

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Spezifische Phosphodiesterase Typ-4-Inhibitoren:
Apoptoseinduktion bei chronischer lymphatischer
B-Zell Leukämie**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julia Pauline Welsch

aus München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. S. Endres
Mitberichterstatter:	PD Dr. med. H. Schmetzer Prof. Dr. med. C. Nerl
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. B. Siegmund und PD Dr. med. A. Eigler
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	14.10.2004

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	VII
1. Einleitung und Fragestellung	1
1.1. Chronische lymphatische B-Zell Leukämie (B-CLL)	1
1.1.1. Überblick zur B-CLL	1
1.1.2. Diagnostik im Rahmen der B-CLL.....	2
1.1.3. Biologie der B-CLL	3
1.1.4. Klinische Stadieneinteilung	5
1.1.5. Therapie der B-CLL.....	7
1.2. Zyklisches Adenosin-3',5'- Monophosphat (cAMP)	11
1.3. PDE-Inhibitoren	14
1.3.1. Zyklische Nukleotid-Phosphodiesterasen.....	14
1.3.2. Rolipram, ein selektiver PDE-Typ-4-Inhibitor	16
1.4. Interleukin-10 (IL-10)	16
1.4.1. IL-10 in der Pathogenese der B-CLL.....	18
1.5. Apoptose.....	19
1.5.1. Historisches und die physiologische Bedeutung der Apoptose ...	19
1.5.2. Morphologie der Apoptose	21
1.5.3. Caspasen	22
1.6. Bcl-2 Familie	23
1.6.1. Entdeckung und Einteilung.....	23
1.6.2. Wirkung und Funktion	25
1.6.3. Dysregulation der Bcl-2-Familie bei B-CLL	26
1.7. Ziele der Arbeit	28

2. Material und Methoden	29
2.1. Geräte.....	29
2.2. Labormaterial.....	29
2.2.1. Fotomaterial	30
2.2.2. Materialien für die Zellkultur	30
2.2.3. Puffer, Lösungen und Medien	31
2.2.4. Antikörper.....	32
2.2.5. Patienten.....	33
2.3. Substanzen.....	34
2.3.1. Fludarabin (Fludara®, Schering).....	34
2.3.2. Mitoxantron (Novantron®, Lederle).....	35
2.3.3. Enoximon (Perfan, Myogen).....	36
2.3.4. Rolipram (Schering)	36
2.3.5. Pan-Caspase Inhibitor.....	37
2.3.6. Lipopolysaccharid (LPS; E.coli 055:B5, Sigma)	37
2.4. Zellulär – Immunologische Methoden	38
2.4.1. Zellkultur.....	38
2.4.2. Konzentrationsbestimmung von IL-10 mittels ELISA	39
2.4.3. Caspase 3-Aktivitätsbestimmung.....	39
2.4.4. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	40
2.5. Molekularbiologische Methoden.....	43
2.5.1. Nachweis von DNA-Fragmentation	43
2.5.2. Transfer von Protein aus Tris-HCl-Gelen auf PVDF-Membranen (Western-Blot)	45
2.6. Statistik	47

3. Ergebnisse	49
3.1. Apoptoseinduktion durch spezifische PDE-Inhibitoren.....	49
3.1.1. Apoptoseinduktion durch den PDE-Typ-4-Inhibitor Rolipram	49
3.1.2. Apoptoseinduktion durch den PDE-Typ-3-Inhibitor Enoximon	49
3.2. Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika	50
3.2.1. Apoptoseinduktion durch das Purinanalogon Fludarabin	50
3.2.2. Apoptoseinduktion durch das Antrachinon-Derivat Mitoxantron..	51
3.3. Apoptoseinduktion durch die Kombination von PDE-Typ-4-Inhibitoren und Chemotherapeutika.....	52
3.3.1. Wirkung der Kombination von Rolipram und Fludarabin auf B-CLL-Zellen	52
3.3.2. Wirkung der Kombination von Rolipram und Mitoxantron auf B-CLL-Zellen	54
3.4. Nachweis der Rolipram-induzierten Apoptose durch DNA-Fragmentation	55
3.5. Rolle von IL-10 in Bezug auf die Rolipram-induzierte Apoptose .	56
3.5.1. Messung der IL-10-Konzentration nach Inkubation mit Rolipram	56
3.5.2. Wirkung eines IL-10 neutralisierenden Antikörpers auf die Rolipram-induzierte Apoptose	58
3.6. Rolle der Caspasen in Bezug auf die Rolipram-induzierte Apoptose.....	59
3.6.1. Wirkung des Pan-Caspase Inhibitors z-VAD-fmk auf die Rolipram-induzierte Apoptose	59
3.6.2. Bestimmung der Caspase-3-Aktivität unter Rolipram und z-VAD-fmk	60

3.7. Veränderung verschiedener Mitglieder der Bcl-2-Familie im Rahmen der Rolipram- und Fludarabin-induzierten Apoptose	62
3.7.1. Veränderung der Bcl-2/Bax-Ratio unter Rolipram und Fludarabin	62
3.7.2. Suppression des anti-apoptotischen Bcl-X unter Rolipram.....	64
4. Diskussion	66
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	66
4.2. Diskussion der Methoden.....	67
4.2.1. B-CLL-Zellen in vitro.....	67
4.2.2. Messung der Apoptose	68
4.3. Bewertung der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur	69
4.3.1. cAMP-induzierte Apoptose.....	69
4.3.2. Die Rolle von IL-10 im Rahmen der B-CLL	71
4.3.3. Die Rolle der Caspasen im Rahmen der B-CLL.....	73
4.3.4. Die Rolle der Bcl-2 Familie im Rahmen der B-CLL	73
4.4. Klinische Relevanz.....	75
4.4.1. Rolipram (PDE-Typ-4-Inhibitoren) in klinischen Studien	75
4.4.2. Fludarabin in klinischen Studien.....	77
4.4.3. Mitoxantron in klinischen Studien.....	78
5. Zusammenfassung.....	81
6. Literatur.....	83
Danksagung	121
Veröffentlichungen.....	122
Lebenslauf.....	123

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BH	<i>Bcl</i> –homologe
B-CLL	chronische lymphatische B-Zell Leukämie
BMR	Bendamustin, Mitoxantron und Rituximab
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-Mono-Phosphat
CAP	Cyclophosphamid, Doxorubicin und Prednison
CD	“Cluster of differentiation”
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-Mono-Phosphat
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison
CMC	Cladribin, Mitoxantron und Cyclophosphamid
CO ₂	Kohlendioxid
CSIF	“cytokine-synthesis inhibitory factor”
dbcAMP	Dibutyryl cAMP
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	“enhanced chemiluminescence”
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	“enzyme-linked immuno sorbent assay”
FACS	“fluorescence activated cell sorter”
FCS	fötales Kälberserum
FDB	Fludarabin
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FSC	“forward scatter“
<i>g</i>	Zentripetalbeschleunigung der Erde
g	“goat“, (Ziege)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
G-Proteine	Guanin bindende Proteine
h	Stunde

HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N´-(2-Ethanoesulfonsäure)
HRP	“Horseradishperoxidase“
HSA	humanes Serumalbumin
IC ₅₀	“inhibitory concentration“, Konzentration, die zu einer 50 %igen Suppression führt
ICE	“Interleukin-1β-converting enzyme“
I.E.	internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
IFN-γ	Interferon gamma
IL-2	Interleukin-2
IL-10	Interleukin-10
kDa	Kilodalton
LC ₅₀	halbe lethale Konzentration
LFA-1	Lymphozyten-Funktion-assoziiertes-Antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid
m	murin
MFI	“mean fluorescence intensity“
MG	Molekulargewicht
min	Minute
mini-CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison
mRNS	“messenger“ Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NCI	“National Cancer Institute“
NHL	Non-Hodgkin-Lymphome
p	statistische Wahrscheinlichkeitskonstante
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBMC	“peripheral blood mononuclear cells“, mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut
PBS	“phosphat-buffered saline“
PDE	zyklische Nukleotid-Phosphodiesterase
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PI	Propidium-Iodid
PKA	Proteinkinase A
PVDF	“Polyvinylidene fluoride“
ra	Ratte

rb	Kaninchen
RNAse	Ribonuklease
RpcAMPS	Rp-adenosine-3',5'-cyclic phosphorothioate
s	Schaf
SDS	“sodium dodecyl sulfate“
SEM	“standard error of mean“
SSC	“sideward scatter“
TAE	Tris-Azetat/EDTA-Elektrophorese-Puffer
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TRAIL	“TNF-related apoptosis-inducing ligand“
TRAMP	“TNF receptor-related apoptosis-mediated protein“
UV	Ultraviolett
z-VAD-fmk	Carbobenzoxy-Valyl-Alanyl-Aspartyl-[O-methyl]- Fluoromethylketon

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Chronische lymphatische B-Zell Leukämie (B-CLL)

1.1.1. Überblick zur B-CLL

Die B-CLL ist, mit 25 % aller Leukämien, die Häufigste des Erwachsenenalters in der westlichen Hemisphäre (Linnet et al. 1988), mit einer jährlichen Inzidenzrate von 3 bis 5 Fällen pro 100.000 Einwohner. In Japan und anderen asiatischen Ländern hingegen ist sie äußerst selten (Nishiyama et al. 1969). Die Ätiologie der B-CLL ist unklar. Es konnte jedoch eine familiäre Prädisposition nachgewiesen werden. Von 29 CLL-Patienten hatten 34 % Verwandte ersten Grades mit einer hämatologischen Systemerkrankung, sowie 10 % Verwandte, die selbst an CLL erkrankt waren (Cuttner 1992; Capalbo et al. 2000). Der Einfluss von Umweltfaktoren, wie ionisierende Strahlung, Chemikalien oder Viren hingegen, konnte nicht sicher mit der Pathogenese der Erkrankung assoziiert werden (Hjelle et al. 1991; Inskip et al. 1993).

Die B-CLL ist charakterisiert durch die progressive Akkumulation von langlebigen, funktionell inaktiven, neoplastischen B-Zellen, von denen ein Großteil sich in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus befindet. Die klonale Expansion ist primär durch einen Defekt im Ablauf des programmierten Zelltodes verursacht. Die B-CLL wird daher eher den lymphoakkumulativen, als den lymphoproliferativen Erkrankungen zugeordnet.

Bei der B-CLL handelt es sich um eine Erkrankung des höheren Erwachsenenalters, das durchschnittliche Diagnosealter liegt bei ca. 60 Jahren. Der Anteil der Patienten, bei denen die Diagnose vor dem 55. Lebensjahr gestellt wird, liegt bei lediglich 10-15 % (Catovsky et al. 1995; O'Brien et al. 1995). Bei Männern wird die Diagnose B-CLL zwei- bis dreimal häufiger gestellt als bei Frauen (Montserrat et al. 1995; Pangalis et al. 1999). Bis heute bleibt die B-CLL eine Erkrankung, die einerseits durch eine lange mittlere Überlebensdauer gekennzeichnet ist (Dighiero et al. 1991; Rozman et al. 1995), andererseits jedoch immer noch als unheilbar gilt.

1.1.2. Diagnostik im Rahmen der B-CLL

Die Diagnose der B-CLL basiert auf den Kriterien des *National Cancer Institute* (NCI) (Cheson et al. 1996): (1) absolute Lymphozytose ($> 5 \times 10^9/l$) mit überwiegend morphologisch reifen Lymphozyten im peripheren Blut und $< 55\%$ Prolymphozyten; (2) Expression von mindestens einem B-Zell Marker (Cluster of Differentiation [CD]19, CD20, CD23) in Kombination mit CD5, kein Nachweis von Pan-T-Zell Markern und eine Leichtketten-Restriktion (kappa oder lambda) als Ausdruck ihrer Monoklonalität.

Im Rahmen der Diagnostik bei B-CLL sollten folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

Anamnese: Der Großteil der Patienten ist zum Diagnosezeitpunkt asymptomatisch (Karmiris et al. 1994; de Lima et al. 1998). Lediglich 15 % der Patienten zeigen eine B-Symptomatik mit Nachtschweiß, Gewichtsverlust und Abgeschlagenheit.

Körperliche Untersuchung: Bei 50-60 % lassen sich körperliche Veränderungen meist in Form einer Lymphadenopathie feststellen.

Blutbild/Ausstrich: Eine Lymphozytose mit Werten bis $30 \times 10^9/l$ findet sich bei ca. 60 % der B-CLL-Patienten (Dighiero et al. 1991), jedoch werden auch Werte weit über $100 \times 10^9/l$ beobachtet. Zum Diagnosezeitpunkt finden sich lediglich bei 10-15 % der Patienten eine Anämie ($< 11 \text{ g/dl}$) und bei 10 % eine Thrombozytopenie ($< 100 \times 10^9$). Im Blutausstrich finden sich bei der B-CLL typische kleine Lymphozyten mit einem schmalen Zytoplasmarand, dichten Kernen mit reifem, verklumptem Chromatin. Prolymphozyten finden sich gelegentlich, selten jedoch mehr als 10 %. Besonders typisch sind auch Gumprechtsche Kernschatten, die regelmäßig in Blutausstrichen zu finden sind und Zelltrümmer darstellen.

