ODN 2009, n = 9 für ODN 2017). Die mRNA-Bestimmung wurde in n = 6 dieser Patienten durchgeführt. * p < 0,05, ** p < 0,01 gegenüber der Probe „unbehandelt“.

Trägt man die Bcl-2-Werte auf Protein- und RNA-Ebene in einem Korrelationsdiagramm gegeneinander auf (s. **Abb 3.24**), so zeigt sich eine lineare Korrelation zwischen beiden Expressionsebenen (für ODN 2006 r = 0,91; für G3139 r = 0,64). Weiterhin sieht man, dass es einzelne Probanden gab, bei denen tatsächlich eine Bcl-2-Reduktion auf RNA- und Proteinebene zu registrieren war. Die Bcl-x_L-Werte zeigen keine lineare Korrelation zwischen Protein- und RNA-Ebene. Wie in Abbildung 3.23 bereits gesehen, zeichnete sich die Bcl-x_L-Induktion stärker auf der RNA- als auf der Proteinebene ab.

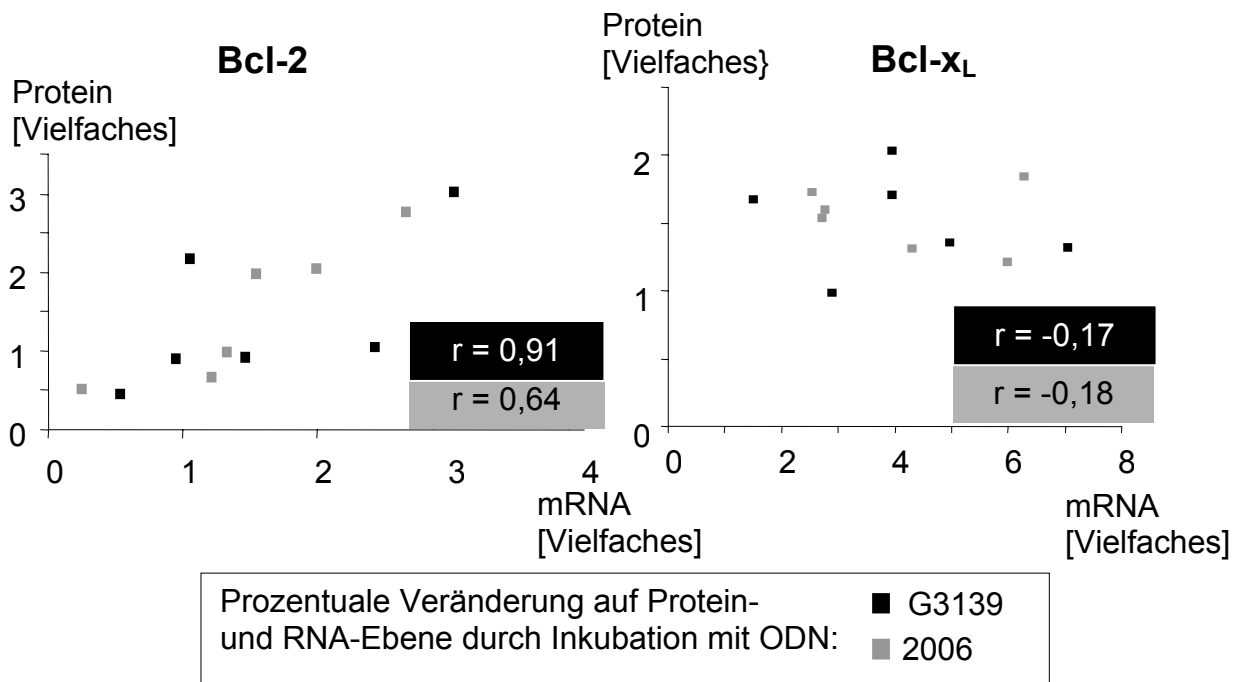


Abb. 3.24: Korrelation zwischen der RNA- und Proteinebene bezüglich der Effekte von G3139 und ODN 2006 auf die Expression von Bcl-2 und Bcl-x_L. Zum Versuchsprotokoll siehe Abbildung 3.26. Es wurde jeweils der gemessene RNA- und Proteinwert desselben Patienten miteinander in Beziehung gesetzt. Die Werte sind jeweils als Vielfaches der Mediumkontrolle dargestellt. Ergebnisse von sechs unabhängigen Experimente.

Die spontane Apoptoserate änderte sich durch kein ODN signifikant (s. **Abb. 3.25**). G3139 scheint zwar die Apoptoserate etwas zu erhöhen, jedoch ist dieser Effekt nicht statistisch signifikant.

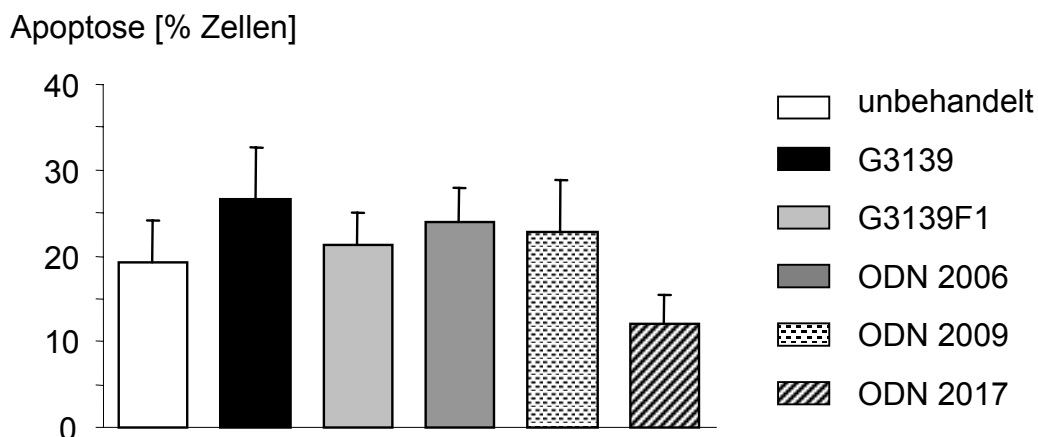


Abb. 3.25: Wirkungen CpG-haltiger ODN auf die spontane Apoptoserate von B-CLL-Zellen. Nach 48 h Inkubation der PBMC mit den in der Legende benannten ODN wurde die spontane Apoptoserate durch AnnV-PI-Färbung im FACS bestimmt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SEM von $n = 13$ Versuchen (Ausnahmen: $n = 11$ für G3139F1 und ODN 2009, $n = 9$ für ODN 2017).

Die B-CLL ist jedoch eine inhomogene Erkrankung mit biologisch wie klinisch unterschiedlichen Phänotypen, was sich etwa in dem Marker der proliferativen Aktivität und gleichzeitigen Prognoseindikator Serum-Thymidinkinase (s-Tk) widerspiegelt. Korreliert man die G3139-induzierte Änderung der Apoptoserate mit der s-Tk, so stellt sich das Bild so dar (s. **Abb. 3.26**): Für geringe s-Tk-Werte beobachtet man eine deutliche Apoptoseinduktion, für hohe s-Tk-Werte jedoch eine Apoptosehemmung. Der Effekt von G3139 auf die Apoptose ist also differenziell. Für 2006 gilt dasselbe (Daten nicht gezeigt).

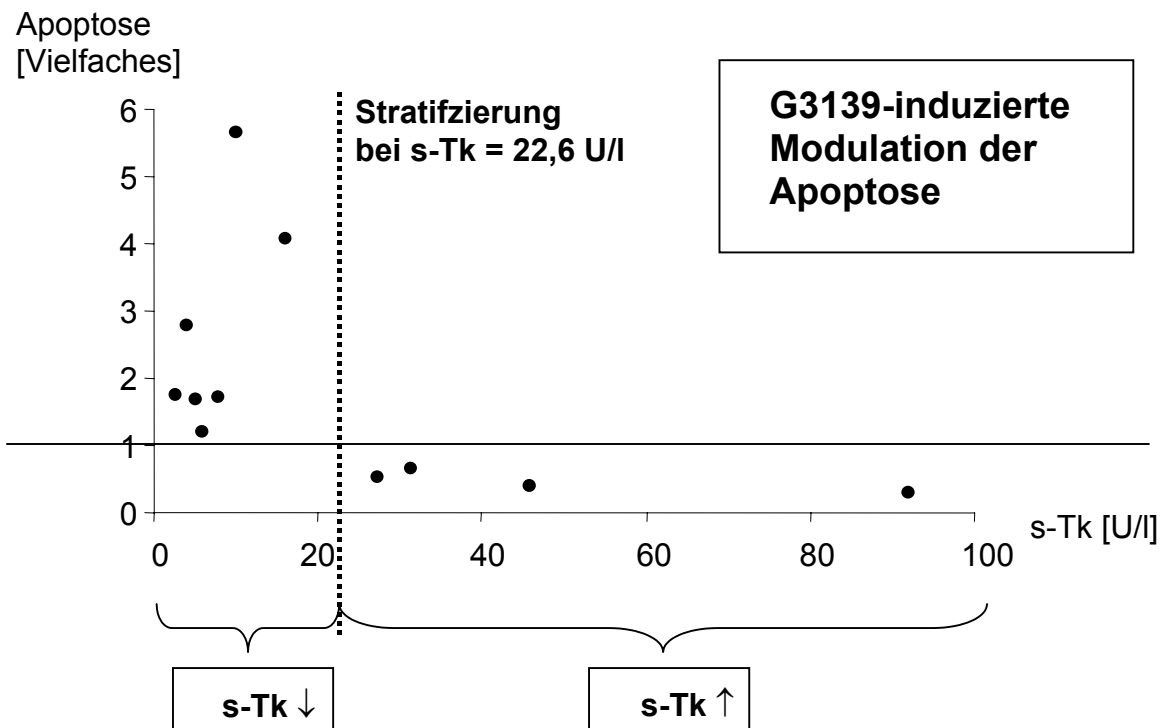


Abb. 3.26: G3139-induzierte Modulation der Apoptose maligner B-CLL-Zellen in Korrelation zur Thymidinkinase-Aktivität im Serum (s-Tk) des jeweiligen Patienten. Die Apoptoserate ist ausgedrückt als Vielfaches der spontanen Apoptoserate bei der Mediumkontrolle (AnnV/PI-Messung). Der s-Tk-Wert wurde den Patientenakten entnommen (s. Text zu Tab. 3.1). Die horizontale Linie trennt anti-apoptotische von pro-apoptotischen Effekten. Für weitere Analysen wurden die Werte am arithmetischen Mittel stratifiziert (gestrichelte, vertikale Linie). Ergebnisse 11 unabhängiger Experimente.

Stratifiziert man die Daten nach dem arithmetischen Mittel der s-Tk (22,6 U/ml), so fallen deutliche Unterschiede der beiden Subpopulationen auf (s. **Abb. 3.27**). Der Apoptosehemmung bei s-Tk > 22,6 U/l entspricht eine deutliche Bcl-2-Erhöhung durch G3139, G3139F1 und ODN 2006, also durch die CpG-haltigen ODN. Bei s-Tk ≤ 22,6 U/l bleibt der Bcl-2-Level nahezu unverändert und die spontane Apoptoserate nimmt zu. Bcl-x_L wird zwar in beiden Patientenkollektiven erhöht, jedoch stärker in jenem mit der s-Tk > 22,6 U/l.

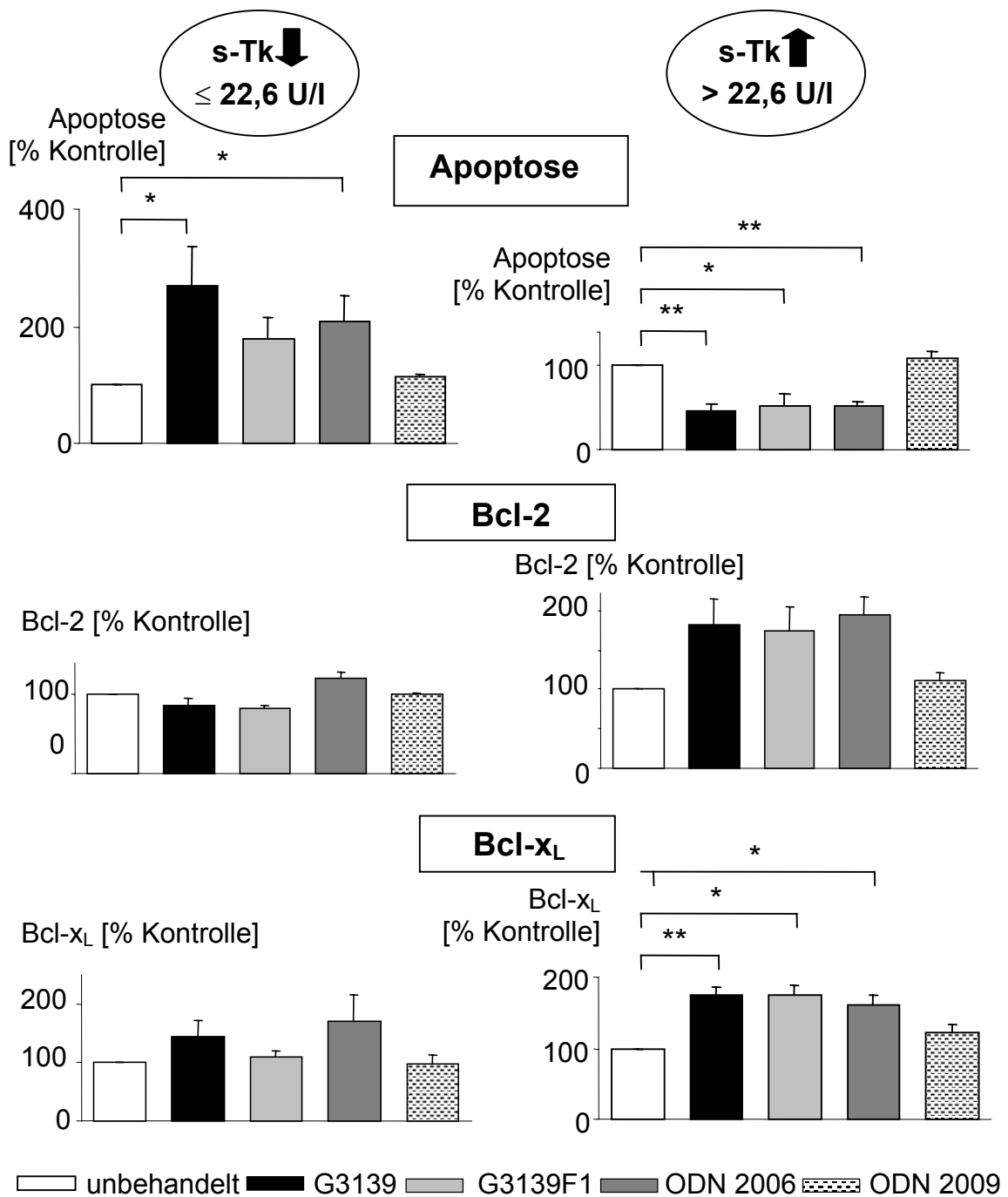


Abb. 3.27: CpG-ODN haben differenzielle Effekte auf die spontane Apoptoserate sowie die Expression von Bcl-2 und Bcl-x_L (nach Stratifizierung am arithmetischen Mittel der s-Tk). Die Werte sind als Prozent der Kontrollprobe „unbehandelt“ angegeben. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte + SEM von n = 11 unabhängigen Experimenten (Ausnahmen: n = 9 für G3139F1 und ODN 2009). Dabei fallen n = 7 (n = 5 für G3139F1 und ODN 2009) in die niedrige s-TK-Gruppe und n = 4 in die hohe s-TK-Gruppe. * p < 0,05, ** p < 0,01.

Der differenzielle Effekt von G3139 auf die Apoptose ist in **Abbildung 3.28** noch einmal gegen die s-Tk sowie gegen β_2 M, einen weiteren prognostischen Indikator, aufgetragen. In beiden Fällen deutet sich eine inverse Korrelation zwischen prognostischem Marker und G3139-abhängiger Apoptoseinduktion an, die jedoch eher exponentiell als linear erscheint. Analog sieht die Situation mit ODN 2006 aus. Niedrige Serumwerte für die Thymidinkinase oder das β_2 -Mikroglobulin scheinen mit der Wirkung von CpG-ODN zu korrelieren, die spontane Apoptose zu fördern, und *vice versa*.

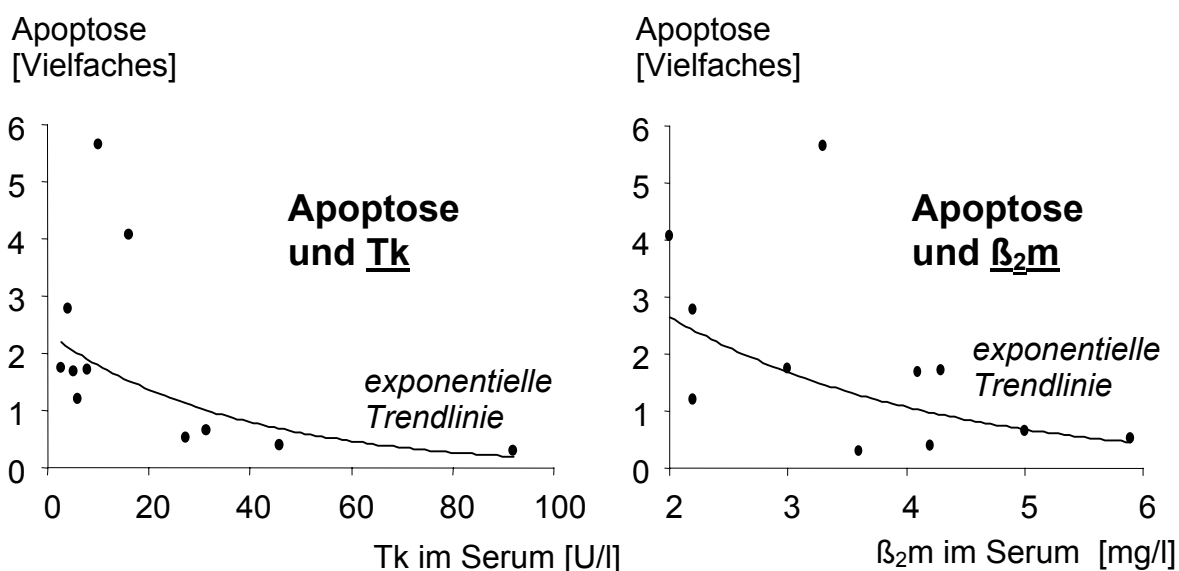


Abb. 3.28: Korrelation der G3139-abhängigen Modulation der Apoptose maligner B-CLL-Zellen mit den beiden klinischen Verlaufs- und Prognoseparametern Serum-Thymidinkinase (s-Tk) und Beta-2-Mikroglobulin (β_2 M.) Versuchsprotokoll wie oben beschrieben. Die spontane Apoptoserate ist dargestellt als Vielfaches der Mediumkontrolle. Zur optischen Hilfe ist eine exponentielle Trendlinie eingezeichnet. N = 11 Patienten.

Offensichtlich wirken die beiden ODN G3139 und 2006 in diesem Modell sehr ähnlich. Deshalb wurde das Verhältnis zwischen G3139 und 2006 rechnerisch genauer analysiert. Vergleicht man die Effekte der beiden ODN mittels Regressionsanalyse (s. **Abb. 3.29**), so finden sich für sämtliche untersuchten Wirkungen auf B-CLL-Zelleneine deutliche Korrelationen der beiden Wirkstoffe (für CD40, $r = 0,94$; für Bcl-2, $r = 0,93$; für Bcl- x_L , $r = 0,90$; für CD80, $r = 0,86$; für die Apoptose, $r = 0,71$).

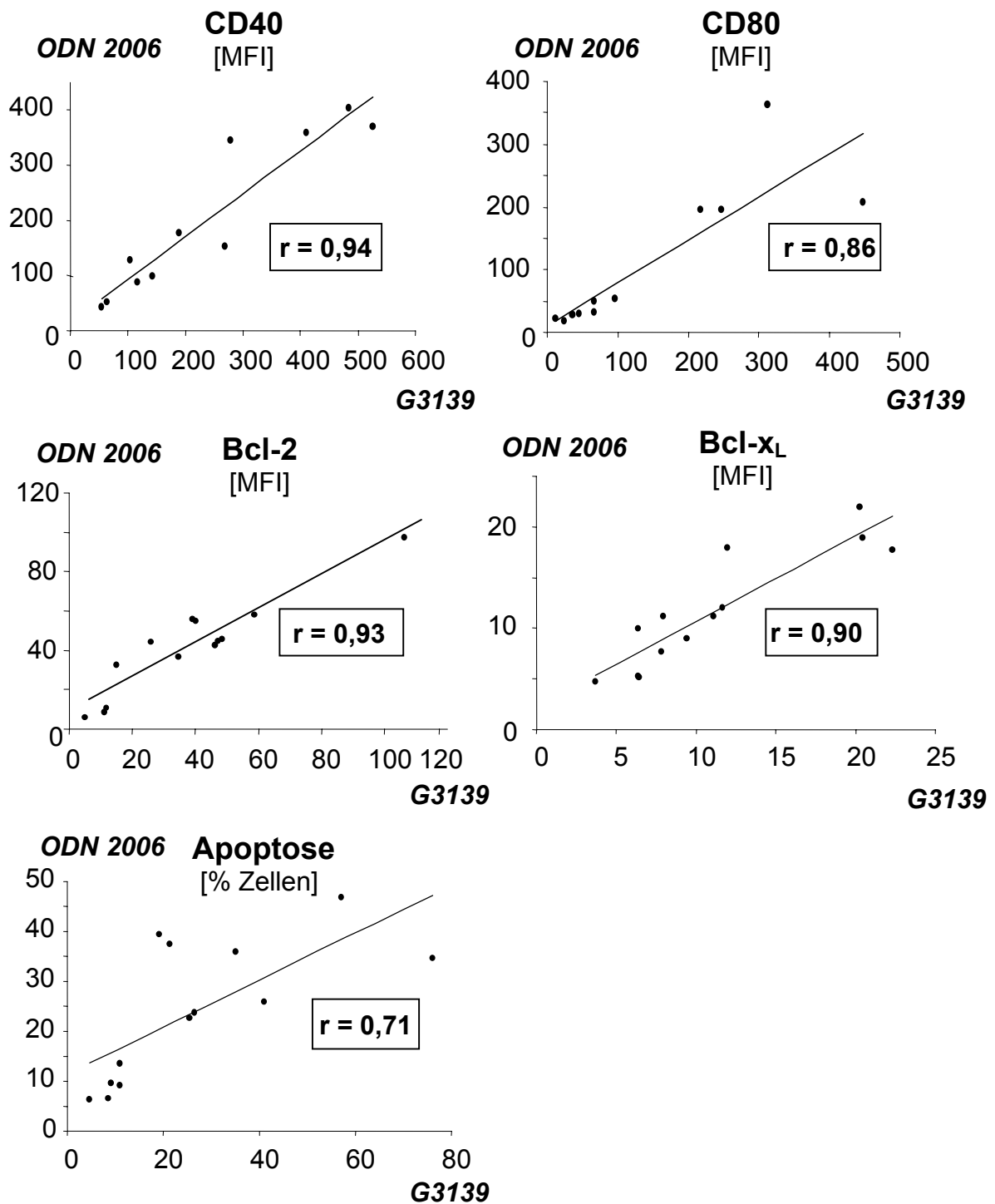


Abb. 3.29: Die Effekte von ODN 2006 und G3139 auf CD40, CD80, Bcl-2, Bcl-x_L und die spontane Apoptoserate korrelieren zwischen den beiden ODN. Die Werte sind für die Oberflächenmarker und Apoptoseproteine als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) dargestellt, für die Apoptoserate als Prozentsatz aller Zellen. Die Ordinate zeigt die ODN 2006-induzierte und die Abszisse die G3139-induzierte Modulation des jeweiligen Parameters an. Eine lineare Trendlinie sowie der Wert des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten wurden eingezeichnet. Ergebnisse von 13 Experimenten.