Knochenmark: Das Knochenmark ist bei der B-CLL immer befallen. In den meisten Fällen verläuft das Ausmaß der Knochenmarksinfiltration proportional zum Krankheitsprozess (Pangalis et al. 1984; Rozman et al. 1984; Pangalis et al. 1987). Das Befallsmuster wird in vier Gruppen unterteilt: Ein nodulärer Befall, der mit der besten Prognose einhergeht, findet sich bei ca. 7 %. Ein

interstitielles Muster findet sich in 34 %, ein gemischtes Muster bei 24 % und ein diffuser Befall, mit der schlechtesten Prognose bei 35 % (Han et al. 1984).

Histologie vergrößerter Lymphknoten: Die Histologie gewinnt besondere Bedeutung in Fällen, bei denen die genaue Diagnosestellung schwierig ist. Sie ermöglicht eine zusätzliche Sicherheit in der Abgrenzung zu B-CLL ähnlichen Erkrankungen, wie dem Immunozytom, dem Mantelzelllymphom und dem Marginalzelllymphom. Für die B-CLL ist ein histologisches Bild mit aufgehobener Lymphknotenarchitektur, dem Verlust von Keimzentren und der Verlegung der Sinus durch kleine lymphatische Zellen typisch (Pangalis et al. 1977).

Leber/Milzhistologie: Das typische histologische Bild des Milzbefalls ist die Infiltration der weißen Pulpa. Die rote Pulpa kann ebenfalls befallen sein, in diesen Fällen kommt es meist zu einem Hypersplenismus. Ein Leberbefall zeigt sich meist durch lymphozytische Infiltrate im Bereich der Portalfelder (Praz et al. 1984).

1.1.3. Biologie der B-CLL

Es handelt sich um eine Erkrankung, bei der die Inhibition des programmierten Zelltodes, und somit ein verlängertes Überleben der B-Zellen, im Vordergrund steht (Jurlander 1998; Reed 1998; Soderberg 1998). Molekulare Defekte, wie die Überexpression von *Bcl*-Familienmitgliedern und die Aberration des *p53* Tumorsuppressorgenes, aber auch chromosomale Veränderungen wie die Trisomie 12, die 13q14-Deletion, die 11q-Deletion und die 17q-Deletion wurden beschrieben.

Zytogenetik. Der Nachweis chromosomaler Aberrationen wird heutzutage mittels der Interphasenzytogenetik (Fluoreszenz in situ Hybridisierung, FISH, [Lichter et al. 1990]) durchgeführt, die im Gegensatz zur klassischen Chromosomenanalyse einen Nachweis unabhängig vom Zellzyklus ermöglicht. Bei B-CLL-Patienten lassen sich so in über 80 % der Fälle Aberrationen nachweisen (Tabelle 1; Dohner et al. 2000). Chromosomale Translokationen sind jedoch im Vergleich zu anderen B-Zell Neoplasien selten. Von den

bekanntesten Aberrationen haben die Deletion 11q und 17p die schlechtesten Prognosen, im Vergleich zu Patienten mit normalem Karyotyp oder Deletion 13q. Patienten mit einer 11q-Deletion zeigen auch klinisch ausgeprägte Symptome, so besteht oft eine sehr ausgeprägte Lymphadenopathie und eine B-Symptomatik. Die Deletion 17q- geht mit Aberration des Tumor-Suppressorgenes *p53* einher. Dabei handelt sich um das am häufigsten mutierte Gen bei menschlichen Krebsformen, das bis heute bekannt ist. Das *P53*-Gen spielt eine wichtige Rolle in der Zellzyklusregulation und gilt als einer der sichersten Marker für Chemoresistenz (Hollstein et al. 1991; Levine et al. 1991). Mutationen des *p53*-Genes finden sich relativ häufig bei B-CLL-Patienten (10-20 %). Im Verlauf der Erkrankung nimmt die Häufigkeit zu und deutet somit auf einen aggressiveren Verlauf und eine zunehmende Resistenz gegenüber Alkylantien und Purin-Analoga hin (Fenaux et al. 1992; Wattel et al. 1994; Dohner et al. 1995; Cordone et al. 1998).

Tabelle 1. Interphasen-Zytogenetik (FISH; Dohner et al. 1999).

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

Die häufigste Deletion ist am langen Arm des Chromosom 13, bei der es zu einem Verlust der 13q14 Bande kommt. Das dort liegende Tumorsuppressorgen wurde jedoch bislang nicht eindeutig charakterisiert (Kalachikov et al. 1997). Diese Deletion findet sich ebenfalls häufig bei anderen Neoplasien, wie z.B. beim Multiplen Myelom, sowie bei unterschiedlichen Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL). Unter den Patienten mit chromosomalen Aberrationen finden sich bei 65 % eine, bei 25 % zwei und bei ca. 10 % drei oder mehr Aberrationen (Dohner et al. 2000). Dohner und Kollegen

untersuchten 343 CLL-Patienten und unterteilen diese in zwei genetisch definierte prognostische Gruppen, eine Niedrig- und eine Hochrisikogruppe (Tabelle 2).

Tabelle 2. Genetisch definierte prognostische Gruppe (Dohner et al. 1999).

Risikogruppe		Karyotyp/Aberration
Niedriges Risiko	oder oder	13q- 6q- normaler Karyotyp
Hochrisiko	oder	11q- 17q-

Adhäsionsmoleküle. Um die Verschiedenheit der klinischen Manifestationen der B-CLL besser zu verstehen, wurden Adhäsionsmoleküle auf den Lymphozyten eingehend untersucht (Angelopoulou et al. 1999). Bei Patienten mit ausgeprägter Lymphozytose lässt sich meist L-Selektin auf den B-CLL-Zellen nachweisen. Typischerweise besteht bei diesen Patienten nur eine geringe Gewebeteilung. Ebenfalls häufig wird CD44 (Eistere et al. 1996), Lymphozyten-Funktion-assoziiertes-Antigen-1 (LFA-1) und CD11c exprimiert, bei gleichzeitigem Fehlen von CD54 (De Rossi et al. 1993; Domingo et al. 1997; Lucio et al. 1998). Bei Patienten mit Milzbefall findet sich oft eine hohe Expression von CD11c, CD11a, CD18 in Abwesenheit von L-Selektin (Pangalis et al. 2002), während eine kurze Lymphozytenverdopplungszeit und starke Lymphadenopathie mit sehr niedriger Expression aller Adhäsionsmoleküle, mit Ausnahme von CD44, einhergeht (Angelopoulou et al. 1999).

1.1.4. Klinische Stadieneinteilung

Der Krankheitsverlauf der B-CLL kann sehr unterschiedlich sein. Die mittlere Überlebenszeit variiert abhängig von Stadium und Diagnosezeitpunkt zwischen zwei bis über 20 Jahren. Die Stadieneinteilung nach Rai (Tabelle 3; Rai et al.

1975; Cheson et al. 1996) und Binet (Tabelle 4; Binet et al. 1981) gehören bislang zu den Standardklassifikationen der CLL, anhand derer Prognoseabschätzungen und Therapieplanungen durchgeführt werden. Sie beruhen auf Beobachtungen, dass im frühen Krankheitsverlauf vor allem die zunehmende Tumormasse und in fortgeschrittenen Stadien das Ausmaß der Knochenmarksinfiltration die Prognose bestimmt. Die Tatsache, dass heutzutage zunehmend Patienten in frühen Stadien diagnostiziert werden, bei denen die Prognose sehr inhomogen ist, macht zusätzliche Prognosefaktoren notwendig, um indolente Frühformen von solchen mit rascher Progredienz zu unterscheiden (Hallek et al. 1997; Zwiebel et al. 1998).

Als besonders günstige Verlaufsform hat sich die "smouldering" B-CLL herausgestellt, die durch ein noduläres Knochenmarksinfiltrationsmuster, einen Hb > 12 g/dl, eine absolute Lymphozytenzahl < 30.000/ μ l und eine Lymphozytenverdopplungszeit > 12 Monate charakterisiert ist.

Tabelle 3. Rai Klassifikation der B-CLL (Rai et al. 1975).

Stadium	Definition	Medianes Überleben
Niedriges Risiko 0	Lymphozytose > 15 000/mm ³ KM-Infiltration > 40 %	> 10 Jahre
Intermediäres Risiko I II	Lymphozytose und Lymphadenopathie Lymphozytose und Hepatomegalie und/oder Splenomegalie mit/ohne Lymphadenopathie	7 Jahre
Hochrisiko III	Lymphozytose und Anämie (Hb < 11g/dl) mit/ohne Lymphadenopathie und/oder Organomegalie	2 - 3,5 Jahre
IV	Lymphozytose und Thrombozytopenie < 100.000/mm ³ mit/ohne Anämie, Lymphadenopathie, Organomegalie	

Tabelle 4. Binet Klassifikation der B-CLL (Binet et al. 1981).

Stadium	Definition	Medianes Überleben
Niedriges Risiko A	Hb > 10 g/dl Thrombozytenzahl normal < 3 vergrößerte Lymphknotenregionen ^a	> 10 Jahre
Intermediäres Risiko B	Hb > 10 g/dl Thrombozytenzahl normal ≥ 3 vergrößerte Lymphknotenregionen ^a	7 Jahre
Hochrisiko C	Hb < 10 g/dl und/oder Thrombozytenzahl < 100.000 x 10 ⁹ /l Unabhängig von der Zahl der Regionen ^a	2 - 3,5 Jahre

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

1.1.5. Therapie der B-CLL

Die Indikation zum Therapiebeginn der B-CLL orientiert sich am Stadium der Erkrankung, den Symptomen und der Krankheitsaktivität. Für die genaue Beurteilbarkeit, ob eine Therapie im jeweiligen Krankheitsstadium sinnvoll ist, hat das NCI eine Kriterienliste erstellt (Tabelle 5; Cheson et al. 1996). Zur Beurteilung des Therapieerfolges werden klinische und hämatologische Kriterien eingesetzt, die die Unterscheidung zwischen partieller und kompletter Remission sowie fortschreitender Erkrankung ermöglichen (Tabelle 6; Cheson et al. 1996).

Tabelle 5. Kriterien des NCI für den Therapiebeginn bei B-CLL.

-
- (1) Mindestens eines der folgenden Symptome:
 - (a) Gewichtsverlust $\geq 10\%$ innerhalb der letzten 6 Monate
 - (b) ausgeprägte Müdigkeit
 - (c) Fieber $> 38\text{ °C}$ für ≥ 2 Wochen ohne Anhalt für eine Infektion
 - (d) Nachtschweiß ohne Anhalt für eine Infektion
 - (2) Zunehmende KM-Infiltration mit Entwicklung/Verschlechterung von Anämie und Thrombozytopenie
 - (3) Autoimmunhämolytische Anämie/Thrombozytopenie ohne Ansprechen auf Steroide
 - (4) massive/progressive Splenomegalie
 - (5) massive/progressive Lymphknotenvergrößerung
 - (6) progressive Lymphozytose mit Verdopplungszeit < 6 Monaten
 - (7) Hypogammaglobulinämie
-

Tabelle 6. NCI Kriterien zur Beurteilung des Ansprechens auf Therapie.

Parameter	komplette Remission (CR)*	partielle Remission (PR) ⁺	progressive Erkrankung (PD) [°]
(1) <u>körperliche Symptome</u>	keine	NS	NS
(2) <u>körperliche Untersuchung</u>			
(a) Lymphadenopathie	keine	$\geq 50\%$ Rückgang	$\geq 50\%$ Zunahme
(b) Leber/Milz	nicht tastbar	$\geq 50\%$ Rückgang	$\geq 50\%$ Zunahme
(3) <u>Blutbild</u>			
(a) Lymphozyten ($\times 10^9/l$)	≤ 5	$\geq 50\%$ Rückgang	$\geq 50\%$ Zunahme
(b) Hb (g/dl)	< 11	> 11 oder $> 50\%$ Zunahme	NS
(c) Neutrophile ($\times 10^9/l$)	$\geq 1,5$	$\geq 1,5$ oder $> 50\%$ Zunahme	NS
(d) Thrombozyten	> 100	> 100 oder $> 50\%$ Zunahme	NS
(4) <u>Knochenmark</u>	$< 30\%$	NS	NS
(5) <u>andere</u>	-	-	RS, PLL

NS (not stated), PLL (Prolymphozytenleukämie), RS (Richter Syndrom)

* alle Kriterien müssen über mindesten 2 Monate erfüllt sein.

⁺ Kriterien 1, 2 und 3a plus mindestens eins aus 3b, 3c, oder 3d, für mindestens 2 Monate

[°] Mindestens eines der Kriterien muss erfüllt sein.

In den frühen Stadien (Binet A und Rai 0 bis 2) hat sich bei Patienten ohne Krankheitssymptome die "watch and wait" Strategie durchgesetzt (Dighiero et al. 1998), bei der die Patienten ohne Therapie in regelmäßigen Zeitabständen untersucht werden. Diese Gruppe mit niedrigem Risiko, zu der fast zwei Drittel der B-CLL-Patienten gehören, hat ein mittleres Alter von 64 Jahren und eine Lebenserwartung von 10 Jahren, was in etwa der Lebenserwartung gesunder Menschen, gleichen Geschlechts und Alters, entspricht (Dighiero et al. 1998; 1999). Welcher der Patienten eine Progression der Erkrankung bekommen wird, lässt sich bis heute jedoch auch mit Hilfe der Binet und Rai Klassifikation nur schwer vorhersagen. Andere Faktoren wie das Serum β -2-Mikroglobulin, die Laktatdehydrogenase oder die lösliche CD23 Konzentration (ein B-Zell Membranprotein) ermöglichen eine Beurteilung der Krankheitsaktivität, jedoch haben sich die zytogenetischen Aberrationen als bessere Indikatoren für den Verlauf der Erkrankung erwiesen (Damle et al. 1999; Hamblin et al. 1999). Dies lässt vermuten, dass man zwei verschiedene B-CLL-Arten unterscheiden kann, zum einen die, die aus relativ undifferenzierten (immunologisch naiven) B-Zellen hervorgeht und eine schlechte Prognose hat zum anderen die, die aus differenzierteren (memory) B-Zellen hervorgeht und durch eine gute Prognose gekennzeichnet ist. Wie sich die zwei verschiedenen Gruppen bezüglich frühzeitiger Therapie und Beeinflussung der Prognose verhalten, ist unklar (Cheson et al. 1996). Bei Patienten in späten Stadien (Binet B und C und Rai III und IV), sowie Patienten in frühen Stadien (Rai I und II) mit Progression, die eine Lebenserwartung von sieben oder weniger Jahren haben, sollte ein Therapiebeginn in Betracht gezogen werden.

Unter den möglichen chemotherapeutischen Substanzen ist Chlorambucil, das *per os* eingenommen wird, das am besten Verträgliche und mit Abstand Günstigste. Fludarabin, ein Purin-Analogon, erzielt höhere Ansprechraten, bei deutlich höherer Myelotoxizität, stärkerer CD4⁺-Reduktion und höherem Preis. Die Kombinationschemotherapien Cyclophosphamid, Doxorubicin und Prednison (CAP) und Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison (mini-CHOP) erzeugen ebenfalls starke Nebenwirkungen. Hierzu gehören die Alopezie, Übelkeit, Erbrechen und starke Kardiotoxizität. Keine der genannten Therapien führt zu einer Heilung.

Verschiedene Studien haben die unterschiedlichen Schemata miteinander verglichen. Eine große Langzeit-Multicenter-Studie verglich Chlorambucil mit Fludarabin bei 509 Patienten mit unbehandelter, fortgeschrittener B-CLL. Hierbei zeigte Fludarabin eine deutlich höhere Ansprechrate, eine längere Remissionsphase und ein längeres progressionsfreies Überleben. Das Überleben insgesamt konnte jedoch weder durch Chlorambucil noch durch Fludarabin verlängert werden (Rai et al. 2000). Eine andere große Studie untersucht 938 B-CLL-Patienten in den Binet Stadien B und C, die bis zu dem Zeitpunkt keine Chemotherapie erhalten hatten. Hier wurde Fludarabin mit den zwei Kombinationsschemata verglichen. Die Ansprechraten und das progressionsfreie Überleben waren hier für Fludarabin und mini-CHOP ähnlich, während CAP jeweils schlechter abschnitt. Eine andere große europäische Studie, in der Fludarabin mit CAP verglichen wurde, kam zu ähnlichen Ergebnissen (Johnson et al. 1996).

Eine Meta-Analyse aus 10 randomisierten Studien, bei denen 2035 Patienten mit fortgeschrittener B-CLL eingeschlossen waren, die mit unterschiedlichen Schemata behandelt wurden, zeigte, dass bei keiner der Therapien eine Erhöhung der Ansprechrate mit einer Verlängerung des Überlebens assoziiert ist (1999). Diese Tatsache wurde auch schon bei anderen chronischen, lymphoproliferativen Erkrankungen beobachtet.

Intensivere Therapien werden zur Zeit in verschiedenen Studien untersucht, ihr Ziel ist eine molekulare Remission (kein Nachweis molekularer Marker des malignen Zellklons nach Therapie). Zu diesen Therapieformen gehören die autologe Knochenmarkstransplantation sowie die Kombination aus Chemotherapie mit monoklonalen Antikörpern (anti-CD20, anti-CD52; Byrd et al. 2000). Bei einigen Patienten kann durch eine solch intensive Therapie eine langfristige molekulare Remission erreicht werden. Ob es sich dabei um eine Verzögerung des Rückfalls oder um eine Heilung handelt, ist unbekannt. Die konventionelle Knochenmarkstransplantation stellt eine andere mögliche kurative Option dar, sie kommt jedoch nur für knapp 10 % aller B-CLL-Patienten in Frage und ist mit einer Mortalitätsrate von bis zu 40 % assoziiert.

Empfehlungen zur Therapie sehen für frühe Stadien (Binet A) die "watch and wait"-Strategie vor. Für Patienten in höheren Stadien sowie mit Progression, sollte, wenn sie unter 65 Jahre alt sind, eine der intensiveren Therapien ausgewählt werden. Bei Patienten über 65 Jahre und mit Begleiterkrankungen ist das Mittel der ersten Wahl nach wie vor Chlorambucil. Für Patienten, die in dieses Schema nicht eingeordnet werden können, kann die First-line-Therapie sowohl aus Chlorambucil aber auch aus mini-CHOP oder Fludarabin bestehen. Generell ist Fludarabin das Mittel der Wahl bei Patienten mit einer Chlorambucil refraktären B-CLL (Sorensen et al. 1997).

1.2. Zyklisches Adenosin-3',5'- Monophosphat (cAMP)

Extrazelluläre Signale, die durch Hormonbindung an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche vermittelt werden, gelangen zur zellulären Antwort durch verschiedene Systeme sekundärer Botenstoffe, den sogenannten "second messengern".

Im Jahre 1957 wurde cAMP als einer der ersten zellulären Botenstoffe durch den amerikanischen Physiologen Earl Wilbur Sutherland entdeckt, der dafür im Jahre 1971 den Medizinnobelpreis erhielt. Einige Jahre später wurde von Walsh und Kollegen beschrieben, dass die meisten der cAMP-vermittelten Signale durch die cAMP-abhängige Proteinkinase weitergeleitet werden (Walsh et al. 1968). Viele bekannte Hormone, wie z.B. Glukagon, Vasopressin, Adrenalin und Acetylcholin, vermitteln ihre spezifische Wirkung auf die Zielzellen durch cAMP-abhängige Systeme. Diese Hormone binden an membranständige Rezeptoren, die dadurch aktiviert werden. Diese Rezeptoren sind wiederum gekoppelt an stimulierende Guanin-bindende Proteine (G-Proteine), die aus drei Untereinheiten (α , β , γ) bestehen (Abbildung 1). Die α -Untereinheit kann eine inaktive GDP-gebundene oder eine aktive GTP-gebundene Form annehmen. Durch die Hormonbindung kommt es in dieser Untereinheit zur Aktivierung und somit zum Austausch von GDP zu GTP. Daraufhin dissoziiert die α -Untereinheit vom restlichen G-Proteinkomplex und geht eine Bindung mit der Adenylatcyclase ein. Diese wird dadurch aktiviert und wandelt somit Adenosintriphosphat (ATP) durch Pyrophosphatabspaltung und Ringbildung zwischen dem 3. C-Atom der Ribose und dem Phosphatrest in cAMP um. Die

Aktivierung der Adenylatcyclase wird durch die Hydrolyse von GTP zu GDP, durch die GTPase-Aktivität der G- α -Untereinheit, wieder aufgehoben (Gilman 1984; Schramm et al. 1984). Die Deaktivierung durch Hydrolyse von cAMP zu Adenosinmonophosphat (AMP) wird durch die zyklische Nukleotid-Phosphodiesterasen (PDE) vermittelt. Der intrazelluläre cAMP-Spiegel wird somit durch das Gleichgewicht zwischen Adenylatcyclase und PDE-Aktivität bestimmt (McKnight 1991; Tang et al. 1992; Beavo et al. 1994).

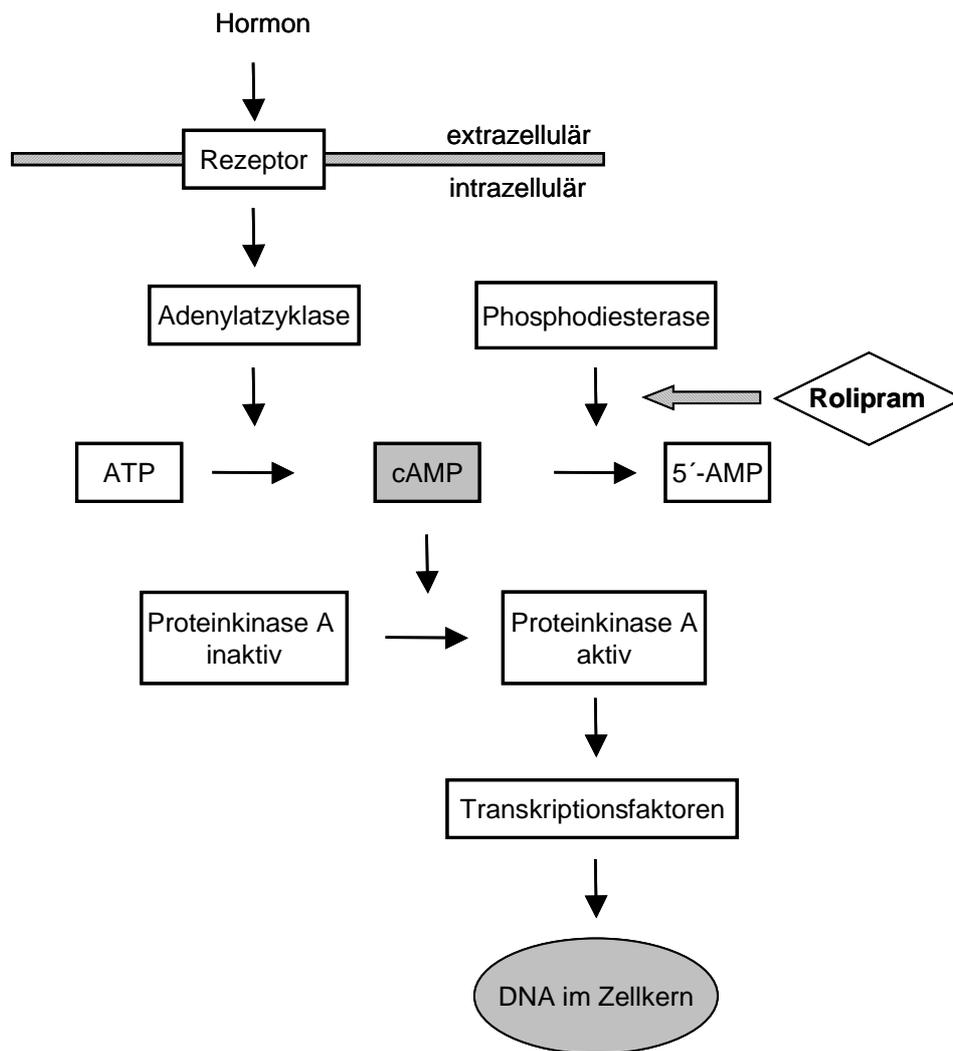


Abbildung 1. Ablauf der Signaltransduktion vom membranständigen Rezeptor bis zur Desoxyribonukleinsäure (DNA) im Zellkern. ATP steht für Adenosin-Tri-Phosphat, 5'-AMP für 5'-Adenosin-Mono-Phosphat. Der spezifische PDE-Typ-4-Inhibitor Rolipram hemmt den cAMP-Abbau über die Hemmung der PDE.

Ein Großteil der cAMP-vermittelten Signale werden durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), durch Phosphorylierung zellulärer Proteine, weitergeleitet (Williams et al. 1968; Taylor et al. 1990). Die Proteinkinasen phosphorylieren in einer ATP-abhängigen Reaktion die OH-Gruppen von Serin-, Threonin-, und Thyrosin-Seitenketten in Proteinen. Die Proteinkinasen sind dimere Enzyme, die aus zwei verschiedenen Untereinheiten bestehen. Die eine Untereinheit dient als Bindungsstelle für das cAMP, während die andere die

katalytische Aktivität trägt. Die PKA liegt in Abwesenheit von cAMP als Dimer vor und ist enzymatisch inaktiv. Nach der Bindung von cAMP dissoziiert die katalytische Einheit ab und kann nun als enzymatisch aktives Monomer Proteine phosphorylieren (Kemp et al. 1977).