3.3.5 Kombination von G3139 mit Mitoxantron

Eine abschließende Untersuchung sollte die Frage beantworten, ob die Apoptose-fördernde Wirkung von G3139 durch das Zytostatikum Mitoxantron noch verstärkt werden kann. Dazu wurden die PBMC von drei Patienten (aus dem in Tab. 3.1 spezifizierten Kollektiv) mit $s\text{-Tk} \leq 22,6$ U/l gemeinsam mit Mitoxantron kokultiviert. Wie **Abbildung 3.30** darstellt, ruft das Zytostatikum Mitoxantron als Monotherapie eine deutliche Apoptose hervor und ist G3139 darin signifikant überlegen. Die Kombination beider Agentien weist keinen Synergieeffekt auf, es kommt sogar zu einer geringeren Apoptoseinduktion als durch Mitoxantron alleine. Dennoch ist die Kombination signifikant besser als die G3139-Monotherapie ($p = 0,028$).

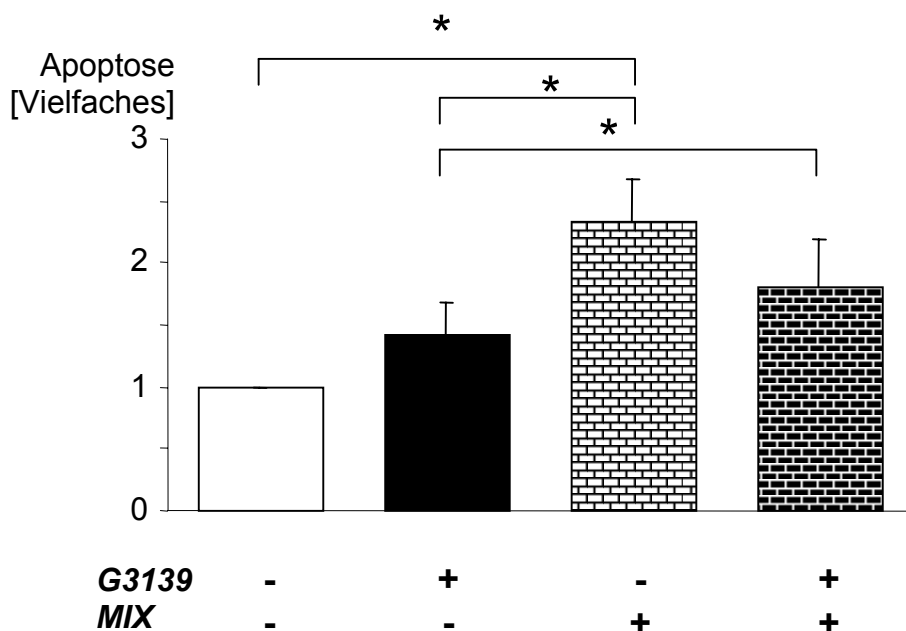


Abb. 3.30: Kombination von G3139 und Mitoxantron bei B-CLL-Subpopulationen mit niedriger Thymidinkinase. PBMC von drei an B-CLL erkrankten Patienten, die $s\text{-Tk}$ -Werte $< 22,6$ U/l aufwiesen, wurden isoliert und für 48 h mit $30 \mu\text{g/ml}$ ODN G3139 allein, $0,5 \mu\text{g/ml}$ Mitoxantron (MIX) allein oder einer Kombination beider Substanzen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im FACS auf Apoptose untersucht, wobei die Fraktion der AnnV- und PI-positiven Zellen als apoptotisch betrachtet wurde. Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten. Asterisken (*) zeigen signifikante Unterschiede zwischen MIX und Medium ($p = 0,020$), MIX und G3139 ($p = 0,049$) sowie der Kombination MIX + G3139 gegenüber G3139 allein ($p = 0,028$).

4. Diskussion

4.1 Übersicht über die experimentellen Befunde

Zunächst wurde an permanenten Zelllinien ein experimentelles Modell zum Studium der Apoptose in malignen B-Lymphozyten etabliert. In der leukämischen Zelllinie GM697 wurde Etoposid als Apoptose auslösendes Agens hinsichtlich Kinetik und Dosis-Wirkungs-Beziehung charakterisiert. Es wurde der differenzielle Nachweis von frühen und späten Apoptosestadien mit Annexin V und Propidiumiodid gezeigt. Ein frühes Stadium der Apoptose konnte ebenfalls durch die durchflusszytometrische Messung der aktiven Form von Caspase-3 identifiziert werden. Diese Nachweismethoden wurden durch die Demonstration der charakteristischen DNA-Fragmentierung (*apoptotic DNA ladder*) validiert.

Ebenfalls in GM697 wurde die Wirkung von Antisense-ODN gegen Bcl-2 untersucht. Experimente zur Aufnahme der ODN belegten, dass das kationische Lipidgemisch Lipofektin in diesem Modell einen geeigneten Carrier darstellt. Die optimale ODN-Aufnahme in die Zelle erfolgte bei einem Ladungsverhältnis von 1,2 : 1 (positive zu negative Ladungsäquivalente). Die Toxizität des Lipofektin-ODN-Gemisches war minimal. Der Carrier ExGen 500 (= lineares Polyethylenimin) zeigte gegenüber Lipofektin eine deutlich geringere Effektivität und inakzeptabel hohe Toxizität. Die Antisense-Experimente wurden anschließend nach dem zuvor etablierten Modell mit Hilfe von Lipofektin durchgeführt. Mit dem Bcl-2-Antisense-ODN G3139 konnte nach 12 h eine signifikante Reduktion des Bcl-2-Proteins um 50 Prozent gegenüber der Mediumkontrolle erreicht werden. Mit dem alternativen Antisense-Oligonukleotid ODN 2009 wurde nur eine Reduktion um 20 Prozent erzielt. Entsprechend wurde durch G3139 eine zehnfache und durch ODN 2009 eine dreifache Erhöhung der spontanen Apoptoserate beobachtet. Ohne Lipofektin zeigten sich keine Änderungen in der Bcl-2-Expression und Apoptoserate.

G3139 führte auch zu einer Hochregulation von Bcl-x_L, was mit dem Antisense-Effekt alleine nicht zu erklären war. Auf der Suche nach nicht-Antisense-vermittelten Effekten von G3139, das zwei CpG-Motive enthält, konnte gezeigt werden, dass G3139 in GM697-Zellen die kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) induziert. Um zu zeigen, dass die Induktion von Bcl-x_L, CD80 und CD86 nicht nur Epiphänomene eines Bcl-2-Antisense-Effekts sind, wurde die Wirkung von G3139 auf die Burkitt-Lymphom-Linie „Daudi JP“ untersucht, welche zwar Bcl-x_L und die Oberflächenmarker exprimiert, aber kein Bcl-2. In diesem Modell zeigte G3139 eine Hochregulation der Aktivierungsmarker

CD80, CD86 und CD54 (ICAM-1) sowie eine Induktion von Bcl-x_L. Ein identisches Wirkprofil wies das als potentes humanes CpG-Oligonukleotid etablierte ODN 2006 auf. Diese Ergebnisse stützten die Theorie, dass G3139 zusätzlich zu seinem Bcl-2-Antisense-Effekt ein immunstimulatorisch aktives CpG-ODN darstellt.

In einem kliniknäheren Modell wurde die Wirkung von G3139 auf primäre Zellen der chronischen lymphatischen Leukämie von B-Zelltyp untersucht. Bei dieser Erkrankung wird G3139 bereits in klinischen Studien evaluiert. Auf Einzelzellebene konnte eine hinreichend effektive Spontanaufnahme der Oligonukleotide gezeigt werden. Durch G3139 kam es zu einer Zunahme von Größe und Granularität der malignen Zellen, was mit einer immunologischen Aktivierung korrelierte, erkennbar an der Induktion von CD40 und CD80. Die Bcl-x_L-Expression wurde durch G3139 sowie ODN 2006 signifikant induziert, was auf RNA-Ebene noch deutlicher als auf Proteinebene zu erkennen war (Induktion um das Vierfache). Die Bcl-2-Expression blieb ebenso wie die Rate der spontanen Apoptose im Durchschnitt bei allen 13 Probanden unverändert. Die Ergebnisse von Pepper et al. 1999 konnten also nicht reproduziert werden.

Eine genauere Auswertung unter Berücksichtigung der einzelnen Patientendaten erbrachte weitere Erkenntnisse: Eine Stratifizierung der Probanden nach dem prognostisch und biologisch relevanten Marker proliferativer Aktivität, der Serum-Thymidinkinase (s-Tk), enthüllte einen differenziellen Effekt der CpG-Oligonukleotide. Bei Probanden mit einer hohen s-Tk (> 22,6 U/l) führten sowohl G3139 als auch ODN 2006 zu einer deutlichen Erhöhung des Bcl-2 und Hemmung der spontanen Apoptose. Bei Probanden mit einer niedrigen s-Tk (≤ 22,6 U/l) kam es durch diese Oligonukleotide sogar zu einer Reduktion des Bcl-2 und einer entsprechenden Steigerung der spontanen Apoptoserate. Die differenzielle Regulation von Bcl-2 sowie die generelle Induktion von Bcl-x_L konnte auf RNA-Ebene bestätigt werden.

Die beiden CpG-haltigen ODN G3139 und ODN 2006 zeigten in der Pearson-schen Analyse eine hohe Korrelation zueinander bezüglich sämtlicher Wirkungen (CD40, CD80, Bcl-2, Bcl-x_L, Apoptose). Die Kombination von G3139 mit dem bei der B-CLL wirksamen Zytostatikum Mitoxantron in Patienten mit niedriger s-TK (< 22,6 U/l) führte noch zu einer Verstärkung der Apoptoseinduktion verglichen mit G3139 alleine. Damit sind die in Kapitel 1.1 gestellten Fragen beantwortet, aber gleichzeitig umso mehr neue Fragen aufgetaucht, die im folgenden teilweise diskutiert werden sollen.

4.2 Diskussion der Methoden

4.2.1 Messung der Apoptose

Eine etablierte Methode der Apoptosemessung weist Veränderungen in der Komposition der Zellmembran nach. In vitalen Zellen besteht eine charakteristische Asymmetrie im Aufbau der Zellmembran: Phosphatidylserine finden sich ausschließlich in der inneren Membranschicht, während die anderen Phospholipide, insbesondere Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin, in beiden Membranschichten vorkommen. Charakteristischerweise werden jedoch die Phosphatidylserine früh im Verlauf der Apoptose in der äußeren Membranschicht nachweisbar, wobei es dafür irrelevant ist, durch welchen Stimulus die Apoptose induziert wird [Martin, 1995]. Diese Exposition der Phosphatidylserine in der äußeren Membranschicht dient Makrophagen dazu, apoptotische Zellen zu erkennen und zu phagozytieren [Fadok, 1993].

Seit kurzem ist bekannt, dass ein spezifisches Enzym die Asymmetrie der Phospholipide in der eukaryonten Zellmembran aufrecht erhält. Die Mg^{2+} -ATPase Aminophospholipid-Translokase bewegt ATP-abhängig die beiden Aminophospholipide Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin von der äußeren in die innere Membranschicht [Bever, 1998]. Wenn sich die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration im Rahmen der Apoptose erhöht, wird dieses Enzym gehemmt und simultan ein anderes Enzym aktiviert: die sogenannte Phospholipid-Scramblase, die unspezifisch die bidirektionale Migration aller Phospholipide fördert [Zhou, 1997]. Auch die apoptotisch relevante Proteinkinase $C\delta$ erhöht die Aktivität der Scramblase [Frasch, 2000]. Dies erklärt möglicherweise, weshalb im Lauf der Apoptose Phosphatidylserine in der äußeren Schicht der Zellmembran nachweisbar werden.

Das Protein Annexin V (AnnV, 35.8 kDa) bindet spezifisch und hochaffin an Phosphatidylserin, nicht aber an die anderen Phospholipide [Martin, 1995]. AnnV gehört zur Familie der Annexine, die Ca^{2+} -abhängig Phospholipide binden. Sie haben eine physiologische Rolle im Ablauf der primären Hämostase und Thrombozytenaktivierung [Tzima, 1999]. Durch fluoreszenzmarkiertes AnnV können exponierte Phosphatidylserine nachgewiesen und damit apoptotische Zellen identifiziert werden.

Während es bei der Apoptose zu einer spezifischen Translokation der Phosphatidylserine an die intakt bleibende Membranoberfläche kommt, wird bei der

Nekrose die Membranintegrität frühzeitig zerstört, wodurch kurzzeitig auch wenige Phosphatidylserine exponiert werden können. Daher hätte eine reine AnnV-Färbung nur begrenzte Spezifität zum Nachweis der Apoptose. Zwischen beiden Phänomenen lässt sich jedoch unterscheiden, sobald man die AnnV-Färbung mit einem zweiten Farbstoff kombiniert, der von intakten Membranen ausgeschlossen wird, etwa Propidiumiodid (PI). Diese Doppelfärbung wurde in der vorliegenden Arbeit überwiegend angewandt, um apoptotische Zellen zu identifizieren und sowohl von vitalen als auch nekrotischen zu unterscheiden.

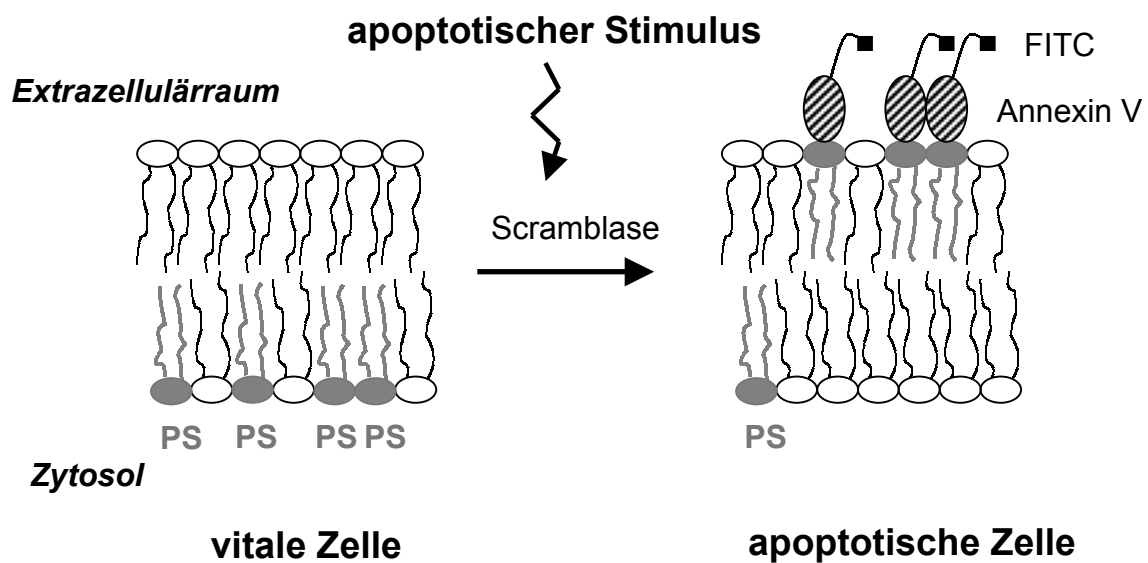


Abb. 4.1: Wirkprinzip von AnnV-FITC zum durchflusszytometrischen Nachweis von Apoptose. Die vitale Zelle zeigt eine ausschließliche Lokalisation der Phosphatidylserine (PS) in der inneren Schicht des Plasmalemm. In einem frühen Stadium der Apoptose wird die Phospholipid-Scramblase Calcium-abhängig aktiviert und induziert eine Umverteilung der PS in die äußere Membranschicht. FITC-gekoppeltes AnnV kann dann spezifisch an PS binden und somit frühapoptotische Zellen anzeigen. Die Abbildung schematisiert die realen Verhältnisse. Die tatsächliche Stöchiometrie der AnnV-PS-Bindung beträgt 4:1-8:1 [Pigault, 1994]. AnnV = Annexin V; FITC = Fluoresceinisothiocyanat.

Während die Verwendung von AnnV und PI eine etablierte Nachweismethode für den apoptotischen Zelluntergang darstellt, ist die Bestimmung der aktiven Caspase-3 eine relativ junge Methode, die jedoch ein ebenso frühes oder noch früheres Stadium der Apoptose nachzuweisen verspricht. Die aktive Form der Caspase-3 (Synonyme: CPP32, Yama, Apopain) spielt eine zentrale Rolle im apoptotischen Prozess, konnte jedoch bisher nur unzureichend durch Antikörper von verwandten Caspasen getrennt werden. Seit kurzem gibt es einen polyklo-

nen Antikörper, der spezifisch die aktive Form der humanen Caspase-3 erkennt (PharMingen Becton Dickinson, Heidelberg, BRD). Der inaktive Vorläufer, Procaspase-3, ist ein 32 kD großes Protein, das bei Aktivierung in das aktive Heterodimer, bestehend aus einem 12 kD und einem 17 kD großen Fragment, zerfällt. Der Antikörper bindet an ein konformationelles Epitop dieses Heterodimers und zeigt dadurch eine 50-fache Präferenz für die aktive Form (PharMingen, Datenblatt zu Katalog-Nr. 67345X). Damit ist es möglich, die Aktivierung der Caspase-3 in einem frühen Stadium der Apoptose spezifisch nachzuweisen. Allerdings bestehen Zweifel, ob der Nachweis der Caspase-3 oder überhaupt irgendeiner Effektor-Caspase jede Form von Apoptose identifiziert. Jüngst wurden Hinweise darauf gefunden, dass es eine Caspase-unabhängige Apoptose geben könnte, die durch Bax eingeleitet und über die aus dem Mitochondrium freigesetzten Enzyme mediiert wird (AIF [Daugas, 2000], Endonuklease G [Parrish, 2001] etc.). Aus diesem Grund und weil die AnnV-PI-Messung eine bewährte Methode darstellt, wurde bei den B-CLL-Versuchen die AnnV/PI-Bestimmung der Caspase-3-Bestimmung vorgezogen.

Der Goldstandard einer qualitativen Apoptosenachweise bedient sich des charakteristischen Profils der internukleosomalen DNA-Fragmente, die in einem späten Stadium der Apoptose nach enzymatischem Verdau der Nucleinsäuren vorliegen. Eine Ca^{2+} - und Mg^{2+} -abhängige Endonuklease spaltet die nukleäre DNA in Fragmente, die 180-200 Basenpaare groß sind [Wyllie, 1980]. Seit kurzem wird diskutiert, ob in bestimmten Zelltypen auch pH-abhängige Endonucleasen diese Rolle übernehmen, die nicht durch eine intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung, sondern durch einen pH-Abfall aktiviert werden [Walker, 1997]. Die Länge von 180 bis 200 bp ist genau die Länge einer DNA, die um ein Histon gewickelt ist und durch dieses Histon vor der Endonuklease geschützt wird.

Diese internukleosomalen DNA-Fragmente können von anderen zellulären Kompartimenten isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid visualisiert werden. Dadurch ergibt sich die für apoptotische Zellen typische *DNA ladder*. Die native DNA von nicht-apoptotischen Zellen hat ein vielfach höheres Molekulargewicht und wandert deshalb in dem benutzten Elektrophorese-Gel nicht weit. Bei der Nekrose kommt es im Gegensatz zur Apoptose zu einer randomisierten DNA-Lyse, so dass nach der Elektrophorese keine distinkten Fragmente zu sehen sind, sondern nur ein kontinuierliches Übergangsbild. Die DNA-Fragmentierung wurde zur Validierung der anderen Nachweismethoden einmalig gezeigt, da sie als Routinemethode zu aufwändig ist.