1.3. PDE-Inhibitoren

In vivo-Beobachtungen bei einzelnen B-CLL-Patienten deuteten darauf hin, dass durch die Gabe von unspezifischen PDE-Inhibitoren (z.B. Theophyllin) die Progression der Erkrankung verlangsamt werden kann (Mentz et al. 1995; Makower et al. 1999). Darauf aufbauende *in vitro*-Versuche mit ansteigenden Konzentrationen Theophyllin, einem kompetitiven Inhibitor der PKA und somit einem cAMP-Antagonist und einem cAMP-Analagon konnten die Mediatorfunktion von cAMP bezüglich der Theophyllin-induzierten Apoptose bestätigen (Mentz et al. 1999).

1.3.1. Zyklische Nukleotid-Phosphodiesterasen

Bis heute konnten elf verschiedene Isoenzymfamilien der PDE charakterisiert werden (Tabelle 7), (Fisher et al. 1998b; Fisher et al. 1998a; Soderling et al. 1998; Fawcett et al. 2000). Die Klassifikation erfolgt aufgrund von Sequenzhomologien, Substratspezifität und Substrataffinität, Sensitivität gegenüber Co-Faktoren sowie gegenüber Inhibitoren (Beavo 1995). Innerhalb der elf Isoenzymfamilien finden sich wiederum multiple Subtypen und Splicevarianten, die gewebespezifische Unterschiede in Ihrer Affinität zum Substrat aufweisen, jedoch alle durch denselben Inhibitor gehemmt werden können. Die PDE bestehen aus einer katalytischen Domäne die ca. 270 Aminosäuren umfasst, einer N-terminalen Regulationsdomäne sowie einer C-terminalen Domäne mit bislang unbekannter Funktion. Innerhalb der katalytischen Domäne findet sich eine Sequenzhomologie von ca. 30 % unter den verschiedenen PDE-Familien und ca. 85-95 % unter den Subtypen einer Familie (z.B. PDE-Typ-4A zu PDE-Typ-4B). Auch außerhalb der katalytischen Domäne findet sich innerhalb einer Familie ca. 60 % Übereinstimmung der Sequenz (Fisher et al. 1998b).

Tabelle 7. Übersicht über die bis heute bekannten PDE-Isoenzyme (Beavo 1995; Soderling et al. 2000), zyklisches Guanosin-3', 5'-Mono-Phosphat (cGMP).

Klasse	Bezeichnung	Charakteristika	Inhibitoren
I	Ca ²⁺ /CaM – PDE	sieben bekannte Isoformen, Regulation durch Ca ²⁺ /CaM – PDE Komplexbildung und Phosphorylierung	Vinpocetin, SCH 51806
II	cGMP –stimulierte PDE	zwei bekannte Isoformen hydrolysiert cAMP und cGMP	-
III	cGMP – inhibierte PDE	zwei bekannte Isoformen, hohe Spezifität für cAMP	Enoximone Milrinon
IV	cAMP – spez. PDE	30 bekannte Isoformen, Regulation durch cAMP abhängige oder direkte Phosphorylierung	Rolipram Ro 20-1724 Zadaverdin
V	cGMP – spez. PDE	eine bekannte Isoform, hohe Spezifität für cGMP	Zaprinast Sildenafil
VI	Rod outer segment PDE	neun bekannte Isoformen Photorezeptor Isoenzym	Vardenafil
VII	cAMP – spez. PDE	eine bekannte Isoform, verwandt mit PDE-IV	-
VIII	cAMP – spez. PDE	cAMP Regulation der Keimzellentwicklung	Dipyridamol
IX	cGMP – spez. PDE	sehr hohe Spezifität für cGMP	Zaprinast
X	cAMP – inhibierte PDE	hydrolysiert cAMP und cGMP	IBMX
XI	cAMP – spez. PDE	hydrolysiert cAMP und cGMP	IBMX Dipyridamol

1.3.2. Rolipram, ein selektiver PDE-Typ-4-Inhibitor

Die PDE-Typ-4-Inhibitoren lassen sich in drei Gruppen unterteilen. Neben den Quinazolindionen sind Xanthin-Derivate und Rolipram-Analoga in Verwendung. Rolipram (4-(3-cyclopentylloxy-4-methoxy-phenyl)-2-pyrrolidon), der hier verwendete PDE-Typ-4-Inhibitor, ist eine Substanz mit einer Vielzahl biologischer Wirkungen. Besondere Beachtung haben vor allem die antiinflammatorische, immunsuppressive, antidepressive (Wachtel et al. 1986), neuroprotektive (Dinter et al. 1997) und anti-Parkinson Wirkung gewonnen.

Die chemische Struktur Roliprams entspricht einem in Position 4 substituierten Pyrrolidon. Es setzt sich zusammen aus einem großen Alkoxy-Substituent an der Position 3` und einem kleinen Alkoxy-Substituent an der Position 4`. Für die PDE-Inhibitor-Aktivität ist ausserdem eine Carbonylgruppe in Position 2 des Pyrrolidionrings notwendig. Die inhibitory concentration (IC_{50}), die Menge Rolipram die notwendig ist um die PDE-Aktivität um 50 % zu reduzieren, liegt bei 1 μ M Rolipram (Beavo et al. 1990). Die Pharmakokinetik wurde im Tierversuch sowie am Menschen untersucht (Krause et al. 1988). Hierbei zeigte sich, dass die orale Bioverfügbarkeit relativ variabel ist (73 ± 25 %). Die mittlere Halbwertszeit liegt bei 1,5 bis 3,8 h. Da Rolipram vor seiner Ausscheidung komplett metabolisiert wird, ist davon auszugehen, dass die Plasma-Clearance-Rate (2 ml/min/kg) der metabolischen Clearance-Rate (Krause et al. 1989) entspricht.

1.4. Interleukin-10 (IL-10)

IL-10 wurde erstmals 1989 als ein pleiotropes Zytokin beschrieben, dass von murinen Typ 2 T-Helfer Zellen produziert wird (Fiorentino et al. 1989). Aufgrund seiner Fähigkeit die Produktion bestimmter Zytokine, wie z. B. Interferon-gamma ($IFN-\gamma$), Tumor-Nekrose-Faktor-alpha ($TNF-\alpha$) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden-Faktor (GM-CSF) zu inhibieren, erhielt es den Namen "cytokine synthesis inhibitory factor" (CSIF) (Moore et al. 1990; Moore et al. 1991; Mosmann et al. 1991). Humanes IL-10 zeigt eine ausgeprägte Homologie zu murinem IL-10, so besteht auf DNA Ebene 80 % und auf Protein Ebene 73 % Übereinstimmung (Vieira et al. 1991).

Humanes sowie murines IL-10 zeigen eine starke DNA- und Aminosäure-Sequenz-Homologie zum offenen Leseraster (BCRF-1) im Genom des Epstein-Barr-Virus (Baer et al. 1984; Moore et al. 1990). Das durch BCRF-1 kodierte Protein besitzt viele der biologischen Eigenschaften des humanen und murinen IL-10 und wurde daraufhin als virales IL-10 bezeichnet. Es ist durch die gleiche antiinflammatorische Aktivität wie das humane IL-10 charakterisiert (de Waal Malefyt et al. 1991a; de Waal Malefyt et al. 1991b; Hsu et al. 1992; Del Prete et al. 1993). Das Gen für IL-10 ist im humanen wie im murinen Genom als alleinige Kopie auf Chromosom 1 zu finden (Kim et al. 1992). Die entsprechenden komplementären Desoxyribonukleinsäure-(cDNA)-Klone kodieren für eine 18 Kilodalton (kDa) große Polypeptidkette, die sich aus 160 Aminosäuren zusammensetzt (Moore et al. 1991). Das sezernierte Protein bildet in Lösung nicht kovalent gebundene Homodimere mit einem Molekulargewicht von 33 kDa.

Humanes IL-10 konnte in CD4⁺ T-Zellen (Th0 und Th2; Fiorentino et al. 1991), CD8⁺ T-Zellen (Yssel et al. 1992), Monozyten, Makrophagen sowie normalen und neoplastischen B-Zellen (O'Garra et al. 1990; Benjamin et al. 1992; O'Garra et al. 1992) nachgewiesen werden. Die Th2 Zellen stellen jedoch die Hauptquelle dar. In aktivierten Th1-Zellen inhibiert IL-10 die Synthese und Sekretion von verschiedenen Zytokinen (Moore et al. 1993), führt durch Bcl-2 Hochregulation zu einer Hemmung der T-Zell-Apoptose und hat einen negativen Effekt auf die Chemotaxis der CD4⁺ T-Zellen. Im Gegensatz zu diesen immunsuppressiven Effekten stellt IL-10 einen potenten Induktor der B-Zellaktivierung dar. IL-10 führt zu B-Zellproliferation, Ig-Sekretion (Rousset et al. 1992; Armitage et al. 1993) und Ig-Isotyp-Wechsel auf anti-CD40 und anti-Ig aktivierten B-Zellen (Defrance et al. 1992). In Kombination mit Interleukin-2 (IL-2) bewirkt IL-10 die Differenzierung im Keimzentrum gelegener B-Zellen zu Gedächtnis- oder Plasmazellen (Arpin et al. 1995).

1.4.1. IL-10 in der Pathogenese der B-CLL

Die Rolle von IL-10 in der Pathogenese der B-CLL wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Fluckinger und Kollegen beschreiben erstmals die Apoptoseinduktion in B-CLL-Zellen durch Inkubation mit IL-10 und konnten zeigen, dass diese in IL-10 Dosisbereichen von 1-100 ng/ml nicht steigerbar ist (Fluckiger et al. 1994). Dies steht im Widerspruch zur IL-10-induzierten Steigerung der Überlebensfähigkeit normaler B-Zellen (Go et al. 1990). Sjöberg und Kollegen erzielten ähnliche Ergebnisse; sie zeigten, dass die IL-10 messenger Ribonukleinsäure (mRNS)-Expression negativ mit der Progression der Erkrankung korreliert. Diese Versuche wurden mit isolierten B-CLL-Zellen durchgeführt (Sjoberg et al. 1996). Es wird angenommen, dass entweder die neoplastischen B-Zellen im Verlauf der Erkrankung Veränderungen erfahren und somit in späteren Stadien weniger IL-10 mRNS produzieren, oder die IL-10-positiven B-Zellen chemosensitiver sind und dadurch im Verlauf der Erkrankung ihr Anteil sinkt. Untersuchungen, die mit nicht gereinigten mononukleären B-CLL-Zellen durchgeführt wurden, kamen zu dem Ergebnis, dass IL-10 dosisabhängig die Proliferation inhibiert, während die Differenzierung und IgM-Produktion gefördert wird. Die Viabilität wurde in dieser Studie durch IL-10 nicht beeinflusst (Jurlander et al. 1997). Kitabayashi und Kollegen kamen zu ähnlichen Ergebnissen, ebenfalls anhand von mononukleären B-CLL-Zellen. Sie zeigten, dass IL-10 dosisabhängig den apoptotischen Zelltod inhibiert und somit die Viabilität erhöht. *Bcl-2* als antiapoptotisches Mitglied der *Bcl-2*-Familie wurde durch IL-10 nicht signifikant hochreguliert (Kitabayashi et al. 1995). Eine andere Arbeit konnte diese Resultate bestätigen; Tangye und Kollegen deuten die Ergebnisse so, dass IL-10 als Regulator der Homöostase von CD5⁺ B-Zellen eine Rolle spielt und im Rahmen der B-CLL die unkontrollierte klonale Expansion dadurch zustande kommt, dass die Fähigkeit zur IL-10-Produktion mit der Progression der Erkrankung abnimmt (Tangye et al. 1998).

Der PDE-Typ-4-Inhibitor Rolipram induziert, teilweise cAMP-abhängig (Eigler et al. 1998), die IL-10-Synthese (Kambayashi et al. 1995; Platzer et al. 1995) in

mononukleären Zellen. Die Rolle spezifischer PDE-Inhibitoren in der Rolipram-induzierten Apoptose ist unbekannt.

1.5. Apoptose

1.5.1. Historisches und die physiologische Bedeutung der Apoptose

Die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist ein Phänomen, das erstmals bereits Mitte des 19. Jahrhunderts durch Vogt beschrieben wurde, jedoch gelang es erst 1972 detailliert die morphologischen Veränderungen während der Apoptose zu beschreiben (Kerr et al. 1972). Der Name Apoptose stammt aus dem Griechischen und setzt sich zusammen aus “απο“ = herab und “πτωσις“ = fallen und beschreibt symbolhaft das Fallen verwelkter Blätter von Bäumen im Herbst. Im Fall des programmierten Zelltodes ist dies zu vergleichen mit dem sogenannten “membrane blebbing“, der Entstehung und Ausstülpung von Zytoplasmamembranvesikeln (Abbildung 2), die sich im Verlauf der Apoptose von der Zelle abschnüren, um dann durch Makrophagen phagozytiert zu werden.

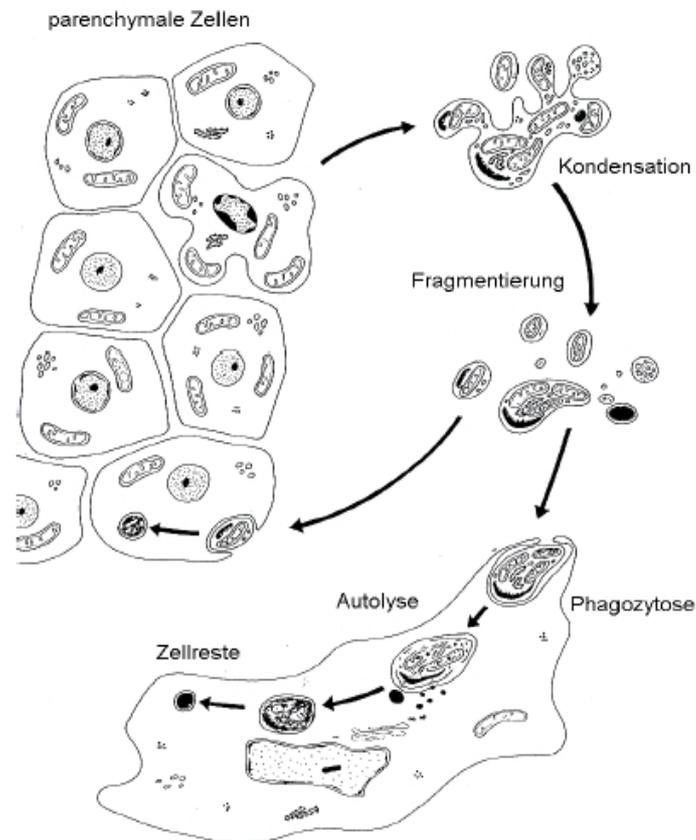


Abbildung 2. Schematisch dargestellter Ablauf der Apoptose (nach Kerr et. al. 1972). Als erstes kommt es in den Membranen der Zellorganellen (z.B. Mitochondrien) zu Leckbildung, im Verlauf fragmentiert die chromosomale DNA und die Zelle verliert ihre ursprüngliche Form. Später kommt es zum Zerfall der Zelle in kleine Fragmente, die von Makrophagen aufgenommen werden.

Der programmierte Zelltod entspricht einer physiologischen Form des Zelluntergangs, der während der Entstehung, der Differenzierung und der Homöostase von embryonalem sowie adultem Gewebe eine Schlüsselrolle einnimmt. Bei Erwachsenen unterliegen die Gewebe einem ständigen Gleichgewicht zwischen Zellwachstum (Proliferation) und Untergang (Apoptose). So werden täglich bis zu 10^{11} Zellen des menschlichen Körpers auf dem Weg der Apoptose eliminiert, pro Jahr entspricht dies etwa dem Gewicht eines erwachsenen Menschen.

Die Aufgaben der Apoptose lassen sich in vier Gruppen aufteilen. Erstens das Formen von Gewebestrukturen, zweitens die Entfernung von nicht benötigten Gewebestrukturen (z.B. der Untergang von Gewebe im Interdigitalraum bei der Entwicklung der Finger, (Mori et al. 1995; Rodriguez et al. 1997; Roberts et al. 1998), drittens die Kontrolle der Zellzahl und viertens das Entfernen von nicht normalen, nicht funktionierenden, falsch lokalisierten oder potentiell schädlichen Zellen (z.B. Virus-infizierte Zellen). Es gibt Hinweise, dass auch hoch spezialisierte Entwicklungsprozesse, wie die Produktion von differenzierten Zellen ohne Zellorganellen (z.B. Keratinozyten der Haut, Linsenepithelzellen, Erythrozyten), einer modifizierten Form des programmierten Zelltods entsprechen (Jacobson et al. 1997).

1.5.2. Morphologie der Apoptose

Die morphologischen Veränderungen, die eine Zelle im Rahmen des programmierten Zelltodes durchläuft, wurden erstmals Anfang der 70er Jahre detailliert beschrieben (Kerr et al. 1972). Es wurde beobachtet, dass Zellen, die unterschiedlichen, Apoptose-induzierenden Stimuli ausgesetzt wurden, immer in ähnlicher morphologischer Weise darauf reagierten. Durch die jeweiligen Stimuli kommt es zur Abrundung und zum Zellkontaktverlust angrenzender Zellen. An der Oberfläche der Zellen beginnen sich Vesikel bzw. Bläschen zu bilden und abzuschnüren, die sogenannten "apoptotic bodies", welche das Zytoplasma und sonstige intrazelluläre Bestandteile enthalten. Diese Vesikel werden von phagozytierenden Zellen (z.B. Makrophagen) in unmittelbarer Umgebung aufgenommen. Im Zellkern kommt es zur Kondensation des Chromatins und zur DNA-Fragmentation in Segmente von einer Größe von 180 Basenpaaren. Im Verlauf dieses sehr regulierten Zelluntergangs kommt es nicht zur Freisetzung intrazellulärer Bestandteile, wie dies beim nekrotischen Zelltod der Fall ist. Hier ist der Grund für den Zelluntergang ein unphysiologischer (z.B. Hitze, Kälte, Hypoxie), wobei meist ein ganzer Gewebsverbund betroffen ist und nicht wie im Fall der Apoptose einzelne Zellen. Wenn nicht bereits die primäre Einwirkung des Stimulus zur Zerstörung der Zelle geführt hat, so kommt es im Verlauf der Nekrose zum irreversiblen

Anschwellen der Zellen und zum Zerplatzen. Die hierdurch freigesetzten intrazellulären Bestandteile führen zu einer Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes, die im Rahmen der Apoptose nicht beobachtet wird.

1.5.3. Caspasen

Für die Übermittlung des Apoptose-induzierenden Signals gibt es verschiedene Rezeptoren (Schulze-Osthoff et al. 1998). Sie besitzen eine intrazelluläre "death domain", die für die Übermittlung des zytotoxischen Signals verantwortlich ist. Aktuell sind fünf solcher Rezeptoren bekannt, der TNF Rezeptor-1, CD 95 (Fas, APO-1), TNF receptor-related apoptosis-mediated protein (TRAMP) und TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) Rezeptor 1 und 2. Der Mechanismus, über den die verschiedenen Rezeptoren Apoptose induzieren, ist jedoch recht ähnlich. Durch die Bindung des Liganden kommt es zur Oligomerisation des Rezeptors, was wiederum zur Bindung eines Adapterproteins an die "death domain" führt (Borgerson et al. 1999). Im Verlauf kommt es zur Bindung des Adaptorproteins an eine sogenannte proximale Caspase, wodurch das Todessignal an die ausführenden Caspasen weitergeleitet wird.

Die Caspasen sind für die morphologischen Veränderungen, die im Rahmen der Apoptose beobachtet werden, verantwortlich. Früher wurden sie Interleukin-1 β -converting Enzyme (ICE)/CED-3 Proteasen genannt, seit 1996 hat sich jedoch der Name Caspase durchgesetzt. Der Name entstand aus den zwei katalytischen Eigenschaften des Enzyms, einem "C" für den Anteil des konservierten Cysteins und dem Anteil "aspase", der sich auf die Fähigkeit der Protease bezieht immer Asparaginsäure in der Position P1 zu spalten. Die Nummerierung der Caspasen erfolgt nach der Reihenfolge der Publikation (Alnemri et al. 1996). Bis heute wurden 14 verschiedene Caspasen benannt, die sich in zwei Untergruppen einteilen lassen (Hengartner 2000). Die ICE-Untergruppe (Caspase 1, 4 und 5) spielen eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Prozessen, während die ced-3-Untergruppe (Caspase 2, 3, 6, 7, 9, 10) im Rahmen des programmierten Zelltodes aktiviert wird.

Die meisten Caspasen werden als inaktive ca. 35 kDa große Proenzyme synthetisiert (Earnshaw et al. 1999; Zimmermann et al. 2001) und durch Spaltung in eine große (ca. 20 kDa) und eine kleine (ca. 10 kDa) Untereinheit aktiviert. Von den ursprünglichen drei Domänen, dem C-terminalen und dem N-terminalen Rest, sowie der dazwischen gelegenen großen Domäne mit dem konservierten QACXG Pentapeptid Motiv, wird im weiteren Verlauf der N-terminale Teil abgeschnitten. Die aktive Caspase ist ein heterotetrameres Protein, das sich aus zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten zusammensetzt, wobei das aktive Zentrum auf der großen Untereinheit lokalisiert ist. Die Aktivierung erfolgt zum einen autokatalytisch, zum anderen im Rahmen einer kaskadenartigen Aktivierung durch andere bereits aktive Caspasen (Cohen 1997; Nicholson et al. 1997). Die aktivierten Caspasen führen nun zur Spaltung wichtiger zellulärer Bestandteile, unter anderem der Poly (ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), Lamin A und B sowie unterschiedliche Proteinkinasen.

1.6. *Bcl-2* Familie

1.6.1. Entdeckung und Einteilung

Das erste Mitglied der *Bcl-2* Familie wurde 1985 entdeckt und somit zum Hauptmitglied und Namensgeber einer mittlerweile mehr als 12 Protoonkogene umfassenden Gruppe. Damals wurde es bei der Untersuchung follikulärer B-Zell Lymphome (B-cell-lymphoma) entdeckt, die ihm seinen Namen gaben (Tsujiimoto et al. 1985). Diese Lymphome tragen häufig eine t(14;18) Translokation, die dazu führt, dass *Bcl-2* auf Chromosom 18 lokalisiert ist und stark überexprimiert wird (Levine et al. 1985; Yunis 1987). Funktionell lassen sich die 12 Mitglieder nach *Bcl*-homologen (BH) Domänen (Tsujiimoto et al. 2000) in vier Gruppen unterteilen (Abbildung 3; Adams et al. 1998; Antonsson et al. 2000). Mitglieder der Gruppe 1 bestehen aus anti-apoptotischen Mitgliedern, die fast alle durch vier kurze *Bcl-2* homologe Domänen charakterisiert sind (BH1-BH4). Zur Gruppe 1 gehören neben dem *Bcl-2* das *Bcl-x*, *Bcl-w* (Gibson et al. 1996), *Bfl-1* (Choi et al. 1995), *A1* (Lin et al. 1993)

und *Mcl-1* (Sedlak et al. 1995; Zhou et al. 1997). Die Mitglieder der Gruppe 2 umfassen die pro-apoptotischen Mitglieder *Bax* und *Bak*, die denen der Gruppe 1 sehr ähnlich sind. Es besteht eine Sequenzhomologie für BH1, BH2 und BH3, nicht jedoch für BH4. Gruppe 3-Mitglieder bestehen ebenfalls aus pro-apoptotischen Mitgliedern *Bik* und *Bid*, die nur aus der 12 bis 16 Aminosäuren umfassenden BH3 bestehen (BH3-only Mitglieder; Hengartner 2000). Aus *Bcl-x* werden durch alternatives Splicen die Mitglieder der Gruppe 4 *Bcl-xS*, welches 63 Aminosäuren gegenüber *Bcl-x* verloren hat und *Bcl-x β* , das keine Transmembrandomäne besitzt (Gonzalez-Garcia et al. 1994). Gruppe 4-Proteine wirken im Gegensatz zu *Bcl-x* pro-apoptotisch. Mitglieder der Gruppen 1 und 2 tragen eine C-terminale hydrophobe Transmembrandomäne, Proteine, die diese Domäne tragen, sind über die äussere mitochondriale Membran mit dem Endoplasmatischen Retikulum verbunden (Hockenberry et al. 1990; Krajewski et al. 1993). Die N-terminale Domäne ist frei im Zytosol lokalisiert.