4.2.2 Phosphorothioat-Modifikation der Oligonukleotide

Antisense-Oligonukleotide können industriell in großem Maßstab synthetisiert werden. Die einzelnen Nukleotide werden nach und nach an die entstehende Oligonukleotid-Kette angehängt. Die so entstandene Phosphordiesterkette würde allerdings extra- und intrazellulär von ubiquitär vorhandenen Nukleasen rasch abgebaut und dabei Nukleosid-Monophosphate freisetzen, die auf eine Zelle toxisch und mutagen wirken können [Stein, 1993]. Deshalb bedarf es einer chemischen Modifikation, um die ODN nukleaseresistent zu machen. In bisherigen Untersuchungen wurde meistens die Phosphorothioat-Modifikation verwendet, bei der das nicht-bindende Sauerstoffatom des Phosphats durch ein Schwefelatom substituiert ist, wie in **Abb. 4.2** gezeigt [Eckstein, 1985].

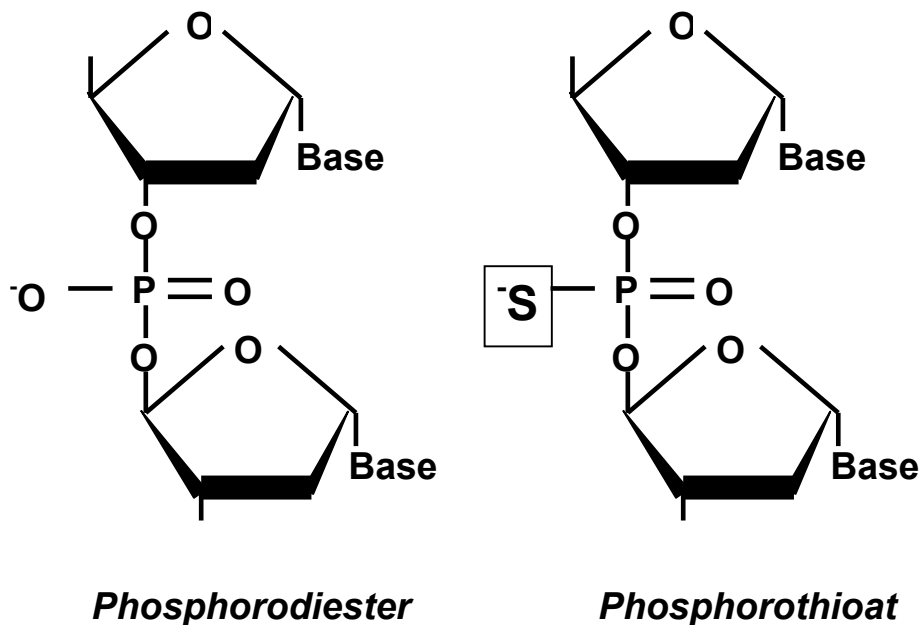


Abb. 4.2: Strukturformeln der Grundbausteine eines Phosphordiester- und eines Phosphorothioat-Oligonukleotids. Beide unterscheiden sich lediglich in der Substitution am Phosphoratom des die beiden Nukleoside verbindenden Phosphats: das Sauerstoffatom des Phosphordiesters ist durch das größere Schwefelatom ersetzt, wodurch ein Phosphorothioat entsteht, das gegenüber Nukleasen resistenter ist.

Phosphorothioate sind hydrophil, gut löslich und nukleaseresistent. Allerdings konnte neuerdings gezeigt werden, dass Phosphorothioat-ODN in der Regel als Razemat zweier Diastereomere hergestellt werden. Nun ist zwar das Sp-Diastereomer ziemlich nuklease-resistent. Das Rp-Diastereomer jedoch, wel-

ches den Vorteil hat, dass es die Affinität des ODN für die Ziel-RNA erhöht, ist nuklease-sensitiv [Lebedeva, 2001]. Deshalb stellt das Razemat einen brauchbaren Kompromiss zwischen Nukleaseresistenz und RNA-Affinität dar.

Phosphorothioate besitzen zudem den Vorteil, dass sie die RNase H optimal aktivieren [Cotter, 1999]. Aus diesen Gründen sind Phosphorothioate auch die am besten untersuchte Klasse von Oligonukleotiden und haben sich in zahlreichen Experimenten *in vitro* und *in vivo* bewährt. Ein Hauptproblem der Phosphorothioate sind jedoch die unspezifischen Effekte, welche nicht mit dem Antisense-Mechanismus allein erklärt werden können (s. hierzu Kap. 4.3.3 und [Warzocha, 1999]). Ein weiteres Problem der Phosphorothioate ist ihre nur unzureichende spontane Aufnahme durch permanente Zelllinien, weshalb besondere Techniken zur Transfektion der Zellen mit diesen ODN entwickelt wurden. Dieses soll im nächsten Kapitel eingehender dargestellt werden.

4.2.3 Transfektion im allgemeinen

Da die meisten Oligonukleotide (z.B. Phosphordiester und Phosphorothioate) mehrfach geladene Anionen sind, können sie nicht *per diffusionem* die Zellmembran passieren [Cotter, 1999]. Oligonukleotide werden entweder durch Rezeptor-abhängige Endozytose oder durch Pinozytose aufgenommen, obwohl die genauen Mechanismen nach wie vor ungeklärt sind [Wu-Pong, 2000]. Allerdings bedarf es dazu hoher Dosen von ODN, mindestens ein tausendfacher Überschuss im Vergleich zur Ziel-RNA [Cotter, 1999]. Dieser ineffiziente Prozess muss daher verbessert werden. Allerdings gilt dies mehr für die Situation bei permanenten Zelllinien *in vitro*. Primäre Zellen *in vitro* und Zellen *in vivo* zeigen eine bessere Spontanaufnahme negativ geladener ODN, abhängig von der Art und Herkunft der Zelle [Hartmann, 1998 b].

Aus der Gentherapie sind bereits länger sogenannte Carrier bekannt, die Oligonukleotide binden und durch geeignete physikochemische Eigenschaften in die Zelle „schleusen“ können. Effiziente Carrier müssen einer Vielzahl von Bedingungen genügen: 1) Sie müssen mit den ODN stabile, nicht-kovalente Bindungen eingehen; 2) Sie müssen im Komplex mit den ODN die Zellmembran permeieren und die ODN in die richtigen intrazellulären Kompartimente, v.a. in den Kern, einbringen; 3) Sie dürfen selbst nicht toxisch sein und keine biologische Eigenwirkung entfalten.

Die aktuell am besten untersuchten und als methodischer Standard geltenden Carrier sind kationische Lipide, die mit den anionischen Phosphorothioat-ODN elektrostatische Wechselwirkungen eingehen. Im Komplex mit diesen bilden sie überwiegend unilamelläre Vesikel aus, welche die Oligonukleotide einerseits vor extrazellulären Nukleasen schützen und andererseits effizient in die Zelle transfizieren können [Felgner, 1993; Lasic, 1995]. Kationische Lipide scheinen eine ideale intrazelluläre Verteilung der Oligonukleotide zu begünstigen [Hartmann, 1998 b]. Eine andere, in jüngster Zeit häufiger verwendete Klasse von Carriern sind Polymere wie z.B. Polystyrol oder Polyethylenimin (= ExGen [Godbey, 1999]).

Neben chemischen Methoden wie dem Gebrauch von Carriern gibt es noch physikalische Methoden der Transfektion. Die Elektroporation ist ein klassisches Verfahren [Weaver, 1993]. Neuere Untersuchungen konzentrieren sich auf die Verwendung von Ultraschall [Kim, 1996] oder Druckwellen [Mann, 1999]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Schockwellen eines Lithotripters, wie er zur klinischen Behandlung von Nierensteinen eingesetzt wird, ebenfalls die Transfektion von Zellen mit ODN fördert und der Elektroporation überlegen ist [Lauer, 1997]. Damit konnte eine Antisense-vermittelte Hemmung von TNF- α in mononukleären Zellen des peripheren Blutes um 62 Prozent erreicht werden [Tschoep, 2001].

Die Vorteile dieser Methode bestehen darin, dass sie gut reproduzierbar ist, auf verschiedenste Zellarten angewendet werden kann, und dass der Aufnahme-mechanismus unabhängig von der Länge, Sequenz und chemischen Modifikation des ODN ist. Auch können größere Mengen von ODN innerhalb weniger Minuten transfiziert werden, ohne dass die Toxizität limitierend wird. Allerdings ist die Schockwellen-Technik wie alle physikalischen Methoden zur DNA-Transfektion sehr aufwendig, kostspielig und zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht so umfassend untersucht, dass die kationischen Lipide als Standardmethode dadurch verdrängt werden könnten.

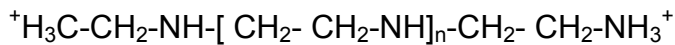
Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit Lipofektin als Carrier für Antisense-ODN gewählt. Als Alternativmethode wurde lineares Polyethylenimin (ExGen 500) untersucht und mit Lipofektin verglichen.

4.2.4 Transfektion mit Lipofektin und ExGen 500

Bei Lipofektin handelt es sich um ein isomolares Gemisch aus dem monovalenten kationischen Lipid DOTMA (N-(1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl)-n,n,n-Trimethylammoniumchlorid) und dem neutralen Phospholipid DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin). Das Lipidgemisch liegt in Form kleiner Vesikel mit dem Durchmesser von 30 nm vor [Felgner, 1993]. Bringt man Lipofektin mit negativ geladenen organischen Makromolekülen wie ODN zusammen, so bilden sich auf Grund elektrostatischer Attraktionskräfte elektrisch neutrale Komplexe, die durch ihre amphiphile Eigenschaft Zellmembranen ohne Interaktion mit Rezeptoren direkt passieren können. Auf Grund dieser Eigenschaften wurde Lipofektin bereits in den 80er Jahren zur Transfektion von DNA, RNA und ODN verwendet [Felgner, 1987]. Zahlreiche Experimente mit Antisense-ODN bedienten sich des Lipofektin zur Transfektion.

Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll zur Lipofektin-vermittelten Transfektion lehnt sich an die Literatur an [Felgner, 1993], wurde jedoch entsprechend jahrelangen Erfahrungen von Laborkollegen und eigenen Vorversuchen empirisch modifiziert. Bei der Transfektion mit Lipofektin muss darauf geachtet werden, dass die Zelldichte für die jeweilige Zelllinie optimal ist und das stöchiometrisch passende Gemisch von ODN und Lipofektin erreicht wird. Da 1 mg/ml Lipofektin 0,75 mM einfach positiv geladenes DOTMA und 0,75 mM neutrales DOTEP enthält, hat es damit auch 0,75 mM positive molare Ladungsäquivalente. Ein ODN von 18 Basen Länge enthält 17 einfach negativ geladene Phosphatgruppen und damit 17 negative molare Ladungsäquivalente. Vor diesem Hintergrund lässt sich je nach gewünschtem Ladungsverhältnis zwischen negativ geladenen ODN und positiv geladenem Lipofektin die erforderliche Menge Lipofektin berechnen: Um eine Endkonzentration von 1 μM eines 18-mer ODN zu neutralisieren (= 17 μM negative Valenzen), braucht man, falls ein molares Ladungsverhältnis von 1 : 1,2 (Anion : Kation) gewünscht ist, genau 20,4 μM positive Valenzen ($1,2 \times 17 = 20,4$). Das entspricht einer Lipofektinkonzentration von 27,2 $\mu\text{g/ml}$ ($20,4 : 0,75 = 27,2$). Für die Zelllinie GM697 erwies sich eine ODN-Konzentration von 1 μM und eine Lipofektin-Konzentration von 27,2 $\mu\text{g/ml}$ als optimal, also ein molares Ladungsverhältnis von 1 : 1,2. Interessanterweise erwiesen sich Materialien aus Polypropylen als ungeeignet zur Transfektion mit Lipofektin, da Lipofektin mit diesem Material vermutlich in Wechselwirkung trat und deswegen nicht optimal mit ODN komplexierte. Als brauchbare Materialien erwiesen sich Polystyrol und Glas. Dieses Phänomen ist in der Literatur bereits beschrieben [Felgner, 1993].

Bei ExGen 500 handelt es sich um lineare Polyethylenimin-Moleküle (= PEI, 22 kDa), die zur Klasse der kationischen Polymere gehören. Die vereinfachte Strukturformel eines PEI-Elements sieht folgendermaßen aus:



Mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops kann die Verpackung von DNA durch PEI visualisiert werden: PEI bindet DNA an sich, indem es sie zu hochorganisierten, 20-40 nm messenden Kondensaten verpackt, die aus parallelen Schleifen mit scharfer Faltung bestehen [Dunlap, 1997]. Konfokalmikroskopische Untersuchungen zeigen auch, dass PEI-DNA-Komplexe zunächst an der Zelloberfläche Aggregate bilden, dann endozytotisch aufgenommen werden und nach wenigen Stunden die Endolysosomen verlassen und im Kern sichtbar werden [Godbey, 1999]. Die Resistenz der PEI-DNA-Komplexe gegenüber dem sauren Milieu der Endolysosomen beruht auf der Pufferkapazität von PEI, die mit den protonierbaren Stickstoff-Atomen zusammenhängt [Kichler, 2001].

4.2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) ist eine apparative Methode der Zelldifferenzierung und -identifizierung auf Grund von zytomorphologischen und proteinchemischen Merkmalen. Sämtliche Zellen, die in Suspension gebracht werden können, können damit auf Einzelzellebene untersucht und sortiert werden, am besten natürlich zirkulierende Blutzellen. Die Methode findet daher zunehmend breite Verwendung in der hämatologischen Routinediagnostik und der biomedizinischen Forschung.

Das Prinzip besteht darin, dass in einem Flüssigkeitsstrom suspendierte Partikel in einer Kapillare hydrodynamisch fokussiert und dabei Streulicht- und Fluoreszenzsignale der einzelnen Partikel von Photodetektoren registriert werden können. Die Zellsuspension wird durch Unterdruck angesaugt und gemeinsam mit einer sie umhüllenden Trägerflüssigkeit (*sheath fluid*) in eine Kapillare geleitet, so dass die Suspension laminar durch eine Quarzküvette fließt. Indem sich die Kapillare am Ende der Küvette verjüngt, wird der Flüssigkeitsstrom beschleunigt und hydrodynamisch fokussiert, wodurch die Zellen hintereinander und in ausreichendem Abstand voneinander den Messpunkt passieren.

An diesem Messpunkt wird die einzelne Zelle von einem orthogonal einfallenden Laserstrahl getroffen, so dass Streulicht entsteht. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*) liegt 0° - 10° zur Richtung des einfallenden Strahls und repräsentiert den Größendurchmesser der Zelle, das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*) liegt 90° zur Richtung des einfallenden Strahls und spiegelt die Oberflächenbeschaffenheit bzw. den Grad der Granularität der Zelle wider. Außerdem werden durch den Laserstrahl Fluorochrome (Fluoreszenzfarbstoffe) in bzw. auf den Zellen angeregt, die mit einer für jeden Farbstoff charakteristischen Wellenlänge elektromagnetische Strahlung emittieren. Die Photodetektoren registrieren die eintreffenden Signale und wandeln sie über Photomultiplier in elektrische Spannung um. Ein Analog-Digital-Konverter weist jeder Signalspannung eine Zahl von 0 bis 1024 zu, so dass die Signale graphisch visualisiert werden können. Die Fluoreszenzsignale werden logarithmisch verstärkt und auf einer vier Dekaden umfassenden Skala (0,1 bis 1000) auf dem Bildschirm dargestellt.

Da man Fluorochrome chemisch an Antikörper koppeln kann, ist es prinzipiell möglich, jedes Antigen auf der Zellmembran oder, nach Fixation und Permeabilisierung der Zelle, auch in intrazellulären Kompartimenten anzufärben. Insofern die Fluoreszenzfarbstoffe in einem fixen stöchiometrischen Verhältnis zu den Antikörpern und diese wiederum zu ihren Antigenen stehen, kann von der Intensität des emittierten Fluoreszenzsignals auf die Quantität des Antigens geschlossen werden. Somit kann also die Expression eines Proteins quantitativ gemessen und zwischen mehreren Zellen verglichen werden. Im Unterschied zu einem *western blot* wird die Expression hier auf Einzelzellebene messbar, wodurch verschiedene Zellen untereinander hinsichtlich der Proteinexpression simultan verglichen werden können. Durch die Kombination von bis zu vier Fluoreszenzfarbstoffen pro Zelle und Analyse können darüber hinaus Korrelationen zwischen verschiedenen Antigenen, aber auch zwischen Antigenen und Zellgröße bzw. -granularität auf Einzelzellebene errechnet werden.

Mittels einer speziellen Software können verschiedene Darstellungsformen gewählt werden. In Einparameter-Histogrammen kann die Häufigkeitsverteilung eines einzelnen Parameters innerhalb der Zellpopulation veranschaulicht werden, beispielsweise die Intensität von PI (s. Abb. 3.4). In Punktdiagrammen (*dot plots*) kann die Korrelation zweier Parameter dargestellt werden, so dass jeder Punkt einer Zelle entspricht (s. Abb. 3.3). Die Häufigkeitsverteilung der beiden Parameter kommt dann in der Punktdichte zum Ausdruck.

4.3 Diskussion der Ergebnisse im Horizont der Literatur

4.3.1 Antisense-Hemmung von Bcl-2

Die Untersuchung von DNA-Carriern ergab, dass Lipofektin im Gegensatz zu ExGen 500 GM697-Zellen effektiv mit ODN tranfizieren kann. Zudem war die Toxizität von Lipofektin gering, die von ExGen 500 jedoch exorbitant. Lipofektin und andere kationische Lipidformulationen wurden bereits erfolgreich als Carrier für hämatopoietische Zellen des Menschen eingesetzt, allerdings mit großer Variabilität zwischen verschiedenen Zellarten [Harrison, 1995; Kronenwett, 1998]. In GM697-Zellen ist Lipofektin bisher noch nicht beschrieben worden. Hier wurde zum ersten Mal gezeigt, dass Lipofektin auch ein effektiver ODN-Carrier für GM697-Zellen ist. Das empirisch ermittelte, optimale molare Ladungsverhältnis von 1,2 : 1 steht im Einklang mit Berichten, wonach ein Verhältnis von 1,1 : 1 als optimal für primäre B-Lymphozyten beschrieben wurde [Hartmann, 1998 b]. Die Toxizität von unkomplexierten kationischen Lipiden, die hier beobachtet wurde, ist bereits aus Versuchen mit Makrophagen bekannt [Aramaki, 1999].

Lineares Polyethylenimin (PEI, = ExGen 500) soll gegenüber kationischen Lipiden den Vorteil besitzen, dass es weniger toxisch und deshalb für einen Einsatz *in vivo* besser geeignet sei [Boussif, 1995]. Allerdings wurde beobachtet, dass die Effektivität von PEI von Zelltyp zu Zelltyp dramatisch variiert [Gebhart, 2001]. Die Anwendung von ExGen 500 wurde in dieser Arbeit erstmalig für GM697-Zellen untersucht, wobei gezeigt werden konnte, dass dieser Zelltyp nicht für die Transfektion mit ExGen 500 geeignet ist.

Bei den Antisense-Versuchen mit Lipofektin ließ sich mit dem ODN G3139 eine deutliche Bcl-2-Reduktion und konkomitante Apoptoseinduktion 12 h nach Ende der ODN-Inkubation erreichen, während ODN 2009 dieselben Effekte nur schwach zeigte. Dass eine bestimmte Antisense-Sequenz besser wirkt als eine andere, wurde oft beobachtet, aber noch nie befriedigend erklärt. Dies ist auch der Hauptgrund, weshalb wirksame Antisense-Sequenzen empirisch ermittelt werden müssen [Lebedeva, 2001]. Die Tatsache, dass G3139 das *in vitro* und *in vivo* am häufigsten eingesetzte Bcl-2-Antisense-ODN ist und ODN 2009 sich nur selten in der Literatur findet, deutet bereits auf die empirische Überlegenheit des G3139 hin.

Die Kontrolle zu ODN 2009, ODN 2010, zeigte ebenfalls eine leichte Bcl-2-Reduktion und Apoptoseinduktion, etwas geringer als ODN 2009 selbst. Be-

trachtet man die Sequenz der beiden Oligonukleotide, so erkennt man, dass beides 20-mere sind, während G3139 ein 18-mer ist. ODN verlieren jedoch ihre Wirksamkeit, wenn sie zu lang werden. Woran liegt das?

Die Spezifität der Antisense-ODN ist begrenzt. Sie hybridisieren nicht nur mit dem komplementären Abschnitt der Ziel-RNA, sondern binden auch an andere RNA-Transkripte und sogar Proteine. Die "falsche" Bindung eines ODN an eine beliebige RNA auf Grund einer partiellen Komplementarität von nur fünf (*sic*) sequentiellen Basenpaaren kann bereits die RNase H aktivieren und zur Spaltung des betroffenen RNA-Transkripts führen [Woolf, 1992]. Dieses Phänomen nennt man *irrelevant cleavage*. Je länger ein verwendetes ODN ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit solcher partieller Komplementaritäten und entsprechend geringer wird die Spezifität des Antisense-ODN bzw. des Kontroll-ODN. Statistische Berechnungen zeigen, dass ein 15-mer ODN mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von 1 zu 10^9 eine komplett komplementäre Sequenz findet. Genügt jedoch eine partielle Komplementarität von acht konsekutiven Basenpaaren, so erhöht sich die Wahrscheinlichkeit auf 1 zu 8192, das heißt, das ODN findet alle 8192 Basen eine hinreichend komplementäre Sequenz zur Aktivierung der RNase H. Eine Komplementarität von fünf Basen ist demnach noch um ein Vielfaches wahrscheinlicher. Allerdings scheint nicht nur die bloße Länge des ODN, sondern auch die chemische Modifikation und die dreidimensionale Struktur eine Rolle zu spielen [Lebedeva, 2001].