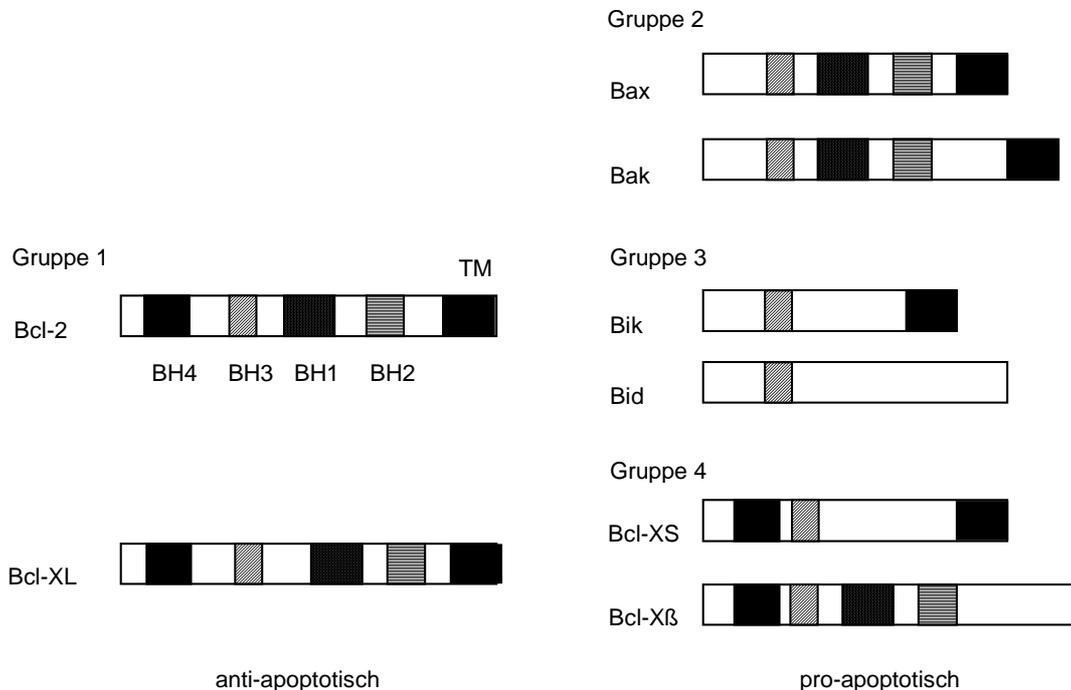


Abbildung 3. Schematische Einteilung der vier Hauptgruppen der Mitglieder der *Bcl-2* Familie (Antonsson et al. 2000). TM = hydrophobe Transmembrandomäne, BH = Bcl-homologe-Domäne.

1.6.2. Wirkung und Funktion

Ausgehend von der Wirkung der jeweiligen Proteine lassen sich die Mitglieder der *Bcl-2* Familie in eine pro- und eine anti-apoptotische Gruppe aufteilen. Zur Gruppe der anti-apoptotischen Mitglieder gehören neben dem Hauptmitglied und Namensgeber, dem Protoonkogen *Bcl-2* (B-cell lymphoma gene) (Tsujiimoto et al. 1986), auch *mcl-1*, *A1* und *Bcl-x* (die lange Splicevariante des *Bcl-x*) (Boise et al. 1993). Die Wirkung von *Bcl-2* unterscheidet sich von der vieler anderer Protoonkogene dadurch, dass es die Zellen vor Apoptose schützt und nicht die Proliferation anregt (Korsmeyer 1992a). *Bcl-2* konnte auf der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert werden, es stabilisiert die Membran und hemmt somit die Cytochrom C-Ausschüttung aus dem Intermembranraum (Korsmeyer 1992b; Yang et al. 1997). Dadurch inhibieren *Bcl-2* und *Bcl-x* nicht nur den apoptotischen sondern auch den nekrotischen (Jaattela et al. 1995; Shimizu et al. 1996a) Zelltod durch Stabilisierung des Transmembranpotentials (Shimizu et al. 1996b; Decaudin et al. 1997). Die anderen Mitglieder der Gruppe 1, die ebenfalls eine anti-apoptotische Wirkung auszeichnet, sind dadurch zu charakterisieren, dass sie über alle vier Homologiedomänen (BH1-BH4) verfügen. Diese Domänen sind für die Interaktion zwischen den einzelnen Mitgliedern der *Bcl-2*-Familie essentiell, da sie für die Entstehung und Interaktion von Homo- und Heterodimeren verantwortlich sind. Durch die Heterodimerbildung besteht die Möglichkeit der pro- und anti-apoptotischen Proteine sich gegenseitig in ihrer Funktion zu beeinflussen (Oltvai et al. 1993; Chittenden et al. 1995; Yang et al. 1995; Reed et al. 1996; Hsu et al. 1997a). Zu den Proteinen, die mit *Bcl-2* und *Bcl-x* Heterodimere bilden, gehören vor allem pro-apoptotische Proteine der Gruppe 2, die in BH1, BH2 und BH3 der Gruppe 1 homolog sind. Hierzu gehört *Bax*, welches normalerweise im Zytosol von Zellen frei vorhanden ist und pH- und spannungsabhängige Ionenkanäle bilden kann (Antonsson et al. 1997). Die pro-apoptotische Wirkung von *Bax* kommt durch Zusammenlagerung zweier *Bax*-Proteine zu einem Homodimer, und dessen Verlagerung zu den Mitochondrien zustande (Hsu et al. 1997b; Wolter et al. 1997). Die Homodimerisierung kann jedoch durch Heterodimerbildung mit einem anti-apoptotisch wirksamen Protein wie *Bcl-2* und *Bcl-x* in einen gegensätzlichen Stimulus umgewandelt werden (Oltvai et al. 1993; Sedlak et al.

1995). Die Fähigkeit von *Bax* einen anti-apoptotischen Stimulus durch Heterodimerbildung zu antagonisieren, beschränkt sich jedoch auf *Bcl-2* (Hirotsani et al. 1999). Ähnlich wie *Bax* kann auch *Bad*, welches primär phosphoryliert und inaktiv vorliegt, mit anti-apoptotischen Mitgliedern der *Bcl-2* Familie Heterodimere bilden. Hierfür wird es dephosphoryliert und wandert an die äußere mitochondriale Membran, wo es *Bcl-2* und *Bcl-X* inaktiviert und wie *Bax* die mitochondriale Membranpermeabilisierung durch Porenbildung und fehlerhafte Kanalregulation induziert (Datta et al. 1997; Wang et al. 1999). Dies führt zur Freisetzung von mitochondrialen Faktoren (Cytochrom C, AIF), die in einer Aktivierung der Caspasekaskade resultiert. Über einen ähnlichen Mechanismus induziert *Bid* (*Cif*), eines der "BH-3-only"-Proteine (Wang et al. 1996; Han et al. 1999), die Membranpermeabilisierung. *Bid* liegt ursprünglich frei im Zytosol vor und wird erst durch die Spaltung durch die aktivierte Caspase 8 zu *t-Bid* (*truncated-Bid*) aktiviert und an die äußere Mitochondrienmembran transloziert, wo es ebenfalls zur Freisetzung von mitochondrialen Faktoren führt.

Einige *Bcl-2* verwandte Proteine werden gewebsspezifisch exprimiert, wie z.B. das Protein *Bok*, das nur im reproduktiven Gewebe nachgewiesen wurde (Hsu et al. 1997a) oder *Bak*, das besonders im Herz- und Skelettmuskel sowie im Gehirn exprimiert wird (Farrow et al. 1995). Die meisten Mitglieder der *Bcl-2*-Familie werden allerdings ubiquitär exprimiert (Krajewski et al. 1994).

1.6.3. Dysregulation der *Bcl-2*-Familie bei B-CLL

Nachdem Mitte der 80er Jahre für einen Großteil der folliculären Lymphome eine t(14;18) Translokation des *Bcl-2*-Gens beschrieben worden war (Levine et al. 1985; Yunis 1987), wurde auch die B-CLL auf eine ähnlich Translokation hin untersucht. Es fanden sich jedoch nur bei einem sehr geringen Teil (unter 10 %) der Fälle ein *Bcl-2*-Translokation (Adachi et al. 1990; Raghoeber et al. 1991). Trotz dieser Seltenheit konnte *Bcl-2*-mRNS und *Bcl-2*-Protein häufig und in großer Menge nachgewiesen werden. Siebzig % der untersuchten B-CLL-Fälle zeigten eine *Bcl-2*-Expression, die gleich groß bzw. größer als die der untersuchten t(14;18) Zelllinien waren. Im Vergleich zu normalen Lymphozyten

konnte in 95 % der B-CLL-Fälle eine 1,7- bis zu 25-fach erhöhte *Bcl-2*-Konzentration festgestellt werden (Hanada et al. 1993). Die *Bcl-2*-Überexpression bei B-CLL lässt sich am ehesten auf eine Hypomethylierung der DNA im Bereich der Promotor Region zurückführen.

Die Lokalisation von *Bcl-2* in gesunden und B-CLL-Zellen ist sehr ähnlich (de Jong et al. 1994). Mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie konnte *Bcl-2* in Mitochondrien, der Zellmembran und der Kernhülle nachgewiesen werden. Die Lokalisation auf den Mitochondrien legt eine Verbindung zu Kontaktzonen zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran nahe. Möglicherweise spielt *Bcl-2* eine Rolle bei der Kontrolle des Ca^{2+} -Transportes in die Zelle und somit über die Ca^{2+} -abhängige DNA-Endonuklease eine Schlüsselrolle in der Apoptoseregulation.

Im Falle der B-CLL spielt, mehr noch als die absolute *Bcl-2* Menge, die Interaktion zwischen *Bcl-2* und *Bax* eine wichtige Rolle in der Regulation der Apoptose. Bei chemosensitiven B-CLL-Zellen konnte ein besonders schnelles Ansteigen der *Bax*-Expression nach Exposition mit dem Chemotherapeutikum Chlorambucil nachgewiesen werden (Pepper et al. 1998). Im Gegensatz dazu lässt sich bei chemoresistenten B-CLL-Zellen meist eine deutlich erhöhte *Bcl-2/Bax*-Ratio nachweisen (Pepper et al. 1997). Die *in vitro* bestimmte halbe lethale Konzentration (LC_{50}) von Chlorambucil korreliert mit der *Bcl-2/Bax*-Ratio (Pepper et al. 1996; Thomas et al. 1996). Untersuchungen mit Fludarabin haben gezeigt, dass die Apoptoserate, die durch Fludarabin induziert werden konnte, sich zur *Bcl-2/Bax*-Ratio proportional verhält (Thomas et al. 1996). Jedoch konnte keine Korrelation der Apoptoserate zur Höhe der *Bcl-2*-Expression festgestellt werden (Morabito et al. 1997). Diese Ergebnisse widersprechen Daten einer anderen Arbeitsgruppe, die keinerlei Korrelation zwischen der Chemosensitivität von B-CLL-Zellen auf Fludarabin, Cladirabin und Fludarabin-Phosphat und der Expression von *mdm-2*, *Bcl-2*, *Bax* bzw. der *Bcl-2/Bax*-Ratio gefunden hat (Johnston et al. 1997).

Ein anderes anti-apoptotisches Mitglied der *Bcl-2*-Familie, bei dem eine starke Assoziation mit Chemoresistenz gegen Chlorambucil und Fludarabin

nachgewiesen wurde, ist *mcl-1* (Kitada et al. 1998). B-CLL-Patienten mit hoher *mcl-1*-Expression zeigten *in vivo* deutlich schlechtere Ansprechraten.

1.7. Ziele der Arbeit

Voruntersuchungen haben gezeigt, dass die unspezifische PDE-Inhibition mittels Theophyllin einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt für die Behandlung der B-CLL bietet. Dies konnte *in vitro* dosisabhängig für den unspezifischen PDE-Inhibitor Theophyllin an B-Lymphozyten von Patienten nachgewiesen werden (Binet et al. 1995a; Mentz et al. 1999). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Theophyllin in Kombination mit Chlorambucil *in vitro* eine synergistische Wirkung bezüglich der Apoptoseinduktion aufweist (Binet et al. 1995b; Mentz et al. 1996).

Eine Therapie mit unspezifischen PDE-Inhibitoren ist jedoch aufgrund von Nebenwirkungen nur eingeschränkt möglich. Diese sind vor allem durch eine gleichzeitige Adenosin-Rezeptor-antagonistische Wirkung begründet (Schwabe et al. 1985). Eine spezifische Inhibition der in B-CLL-Zellen primär exprimierten PDE 3, PDE 4 (Beavo 1995) bzw. PDE 1B1, PDE 4A, PDE 4B (Kim et al. 1998) ist somit anzustreben.

Folgende Fragen sollen mit der vorgelegten Arbeit beantwortet werden:

1. Lässt sich durch die Gabe eines spezifischen PDE-Typ-3- bzw. Typ-4-Inhibitors (Enoximon bzw. Rolipram) eine dosisabhängige Apoptoseinduktion bei B-CLL-Zellen nachweisen?
2. Kann durch die Kombination von Rolipram und Fludarabin oder Mitoxantron ein synergistischer Effekt bezüglich der Apoptoseinduktion erreicht werden?
3. Ist die Rolipram-induzierte Apoptose IL-10 abhängig?
4. Ist die Rolipram-induzierte Apoptose durch Inhibition von Caspasen zu beeinflussen?
5. Wie verändert sich das Verhältnis pro- und anti-apoptotischer Mitglieder der *Bcl-2*-Familie durch den Einsatz von Rolipram?

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

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

2.2. Labormaterial

Kaleidoscope Prestained Standards Premixed	Fa. Bio-Rad
Protein Molecular Weight Marker	Fa. Roche (Mannheim)
Combithek®	
Protein Molecular Weight Marker	Fa. Roche
Bax Protein (sc4239WB)	Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)

<i>Bcl-2</i> Protein (sc4096)	Fa. Santa Cruz
<i>Bcl-x</i> Protein (sc4115WB)	Fa. Santa Cruz
Tris-HCl Ready Gels 4-20 %	Fa. Bio Rad
Tris-HCl Ready Gels 7,5 %	Fa. Bio Rad
enhanced chemiluminescence (ECL) Detection System	Fa. Amersham (Little Chalfont, GB)
Ribonuklease (RNAse)	Fa. Roche
Proteinase K	Fa. Sigma (Deisenhofen)
Phenol-Chloroform	Fa. Roth (Karlsruhe)
Polyvinylidene fluoride (PVDF)	Fa. Millipore (Bedford, MA, USA)
Blotting Papier	Fa. Schleicher & Schuell (Dassel)
WB Blocking Agent	Fa. Bio-Rad
Saran Film	Fa. Sigma
Ethidiumbromid	Fa. Sigma
Agarose	Fa. Sigma
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fa. Sigma
Humaner IL-10 ELISA	Fa. Endogen (Woburn, MA, USA)
Fix and Perm Kit	Fa. Sigma

2.2.1. Fotomaterial

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

2.2.2. Materialien für die Zellkultur

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

Standard Labor-Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in Analysen- und Reinst-Qualität von den Firmen Sigma, Roth (Karlsruhe), Gibco BRL (Eggenstein) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

2.2.3. Puffer, Lösungen und Medien

RPMI-Vollmedium:	500 ml RPMI-1640 Medium 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 10 mM HEPES Puffer 10 % hitzeinaktiviertes FCS
”Phosphate-Buffered Saline” (PBS):	0,2 g/l KCl 0,2 g/l KH_2PO_4 8,0 g/l NaCl 2,16 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
PBS-Tween:	500 ml PBS 500 µl Polyoxyethylensorbitan Monolaurate (Tween 20)
Towbin-Puffer (Blotting Puffer):	3,03 g Tris-Base 14,4 g Glycine 200 ml Methanol 800 ml Aqua dest.
Tris-Glycine-SDS- Elektrophorese Laufpuffer:	0,1 % Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS) 192 mM Glycin 25 mM Tris-Base mit Aqua dest. aufgefüllt auf 1l
DNA Ladepuffer:	50 ml Glycerol 10 mg Bromphenolblau 50 ml Aqua dest.
DNA Lyse-Puffer:	100 mM TrisHCL pH 8,5 0,5 M Ethyldiamintetraessigeäure (EDTA) 10 % SDS 5 M NaCl
Tris-Azetat/EDTA- Elektrophorese (TAE)-Puffer:	0,001 M EDTA 0,04 M Tris-Acetat
5x Laemmli-Puffer:	0,6 ml Tris HCL pH 6,8 5 ml 50 % Glycerol 2 ml 10 % SDS 0,5 ml 2 % Mercaptoethanol 1 ml 1 % Bromphenolblau 0,9 ml H_2O

Blocking Lösung (5 %):	750 mg fettarme Trockenmilch 15 ml PBS-Tween
Western-Blot Lyse-Puffer:	10 mM Tris-HCL pH 7,4 1 mM EDTA 0,1 % SDS 0,1 % Triton-X 100 1 µM Aprotinin 0,1 mM Phenylmethansulfonsäurefluorid (PMSF; gelöst in 100 % Isopropanol)
Annexin V-Binding-Puffer:	10 mM HEPES/NaOH pH 7,4 140 mM NaCl 2,5 mM CaCl ₂ (durch 0,2 µm Porenfilter gefiltert)
Bradford-Reagenz:	20 mg Serva Blau 1,88 ml Ethanol 80 % 20 ml H ₃ PO ₄ 85 % 200 ml H ₂ O

2.2.4. Antikörper

Folgende Antikörper wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet (Tabelle 8): m steht für murine-Antikörper, ra für Ratten-Antikörper, rb für Hasen-Antikörper, g steht für goat-Antikörper und s steht für Schaf-Antikörper.

Tabelle 8. Verwendete Antikörper (Immunglobulin, Ig)

Namen	Markierungen	Isotyp	Herkunft
Annexin V	FITC		Bender Med
Bcl-2	FITC	m IgG1-κ	Dako
Bcl-2 (sc 783)	-	rb IgG	Santa Cruz
Bax (sc 930)	-	rb IgG	Santa Cruz
Bax (sc 493)	-	rb IgG	Santa Cruz
Bcl-x (sc 7195)	-	rb IgG	Santa Cruz
Bcl-x	FITC	m IgG3	Southern Biotechnologies
CD5	FITC	m IgG1-κ	Becton Dickinson
CD19	PE	m IgG1-κ	Becton Dickinson
CD19	APC	m IgG1-κ	Becton Dickinson
CD3	FITC	m IgG1-κ	Becton Dickinson
CD3	PerCP	m IgG1-κ	Becton Dickinson
CD14	PE	m IgG1-κ	Becton Dickinson
Sheep-anti-Rabbit	PE	s IgG	Serotec
Goat-anti-Rabbit	PE	g IgG _{2b}	Serotec
anti-hu-IL-10	-	ra IgG _{2a}	Pharmingen

anti-mouse	FITC	IgG1-κ	Becton Dickinson
anti-mouse	FITC	IgG3	Becton Dickinson
anti-mouse	APC	m IgG1-κ	Becton Dickinson
anti-mouse	PerCP	m IgG1-κ	Becton Dickinson

2.2.5. Patienten

Es wurden neunzehn B-CLL-Patienten (13 Männer und 6 Frauen) mit einem mittleren Alter von 69 Jahren (zwischen 47 und 79 Jahre), deren Diagnose durch klinische und labortechnische Standardkriterien ermittelt wurde und die innerhalb der letzten 6 Monate keine Therapie bekommen hatten, untersucht (Tabelle 9). Der mittlere Leukozytenwert lag bei $76 \times 10^9/l$ (zwischen 12 und $159 \times 10^9/l$). Der mittlere $\beta 2$ -Mikroglobulinwert lag bei 4 mg/l (zwischen 2 und 14 mg/l) und der mittlere Thymidinkinasewert bei 18 U/l (zwischen $5,3$ und 80 U/l). Nach Einverständniserklärung wurde den Patienten 20 ml Blut aus der Armvene entnommen. Dem Blut wurden 50 internationale Einheiten (I.E.) Na-Heparin pro Milliliter zugesetzt. Die Blutentnahme bei B-CLL-Patienten, für die hier durchgeführten Untersuchungen, wurde durch die Ethikkommission genehmigt.

Tabelle 9. Charakteristika der B-CLL-Patienten.

Patient Nr.	Alter/ Geschlecht	Leukozyten ($10^9/l$)	Stadium	bisherige Therapie
1	58/F	66,8	B	keine
2	62/M	51,7	C	Chlorambucil
3	79/M	56,4	C	keine
4	67/M	84,3	C	unbekannt
5	70/M	89,8	C	keine
6	63/M	36,5	A	keine
7	79/F	12,4	A	keine
8	64/M	101,9	C	keine
9	76/F	159	B	keine
10	56/M	26,3	A	keine
11	53/M	75,7	A	keine
12	77/F	110	C	Chlorambucil
13	64/F	19,7	A	keine
14	47/M	76	C	keine
15	60/M	61,7	A	keine
16	76/M	134,6	C	unbekannt
17	69/M	34,8	A	keine
18	71/M	93,6	C	unbekannt
19	72/F	22	B	keine

Die Stadieneinteilung der Patienten erfolgte nach der Binet Klassifikation (Binet et al. 1981). Es ergab sich eine Verteilung von sieben Patienten im Stadium A, drei im Stadium B und neun Patienten, die dem Stadium C zugeteilt werden konnten.

2.3. Substanzen

2.3.1. Fludarabin (Fludara®, Schering)

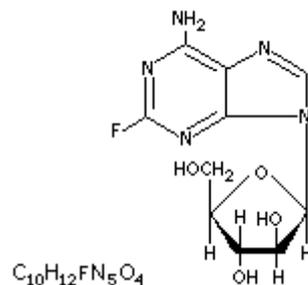


Abbildung 4. Strukturformel Fludarabin.

Fludara® enthält Fludarabinphosphat, ein fluoriertes Nukleotid-Analogon des Virostatikums Vidarabin (Ara-A, 9-β-D-Arabinofuranosyladenin), das relativ stabil gegenüber der Desaminierung durch Adenosin-Desaminase ist. Fludarabinphosphat wird rasch zu 2F-Ara-A dephosphoryliert (Abbildung 4). Dieses wird in die Zelle aufgenommen und dann intrazellulär durch Deoxycytidin-Kinasen zum aktiven Triphosphat 2F-Ara-ATP phosphoryliert. Dieser Metabolit verhindert die DNA-Synthese durch Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase, DNA-Polymerase α/δ und ε sowie der DNA-Primase und der DNA-Ligase. Die Aktivität der RNA-Polymerase II wird ebenfalls partiell gehemmt und dadurch die Proteinsynthese reduziert. Obwohl die Wirkung von 2F-Ara-ATP noch nicht vollständig geklärt ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Wirkung auf die DNA, RNA und Proteinsynthese zur Hemmung des Zellwachstums beitragen, wobei die DNA-Synthesehemmung

als dominierender Faktor hervorzuheben ist. Fludarabin wird zur Behandlung der B-CLL eingesetzt, wobei sich *in vitro* charakteristische Zeichen des apoptotischen Zelltodes mit ausgeprägter DNA-Fragmentation zeigen.

Fludarabin Trockensubstanz wurde in 2 ml Aqua rekonstituiert, in RPMI-Vollmedium auf eine Konzentration von 100 μM verdünnt (Molekulargewicht: 365,2 g/mol) und aliquotiert bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2.3.2. Mitoxantron (Novantron®, Lederle)

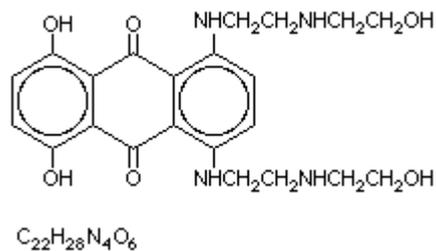


Abbildung 5. Strukturformel Mitoxantron.

Mitoxantron ist ein zytotoxisches Antrachinon-Derivat dessen antineoplastische Wirkung wahrscheinlich auf einer Interkalation mit nachfolgender Quervernetzung der DNA-Stränge beruht. Die toxische Wirkung konnte in menschlichen Zellkulturen sowohl bei proliferierenden als auch bei nicht proliferierenden Zellen nachgewiesen werden, was auf eine phasenunspezifische Wirkung hinweist (Abbildung 5).

Mitoxantron wird bei Mamma-Karzinomen, Ovarial-Karzinomen, NHL, akuten Leukämien des Erwachsenenalters sowie Blastenschüben bei chronisch myeloischer Leukämie eingesetzt. Andere Indikationen beinhalten progrediente Formen der multiplen Sklerose.

Mitoxantron Injektionslösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml wurde steril aliquotiert und bei 4 °C aufbewahrt. Die jeweiligen Verdünnungen wurden mit RPMI-Medium durchgeführt.

2.3.3. Enoximon (Perfan[®], Myogen)

Enoximon ist ein spezifischer PDE-Typ-3-Inhibitor mit einem Molekulargewicht von 248,3 g/mol. Enoximon wird wegen seiner positiv inotropen und vasodilatatorischen Wirkung zur Behandlung von Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz eingesetzt.

Enoximon Injektionslösung in einer Konzentration von 5 mg/ml wurde steril aliquotiert und mit RPMI-Vollmedium weiterverdünnt.

2.3.4. Rolipram (Schering)

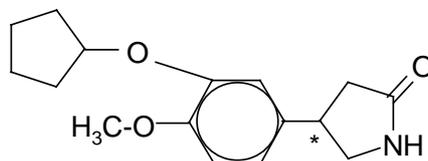


Abbildung 6. Strukturformel Rolipram.