Die *irrelevant cleavage* führt einerseits dazu, dass durch ein zu langes Antisense-ODN auch die Synthese anderer, meist homologer Proteine mit identischen Teilsequenzen beeinträchtigt werden kann. Andererseits kann es bedeuten, dass vermeintliche Kontroll-ODN, wenn sie zu lang sind, ebenfalls eine leichte Antisense-Hemmung der Ziel-RNA bewirken können. Vergleicht man nun die beiden 20mere, das Antisense-ODN 2009 und das Kontroll-ODN 2010, so erkennt man, dass sie tatsächlich an zwei Stellen fünf identische Basenabfolgen aufweisen. Berücksichtigt man diese Erkenntnisse, so könnte die partielle Komplementarität von ODN 2010 mit der Bcl-2-mRNA ausreichen, um die leichte Bcl-2-Reduktion zu erklären. Das würde bedeuten, dass ODN 2010 keine geeignete Negativkontrolle ist, sondern zu einer unerwünschten *irrelevant cleavage* führt.

Eine alternative Erklärung berücksichtigt Lipofektin: Da ODN 2010 nur im Komplex mit Lipofektin eingesetzt wurde und eine Kontrolle ohne Lipofektin fehlte, kann letztlich nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem minimalen

Effekt von ODN 2010 um eine Eigenwirkung des Lipofektins handeln könnte. Als Konsequenz daraus müsste man jedoch dieser Eigenwirkung von Lipofektin auch einen Anteil am Antisense-Effekt von Lipofektin-komplexiertem ODN 2009 und G3139 zurechnen.

Die Kinetik der Antisense-bedingten Bcl-2-Reduktion mit einem Nadir 12 h nach Ende der ODN-Inkubation reflektiert die Geschwindigkeit der intrazellulären Proteindegradierung, also die Halbwertszeit von Bcl-2. Wenn nämlich wegen der RNA-Verdauung durch die RNase H kein Protein mehr nachsynthetisiert werden kann, so fällt der nachweisbare Level von Bcl-2 mit der Geschwindigkeit der physiologischen Halbwertszeit. Diese wurde in der Literatur mit 14 h beschrieben [Tsujiimoto, 1986], kann jedoch je nach Zelltyp etwas variieren. Nimmt man für GM697-Zellen eine Halbwertszeit von 14 h an, so ist es nicht überraschend, dass 16 h nach Beginn bzw. 12 h nach Ende der vierstündigen Inkubation mit den Antisense-ODN die maximale Bcl-2-Reduktion eintrat. Der Wiederanstieg des Bcl-2 nach erfolgter Antisense-Inhibition – wenn die Antisense-ODN selbst bereits abgebaut sind – reflektiert wiederum die Geschwindigkeit der Bcl-2-Synthese und damit letztendlich die Geschwindigkeit der Synthesephase des Zellzyklus. Da der Zellzyklus der GM697-Zellen 30 h dauert (Verdoppelungszeit in Kultur) und die Synthesephase etwa ein Drittel des Zellzyklus beträgt (in den meisten Zelltypen konstant 6-10 h lang [Forth, 1996]), wird verständlich, dass 12 h nach dem Antisense-bedingten Bcl-2-Nadir wieder das vorherige Bcl-2-Plateau erreicht oder sogar kompensatorisch überschritten ist.

Die beobachtete Caspase-3-Aktivierung ebenfalls zum Zeitpunkt 12 h nach Ende der ODN-Inkubation beweist, dass der G3139-Lipofektin-Komplex nicht zytotoxisch war, da Caspase-3 lediglich bei der Apoptose, nicht jedoch bei der Nekrose aktiviert wird. Im Einklang mit dieser Apoptosekinetik stehen die Beobachtungen der Gruppe um Reed, die bei Antisense-Versuchen mit GM697 eine Verminderung der Zelldichte nach ein bis drei Tagen registrierte. Denn während diese Gruppe damit ein sehr spätes Ergebnis der Apoptose als Messparameter gewählt hatte [Reed, 1990], wurde in dieser Arbeit mit dem Nachweis der Caspase-3 ein früheres Apoptosestadium detektiert, das logischerweise bereits früher ein Maximum aufweist.

Für Antisense-Experimente wurden jüngst strikte methodische Regeln aufgestellt [Stein, 1998]. Im Licht dieser Regeln hätten die hier vorgestellten Versuche noch zusätzlicher Kontroll-Oligonukleotide (*scrambled-* oder *mismatch-*Kontrollen), weiterer homologer Kontrollproteine aus der Bcl-2-Familie, einer

Bcl-2-mRNA-Messung sowie möglicherweise auch eines *RNase H protection assay* bedurft. Auch ist die Anzahl der Versuche mit $n = 3$ nicht hinreichend, um den Antisense-Effekt statistisch unfechtbar zu machen. Das Ziel dieser Versuche war jedoch nicht, eine Bcl-2-Antisense-Reduktion in GM697-Zellen erstmalig zu zeigen oder unwiderlegbar zu beweisen, was bereits 1990 von Reed erfolgte [Reed, 1990].

Es ging vielmehr darum, aufbauend auf den Versuchen von Reed et al. die beiden Oligonukleotide G3139 und ODN 2009 zu vergleichen und einen eventuellen nicht-Antisense-vermittelten Effekt von G3139 – zum Beispiel einen CpG-Effekt – aufzuzeigen. Im Gegensatz zu Reed et al., die ohne Lipofektin arbeiteten und erst bei ODN-Konzentrationen von $25 \mu\text{M}$ einen Antisense-Effekt sahen, reichte hier durch die Verwendung von Lipofektin $1 \mu\text{M}$ ODN für den Antisense-Effekt aus. Außerdem benutzten Reed et al. eine Zellzählung und eine Trypanblaufärbung, um den Effekt auf die Vitalität der Zellen zu untersuchen. Damit kann jedoch nicht zwischen unspezifischer Toxizität und spezifischer Apoptoseinduktion unterschieden werden. In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Messung der aktiven Caspase-3 gezeigt, dass tatsächlich Apoptose induziert wird. Bcl-2 ist also notwendig für das Überleben von GM697-Zellen, eine kritische Reduktion desselben vermag die spontane Apoptose einzuleiten.

4.3.2 CpG-Effekte in GM697-Zellen und Burkitt-Lymphomzellen

Die Antisense-Experimente hatten gezeigt, dass G3139 in der Zelllinie GM697 nur dann die Expression von Bcl-2 hemmen kann, wenn es im Komplex mit dem Carrier Lipofektin eingesetzt wird. Ohne Lipofektin blieben die Bcl-2-Expression und die spontane Apoptoserate unverändert. Allerdings war nun durch die Beobachtung einer G3139-abhängigen Bcl-x_L-Erhöhung und durch die Tatsache, dass G3139 zwei CpG-Motive enthält, die Frage aufgekommen, ob G3139 auch wie andere CpG-ODN zellaktivierende und immunstimulatorische Aktivität besitzt. Denn schließlich handelt es sich bei GM697-Zellen ja um die leukämische Variante der B-Lymphozyten, die auf Grund ihres TLR9-Rezeptors direkt mit CpG-ODN interagieren können.

Tatsächlich konnte in GM697-Zellen eine G3139-abhängige Induktion der immunologischen Aktivierungsmarker CD80 und CD86 beobachtet werden. Dieser Effekt war nach 24 h am größten und verringerte sich in den Folgetagen allmählich wieder. Ein Indiz für einen CpG-vermittelten Effekt von G3139 ist die Beobachtung

bachtung, dass das CpG-freie ODN 2010 diese Aktivierungsmarker nicht hochregulierte. Dabei ist es irrelevant, dass ODN 2010 keine Antisense-Negativkontrolle (*mismatch* oder *scrambled ODN*) für G3139 ist, wonach es dieselbe Basenzusammensetzung wie G3139 haben müsste. Zur Negativkontrolle eines CpG-Effekts genügt die Tatsache, dass ODN 2010 keine CpG-Motive enthält. Da GM697-Zellen immature maligne B-Lymphozyten sind und CpG-Effekte sowohl bei gesunden wie bei malignen humanen B-Lymphozyten beschrieben wurden [Hartmann, 2000 b; Decker, 2000] liegt es nahe, dass der hier beobachtete Effekt CpG-vermittelt war. Zudem ist eine ähnliche Kinetik wie die hier beobachtete aus Untersuchungen des CpG-Effekts bei B-Zellen bekannt: ein Wirkungsgipfel bei 24 h und ein Wirkungsverlust nach 48-72 h [Krieg, 1995].

In den Bcl-2-negativen Burkitt-Lymphom-Zelllinien Daudi JP und DG 75 ist ein Bcl-2-Antisense-Effekt ausgeschlossen, da Bcl-2 nicht exprimiert wird. Dass in beiden Zelllinien dennoch eine überwiegend signifikante Hochregulation von CD54, CD80 und CD86 durch G3139 gefunden wurde, stützt die Theorie von G3139 als einem immunstimulatorisch aktiven CpG-ODN. Ein weiteres Argument für diese Hypothese beruht darauf, dass G3139 ein beinahe identisches Wirkprofil aufwies wie das im humanen System als CpG-ODN charakterisierte ODN 2006 [Hartmann, 2000 b].

In Daudi JP-Zellen waren die Effekte von G3139 und ODN 2006 kongruent, und ein signifikanter Unterschied zwischen beiden ODN konnte nicht ermittelt werden. In DG 75-Zellen war G3139 zwar signifikant wirksam, aber deutlich geringer als ODN 2006. Dieser Unterschied könnte darauf basieren, dass G3139 und ODN 2006 verschiedene Signaltransduktionswege zur Induktion von Proteinen in Gang setzen. Es wurde aber bisher nur der Signaltransduktionsweg über TLR-9 beschrieben [Hemmi, 2000]. Im Prinzip könnte G3139 über andere, noch unbekannte Sequenzmotive wirken.

Eine alternative, plausiblere Erklärung geht davon aus, dass beide Oligonukleotide zwar wirksame CpG-ODN sind, jedoch mit verschiedener Potenz: Schließlich enthält ODN 2006 vier CpG-Dinukleotide in empirisch optimierten Basenkontexten, G3139 aber nur zwei CpG-Motive in nicht optimierten Basenkontexten. Die Überlegenheit von ODN 2006 käme nach den Gesetzen der Pharmakodynamik darin zum Ausdruck, dass ODN 2006 einen höheren Plateau-Effekt bei maximaler Dosis (V_{max}) erreicht oder aber seinen halbmaximalen Effekt (ED_{50}) bei einer niedrigeren Dosis hat. Letzteres hieße, dass bei einer gegebenen Dosis ODN 2006 einen Effekt erzielen kann, bei dem G3139 noch keinen

erzielt. Dies könnte bei DG 75 der Fall sein und würde die unterschiedliche Stärke der Proteininduktion durch die beiden ODN erklären. Da zudem verschiedene Zelllinien je nach Ausstattung mit Rezeptoren und Signalmolekülen unterschiedliche Sensitivitäten für CpG-Effekte haben können, würde auch verständlich, warum bei derselben Dosis Daudi JP-Zellen auf beide CpG-ODN gleichermaßen ansprechen. Daudi JP-Zellen wären dementsprechend für CpG-ODN sensitiver als DG 75-Zellen. Tatsächlich wurde in B-CLL-Zellen am Beispiel der Induktion von CD86 nachgewiesen, dass ODN 2006 sowohl eine geringere ED₅₀ als auch eine höhere V_{max} als G3139 zeigt.

4.3.3 CpG-Effekte in primären B-CLL-Zellen

Die Untersuchung primärer humaner B-CLL-Zellen ist ein in die Klinik gut übertragbares Modell, das bereits vielfach beschrieben worden ist [Pepper, 1999; Decker, 2000]. Dass bei den Versuchen mit humanen PBMC keine kationischen Lipide eingesetzt wurden, hat zwei Gründe. Ein Grund ist die bekannte, aber noch wenig verstandene Beobachtung, dass ODN von primären Zellen und Zellen *in vivo* besser aufgenommen werden als von permanenten Zelllinien. Es wurde gezeigt, dass hundert Prozent aller B-Lymphozyten in PBMC spontan ODN aufnehmen [Hartmann, 1998 b]. Ein zweiter Grund ist, dass kationische Lipide eine antiinflammatorische und immuninhibitorische Eigenwirkung entfalten können [Filion, 1997], was mit der Untersuchung der ODN-Wirkungen auf das Immunsystem interferieren würde. In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass B-CLL-Zellen Phosphorothioat-ODN in ausreichender Menge spontan aufnehmen. Aus Voruntersuchungen mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop war in unserem Labor bekannt, dass sich Lipofektin-komplexierte ODN zuerst zytoplasmatisch, dann nukleoplasmatisch anreichern. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit darauf verzichtet, die kompartmentale Verteilung der ODN noch einmal zu demonstrieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die beiden CpG-haltigen ODN 2006 und G3139 die immunologischen Oberflächenmarker CD40, CD80 und CD86 hochregulierten. Die leicht induktorische Wirkung von ODN 2009, das keine CpG-Motive enthält, ist am wahrscheinlichsten auf den unspezifischen immunstimulatorischen Hintergrundeffekt des Phosphorothioat-Gerüsts zurückzuführen. Hier lohnt eine genauere Betrachtung der multiplen Effekte von ODN, die nicht nur auf Interaktionen mit RNA – wie oben ausgeführt –, sondern auch auf der Bindung an Proteine beruhen (sogenannte Aptamer-Bindung).

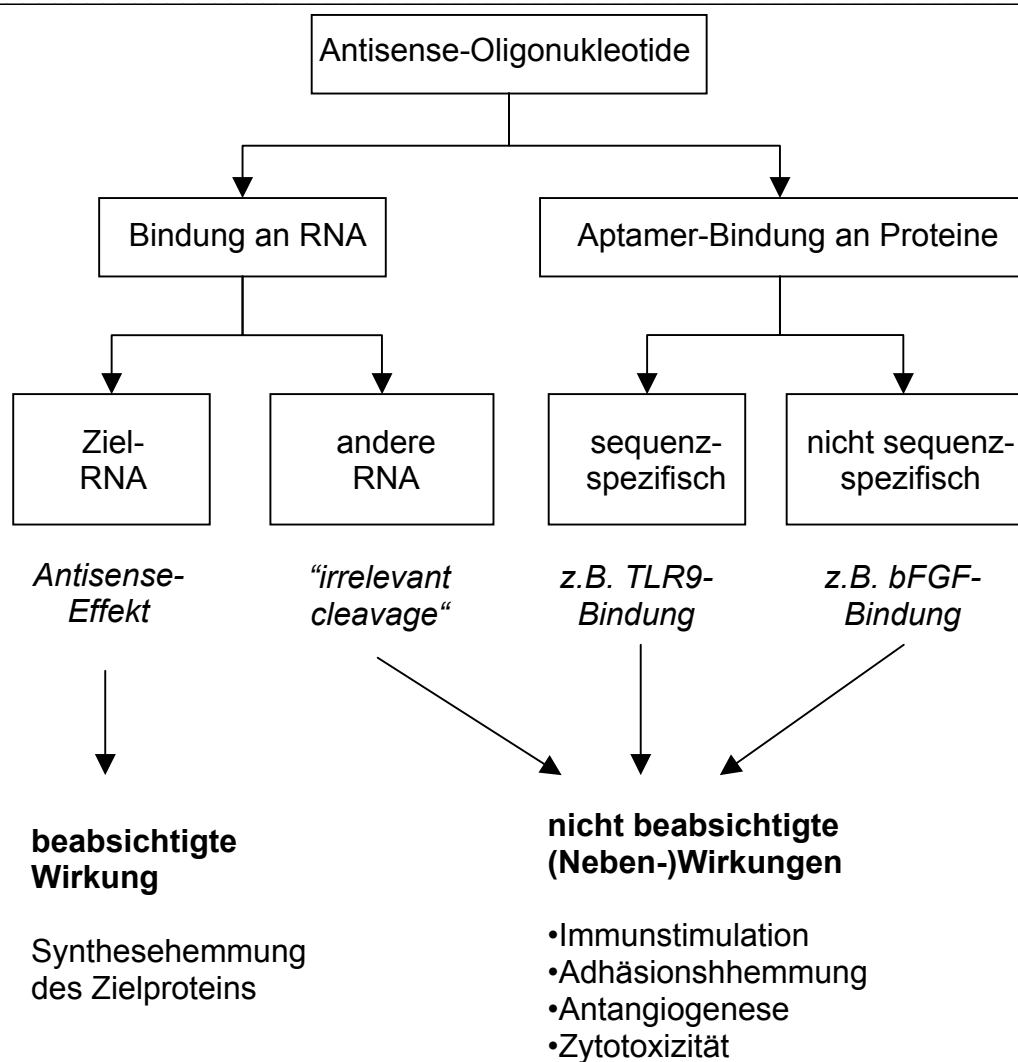


Abb. 4.3: Flussdiagramm zur Veranschaulichung der diversen möglichen Effekte eines Antisense-ODN. Neben dem auf der spezifischen Watson-Crick-Basenpaarung beruhenden, beabsichtigten Antisense-Effekt gibt es noch unbeabsichtigte, auf unspezifischer RNA- sowie spezifischer und unspezifischer Proteinbindung beruhende Effekte, die man bei der Konzeption von Antisense-Experimenten berücksichtigen muss.

Oligonucleotide binden über ihr polyanionisches Phosphatgerüst auch an Proteine und können mit deren Funktionen interferieren. In besonderem Maße ist dies für Phosphorothioat-ODN gezeigt worden. Ähnlich wie polyanionisches Heparin oder Polysulfate binden ODN längenabhängig an zahlreiche Heparin-bindende Proteine, darunter Fibronectin, Laminin, *basic fibroblast growth factor* (bFGF, [Fennewald, 1995]), *epidermal growth factor receptor* (EGFR) und *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR, [Rockwell, 1997]). So zeigten Antisense-Oligonucleotide gegen TNF- α unter Einfluss von Lipopolysaccharid eine Induktion statt einer Hemmung dieses Zytokins, was durch Zugabe von Heparin

wieder rückgängig zu machen war [Hartmann, 1996]. Auch eine Bindung von Oligonukleotiden an CD11-CD18, CD4, HIV-Glykoprotein 120 und die reverse Transkriptase von HIV-1 konnte nachgewiesen werden [Lebedeva, 2001]. Phosphorothioate können sogar NF- κ B-vermittelt den Transkriptionsfaktor Sp-1 induzieren [Perez, 1994]. Diese molekularen Interaktionen entsprechen vermutlich den *in vivo* beobachteten antiadhäsiven, antiangiogenetischen, immunistimulatorischen und antiviralen Effekten einiger Antisense-ODN [Hartmann, 1998 a]. Solche Effekte sind oft unerwünscht, können aber zum Beispiel bei der Antisense-Therapie von Tumoren eine durchaus willkommene Synergiewirkung liefern. Man nimmt an, dass die unspezifische Interaktion von Antisense-ODN mit Proteinen zwar von der Länge und chemischen Struktur, aber nicht primär von der Nukleotidsequenz abhängen. Allerdings beweist die durch Bindung an TLR9 medierte immunistimulatorische Wirkung von CpG-Motiven, dass Oligonukleotide auch wohldefinierte sequenzabhängige Wirkungen haben können, die nichts mit einem Antisense-Effekt zu tun haben.

a) Immunologische Aktivierung

Die wahrscheinlichste Erklärung für die bei B-CLL-Zellen beobachtete Induktion von CD40 und CD80 durch die verschiedenen ODN ist also ein schwacher immunistimulatorischer Hintergrundeffekt des Phosphorothioat-Gerüsts und eine für CpG-ODN hinzukommende, spezifische Immunstimulation durch die Interaktion mit dem CpG-Rezeptor TLR-9. In B-Zellen gesunder Spender wurde die Induktion von CD40 und CD86 durch CpG-ODN bereits nachgewiesen [Bauer, 1999; Hartmann, 2000 b], in B-CLL jedoch bis zum Zeitpunkt der Experimente noch nicht. Was aber bedeutet eine Induktion von CD40 und CD80 funktionell?

CD40 ist nicht nur ein Marker für die Differenzierung von B-Lymphozyten, sondern spielt eine wesentliche Rolle in der Interaktion von B-Zellen mit T-Zellen und damit in der zellulären, T-Zell-vermittelten Immunreaktion [Gordon, 1995; Nishioka, 1994]. Bei CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) handelt es sich um die beiden kostimulatorischen Moleküle, die für eine Aktivierung naiver T-Zellen essentiell sind [Janeway, 1999], wobei CD80 die wichtigere Rolle zukommt [Fields, 1998]. Beide Proteine können mit denselben Proteinen auf der T-Zelloberfläche interagieren. Die Wirkung auf T-Zellen hängt von dem Bindungspartner auf der T-Zelloberfläche ab: Bindet CD80 oder CD86 an CD28 auf naiven T-Zellen, so wird die T-Zelle aktiviert; Bindet dasselbe Molekül jedoch an CD152 (CTLA4) auf aktivierten T-Zellen, so resultiert ein hemmendes Signal und die T-Zell-Aktivierung wird limitiert [Janeway, 1999]. Nur aktivierte B-Zellen exprimieren

CD80 und/oder CD86 und demonstrieren damit ihren Status als professionelle Antigen-präsentierende Zellen. CD80 und CD86 werden auf B-Zellen durch Signale einer Infektion induziert (sogenannte PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*), z.B. durch LPS oder CpG-Motive. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CpG-ODN selbst in den malignen B-CLL-Zellen kostimulatorische Moleküle hochregulieren. Eine extensive Untersuchung weiterer Oberflächenmarker durch Jahrsdörfer et al. zeigte, dass auch CD20, CD54 (ICAM-1), CD69, CD86, MHC-I, MHC-II und 1D10-Antigen auf B-CLL-Zellen induziert werden, wenn sie in Kontakt mit CpG-Oligonukleotiden kommen [Jahrsdörfer, 2002].

In der vorliegenden Arbeit konnte ferner gezeigt werden, dass dieselben Zellen, die auf CpG-Oligonukleotide hin CD40 und CD80 hochregulieren, auch an Größe und Granularität zunehmen. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits mit normalen B-Zellen und malignen B-Zellen verschiedener Lymphome gemacht [Hartmann, 2000 a; Jahrsdörfer, 2001] und als Zeichen einer funktionellen Aktivierung der B-Lymphozyten identifiziert. Zudem gilt in der Biologie generell, dass aktivierte, synthetisch und proliferativ aktive Zellen größer sind als ruhende Zellen, da sie Raum für extensive Proteinsynthese (endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat etc.) benötigen. Dass die vermehrte Nachweisbarkeit von CD40 und CD80 nicht einfach mit der größeren Zelloberfläche erklärt werden kann, sondern überproportional dazu ist und eine Zunahme der Moleküldichte auf der Zellmembran bedeutet, konnten Jahrsdörfer et al. rechnerisch zeigen [Jahrsdörfer, 2002].

Das Konzept einer immunologischen Aktivierung von B-CLL-Zellen durch CpG-ODN wurde inzwischen durch Versuche bekräftigt, die zeigten, dass die durch CpG-ODN aktivierten B-CLL-Zellen allogene T-Zellen in einer *mixed lymphocyte reaction* (MLR) stimulieren können [Decker, 2000]. CpG-Oligonukleotide haben ebenfalls einen Effekt auf den Zellzyklus und erhöhen die Proliferationsrate ihrer Zielzellen, unter anderem der B-Zellen. Auch B-CLL-Zellen werden durch CpG-ODN aus ihrer Arretierung im G₀-Stadium des Zellzyklus in einen proliferativen Status überführt [Jahrsdörfer, 2002; Decker, 2000]. Generell scheinen in B-CLL-Zellen Proliferation und Bcl-2-Expression invers korreliert zu sein, was mit den Effekten von CpG-ODN auf beide Phänomene gut vereinbar ist [Skena, 1992].

In dem hier untersuchten B-CLL-Modell stellt sich nun die Frage, ob die beobachteten Effekte auf einer direkten Interaktion von CpG-ODN und B-CLL-Zelle basieren oder indirekt über andere Zellen und deren Zytokine mediiert sind. Nun ist zwar TLR-9, der Rezeptor für CpG, auf gesunden B-Zellen nachgewiesen

worden [Takeshita, 2001], aber auf B-CLL-Zellen hat noch niemand danach gesucht. Dies ist ohne Zweifel eine der Untersuchungen, die sich an die Ergebnisse dieser Arbeit anschließen müssen.

Durch magnetische Zellseparation konnte jedoch gezeigt werden, dass die CpG-Effekte auf Proliferation, Immunphänotyp und Zytokinproduktion (TNF- α und IL-6) auch bei aufgereinigten B-CLL-Populationen zu beobachten sind [Decker, 2000]. Allerdings bleibt fraglich, ob nicht trotz Zellseparation wenige verbliebene plasmazytoide dendritische Zellen ausreichen, um den beobachteten CpG-Effekt zu bewirken. Auch autokrine Amplifikationsmechanismen könnten zu dem beobachteten CpG-Effekt auf B-CLL-Zellen beitragen. So ist bekannt, dass TNF- α ein autokriner Wachstumsfaktor für B-CLL-Zellen ist, der auch die CD80-Expression reguliert [Foa, 1990; Ranheim, 1995]. Ein Nachweis von TLR-9 auf B-CLL-Zellen sowie der Versuch einer CpG-Stimulation unter selektiver Hemmung des TLR-9 auf B-CLL-Zellen könnten in Zukunft weitere Erkenntnisse zur Natur der CpG-Stimulation von B-CLL-Zellen liefern.

b) Wirkungen auf die Apoptose

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass CpG-ODN eine signifikante Induktion von Bcl-x_L in B-CLL-Zellen bewirken. Dieselbe Beobachtung war bereits mit gesunden B-Zellen im murinen System gemacht worden [Yi, 1998]. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass dieser Effekt auf einer vermehrten Transkription beruht und u.a. über den Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt wird [Grad, 2000]. Eine NF- κ B-induzierte Bcl-x_L-Induktion wurde auch in Neuronen als Wirkung von Nervenwachstumsfaktoren gefunden [Bui, 2001]. Insbesondere c-Rel scheint entscheidend für die direkte Hochregulation von Bcl-x_L zu sein [Chen, 2000]. Dass NF- κ B generell im Rahmen der CpG-Wirkung aktiviert wird, ist ebenfalls gesichert [Hacker, 2000].

Bisher wurde angenommen, dass CpG stets anti-apoptotisch wirkt. In gesunden B-Lymphozyten von Maus und Mensch wurde die anti-apoptotische Wirkung mehrmals beschrieben [Han, 1999; Krieg, 2000; Yi, 1999]. Sie wurde mit einer CpG-vermittelten Induktion von Bcl-x_L, IAP, c-jun und c-myc in Verbindung gebracht [Yi, 1998]. NF- κ B, das im Rahmen der CpG-Signaltransduktion aktiviert wird und in den Kern transloziert, induziert bekanntermaßen die Expression einer Reihe anti-apoptotischer Proteine: IAP-1, IAP-2, TRAF-1/-2, XIAP, Bcl-x_L [Baldwin, 2001].

In der vorliegenden Arbeit zeigten jedoch die beiden CpG-Oligonukleotide G3139 und ODN 2006 bei einer Subpopulation von B-CLL-Patienten eine Erhöhung der spontanen Apoptoserate, gepaart mit einer Reduktion von Bcl-2. Die Bcl-2-Antisense-Sequenz von G3139 kann nicht ursächlich dafür sein, da ODN 2006 diese Antisense-Sequenz nicht enthält (nicht einmal eine partielle Komplementarität). Die plausibelste Erklärung basiert auf der Biologie der B-CLL, die eigentlich mindestens zwei Krankheiten unter einem Begriff subsumiert. Sowohl die Heterogenität der klinischen Verläufe als auch die genetisch und pathogenetisch distinkten Subformen unterstreichen die Hypothese, dass es sich bei der B-CLL um zwei nosologische Entitäten handelt. Dies unterstreichen neuere molekularbiologische Untersuchungen [Damle, 1999; Hamblin, 1999]. Die beiden disparaten B-CLL-Formen scheinen von zwei im Entwicklungsstadium unterschiedenen B-Zellen ihren Ausgang zu nehmen (s. **Abb. 4.4**):

- von einer reifen, naiven B-1-Zelle, die noch nicht das Keimzentrum eines Sekundärfollikels passiert hat (prägerminal) bzw.
- von einer Gedächtnis-B-1-Zelle, die bereits das Keimzentrum passiert hat und dort Kontakt mit einem Antigen hatte (postgerminal).

Eine B-1-Zelle, die im Keimzentrum eines Sekundärfollikels mit Antigen in Kontakt kam, weist als ein hochspezifisches Charakteristikum somatische Hypermutationen auf. Dies sind Punktmutationen in den V-Gensequenzen für die variablen Regionen der schweren und leichten Immunglobulin-Ketten. Diejenigen Mutationen, die zur Bildung von Immunglobulinen mit höherer Affinität für das Antigen führen, bedingen eine positive Selektion und Expansion des betroffenen Zellklons. Aus diesen Zellen werden dann entweder Plasmazellen oder Gedächtniszellen. In etwa 50 Prozent der B-CLL-Zellen wurden somatischen Hypermutationen der IgV_H-Gene gefunden [Damle, 1999; Hamblin, 1999]. Diese Zellen stammen mit großer Wahrscheinlichkeit von Gedächtnis-B-1-Zellen ab und sind daher postgerminal, wohingegen die anderen 50 Prozent ohne somatische Mutationen prägerminalen B-1-Zellen entsprechen müssen. Auch konnte gezeigt werden, dass letztere im Gegensatz zu ersteren ungleich stärker CD38 exprimieren, was typisch für naive, prägerminale B-1-Zellen ist. Beide Formen der B-CLL zeigen auch unterschiedliche genetische Aberrationen, die prägerminale eher Trisomie 12, die postgerminale eher Chromosom 13-Deletionen. Den molekularen und immunphänotypischen Unterschieden entspricht auch eine klinische Heterogenität. Die von prägerminalen B-1-Zellen abstammenden B-CLL-Zellen zeigen einen progredienteren klinischen Verlauf mit einer kürzeren Überlebenszeit [Damle, 1999].

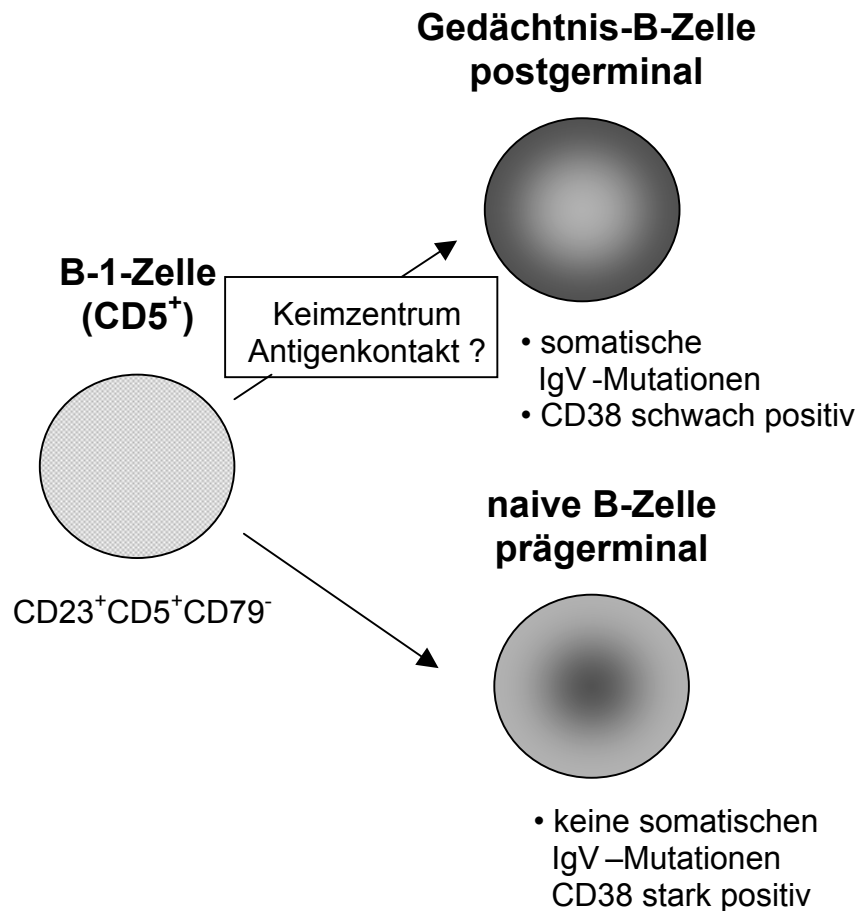


Abb. 4.4: Schematische Darstellung der pathogenetischen Entwicklung zweier distinkter Formen der chronischen lymphatischen Leukämie vom B-Zelltyp (B-CLL), wie sie von Damle und Hamblin vermutet wird [Damle, 1999; Hamblin, 1999].

Vor diesem Hintergrund könnte die differenzielle CpG-Wirkung die beiden distinkten B-CLL-Subformen widerspiegeln. Die beobachtete Korrelation der differenziellen Beeinflussung der Apoptose mit den beiden klinischen Verlaufs- und Prognoseparametern s-Tk und β_2 M hält jedoch auch die Möglichkeit offen, dass es sich bei den beiden Untergruppen um die frühen und späten Progressionsstufen einer pathogenetisch identischen B-CLL handelt. Es ist bekannt, dass β_2 M ein prognostischer Marker ist, nach dem die B-CLL in eine milde und eine schwere Form zerfällt [Ibrahim, 2001]. Patienten mit einer s-Tk unter 7 U/l zeigten in einer Untersuchung ein deutlich längeres progressionsfreies Überleben als jene mit höheren s-Tk-Werten [Hallek, 1999].

Durch welche Proteine der Effekt auf die Apoptose mediiert ist, muss offen bleiben. Es kam zwar parallel zur pro-apoptotischen Wirkung zu einer Bcl-2-

Reduktion, doch diese Korrelation sagt nichts über Kausalitäten aus. Untersuchungen an demselben B-CLL-Modell zeigten, dass das Fas-System nicht beteiligt ist, da der Fas-Rezeptor auf den B-CLL-Zellen nicht exprimiert und durch CpG auch nicht induziert wird [Jahrsdörfer, 2002].

Die molekularen Entsprechungen für den differenziellen CpG-Effekt auf die Apoptose könnten in der Signaltransduktion von CpG liegen. Von Interesse ist hierbei die Beobachtung, dass NF- κ B, an sich der Initiator einer Überlebensreaktion in der Zelle, in bestimmten Situationen pro-apoptotisch wirken kann. In aktivierten T-Zellen kann NF- κ B den Fas-Liganden hochregulieren und somit die Apoptoseschwelle der Zelle erniedrigen [Kasibhatla, 1999]. In Mitogen-aktivierten Lymphomzellen scheint NF- κ B die Apoptose über eine Repression von c-myc zu initiieren [Wu, 1996]. Die unterschiedlichen, einmal anti- und einmal pro-apoptotischen Wirkungen von NF- κ B erklärt man sich durch die unterschiedlich assemblierten Proteine aus der NF- κ B-Familie, wobei RelA den pro-apoptotischen Weg begünstigen soll [Ouaaz, 1999].

Dass CpG-Oligonukleotide in einer Subpopulation von B-CLL-Zellen auch pro-apoptotische Effekte haben kann, wurde erst in dieser Arbeit entdeckt und ist vor allem deshalb von herausragendem Interesse, weil die bisher beschriebenen anti-apoptotischen CpG-Effekte natürlich einer Tumorthherapie mit CpG-ODN im Wege stehen. Eine auffällige Analogie besteht zwischen den CpG-Effekten auf B-CLL-Zellen und den Wirkungen der CD40-Aktivierung. Die Aktivierung von CD40 auf B-CLL-Zellen führt zur Hochregulation von CD80 und CD86 sowie zu einer momentanen Hemmung der Apoptose, aber gleichzeitig zu einer erhöhten Apoptosebereitschaft [Van den Hove, 1997; Romano, 2000; Schattner, 1995]. Mediert werden diese Effekte durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1, die auch im Rahmen der CpG-Wirkung eine Rolle spielen [Furman, 2000]. Da CpG-ODN die Expression von CD40 induzieren, käme es bei Vorhandensein des CD40-Ligands (CD154) zu einer Verstärkung der CpG-Effekte auf CD80, CD86 und die Apoptose. Denkbar wäre daher, dass die in dieser Arbeit beobachteten differenziellen Effekte von der Präsenz oder Absenz von CD154 auf Bystander-Zellen und damit einer unterstützenden CD40-Aktivierung abhängt.

Dass in den beschriebenen Experimenten pro-apoptotische Effekte der CpG-Oligonukleotide auf B-CLL-Zellen *in vitro* beobachtet wurden, lässt noch nicht den Schluss zu, dass diese Effekte auch *in vivo* vorhanden wären. Es ist bekannt, dass B-CLL-Zellen *in vitro* leichter zur Apoptose tendieren als *in vivo* [O-

sorio, 1998]. Diese Diskrepanz könnte durch den Einfluss von Faktoren aus dem Umfeld (*microenvironment*) der Tumorzellen erklärbar sein. So wurde gezeigt, dass B-CLL-Zellen *in vivo* die induzierbare Isoform der NO-Synthase (= iNOS) exprimieren [Kolb, 2001]. Eine experimentelle Hemmung der iNOS führt zur Apoptose der B-CLL-Zelle. Es wird vermutet, dass Hilfszellen aus der peritumoralen Umgebung über CD23, CD40 oder andere Faktoren die iNOS in B-CLL-Zellen induzieren und damit zur Apoptoseresistenz der malignen Zellen beitragen. Auf welche Weise jedoch NO in das Apoptosesystem eingreift, ist ungeklärt [Kolb, 2001].

Analog zur differentiellen Wirkung von CpG-ODN auf die spontane Apoptose von B-CLL-Zellen war auch die Wirkung auf Bcl-2 differentiell. Die Patienten mit niedriger s-Tk zeigten eine leichte Bcl-2-Reduktion, die Patienten mit hoher s-Tk jedoch eine deutliche Bcl-2-Erhöhung. Ein Effekt von CpG-ODN auf Bcl-2 wurde bisher weder in B-CLL-Zellen noch überhaupt in B-Zellen beschrieben. Bekannt ist jedoch, dass das Gen *bcl-2* durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 reguliert werden kann, die auch als Mediatoren der CpG-Wirkung auftreten. Sowohl im murinen als auch im humanen System wurden NF- κ B-Bindungsstellen in *bcl-2*-Promotoren gefunden und eine NF- κ B-vermittelte Induktion von Bcl-2 nachgewiesen [Kurland, 2001; Catz, 2001; Ramirez, 2001].

Andererseits gibt es auch Berichte über eine NF- κ B-vermittelte Repression von Bcl-2: In B-Progenitor-Zellen führt der Entzug von Zytokinen (z.B. IL-3) über eine NF- κ B-Aktivierung zur Bcl-2-Repression und damit zur Apoptose [Sohur, 1999]. An Myokardiozyten wurde gezeigt, dass adaptierte Herzen auf Ischämie mit einer NF- κ B-vermittelten Bcl-2-Induktion reagieren und dadurch den Zelltod verhindern können, nicht adaptierte Herzen jedoch über dieselbe NF- κ B-Aktivierung Bcl-2 herunterregulieren und der Apoptose erliegen [Maulik, 1999]. Damit ist eine differentielle Regulation der Bcl-2-Expression über den NF- κ B-Weg im Rahmen der CpG-Wirkung gut mit der Literatur vereinbar.

Es ist damit jedoch nicht gesagt, dass CpG-ODN nur über die Transkription auf die Bcl-2-Funktion einwirken müssen. Seit kurzem ist bekannt, dass Bcl-2 durch posttranskriptionale und posttranslationale Modifikationen reguliert werden kann. Die Bcl-2-mRNA besitzt z.B. zahlreiche Adenin-Uracil-reiche Elemente (ARE), die im Rahmen der Apoptose bestimmte Enzyme binden, welche darauf den Zerfall der Bcl-2-mRNA bewirken [Schiavone, 2000].

c) G3139 als CpG-Oligonukleotid

Die in B-CLL beobachteten CpG-Effekte traten in nahezu identischer Weise bei den beiden Oligonukleoiden G3139 und ODN 2006 auf. Beide besitzen ausreichend viele und potente CpG-Motive. Allerdings zeigte auch ODN 2009, obwohl es kein CpG-Motiv beinhaltet, eine gewisse, wenn auch deutlich schwächere Wirkung auf die Induktion von Oberflächenmarkern und von Bcl-x_L. Diese Beobachtung ist kompatibel mit zahlreichen Berichten über eine leichte, unspezifische Immunstimulation durch das Phosphorothioat-Rückgrat von ODN [Liang, 1996; Hartmann, 1996]. Somit kann der Phosphorothioat-Effekt auch den anderen ODN zugerechnet werden, es muss jedoch noch ein sequenzspezifischer Effekt hinzutreten, um die deutlich stärkeren Wirkungen zu erklären. Das Kontroll-ODN 2017 ist ein Poly-C-ODN und ist bekannt dafür, dass es eher immunhemmend wirkt und deshalb den unspezifischen Phosphorothioat-Effekt nicht aufweist (persönliche Kommunikation G. Hartmann). Daher stellt ODN 2017 eine brauchbare Kontrolle für jegliche immunstimulatorischen Wirkungen von Phosphorothioat-Oligonukleotiden dar. Bei den B-CLL-Versuchen in dieser Arbeit war ODN 2017 wie erwartet der Mediumkontrolle gegenüber äquivalent.

Dass es sich bei den Effekten von G3139 in dem verwendeten B-CLL-Modell um CpG-Effekte handelte, kann auf Grund der vorhandenen Daten nicht mit allerletzter Sicherheit behauptet werden. Vor allem fehlt eine spezifische CpG-Kontrolle, etwa ein ODN mit Inversion der CG-Dinukleotide in GC-Dinukleotide oder ein ODN mit methylierten CpG-Motiven. Es liegen jedoch genügend Argumente auf der Hand, um eine CpG-Aktivität von G3139 postulieren zu können. Faktum ist zunächst das Vorhandensein zweier theoretisch hochwirksamer CpG-Motive in der G3139-Sequenz. Zusätzlich verfügt G3139 über dasselbe TC-Dinukleotid am 5'-Ende, das an derselben Stelle bei ODN 2006 eingebaut wurde, um dessen immunstimulatorische Wirkung zu erhöhen [Hartmann, 2000 a]. Sämtliche Wirkungen von G3139 auf B-CLL-Zellen korrelieren eng mit denen des CpG-ODN 2006 (Abb. 3.29). Die Dosis-Wirkungs-Kurven beider ODN zeigen ein kongruentes Profil, auch wenn ODN 2006 eine geringere ED₅₀ aufweist. Die eingesetzte ODN-Konzentration wurde bei den B-CLL-Experimenten bewusst im supramaximalen Bereich von 5 µM gewählt, damit ein *qualitativer* Vergleich zwischen G3139 und ODN 2006 hinsichtlich der Immunstimulation möglich wurde. Ein *quantitativer* Vergleich hinsichtlich der immunstimulatorischen Potenz konnte deshalb erst durch die Konzentrationsreihe gezogen werden.

Besonders auffällig ist, dass beinahe alle gegen Tumore gerichteten Bcl-2-Antisense-Experimente, die zu einer erfolgreichen Tumorregression *in vivo* führten, mit G3139 und nicht etwa mit ODN 2009 oder anderen Bcl-2-Antisense-ODN durchgeführt wurden. Dies trifft sowohl auf tierexperimentelle Untersuchungen (auf eine Auflistung wird verzichtet) als auch klinische Studien zu (s. **Tabelle 4.1**). Dieser *bias* in der Auswahl von Bcl-2-Antisense-ODN zu Gunsten von G3139 ist durch dessen immunstimulatorische Potenz erklärbar. Darüber hinaus unterstreichen die überwiegend inflammatorischen Nebenwirkungen jeder G3139-Therapie die CpG-Aktivität dieses Oligonukleotids. Die meist phosphorothioat-modifizierten ODN wurden zwar insgesamt gut vertragen [Crooke, 2000]. Wenn aber Symptome auftraten so waren dies eine autoimmune Thrombozytopenie, eine Erhöhung der Leberenzyme, eine Verlängerung der aPTT, eine Komplementaktivierung oder ein Zytokin-Release-Syndrom mit konstitutionellen Symptomen wie Fieber, Myalgien, Arthralgien, Hypotension und Asthenie [Levin, 1999]. Diese Wirkungen deuten auf eine Interaktion mit dem Immunsystem hin. Oftmals wird dies lediglich mit dem Phosphorothioat-Gerüst erklärt. Es wäre jedoch gut denkbar, dass CpG-Motive, wie sie in vielen klinisch untersuchten ODN vorliegen, für die immunvermittelten Nebenwirkungen verantwortlich sind.

Es wird vielfach argumentiert, dass die *In-vivo*-Wirkungen von G3139 nicht durch immunstimulatorische CpG-Motive erklärbar seien, weil sie auch in Mäusen mit dem *severe combined immunodeficiency syndrome* (SCID) auftraten. SCID-Mäuse sind jedoch kein adäquates Modell, um CpG-Effekte auszuschließen. Diese Mäuse haben eine rezessive Mutation, die einen Defekt in der *DNA dependent kinase* zur Folge hat. Deshalb können sich deren Lymphozyten nicht so leicht differenzieren. Im Gegensatz zu den RAG-1- oder RAG-2-Mäusen, einer anderen Form von immunkompromittierten Versuchstieren, besitzen SCID-Mäuse jedoch eine Restanzahl reifer B- und T-Lymphozyten und zwar desto mehr, je älter sie sind. Abgesehen davon haben SCID-Mäuse ein voll funktionstüchtiges angeborenes Immunsystem, normale Monozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen und ein normales Komplementsystem [Janeway, 1999]. Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass selbst in SCID-Mäusen eine CpG-Therapie von Tumoren wirksam ist, wobei die Makrophagen eine herausgehobene Rolle zu spielen scheinen, da in Makrophagen-depletierten Mäusen die CpG-abhängige Tumor-Abstoßung nicht eintrat [Auf, 2001].

Stadium	Name der Agentien	Target	Indikation
Phase IV	Fomivirsen®	CMVIE2	CMV-Retinitis bei AIDS
Phase III	G3139 (Genasense)	Bcl-2	rezidiertes oder refraktäres malignes Melanom
	Dexamethason +/- G3139 (Oblimersen)	Bcl-2	multiples Myelom im fortgeschrittenen Stadium
	Fludarabin + Cyclophosphamid +/- G3139 (Oblimersen)	Bcl-2	rezidierte oder refraktäre chronische lymphatische Leukämie (CLL)
	Carboplatin + Paclitaxel +/- ISIS 3521	PKC α	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC)
Phase II (Phase I/II)	G3139 (Genasense)	Bcl-2	CLL
	G3139 (Oblimersen) + Gemtuzumab	Bcl-2	rezidierte akute myeloische Leukämie (AML) bei Älteren
	G3139 (Oblimersen)	Bcl-2	rezidierte oder refraktäre CLL
	G3139 (Augmerosen) + Carboplatin + Etoposid	Bcl-2	unbehandeltes, extensives kleinzelliges Bronchialkarzinom (SCLC)
	G3139 (Augmerosen) + Fludarabin + Cytarabin	Bcl-2	Rezidierte o. refraktäre akute myeloische Leukämie oder akute lymphatische Leukämie
	Gemcitabine +/- ISIS 2503	H-ras	lokal fortgeschrittenes oder metastasiertes Pankreas-Adeno-Karzinom
	EGFR Antisense DNA	EGFR	EGFRvIII-exprimierende solide Tumoren
	LErafAON	Raf-1	fortgeschrittene solide Tumore
Phase I	LErafAON + Radiotherapie	Raf-1	fortgeschrittene Malignome

Tab 4.1: Auflistung aktueller klinischer Studien mit Antisense-ODN (November 2001). G3139 (enthält 2 CpG-Motive) als am häufigsten untersuchtes ODN ist optisch hervorgehoben. Es firmiert unter mehreren Bezeichnungen (Oblimersen, Genasense, Augmerosen). Zu den Akronymen siehe das Abkürzungsverzeichnis. Fomivirsen® (Vitravene®) ist in den USA zur intravitrealen Injektion bei CMV-Retinitis zugelassen.

4.4 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Therapeutische Oligonukleotide werden zur Zeit in zahlreichen klinischen Studien untersucht, allerdings meist mit dem Rationale, dass ein Antisense-Effekt gegen bestimmte Zielmoleküle eintreten soll. Die hier präsentierten Experimente legen nahe, dass das in diesen Studien am häufigsten verwendete Oligonukleotid G3139 *in vivo* über andere Mechanismen wirkt als bisher angenommen. Obwohl es als Bcl-2-Antisense-ODN entworfen wurde, kann auf Grund der vorliegenden Befunde die Hypothese untermauert werden, dass die therapeutischen Erfolge *in vivo* eher auf einer durch CpG-Motive vermittelten Immunmodulation und direkten Apoptosemodulation basieren. Dies wurde hier am Beispiel der chronischen lymphatischen Leukämie vom B-Zelltyp gezeigt.

Immuntherapeutische Strategien gegen die chronische lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp basieren auf dem molekularen Verständnis der Eigenschaften maligner B-CLL-Zellen sowie der Interaktion dieser Zellen mit dem Immunsystem. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die von B-1-Lymphozyten abstammenden B-CLL-Zellen nicht immunologisch inert sind, sondern durch CpG-Oligonukleotide auf eine ganz bestimmte Weise stimulierbar sind. Durch CpG-ODN können proliferativ inaktive und schlecht antigenpräsentierende B-CLL-Zellen in proliferativ aktive und gut antigenpräsentierende B-CLL-Zellen transformiert werden. Damit ergeben sich neue Ansätze für eine Therapie der B-CLL und insbesondere ihrer therapierefraktären Manifestationen. Die Transformation der G₀-arretierten B-CLL-Zellen in proliferierende Zellen macht diese wieder zugänglich für eine Reihe konventioneller Zytostatika, deren Wirkung vom Proliferationsindex der Zielzellen abhängt.

Die Wirkung therapeutischer Antikörper gegen Leukämien und Lymphome wird oft dadurch torpediert, dass die Zielmoleküle auf den Tumorzellen herunterreguliert werden. So ist etwa die Wirkung des monoklonalen Anti-CD20-Antikörpers Rituximab (Mabthera®) auf B-CLL-Zellen gering, weil diese kaum CD20 exprimieren. Wenn es gelingt, solche Zielmoleküle – wie bei CD20 gezeigt [Jahrsdörfer, 2002] – durch CpG-Stimulation zu induzieren, lässt sich möglicherweise die Ansprechrate der Tumorzellen wieder erhöhen. Auch CD40 bietet sich für die Therapie mit therapeutischen Antikörpern oder Immunotoxinen an [French, 1999]. Die Effektivität eines solchen synergistischen Ansatzes, bestehend aus CpG-Oligonukleotiden und monoklonalen Antikörpern, wurde bereits in einem Mausmodell unter Beweis gestellt [Wooldridge, 1997].

CpG-Oligonuklotide könnten jedoch auch in anderen immuntherapeutischen Ansätzen eine Rolle spielen: etwa als Adjuvans bei der Tumorstimmung [Weiner, 1997] und adoptiven Tumorthherapie sowie als Monotherapie [Heckelsmiller, 2002]. Gerade im Fall der B-CLL besteht das Problem, dass das Immunsystem die malignen Zellen nicht erkennt, weil diese ihre kostimulatorischen Moleküle herunterreguliert und dadurch ihre antigenpräsentierende Eigenschaft größtenteils eingebüßt haben [Dazzi, 1995]. Da CpG sowohl die antigenpräsentierenden MHC-Moleküle als auch die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf B-CLL-Zellen induziert und diese dadurch wieder zu professionellen antigenpräsentierenden Zellen werden, besteht die berechnete Hoffnung, dass die Tumorzellen von dem T-Zellsystem dann wieder selektiv erkannt und eliminiert werden, zumal T-Zellen bei der B-CLL voll funktionsfähig sind [Decker, 1995]. Eine ähnliche Strategie, die eine Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle über die Interaktion von CD40 und CD154 verfolgt, führte zur Bildung autologer zytotoxischer T-Zellen [Kato, 1998]. Eine Phase-I-Studie mit diesem Ansatz zeigte bereits ermutigende Ergebnisse [Wierda, 2000]. Klinische Studien mit CpG-Oligonukleotiden an Tumorstimmung, darunter auch B-CLL-Patienten, sind in den letzten Jahren begonnen worden.

Abgesehen von den immunologischen Effekten der CpG-Oligonukleotide, die auf die oben beschriebenen Weisen zur Elimination der Tumorzellen führen könnten, wurde in dieser Arbeit auch ein direkter Apoptose-induzierender Effekt auf die Subpopulation der B-CLL mit niedriger Serum-Thymidinkinase (s-Tk) demonstriert. In diesem Patientenkollektiv mag daher eine Therapie mit einem CpG-Oligonukleotid wie G3139 oder eine Kombination von G3139 und Mitoxantron zum verstärkten Absterben von Tumorzellen und damit zur Regression der B-CLL führen. Damit könnte eine Patientengruppe klinisch identifizierbar werden, die für eine CpG-Therapie besonders geeignet erscheint. Umgekehrt muss bei den Patienten mit niedriger s-Tk in Betracht gezogen werden, dass der direkte anti-apoptotische Effekt den immunogenen Antitumor-Effekt konterkarieren könnte.

Therapeutische Oligonukleotide scheinen ihren Weg in die klinische Anwendung zu finden. Ihre Wirkungen entfalten sie allerdings auf kompliziertere Art und Weise als bisher angenommen. CpG-vermittelte Effekte auf Immunzellen könnten insbesondere bei systemischen Tumorerkrankungen wie der chronischen lymphatischen Leukämie in Zukunft eine vielversprechende, ergänzende Therapieoption darstellen.

5. Zusammenfassung

Einleitung

Der apoptotische Zelltod spielt bei malignen Erkrankungen eine entscheidende Rolle hinsichtlich Pathogenese, Prognose und Therapieresistenz. Maligne B-Lymphozyten weisen häufig eine Überexpression des zentralen apoptosehemmenden Proteins Bcl-2 auf, was mit einer Multiresistenz gegen Strahlen- und Chemotherapie sowie einer ungünstigen Prognose korreliert. Bei der chronischen lymphatischen Leukämie vom B-Zelltyp (B-CLL) ist eine Hemmung von Bcl-2 besonders vielversprechend. Die einzige Wirkstoffklasse, die bislang Bcl-2 zu unterdrücken vermochte, sind Oligodesoxyukleotide (ODN). Sogenannte Antisense-ODN binden sequenzspezifisch an die mRNA von Bcl-2 und verhindern dadurch die Synthese des entsprechenden Proteins. Das in Tiermodellen und ersten klinischen Studien wirksamste Antisense-ODN gegen Bcl-2 hat die Bezeichnung G3139. Dieses ODN enthält jedoch in seiner Sequenz zwei CpG-Motive, deren B-Zell-aktivierende und allgemein immunstimulatorischen Effekte erst seit kurzem bekannt sind. CpG-Oligonukleotide führen in Tiermodellen maligner B-Zell-Erkrankungen bereits zu therapeutischen Erfolgen, die auf einer Aktivierung der B-Zellen und einer Modulation des Immunsystems basieren.

Fragestellung

Den Impetus für diese Arbeit lieferte die Hypothese, dass die *in vivo* bei malignen Erkrankungen beobachteten therapeutischen Wirkungen von G3139 weniger auf dem Bcl-2-Antisense-Mechanismus als vielmehr auf den immunmodulatorischen Effekt der CpG-Motive gründeten. In einer malignen B-Zelllinie sollte zunächst das *proof of principle* einer apoptotisch wirksamen Bcl-2-Antisense-Hemmung mit Hilfe eines geeigneten Carriers gezeigt werden. Hierzu mussten zunächst Methoden des Apoptosenachweises etabliert werden. Durch geeignete Kontrollen sollten Antisense-unabhängige Wirkungen von G3139 identifiziert werden, insbesondere CpG-Effekte. In einem kliniknahen Modell mit primären B-CLL-Zellen sollten anschließend CpG-vermittelte Effekte von G3139 auf die Aktivierung und Apoptose der malignen Zellen näher untersucht und mit prognostischen Krankheitsmarkern verglichen werden. Abschließend sollte die Kombination von G3139 und Mitoxantron auf Effekte hinsichtlich der Apoptose untersucht werden.

Material und Methoden

Es wurden Versuche an permanenten Zelllinien (GM697, Daudi JP, DG 75) und primären mononukleären Blutzellen (PBMC) von Patienten mit B-CLL durchgeführt. Das etablierte Apoptosemodell beinhaltete Untersuchungen zur Induktion der Apoptose mit Etoposid oder Mitoxantron sowie Untersuchungen zum Apoptosenachweis durch die durchflusszytometrische Bestimmung von Caspase-3, Annexin V und Propidiumiodid sowie durch die DNA-Gelelektrophorese. Für die Anwendung von ODN wurden die photometrische Quantifizierung und die Transfektion mit den Carriern Lipofektin und ExGen 500 etabliert. In Kooperation mit dem pharmazeutischen Forschungsinstitut Byk Gulden in Konstanz wurde eine RT-PCR zur Quantifizierung der mRNA durchgeführt. Oberflächenmarker und apoptoseassoziierten Proteine wurde mit Hilfe des *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) bestimmt.

Ergebnisse

In der Prä-B-ALL-Zelllinie GM697 konnte eine Antisense-vermittelte Reduktion der Bcl-2-Expression mit Auswirkung auf die spontane Apoptose nachgewiesen werden. Hierzu war jedoch der Einsatz des Carriers Lipofektin notwendig. Zugleich wurden für das ODN G3139 Effekte beobachtet – eine Zunahme der Expression der beiden kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 –, die Antisense-unabhängig und höchstwahrscheinlich CpG-vermittelt waren. Der von Pepper et al. beschriebene Bcl-2-Antisense-Effekt in primären B-Zellen einer chronischen lymphatischen Leukämie konnten nicht reproduziert werden [Pepper, 1999]. Stattdessen führte G3139 zu einer signifikanten Hochregulation der Aktivierungsmarker CD40 und CD80, einer Zunahme von Größe und Granularität der Zellen, einer Induktion von Bcl-x_L sowie einer differenziellen Modulation der Bcl-2-Expression auf mRNA- und Proteinebene: Bei Patienten mit hohen Konzentrationen des ungünstigen Krankheitsmarkers Serum-Thymidinkinase (s-Tk) – er zeigt eine die Proliferationsrate des malignen Klons an – wurde Bcl-2 hochreguliert und die Apoptose gehemmt, bei Patienten mit niedriger s-Tk wurde Bcl-2 jedoch leicht herunterreguliert und die spontane Apoptose verstärkt. Eine ähnliche Korrelation bestand zu dem Prognosemarker Beta-2-Mikroglobulin. Sämtliche Effekte von G3139 wurden in fast identischer Weise von dem CpG-ODN 2006 gezeigt. Die Kombination von G3139 und Mitoxantron führte indes nicht zu einer synergistischen Förderung der Apoptose.

Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit bekräftigt die Hypothese, dass es sich bei G3139 um ein potentes CpG-Oligonukleotid handelt. Erstmals wurden direkte CpG-Effekte auf die Apoptose maligner B-CLL-Zellen gezeigt, die mit klinisch-prognostischen Daten korrelierten. Die Ergebnisse besitzen klinische Relevanz für die Biologie und Behandlung der B-CLL sowie über dieses Krankheitsbild hinaus für den therapeutischen Einsatz von G3139 überhaupt. Damit gehört diese Arbeit einerseits zur pharmakologischen Grundlagenforschung und andererseits zur angewandten Tumorummunologie bzw. onkologischen Therapieforschung.

6. Literaturverzeichnis

- Adams, J.M. and Cory S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, **281**, 1322-6.
- Aderem, A. and Ulevitch R.J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, **406**, 782-7.
- Alexopoulou, L., Holt A.C., Medzhitov R. and Flavell R.A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, **413**, 732-8.
- Aramaki, Y., Takano S. and Tsuchiya S. (1999) Induction of apoptosis in macrophages by cationic liposomes. *FEBS Lett*, **460**, 472-6.
- Auf, G., Carpentier A.F., Chen L., Le Clanche C. and Delattre J.Y. (2001) Implication of macrophages in tumor rejection induced by CpG-oligodeoxynucleotides without antigen. *Clin Cancer Res*, **7**, 3540-3.
- Baldwin, A.S. (2001) Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest*, **107**, 241-6.
- Bauer, M., Heeg K., Wagner H. and Lipford G.B. (1999) DNA activates human immune cells through a CpG sequence-dependent manner. *Immunology*, **97**, 699-705.
- Bellosillo, B., Colomer D., Pons G. and Gil J. (1998) Mitoxantrone, a topoisomerase II inhibitor, induces apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol*, **100**, 142-6.
- Bennett, C.F., Chiang M.Y., Chan H., Shoemaker J.E. and Mirabelli C.K. (1992) Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol*, **41**, 1023-33.
- Bevers, E.M., Comfurius P., Dekkers D.W., Harmsma M. and Zwaal R.F. (1998) Transmembrane phospholipid distribution in blood cells: control mechanisms and pathophysiological significance. *Biol Chem*, **379**, 973-86.
- Binet, J.L., Auquier A., Dighiero G., Chastang C., Piguet H., Goasguen J., Vaugier G., Potron G., Colona P., Oberling F., Thomas M., Tchernia G., Jacquillat C., Boivin P., Lesty C., Duault M.T., Monconduit M., Belabbes S. and Gremy F. (1981) A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, **48**, 198-206.
- Blandino, G. and Strano S. (1997) BCL-2: the pendulum of the cell fate. *J Exp Clin Cancer Res*, **16**, 3-10.
- Boussif, O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B. and Behr J.P. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide

- transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7297-301.
- Bronner, M.P., Culin C., Reed J.C. and Furth E.E. (1995) The bcl-2 proto-oncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model. *Am J Pathol*, **146**, 20-6.
- Brunner, C., Seiderer J., Schlamp A., Bidlingmaier M., Eigler A., Haimerl W., Lehr H.A., Krieg A.M., Hartmann G. and Endres S. (2000) Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J Immunol*, **165**, 6278-86.
- Bui, N.T., Livolsi A., Peyron J.F. and Prehn J.H. (2001) Activation of nuclear factor kappaB and Bcl-x survival gene expression by nerve growth factor requires tyrosine phosphorylation of IkappaBalpha. *J Cell Biol*, **152**, 753-64.
- Bullrich, F., Rasio D., Kitada S., Starostik P., Kipps T., Keating M., Albitar M., Reed J.C. and Croce C.M. (1999) ATM mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*, **59**, 24-7.
- Byrd, J.C., Rai K.R., Sausville E.A. and Grever M.R. (1998) Old and new therapies in chronic lymphocytic leukemia: now is the time for a reassessment of therapeutic goals. *Semin Oncol*, **25**, 65-74.
- Caligaris-Cappio, F. and Hamblin T.J. (1999) B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol*, **17**, 399-408.
- Caligaris-Cappio, F. (2000) Biology of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*, **4**, 5-21.
- Catz, S.D. and Johnson J.L. (2001) Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene*, **20**, 7342-51.
- Chen, C., Edelstein L.C. and Gelinas C. (2000) The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol*, **20**, 2687-95.
- Chi, K.C., Wallis A.E., Lee C.H., De Menezes D.L., Sartor J., Dragowska W.H. and Mayer L.D. (2000) Effects of Bcl-2 modulation with G3139 antisense oligonucleotide on human breast cancer cells are independent of inherent Bcl-2 protein expression. *Breast Cancer Res Treat*, **63**, 199-212.
- Clarke, P.G. and Clarke S. (1996) Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol*, **193**, 81-99.
- Clodi, K., Kliche K.O., Zhao S., Weidner D., Schenk T., Consoli U., Jiang S., Snell V. and Andreeff M. (2000) Cell-surface exposure of phosphatidylserine correlates with the stage of fludarabine-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and expression of apoptosis-

- chronic lymphocytic leukemia and expression of apoptosis-regulating genes. *Cytometry*, **40**, 19-25.
- Coley, W.B. (1911) The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop*, **262**, 3-11.
- Cotter, F.E., Johnson P., Hall P., Pocock C., al Mahdi N., Cowell J.K. and Morgan G. (1994) Antisense oligonucleotides suppress B-cell lymphoma growth in a SCID-hu mouse model. *Oncogene*, **9**, 3049-55.
- Cotter, F.E. (1999) Antisense therapy of hematologic malignancies. *Semin Hematol*, **36**, 9-14.
- Crooke, S.T. (1999) Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta*, **10**, 31-44.
- Crooke, S.T. (2000) Potential roles of antisense technology in cancer chemotherapy. *Oncogene*, **19**, 6651-9.
- Damle, R.N., Wasil T., Fais F., Ghiotto F., Valetto A., Allen S.L., Buchbinder A., Budman D., Dittmar K., Kolitz J., Lichtman S.M., Schulman P., Vinciguerra V.P., Rai K.R., Ferrarini M. and Chiorazzi N. (1999) Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **94**, 1840-7.
- Daugas, E., Nochy D., Ravagnan L., Loeffler M., Susin S.A., Zamzami N. and Kroemer G. (2000) Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett*, **476**, 118-23.
- Davis, H.L., Suparto, II, Weeratna R.R., Jumintarto, Iskandriati D.D., Chamzah S.S., Ma'ruf A.A., Nente C.C., Pawitri D.D., Krieg A.M., Heriyanto, Smits W. and Sajuthi D.D. (2000) CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans. *Vaccine*, **18**, 1920-4.
- Dazzi, F., D'Andrea E., Biasi G., De Silvestro G., Gaidano G., Schena M., Tison T., Vianello F., Girolami A. and Caligaris-Cappio F. (1995) Failure of B cells of chronic lymphocytic leukemia in presenting soluble and alloantigens. *Clin Immunol Immunopathol*, **75**, 26-32.
- Decker, T., Flohr T., Trautmann P., Aman M.J., Holter W., Majdic O., Huber C. and Peschel C. (1995) Role of accessory cells in cytokine production by T cells in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood*, **86**, 1115-23.
- Decker, T., Schneller F., Sparwasser T., Tretter T., Lipford G.B., Wagner H. and Peschel C. (2000) Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, **95**, 999-1006.
- Deveraux, Q.L. and Reed J.C. (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 239-52.

- 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**, 1910-6.
- 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.
- Duggan, B.J., Maxwell P., Kelly J.D., Canning P., Anderson N.H., Keane P.F., Johnston S.R. and Williamson K.E. (2001) The effect of antisense Bcl-2 oligonucleotides on Bcl-2 protein expression and apoptosis in human bladder transitional cell carcinoma. *J Urol*, **166**, 1098-105.
- Dunlap, D.D., Maggi A., Soria M.R. and Monaco L. (1997) Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3095-101.
- 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.
- Eckstein, F. (1985) Nucleoside phosphorothioates. *Annu Rev Biochem*, **54**, 367-402.
- Egeter, O., Mocikat R., Ghoreschi K., Dieckmann A. and Rocken M. (2000) Eradication of disseminated lymphomas with CpG-DNA activated T helper type 1 cells from nontransgenic mice. *Cancer Res*, **60**, 1515-20.
- Emmanouilides, C., Rosen P., Rasti S., Territo M. and Kunkel L. (1998) Treatment of indolent lymphoma with fludarabine/mitoxantrone combination: a phase II trial. *Hematol Oncol*, **16**, 107-16.
- Eris, J.M., Basten A., Brink R., Doherty K., Kehry M.R. and Hodgkin P.D. (1994) Anergic self-reactive B cells present self antigen and respond normally to CD40-dependent T-cell signals but are defective in antigen-receptor-mediated functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 4392-6.
- Fadok, V.A., Laszlo D.J., Noble P.W., Weinstein L., Riches D.W. and Henson P.M. (1993) Particle digestibility is required for induction of the phosphatidylserine recognition mechanism used by murine macrophages to phagocytose apoptotic cells. *J Immunol*, **151**, 4274-85.
- Felgner, P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G.M. and Danielsen M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7413-7.
- Felgner, J. (1993) Cationic lipid-mediated delivery of polynucleotides, *A companion to methods in enzymology*, **5**, 67-75.

- Fennewald, S.M. and Rando R.F. (1995) Inhibition of high affinity basic fibroblast growth factor binding by oligonucleotides. *J Biol Chem*, **270**, 21718-21.
- Ferrari, S., Moro E., Pettenazzo A., Behr J.P., Zacchello F. and Scarpa M. (1997) ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther*, **4**, 1100-6.
- Fields, P.E., Finch R.J., Gray G.S., Zollner R., Thomas J.L., Sturmhoefel K., Lee K., Wolf S., Gajewski T.F. and Fitch F.W. (1998) B7.1 is a quantitatively stronger costimulus than B7.2 in the activation of naive CD8+ TCR-transgenic T cells. *J Immunol*, **161**, 5268-75.
- Filion, M.C. and Phillips N.C. (1997) Anti-inflammatory activity of cationic lipids. *Br J Pharmacol*, **122**, 551-7.
- Finkel, E. (2001) The mitochondrion: is it central to apoptosis? *Science*, **292**, 624-6.
- Foa, R., Massaia M., Cardona S., Tos A.G., Bianchi A., Attisano C., Guarini A., di Celle P.F. and Fierro M.T. (1990) Production of tumor necrosis factor-alpha by B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: a possible regulatory role of TNF in the progression of the disease. *Blood*, **76**, 393-400.
- Forth, W., Henschler D., Rummel W. and Starke K. (1996) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. (7 edn). Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Frasch, S.C., Henson P.M., Kailey J.M., Richter D.A., Janes M.S., Fadok V.A. and Bratton D.L. (2000) Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta. *J Biol Chem*, **275**, 23065-73.
- French, R.R., Chan H.T., Tutt A.L. and Glennie M.J. (1999) CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nat Med*, **5**, 548-53.
- Furman, R.R., Asgary Z., Mascarenhas J.O., Liou H.C. and Schattner E.J. (2000) Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol*, **164**, 2200-6.
- Furuya, Y., Krajewski S., Epstein J.I., Reed J.C. and Isaacs J.T. (1996) Expression of bcl-2 and the progression of human and rodent prostatic cancers. *Clin Cancer Res*, **2**, 389-98.
- Gaidano, G., Ballerini P., Gong J.Z., Inghirami G., Neri A., Newcomb E.W., Magrath I.T., Knowles D.M. and Dalla-Favera R. (1991) p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 5413-7.

-
- Gallichan, W.S., Woolstencroft R.N., Guarasci T., McCluskie M.J., Davis H.L. and Rosenthal K.L. (2001) Intranasal immunization with CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant dramatically increases IgA and protection against herpes simplex virus-2 in the genital tract. *J Immunol*, **166**, 3451-7.
- Gebhart, C.L. and Kabanov A.V. (2001) Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *J Control Release*, **73**, 401-16.
- Gleave, M.E., Miayake H., Goldie J., Nelson C. and Tolcher A. (1999) Targeting bcl-2 gene to delay androgen-independent progression and enhance chemosensitivity in prostate cancer using antisense bcl-2 oligodeoxynucleotides. *Urology*, **54**, 36-46.
- Godbey, W.T., Wu K.K. and Mikos A.G. (1999) Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5177-81.
- Gordon, J. (1995) CD40 and its ligand: central players in B lymphocyte survival, growth, and differentiation. *Blood Rev*, **9**, 53-6.
- Grad, J.M., Zeng X.R. and Boise L.H. (2000) Regulation of Bcl-xL: a little bit of this and a little bit of STAT. *Curr Opin Oncol*, **12**, 543-9.
- Grillo-Lopez, A.J., White C.A., Varns C., Shen D., Wei A., McClure A. and Dalaire B.K. (1999) Overview of the clinical development of rituximab: first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. *Semin Oncol*, **26**, 66-73.
- Hacker, H., Mischak H., Miethke T., Liptay S., Schmid R., Sparwasser T., Heeg K., Lipford G.B. and Wagner H. (1998) CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J*, **17**, 6230-40.
- Hacker, H., Vabulas R.M., Takeuchi O., Hoshino K., Akira S. and Wagner H. (2000) Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med*, **192**, 595-600.
- Hallek, M., Langenmayer, I., Nerl, C., et al. (1999) Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, non-smoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **93**, 1732-37.
- Hallek, M., Schmitt B., Emmerich B. and Stein H. (2001 a) Chronische lymphatische Leukämie. 2. Therapie. *Dtsch Med Wochenschr*, **126**, 690-5.
- Hallek, M., Schmitt B., Emmerich B. and Stein H. (2001 b) Chronische lymphatische Leukämie. 1. Diagnosis. *Dtsch Med Wochenschr*, **126**, 687-9.

-
- Hamblin, T. and Oscier D. (1998) Chronic lymphocytic leukemia. In Whittacker, J. and Holmes, J. (eds), *Leukemia and Associated Diseases*. Blackwell Science, Oxford, pp. 105-135.
- 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**, 1848-54.
- Han, S.S., Chung S.T., Robertson D.A., Chelvarajan R.L. and Bondada S. (1999) CpG oligodeoxynucleotides rescue BKS-2 immature B cell lymphoma from anti-IgM-mediated growth inhibition by up-regulation of egr-1. *Int Immunol*, **11**, 871-9.
- 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**, 1820-8.
- Hande, K.R. (1998) Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer*, **34**, 1514-21.
- Harrison, G.S., Wang Y., Tomczak J., Hogan C., Shpall E.J., Curiel T.J. and Felgner P.L. (1995) Optimization of gene transfer using cationic lipids in cell lines and primary human CD4+ and CD34+ hematopoietic cells. *Bio-techniques*, **19**, 816-23.
- Hartmann, G., Krug A., Waller-Fontaine K. and Endres S. (1996) Oligodeoxynucleotides enhance lipopolysaccharide-stimulated synthesis of tumor necrosis factor: dependence on phosphorothioate modification and reversal by heparin. *Mol Med*, **2**, 429-38.
- Hartmann, G., Bidlingmaier M., Tschöp K., Eigler A., Hacker U. and Endres S. (1998 a) Antisense Oligonukleotide: Nukleinsäuren zur gezielten Synthesehemmung krankheitsfördernder Proteine. *Dt. Ärzteblatt*, **95**, C-1115-1119.
- Hartmann, G., Krug A., Bidlingmaier M., Hacker U., Eigler A., Albrecht R., Strasburger C.J. and Endres S. (1998 b) Spontaneous and cationic lipid-mediated uptake of antisense oligonucleotides in human monocytes and lymphocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, **285**, 920-8.
- Hartmann, G., Weeratna R.D., Ballas Z.K., Payette P., Blackwell S., Suparto I., Rasmussen W.L., Waldschmidt M., Sajuthi D., Purcell R.H., Davis H.L. and Krieg A.M. (2000 a) Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol*, **164**, 1617-24.
- Hartmann, G. and Krieg A.M. (2000 b) Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol*, **164**, 944-53.

-
- Hayashi, F., Smith K.D., Ozinsky A., Hawn T.R., Yi E.C., Goodlett D.R., Eng J.K., Akira S., Underhill D.M. and Aderem A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, **410**, 1099-103.
- Heckelsmiller, K., Rall K., Beck S., Schlamp A., Seiderer J., Jahrsdorfer B., Krug A., Rothenfusser S., Endres S. and Hartmann G. (2002) Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model. *J Immunol*, **169**, 3892-9.
- Hemmi, H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K. and Akira S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, **408**, 740-5.
- Hengartner, M.O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**, 770-6.
- Hockenbery, D.M., Zutter M., Hickey W., Nahm M. and Korsmeyer S.J. (1991) BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 6961-5.
- Hoffmann, J.A., Kafatos F.C., Janeway C.A. and Ezekowitz R.A. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, **284**, 1313-8.
- Huang, D.C., O'Reilly L.A., Strasser A. and Cory S. (1997) The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *EMBO J*, **16**, 4628-38.
- Ibrahim, S., Keating, M., Do, K.A., et al. (2001) CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **98**, 181-6.
- Jahrsdörfer, B., Hartmann G., Racila E., Jackson W., Mühlhoff L., Meinhardt G., Endres S., Link B.K., Krieg A.M. and Weiner G.J. (2001) CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leukoc Biol*, **69**, 81-8.
- Jahrsdörfer, B., Jox R., Mühlhoff L., Endres S. and Hartmann G. (2002) Modulation of malignant B cell activation and apoptosis by bcl-2 antisense ODN and immunostimulatory CpG ODN. *J Leukoc Biol*, **72**, 83-92.
- Janeway, C. (1999) *Immunobiology: the immune system in health and disease* (4 edn). Current Biology Publications, Elsevier Sciences London, London, New York.
- Jansen, B., Schlagbauer-Wadl H., Brown B.D., Bryan R.N., van Elsas A., Muller M., Wolff K., Eichler H.G. and Pehamberger H. (1998) bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice. *Nat Med*, **4**, 232-4.

- Jansen, B., Wacheck V., Heere-Ress E., Schlagbauer-Wadl H., Hoeller C., Lucas T., Hoermann M., Hollenstein U., Wolff K. and Pehamberger H. (2000) Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. *Lancet*, **356**, 1728-33.
- Jones, T.R., Obaldia N., 3rd, Gramzinski R.A. and Hoffman S.L. (2000) Repeated infection of Aotus monkeys with Plasmodium falciparum induces protection against subsequent challenge with homologous and heterologous strains of parasite. *Am J Trop Med Hyg*, **62**, 675-80.
- Jonveaux, P., Hillion J., Bennaceur A.L., d'Agay M.F., Brice P., Daniel M.T., Sigaux F. and Berger R. (1992) t(14;18) and bcl-2 gene rearrangement in a B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, **81**, 620-1.
- Julien, T., Frankel B., Longo S., Kyle M., Gibson S., Shillitoe E. and Ryken T. (2000) Antisense-mediated inhibition of the bcl-2 gene induces apoptosis in human malignant glioma. *Surg Neurol* 2000 Apr, **53**, 360-8.
- Kantor, A.B. (1991) The development and repertoire of B-1 cells (CD5 B cells). *Immunol Today*, **12**, 389-91.
- Karlin, S., Ladunga I. and Blaisdell B.E. (1994) Heterogeneity of genomes: measures and values. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12837-41.
- Kasibhatla, S., Genestier L. and Green D.R. (1999) Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. *J Biol Chem*, **274**, 987-92.
- Kato, K., Cantwell M.J., Sharma S. and Kipps T.J. (1998) Gene transfer of CD40-ligand induces autologous immune recognition of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest*, **101**, 1133-41.
- Kaufmann, S.H. and Earnshaw W.C. (2000) Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res*, **256**, 42-9.
- Keith, F.J., Bradbury D.A., Zhu Y.M. and Russell N.H. (1995) Inhibition of bcl-2 with antisense oligonucleotides induces apoptosis and increases the sensitivity of AML blasts to Ara-C. *Leukemia*, **9**, 131-8.
- 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**, 239-57.
- Kichler, A., Leborgne C., Coeytaux E. and Danos O. (2001) Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J Gene Med*, **3**, 135-44.
- Kim, H.J., Greenleaf J.F., Kinnick R.R., Bronk J.T. and Bolander M.E. (1996) Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. *Hum Gene Ther*, **7**, 1339-46.
- Kim, S.K., Ragupathi G., Musselli C., Choi S.J., Park Y.S. and Livingston P.O. (1999) Comparison of the effect of different immunological adjuvants on

- the antibody and T-cell response to immunization with MUC1-KLH and GD3-KLH conjugate cancer vaccines. *Vaccine*, **18**, 597-603.
- Kline, J.N., Waldschmidt T.J., Businga T.R., Lemish J.E., Weinstock J.V., Thorne P.S. and Krieg A.M. (1998) Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol*, **160**, 2555-9.
- Kolb, J.P., Roman V., Mentz F., Zhao H., Rouillard D., Dugas N., Dugas B. and Sigaux F. (2001) Contribution of nitric oxide to the apoptotic process in human B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma*, **40**, 243-57.
- Kothakota, S., Azuma T., Reinhard C., Klippel A., Tang J., Chu K., McGarry T.J., Kirschner M.W., Kohts K., Kwiatkowski D.J. and Williams L.T. (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*, **278**, 294-8.
- Koty, P.P., Zhang H. and Levitt M.L. (1999) Antisense bcl-2 treatment increases programmed cell death in non-small cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer*, **23**, 115-27.
- 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**, 4701-14.
- Krieg, A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A. and Klinman D.M. (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, **374**, 546-9.
- Krieg, A.M., Love-Homan L., Yi A.K. and Harty J.T. (1998) CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol*, **161**, 2428-34.
- Krieg, A.M. and Wagner H. (2000) Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA. *Immunol Today*, **21**, 521-6.
- Kronenwett, R., Steidl U., Kirsch M., Sczakiel G. and Haas R. (1998) Oligodeoxyribonucleotide uptake in primary human hematopoietic cells is enhanced by cationic lipids and depends on the hematopoietic cell subset. *Blood*, **91**, 852-62.
- Krug, A. and Hartmann G. (2001 a) Gezielte Modulation des Immunsystems mit CpG-Oligonukleotiden. *Dtsch Med Wochenschr*, **126**, 1002-4.
- Krug, A., Rothenfusser S., Hornung V., Jahrsdorfer B., Blackwell S., Ballas Z.K., Endres S., Krieg A.M. and Hartmann G. (2001 b) Identification of CpG o-

- ligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*, **31**, 2154-63.
- Krug, A., Towarowski A., Britsch S., Rothenfusser S., Hornung V., Bals R., Giese T., Engelmann H., Endres S., Krieg A.M. and Hartmann G. (2001 c) Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol*, **31**, 3026-37.
- Kurland, J.F., Kodym R., Story M.D., Spurgers K.B., McDonnell T.J. and Meyn R.E. (2001) NF-kappaB1 (p50) homodimers contribute to transcription of the bcl-2 oncogene. *J Biol Chem*, **276**, 45380-6.
- Lasic, D.D. and Papahadjopoulos D. (1995) Liposomes revisited. *Science*, **267**, 1275-6.
- Lauer, U., Burgelt E., Squire Z., Messmer K., Hofschneider P.H., Gregor M. and Delius M. (1997) Shock wave permeabilization as a new gene transfer method. *Gene Ther*, **4**, 710-5.
- Laytragoon-Lewin, N., Kashuba V., Mellstedt H. and Klein G. (1998) bcl-2 rearrangement detected by pulsed-field gel electrophoresis (PFGF) in B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Int J Cancer*, **76**, 909-12.
- Lazaridou, A., Miraxtsi C., Korantzis J., Eleftheriadis N. and Christakis J.I. (2000) Simultaneous detection of BCL-2 protein, trisomy 12, retinoblastoma and P53 monoallelic gene deletions in B-cell chronic lymphocytic leukemia by fluorescence in situ hybridization (FISH): relation to disease status. *Leuk Lymphoma*, **36**, 503-12.
- Lazebnik, Y.A., Kaufmann S.H., Desnoyers S., Poirier G.G. and Earnshaw W.C. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, **371**, 346-7.
- Lebedeva, I. and Stein C.A. (2001) Antisense oligonucleotides: promise and reality. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **41**, 403-19.
- Levin, A.A. (1999) A review of the issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta*, **10**, 69-84.
- Li, L.Y., Luo X. and Wang X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, **412**, 95-9.
- Liang, H., Nishioka Y., Reich C.F., Pisetsky D.S. and Lipsky P.E. (1996) Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *J Clin Invest*, **98**, 1119-29.
- Macfarlane, D.E. and Manzel L. (1998) Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol*, **160**, 1122-31.

- Mann, M.J., Gibbons G.H., Hutchinson H., Poston R.S., Hoyt E.G., Robbins R.C. and Dzau V.J. (1999) Pressure-mediated oligonucleotide transfection of rat and human cardiovascular tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6411-6.
- Manzel, L. and Macfarlane D.E. (1999) Lack of immune stimulation by immobilized CpG-oligodeoxynucleotide. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **9**, 459-64.
- 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**, 1545-56.
- Maulik, N., Sasaki H. and Galang N. (1999) Differential regulation of apoptosis by ischemia-reperfusion and ischemic adaptation. *Ann N Y Acad Sci*, **874**, 401-11.
- McDonnell, T.J., Deane N., Platt F.M., Nunez G., Jaeger U., McKearn J.P. and Korsmeyer S.J. (1989) bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*, **57**, 79-88.
- Medzhitov, R. and Janeway C.A., Jr. (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*, **9**, 4-9.
- Medzhitov, R. (2001) CpG DNA: security code for host defense. *Nat Immunol*, **2**, 15-6.
- Melino, G. (2001) The Sirens' song. *Nature*, **412**, 23.
- Merup, M., Spasokoukotskaja T., Einhorn S., Smith C.I., Gahrton G. and Juliusson G. (1996) Bcl-2 rearrangements with breakpoints in both vcr and mbr in non-Hodgkin's lymphomas and chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, **92**, 647-52.
- Miyake, H., Tolcher A. and Gleave M.E. (2000) Chemosensitization and delayed androgen-independent recurrence of prostate cancer with the use of antisense Bcl-2 oligodeoxynucleotides. *J Natl Cancer Inst*, **92**, 34-41.
- Miyashita, T. and Reed J.C. (1993) Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood*, **81**, 151-7.
- Motoyama, N., Wang F., Roth K.A., Sawa H., Nakayama K., Negishi I., Senju S., Zhang Q., Fujii S. and et al. (1995) Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science*, **267**, 1506-10.
- Mutschler, E. (2001) *Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. (8 edn). Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart.

- Nishioka, Y. and Lipsky P.E. (1994) The role of CD40-CD40 ligand interaction in human T cell-B cell collaboration. *J Immunol*, **153**, 1027-36.
- Nunez, G., Hockenbery D., McDonnell T.J., Sorensen C.M. and Korsmeyer S.J. (1991) Bcl-2 maintains B cell memory. *Nature*, **353**, 71-3.
- O'Connor, L. and Strasser A. (1999) The Bcl-2 protein family. *Results Probl Cell Differ*, **23**, 173-207.
- Osorio, L.M. and Aguilar-Santelises M. (1998) Apoptosis in B-chronic lymphocytic leukaemia. *Med Oncol*, **15**, 234-40.
- Ouaaz, F., Li M. and Beg A.A. (1999) A critical role for the RelA subunit of nuclear factor kappaB in regulation of multiple immune-response genes and in Fas-induced cell death. *J Exp Med*, **189**, 999-1004.
- Parrish, J., Li L., Klotz K., Ledwich D., Wang X. and Xue D. (2001) Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature*, **412**, 90-4.
- Parronchi, P., Brugnolo F., Annunziato F., Manuelli C., Sampognaro S., Mavilia C., Romagnani S. and Maggi E. (1999) Phosphorothioate oligodeoxynucleotides promote the in vitro development of human allergen-specific CD4+ T cells into Th1 effectors. *J Immunol*, **163**, 5946-53.
- Pepper, C., Thomas A., Hoy T., Cotter F. and Bentley P. (1999) Antisense-mediated suppression of Bcl-2 highlights its pivotal role in failed apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, **107**, 611-5.
- Perez, J.R., Li Y., Stein C.A., Majumder S., van Oorschot A. and Narayanan R. (1994) Sequence-independent induction of Sp1 transcription factor activity by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5957-61.
- Pigault, C., Follenius-Wund A., Schmutz M., Freyssinet J.M. and Brisson A. (1994) Formation of two-dimensional arrays of annexin V on phosphatidylserine-containing liposomes. *J Mol Biol*, **236**, 199-208.
- Ramirez, S.H., Sanchez J.F., Dimitri C.A., Gelbard H.A., Dewhurst S. and Maggirwar S.B. (2001) Neurotrophins prevent HIV Tat-induced neuronal apoptosis via a nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-dependent mechanism. *J Neurochem*, **78**, 874-89.
- Ranheim, E.A. and Kipps T.J. (1995) Tumor necrosis factor-alpha facilitates induction of CD80 (B7-1) and CD54 on human B cells by activated T cells: complex regulation by IL-4, IL-10, and CD40L. *Cell Immunol*, **161**, 226-35.
- Reed, J.C., Stein C., Subasinghe C., Haldar S., Croce C.M., Yum S. and Cohen J. (1990) Antisense-mediated inhibition of BCL2 protooncogene expression and leukemic cell growth and survival: comparisons of phosphodi-

- ester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Cancer Res*, **50**, 6565-70.
- Reed, J.C. (1995) Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr Opin Oncol*, **7**, 541-6.
- Rockwell, P., O'Connor W.J., King K., Goldstein N.I., Zhang L.M. and Stein C.A. (1997) Cell-surface perturbations of the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor receptors by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6523-8.
- Romano, M.F., Lamberti A., Turco M.C. and Venuta S. (2000) CD40 and B chronic lymphocytic leukemia cell response to fludarabine: the influence of NF-kappaB/Rel transcription factors on chemotherapy-induced apoptosis. *Leuk Lymphoma*, **36**, 255-62.
- Rudel, T. and Bokoch G.M. (1997) Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science*, **276**, 1571-4.
- Schattner, E.J., Elkon K.B., Yoo D.H., Tumang J., Krammer P.H., Crow M.K. and Friedman S.M. (1995) CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway. *J Exp Med*, **182**, 1557-65.
- Schena, M., Larsson L.G., Gottardi D., Gaidano G., Carlsson M., Nilsson K. and Caligaris-Cappio F. (1992) Growth- and differentiation-associated expression of bcl-2 in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, **79**, 2981-9.
- Schiavone, N., Rosini P., Quattrone A., Donnini M., Lapucci A., Citti L., Bevilacqua A., Nicolin A. and Capaccioli S. (2000) A conserved AU-rich element in the 3' untranslated region of bcl-2 mRNA is endowed with a destabilizing function that is involved in bcl-2 down-regulation during apoptosis. *FASEB J*, **14**, 174-84.
- Schlagbauer-Wadl, H., Klosner G., Heere-Ress E., Waltering S., Moll I., Wolff K., Pehamberger H. and Jansen B. (2000) Bcl-2 antisense oligonucleotides (G3139) inhibit Merkel cell carcinoma growth in SCID mice. *J Invest Dermatol*, **114**, 725-30.
- Schulz, H., Winkler U., Staak J.O. and Engert A. (2000) The Monoclonal Antibodies Campath-1H and Rituximab in the Therapy of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Onkologie*, **23**, 526-532.
- 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**, 483-7.

- Smith, M.R., Abubakr Y., Mohammad R., Xie T., Hamdan M. and al-Katib A. (1995) Antisense oligodeoxyribonucleotide down-regulation of bcl-2 gene expression inhibits growth of the low-grade non-Hodgkin's lymphoma cell line WSU-FSCCL. *Cancer Gene Ther*, **2**, 207-12.
- Sohur, U.S., Dixit M.N., Chen C.L., Byrom M.W. and Kerr L.A. (1999) Rel/NF-kappaB represses bcl-2 transcription in pro-B lymphocytes. *Gene Expr*, **8**, 219-29.
- Sohur, U.S., Chen C.L., Hicks D.J., Yull F.E. and Kerr L.D. (2000) Nuclear factor-kappaB/Rel is apoptogenic in cytokine withdrawal-induced programmed cell death. *Cancer Res*, **60**, 1202-5.
- Stacey, K.J., Sweet M.J. and Hume D.A. (1996) Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol*, **157**, 2116-22.
- Stein, C.A. and Cheng Y.C. (1993) Antisense oligonucleotides as therapeutic agents--is the bullet really magical? *Science*, **261**, 1004-12.
- Stein, C.A. (1998) How to design an antisense oligodeoxynucleotide experiment: a consensus approach. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **8**, 129-32.
- Strasser, A., Harris A.W., Bath M.L. and Cory S. (1990) Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature*, **348**, 331-3.
- Susin, S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebbersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M. and Kroemer G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**, 441-6.
- Takeshita, F., Leifer C.A., Gursel I., Ishii K.J., Takeshita S., Gursel M. and Klinman D.M. (2001) Cutting edge: role of toll-like receptor 9 in cpg dna-induced activation of human cells. *J Immunol*, **167**, 3555-8.
- Tamm, I., Dorken B. and Hartmann G. (2001) Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea? *Lancet*, **358**, 489-97.
- Thompson, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**, 1456-62.
- Tokunaga, T., Yamamoto H., Shimada S., Abe H., Fukuda T., Fujisawa Y., Furutani Y., Yano O., Kataoka T., Sudo T. and et al. (1984) Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst*, **72**, 955-62.
- Tschoep, K., Hartmann G., Jox R., Thompson S., Eigler A., Krug A., Erhardt S., Adams G., Endres S. and Delius M. (2001) Shock waves: a novel method

- for cytoplasmic delivery of antisense oligonucleotides. *J Mol Med*, **79**, 306-13.
- 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**, 1097-9.
- Tsujimoto, Y. and Croce C.M. (1986) Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 5214-8.
- Tzima, E., Trotter P.J., Orchard M.A. and Walker J.H. (1999) Annexin V binds to the actin-based cytoskeleton at the plasma membrane of activated platelets. *Exp Cell Res*, **251**, 185-93.
- Vabulas, R.M., Pircher H., Lipford G.B., Hacker H. and Wagner H. (2000) CpG-DNA activates in vivo T cell epitope presenting dendritic cells to trigger protective antiviral cytotoxic T cell responses. *J Immunol*, **164**, 2372-8.
- Vairo, G., Soos T.J., Upton T.M., Zalvide J., DeCaprio J.A., Ewen M.E., Koff A. and Adams J.M. (2000) Bcl-2 retards cell cycle entry through p27(Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation. *Mol Cell Biol*, **20**, 4745-53.
- Van den Hove, L.E., Van Gool S.W., Vandenberghe P., Bakkus M., Thielemans K., Boogaerts M.A. and Ceuppens J.L. (1997) CD40 triggering of chronic lymphocytic leukemia B cells results in efficient alloantigen presentation and cytotoxic T lymphocyte induction by up-regulation of CD80 and CD86 costimulatory molecules. *Leukemia*, **11**, 572-80.
- Weis, D.J., Sorenson C.M., Shutter J.R. and Korsmeyer S.J. (1993) Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*, **75**, 229-40.
- 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.
- Wacheck, V., Heere-Ress E., Halaschek-Wiener J., Lucas T., Meyer H., Eichler H.G. and Jansen B. (2001) Bcl-2 antisense oligonucleotides chemosensitize human gastric cancer in a SCID mouse xenotransplantation model. *J Mol Med*, **79**, 587-93.
- Walder, R.Y. and Walder J.A. (1988) Role of RNase H in hybrid-arrested translation by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 5011-5.
- Walker, P.R. and Sikorska M. (1997) New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis. *Biochem Cell Biol*, **75**, 287-99.

- Walker, P.S., Scharon-Kersten T., Krieg A.M., Love-Homan L., Rowton E.D., Udey M.C. and Vogel J.C. (1999) Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- and IFN-gamma-dependent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6970-5.
- Warzocha, K. (1999) Antisense strategy in hematological malignancies. *Cytokines Cell Mol Ther*, **5**, 15-23.
- Waters, J.S., Webb A., Cunningham D., Clarke P.A., Raynaud F., di Stefano F. and Cotter F.E. (2000) Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, **18**, 1812-23.
- Weaver, J.C. (1993) Electroporation: a general phenomenon for manipulating cells and tissues. *J Cell Biochem*, **51**, 426-35.
- Webb, A., Cunningham D., Cotter F., Clarke P.A., di Stefano F., Ross P., Corbo M. and Dziewanowska Z. (1997) BCL-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*, **349**, 1137-41.
- Weiner, G.J., Liu H.M., Wooldridge J.E., Dahle C.E. and Krieg A.M. (1997) Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10833-7.
- Wierda, W.G., Cantwell M.J., Woods S.J., Rassenti L.Z., Prussak C.E. and Kipps T.J. (2000) CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **96**, 2917-24.
- Wooldridge, J.E., Ballas Z., Krieg A.M. and Weiner G.J. (1997) Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma. *Blood*, **89**, 2994-8.
- Wolf, T.M., Melton D.A. and Jennings C.G. (1992) Specificity of antisense oligonucleotides in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 7305-9.
- Wortis, H.H. and Berland R. (2001) Cutting edge commentary: origins of B-1 cells. *J Immunol*, **166**, 2163-6.
- Wu, M., Arsura M., Bellas R.E., FitzGerald M.J., Lee H., Schauer S.L., Sherr D.H. and Sonenshein G.E. (1996) Inhibition of c-myc expression induces apoptosis of WEHI 231 murine B cells. *Mol Cell Biol*, **16**, 5015-25.
- Wu-Pong, S. (2000) Alternative interpretations of the oligonucleotide transport literature: insights from nature. *Adv Drug Deliv Rev*, **44**, 59-70.
- Wyllie, A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **284**, 555-6.
- Yamamoto, S., Yamamoto T., Shimada S., Kuramoto E., Yano O., Kataoka T. and Tokunaga T. (1992) DNA from bacteria, but not from vertebrates, in-

- duces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol*, **36**, 983-97.
- Yamamoto, T., Yamamoto S., Kataoka T., Komuro K., Kohase M. and Tokunaga T. (1994) Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Jpn J Cancer Res*, **85**, 775-9.
- Yang, E. and Korsmeyer S.J. (1996) Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood*, **88**, 386-401.
- Yi, A.K., Hornbeck P., Lafrenz D.E. and Krieg A.M. (1996) CpG DNA rescue of murine B lymphoma cells from anti-IgM-induced growth arrest and programmed cell death is associated with increased expression of c-myc and bcl-xL. *J Immunol*, **157**, 4918-25.
- Yi, A.K., Chang M., Peckham D.W., Krieg A.M. and Ashman R.F. (1998) CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J Immunol*, **160**, 5898-906.
- Yi, A.K., Peckham D.W., Ashman R.F. and Krieg A.M. (1999) CpG DNA rescues B cells from apoptosis by activating NFkappaB and preventing mitochondrial membrane potential disruption via a chloroquine-sensitive pathway. *Int Immunol*, **11**, 2015-24.
- Zangemeister-Wittke, U., Schenker T., Luedke G.H. and Stahel R.A. (1998) Synergistic cytotoxicity of bcl-2 antisense oligodeoxynucleotides and etoposide, doxorubicin and cisplatin on small-cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer*, **78**, 1035-42.
- Zhang, J., Alter N., Reed J.C., Borner C., Obeid L.M. and Hannun Y.A. (1996) Bcl-2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5325-8.
- Zhou, Q., Zhao J., Stout J.G., Luhm R.A., Wiedmer T. and Sims P.J. (1997) Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *J Biol Chem*, **272**, 18240-4.
- Ziegler, A., Luedke G.H., Fabbro D., Altmann K.H., Stahel R.A. and Zangemeister-Wittke U. (1997) Induction of apoptosis in small-cell lung cancer cells by an antisense oligodeoxynucleotide targeting the Bcl-2 coding sequence. *J Natl Cancer Inst*, **89**, 1027-36.
- Zutter, M., Hockenbery D., Silverman G.A. and Korsmeyer S.J. (1991) Immunolocalization of the Bcl-2 protein within hematopoietic neoplasms. *Blood*, **78**, 1062-8.

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

Abb. (6*)	Abbildung
AIDS (110)	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>
AIF (5)	<i>Apoptosis activating factor</i>
AML (11)	Akute myeloische Leukämie
ALL (48)	Akute lymphatische Leukämie
Apaf-1 (6)	<i>Apoptosis activating protease-1</i>
APC (16)	<i>Antigen presenting cell</i>
aPTT (109)	<i>Activated partial thromboplastin time</i>
ARE (107)	<i>Adenin and uracil rich elements</i>
ATP (5)	Adenosintriphosphat
Bp (37)	Basenpaare
BCG (25)	<i>Bacille Calmette-Guérin</i>
Bcl-2 (1)	<i>B cell lymphoma/leukemia-2</i>
B-CLL (9)	Chronische lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp
Bcl-x _L (5)	Lange Splice-Variante von Bcl-x
bFGF (100)	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BH (7)	Bcl-2-homologe Domäne
β ₂ M (14)	Beta-2-Mikroglobulin
BRD (33)	Bundesrepublik Deutschland
CD (3)	<i>Cluster of differentiation</i>
CLL (9)	Chronische lymphatische Leukämie
CMV (110)	Zytomegalievirus
CMVIE2 (110)	<i>Cytomegalovirus immediate early gene-2</i>
cFLIP (6)	<i>Cellular FLICE like inhibiting protein</i>
CpG (1)	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
CpG-ODN (25)	CpG-Motive enthaltende Oligodesoxynukleotide
CS (38)	Chemische Struktur
CTL (28)	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
DIABLO (5)	<i>Direct IAP binding protein with low pI (= Smac)</i>
DNA (3)	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DOPE (91)	Dioleylphosphatidylethanolamin
DOTMA (91)	N-(1-(2,3-Dioleloxy)propyl)-n,n,n-Trimethylammoniumchlorid
DSMZ (33)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ED ₅₀ (74)	Dosis mit halbmaximalem Effekt
EDTA (36)	Ethylendiamintetraacetat

* Seitenzahl der erstmaligen Erwähnung

EGFR (100)	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
Endo G (6)	Endonuklease G
ERK (30)	<i>Extracellular receptor kinase</i>
FACS (35)	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FasL (5)	Fas ligand
FCS (33)	<i>Fetal calf serum</i>
FI (50)	Fluoreszenzintensität
FITC (35)	Fluoresceinisothiocyanat
Hb (14)	Hämoglobin
HIV (9)	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HLA (33)	<i>Human leukocyte antigen</i>
hnRNA (19)	Heterogene nukleäre Ribonukleinsäure
IAP (5)	<i>Inhibitor of apoptosis protein</i>
ICAM-1 (27)	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN (27)	Interferon
Ig (28)	Immunglobulin
I κ B (30)	<i>Inhibitor of NF-κB</i>
IKK (30)	I κ B-Kinase-Komplex
IL (27)	Interleukin
iNOS (107)	<i>Inducible NO synthase</i>
IRAK (30)	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
JNK (30)	<i>C-Jun N-terminal kinase</i>
kb (37)	Kilobase
kDa (10)	Kilodalton
LF (41)	Lipofektin
LPS (26)	Lipopolysaccharid
MDC (27)	Myeloide dendritische Zelle
Min (35)	Minuten
MIX (82)	Mitoxantron
MLR (102)	<i>Mixed lymphocyte reaction</i>
mRNA (1)	<i>Messenger RNA</i>
MyD88 (30)	<i>Myeloid differentiation marker 88</i>
NF- κ B (30)	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NHL (32)	Non-Hodgkin-Lymphome
NK (28)	Natürliche Killerzellen
NO (106)	<i>Nitric oxide</i> , Stickstoffmonoxid
NSCLC (110)	<i>Non-small cell lung cancer</i>
ODN (1)	Oligodesoxynukleotid
ODN-FITC (38)	Oligodesoxynukleotid markiert durch Fluoresceinisothiocyanat

PAK 2 (4)	<i>P21-activated kinase</i>
PAMP (29)	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PBMC (27)	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS (35)	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDC (27)	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE (35)	Phycoerhythin
PEI (92)	Polyethylenimin
PI (35)	Propidiumiodid
PKC α (110)	Proteinkinase C alpha
PKR (30)	Doppelstrang-RNA-aktivierte Proteinkinase
PRR (29)	<i>pattern recognition receptor</i>
PS (86)	Phosphatidylserin
PT (38)	Phosphorothioat
resp. (64)	respektive
RNA (19)	Ribonukleinsäure
Rpm (36)	<i>Rounds per minute</i>
RT-PCR (44)	<i>Real time polymerase chain reaction</i>
SCID (109)	<i>Severe combined immunodeficiency syndrome</i>
SCLC (110)	<i>Small cell lung cancer</i>
SDS (36)	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEM (46)	<i>Standard error of means</i>
slg (16)	<i>Surface immunoglobulins</i>
Smac (5)	<i>Second mitochondria-derived activator of caspases (= DIABLO)</i>
Tab. (3)	Tabelle
TIR (30)	<i>Toll receptor IL-1-receptor domain</i>
TIRAP (30)	<i>TIR domain-containing adapter protein</i>
TLR (29)	<i>Toll-like receptors</i>
TNF (4)	Tumornekrosefaktor
TRAF (30)	<i>TNF--receptor-associated factor</i>
USA (33)	<i>United States of America</i>
VDAC (7)	<i>Voltage dependent anion channel</i>
VEGFR (101)	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
XIAP (103)	<i>X chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan Endres für die fachliche und persönliche Unterstützung sowie die Möglichkeit, in der ebenso engagierten wie freundschaftlichen Atmosphäre der Abteilung zu forschen und die Ergebnisse auf Kongressen und in wissenschaftlichen Zeitschriften zu präsentieren.

Ich danke Herrn PD Dr. Gunther Hartmann für die klare Konzeption, den wissenschaftlichen Rat und die Motivation.

Ich danke Frau Dr. Katharina Tschöp für die methodische Anleitung, die Korrektur der Dissertation und ihre wertvolle Hilfe im allgemeinen.

Ich danke allen Laborkollegen, die mich bereitwillig und tatkräftig unterstützten, allen voran Lars Mühlenhoff, Dr. Bernd Jahrsdörfer und Dr. Britta Siegmund.

Ich danke den wissenschaftlichen Kooperationspartnern in der hämatologisch-onkologischen Abteilung des Klinikums Innenstadt in München (Dr. Gerold Meinhardt und Prof. Dr. Berthold Emmerich), an der University of Iowa (Prof. Dr. Arthur M. Krieg) sowie in den Unternehmen Coley Pharmaceutical Group (Wellesley, Massachusetts) und Byk Gulden (Konstanz).

Ich danke der Studienstiftung des deutschen Volkes für ihre materielle und idelle Unterstützung während der Promotions- und Studienzeit.

Ich danke allen, die das Manuskript korrigierten, neben oben genannten Personen insbesondere Thilo Stephan und Markus Jox.

Ich danke Rainer Jox, Ingrid Jox, Markus Jox und Lucia Bodyová für ihre unschätzbare Hilfe.

Publikationen

ORIGINALARTIKEL:

Tschoep, K., Hartmann, G., **Jox, R.**, Thompson, S., Eigler, A., Krug, A., Erhardt, S., Adams, G., Endres, S. and Delius, M. (2001) Shock waves: a novel method for cytoplasmic delivery of antisense oligonucleotides. *J Mol Med*, **79**, 306-13.

Jahrsdörfer, B., **Jox, R. (contributed equally)**, Mühlenhoff, L., Endres, S. and Hartmann, G. (2002) Modulation of malignant B cell activation and apoptosis by bcl-2 antisense ODN and immunostimulatory CpG ODN. *J Leukoc Biol*, **72**, 83-92.

ABSTRACTS & POSTER:

Jox, R., Tschoep, K., Jahrsdörfer, B., Mühlenhoff L. and Hartmann, G. (2000) Immunostimulation and Apoptosis Modulation of B-CLL cells by Anti-bcl-2-Oligonucleotide G3139. Posterpräsentation auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin April/Mai 2000, Wiesbaden.

Jox, R., Jahrsdörfer, B., Mühlenhoff, L., Tschöp, K., Endres, S., Meinhardt, G. und Hartmann, G., Modulation of spontaneous and chemotherapy-induced apoptosis in B-CLL by bcl-2 antisense ODN and immunostimulatory CpG ODN. Posterpräsentation auf dem "Joint Annual Meeting of Immunology of the German and Dutch Societies" (Dgfl, NVvI), November/Dezember 2000, Düsseldorf.

VORTRAG:

„Wirkung CpG-haltiger Oligonukleotide auf primäre B-CLL Zellen“, Fortbildungsveranstaltung aller klinisch-experimentellen Forschungsgruppen an der Medizinischen Klinik Innenstadt, Klinikum der LMU, Mai 2000, München.

Curriculum vitae

PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Ralf Jürgen Jox
 Geburtsdaten: 09.07.1974 in Weingarten (Württemberg)
 Nationalität: deutsch

SCHULBILDUNG:

1981 – 1983 Grundschule Oberstadt Weingarten
 1983 – 1985 Grundschule St. Konrad Ravensburg
 1985 – 1994 Freies Katholisches Gymnasium St. Konrad Ravensburg
 1994 Abitur (1,0)

ZIVILDienst:

1994 – 1995 Mobiler Sozialer Hilfsdienst der Caritas e.V. in Weingarten

HOCHSCHULAUSBILDUNG:

:

1995-1998 Studium der Medizin an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
 1998-2002 Studium der Medizin an der LMU München
 2001-2002 Praktisches Jahr (Innere Medizin, Neurologie, Chirurgie) am
 Beth Israel Deaconess Medical Center, Mt. Auburn Hospital,
 Brigham and Women's Hospital, Massachusetts General Hospi-
 tal (alle Harvard Medical School, Boston), Neurologische Klinik
 München-Großhadern, Krankenhaus München-Harlaching
 2002 Ärztlichen Prüfung, München (1,66)
 1999-2001 Studium der Philosophie an der Hochschule für Philosophie
 München (Abschluss Bakkalaureat 1,6)
 2002-2003 MA in Medical Ethics & Law, King's College London

STIPENDIEN:

1998-1999 Stipendium des Cusanuswerk e.V.
 1999-2003 Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes
 2001 Stipendium der Munich-Harvard-Alliance for Medical Education
 2002-2003 Postgraduierten-Stipendien der Studienstiftung des deutschen
 Volkes und des britischen Arts and Humanities Research Board