Rolipram ist ein spezifischer PDE-Typ-4-Inhibitor mit einem Molekulargewicht von 275,4 g/mol. Es liegt als ein Racemat von [4-(3'-cyclopentyloxy-4'-methoxyphenyl)-2-pyrrolidon] vor (Abbildung 6). Das asymmetrische C-Atom ist in der Abbildung mit * gekennzeichnet. Rolipram wurde freundlicherweise von der Firma Schering, Berlin zur Verfügung gestellt. Es wurde in RPMI-1640 Medium suspendiert, leicht erwärmt und bis zur Klärung geschüttelt, danach aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

2.3.5. Pan-Caspase-Inhibitor

Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketone (z-VAD-fmk, R&D Systems Inc.) ist ein effektiver, zell-permeabler Pan-Caspase-Inhibitor der selbst keinerlei zytotoxische Effekte hat. z-VAD-fmk bindet irreversibel das katalytische Zentrum der Caspasen-Protease und inhibiert somit die Induktion der Apoptose (Boise et al. 1997; Atkinson et al. 1998; Bossy-Wetzel et al. 1998; Hartfield et al. 1998). Das Peptid ist O-methyliert in der P1-Position der Asparaginsäure, was zu erhöhter Stabilität und Zellpermeabilität führt. Das Lyophilisat wurde in sterilem Dimethyl-sulfoxid (DMSO) rekonstituiert und bei -20 °C aufbewahrt. Es wurde in Konzentrationen von 50 µM und 200 µM eingesetzt.

2.3.6. Lipopolysaccharid (LPS; E. coli 055:B5, Sigma)

Das Endotoxin der Escherichia coli (E. coli 055:B5;Sigma) ist ein Bestandteil der äußeren Zellwand gramnegativer Bakterien. LPS besteht aus einer äußeren Polysaccharid "O"-Kette, welche mit der inneren Core-Region verbunden ist. Diese Core-Region läßt sich wiederum in eine äußere und eine innere unterteilen, wobei die innere mit einem weiteren Bestandteil, dem Lipid A, kovalent verbunden ist. Dieses Lipid A ist für die meisten biologischen Effekte von LPS verantwortlich (Galanos et al. 1977). Die Zuckermoleküle der "O"-Kette sind Träger der O-Antigenspezifität und somit für die Gruppenspezifität verantwortlich. Bei E. coli gibt es mehr als 160 verschiedene "O"-Ketten (Galanos et al. 1993). Hingegen weist die Core-Region nur geringe Unterschiede auf.

LPS wurde als 100 mg/ml Aliquot mit zusätzlich 1 % humanem Serumalbumin (HSA) eingefroren. Das HSA vermindert die Adhäsion des LPS an der Zellkulturplatte. In den Ansätzen wurde LPS in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt.

2.4. Zellulär – Immunologische Methoden

2.4.1. Zellkultur

Kulturbedingungen

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

Isolation von peripheren Blutlymphozyten

Die Isolation peripherer Blutlymphozyten erfolgte über einen Dichte-Gradienten (Boyum et al. 1968). Hierfür wurde heparinisiertes Vollblut von B-CLL-Patienten über einen Ficollgradienten aufgetrennt. Zwanzig ml des Vollblutes wurden dazu in einem 50 ml Leucosep-Röhrchen (Fa. Greiner, Frickenhausen) über 15 ml Ficoll "Separating Solution" geschichtet, 15 Minuten (min) bei 1000 g (Zentripetalbeschleunigung der Erde) bei minimalster Bremsung zentrifugiert, die Zellen in der Interphase vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und dreimal mit PBS gewaschen.

Ficoll ist ein polysaccharidähnliches Makromolekül mit einer Dichte von 1,077 g/ml, das die Eigenschaften besitzt, in einer Dichte-Zentrifugation mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) an der Blutserum/Ficoll-Interphase zu konzentrieren. Granulozyten und Erythrozyten finden sich ihrer höheren spezifischen Dichte wegen in der Ficoll-Schicht bzw. am Boden sedimentiert, Thrombozyten ihrer geringeren Dichte wegen in der Serumschicht oberhalb des Ficoll.

Aufnahme in Zellkulturmedium und Bestimmung der Zellzahl

Resuspendiert wurden die Zellen in RPMI-1640 Medium (Fa. Biochrom, Berlin) mit zusätzlich 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 mM HEPES-Puffer und 10 % Hitze-inaktiviertem FCS. Die Zellen wurden mit 5 % Trypanblau-Lösung angefärbt, die Zellzahl wurde dann durch Auszählen geeigneter Verdünnungen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Zellzahl wurde dann auf 5 Mio/ml eingestellt.

Inkubation der Zellen

Die Zellen wurden mit den verschiedenen Substanzen auf eine 96-well Zellkulturplatte aufgebracht. Die Ansätze für die Durchflusszytometrie-Analyse, den ELISA und Western-Blot wurden 48 Stunden (h) lang inkubiert. Die Zellen für den Nachweis der DNA-Fragmentation blieben 72 h in Kultur.

2.4.2. Konzentrationsbestimmung von IL-10 mittels ELISA

Zur Bestimmung der IL-10 Konzentration wurde ein ultrasensitiver ELISA durchgeführt. Die Proben wurden durch einen Frier-Tau-Zyklus aufgeschlossen und 1 : 1 mit Standard-Diluent verdünnt. Neben dem Standard wurden nun alle Proben in die mit IL-10-Antikörper beschichteten Wells pipettiert. Während der zweistündigen Inkubationszeit bindet das vorhandene IL-10 an die Antikörper. Nach drei Waschschritten wurde ein zweiter biotinylierter Antikörper zugegeben, der das bereits gebundene IL-10 an einem anderen Epitop bindet. Nach 30 min folgt ein weiterer Waschschrift. Daraufhin wird ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zugegeben, welches an Biotin bindet. Durch Verwendung mehrerer Biotin-Streptavidin-Brücken pro Antikörper wird eine Verstärkung und eine höhere Sensitivität erreicht. Nach Entfernung des Konjugates durch einen weiteren Waschschrift gibt man die Substratlösung hinzu, gebundenes Enzym wird nun zu Farbstoff umgesetzt. Die Farbintensität, die proportional zur IL-10-Konzentration der Probe ist, wurde dann mittels eines ELISA-Readers eingelesen. Durch die Standardreihe besteht die Möglichkeit die genaue, in der Probe enthaltene Konzentration, zu errechnen.

2.4.3. Caspase 3-Aktivitätsbestimmung

Caspase 3, auch CPP-32, Yama oder Apopain genannt, ist eine intrazelluläre Cystein-Protease, die als Proenzym existiert und im Rahmen einer Kaskade während der Apoptose aktiviert wird. Caspase 3 spaltet eine große Anzahl zellulärer Proteine, die ein bestimmtes Aminosäure-Motiv (DEVD) beinhalten wie z.B. die PARP, das U1-Ribonucleoprotein oder die DNA abhängige

Proteinkinase. Die Anwesenheit von Caspase 3 in verschiedensten Zellarten legt nahe, daß es sich um ein Schlüsselenzym der Apoptose handelt.

Zur Bestimmung der enzymatischen Caspase 3-Aktivität wurde ein kommerzieller colorimetrischer Assay verwendet. Hierfür wurden 3×10^6 Zellen abzentrifugiert und mit 25 µl pro 1×10^6 Zellen des mitgelieferten Lyse-Puffer lysiert. Das Zelllysat wurde dann 10 min auf Eis inkubiert und im Anschluss eine min bei 10.000 g zentrifugiert. Die Überstände wurde abgenommen und auf Eis gekühlt. Der durchschnittliche Proteingehalt der Überstände betrug zwischen 2-4 mg/ml. Nun wurde von 50 µl jeder Probe auf eine 96 Lochplatte ausgebracht und mit 50 µl des 2x Reaktionspuffers 3 versetzt. Dieser wurde zuvor mit 10 µl DDT pro 1 ml 2x Reaktionspuffers 3 versetzt. Nun wurde jeder Probe noch 5 µl Caspase 3 colorimetrisches Substrat (DEVD-pNA) zugegeben und die Platte für 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte in einem ELISA Reader bei 405 nm Wellenlänge abgelesen.

2.4.4. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Allgemeines Funktionsprinzip

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

Zusätzlich ist es möglich mittels zweier Linsen, die eine ist in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (0° - 10°) angebracht (FSC: forward scatter) und die zweite rechtwinklig zur Verlaufsrichtung (90° ; SSC: sideward scatter), die Zellen auf Größe und Granularität hin zu untersuchen, wobei der FSC hauptsächlich durch die Größe, der SSC durch die Granularität bestimmt ist.

Sowohl das Streulicht als auch die Emission von Lichtquanten der durch den Laser angeregten Fluoreszenzfarbstoffe (Tabelle 10) werden von

Photodetektoren erkannt und in elektrische Signale umgewandelt. Das Zwischenschalten von Bandpassfilter ermöglicht es, das einfallende Licht nach Wellenlänge aufzutrennen und einzelne Fluoreszenzfarbstoffe getrennt voneinander zu quantifizieren.

Tabelle 10. Übersicht über die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe und die dazugehörigen Wellenlängen.

Fluoreszenzfarbstoff	Wellenlänge
Fluorescein-Isozyanat (FITC)	525 nm
Phycoerithrin (PE)	575 nm
Propidiumiodid (PI)	650 nm
Allophycocyanin (APC)	660 nm
Peridinin Chlorophyll-A-Protein (PerCP)	682 nm

Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der gebundenen Antikörper und somit zur Anzahl der untersuchten Oberflächenmoleküle. Damit die verschiedenen Messungen vergleichbar sind, ist es nötig, eine Probe mittels einer Isotypkontrolle anzufärben, die dann als negativ für das entsprechende Antigen gewertet wird. Das entsprechende Signal muss also soweit herunterreguliert werden, dass die Fluoreszenzintensität unter 10^1 mean fluorescence intensity (MFI) liegt. Das ermöglicht unterschiedliche Proben in etwa mit der gleichen Verstärkereinstellung zu messen.

In dieser Arbeit wurde ein FACSCalibur-Durchflusszytometer verwendet. Es arbeitet mit einem Argonlaser. Die Auswertung der mittels des FACS-Gerätes gewonnenen Ergebnisse erfolgt entweder mit CELL Quest (Version 3.2.1) oder FlowJo Software (Version 2.7.8).

FACS-Analyse

Für die FACS-Analyse wurden ca. 1×10^6 Zellen in einem 5 ml Polystyren-Röhrchen, 12 x 75 mm (Fa. Becton Dickinson) abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen je nach geplanter Messung weiterverarbeitet.

Färbung von Oberflächenmarkern

Das Anfärben verschiedener Marker auf der Zelloberfläche ermöglicht es, die Zellen zu charakterisieren und sich bei der Auswertung einer Messung nur auf eine bestimmte Population zu konzentrieren.

Dazu wurden die Zellen in ca. 200 µl PBS resuspendiert und mit 5 µl des Antikörpers (Konzentration 200 µg/ml) 20 min unter Lichtausschluss inkubiert. Danach wurde einmal mit PBS gewaschen. Die in 100 µl PBS resuspendierten Zellen wurden nun auf einem FACSCalibur mit Hilfe von CellQuest Software analysiert.

Annexin V/PI -Färbung

Die Annexin V/PI-Färbung ist eine Methode, die es ermöglicht früh- und spät-apoptotische von nekrotischen Zellen mittels der FACS-Analyse zu unterscheiden. Sie beruht auf der Tatsache, daß bei gesunden Zellen das Phospholipid Phosphatidylserin ausschließlich in der inneren Zellmembran zu finden ist. Wird eine Zelle jedoch apoptotisch, so beginnt sich diese strenge Trennung aufzuheben und Phosphatidylserin findet sich auch in der äußeren Zellmembran. So besteht die Möglichkeit in einer Ca^{2+} -abhängigen Reaktion Annexin V an Phosphatidylserin auf der Zellaussenseite zu binden und apoptotische Zellen zu detektieren. Die zusätzliche Färbung mit PI, welches durch Defekte in der Zellmembran in des Zellinnere gelangt und dort an die DNA bindet, ermöglicht es zwischen früh-apoptotischen Zellen (nur Annexin V positiv) und spät-apoptotischen oder nekrotischen Zellen (sowohl Annexin V als auch PI positiv) zu unterscheiden.

Für die Annexin V/PI-Färbung wurden die Zellen in 200 µl Annexin V-Binding-Buffer resuspendiert, mit 5 µl des Antikörpers (Konzentration 200 µg/ml) 10 min unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend mit PBS einmal gewaschen. Nun wurden die Zellen in ca. 100 µl Annexin V-Binding-Buffer resuspendiert und nach Zugabe von 5 µl PI (Konzentration 100 µg/ml) analysiert.

Intrazelluläre FACS-Messungen

Um intrazelluläre Marker zu bestimmen, muß eine Zelle zuerst fixiert und anschließend permeabilisiert werden. Dazu wurden die Zellen bei 400 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden dann in 100 µl Fix-Lösung resuspendiert und 15 min inkubiert. Danach wurde einmal mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandsvolumens wurden die Zellen in 100 µl Perm-Lösung resuspendiert. Gleichzeitig wurden 5 µl des jeweiligen Antikörpers zugegeben und gut gemischt. Nach 15 min Inkubation wurden die Zellen erneut gewaschen, in 100 µl PBS resuspendiert und analysiert.

2.5. Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Nachweis von DNA-Fragmentation

Die DNA Fragmentation dient als charakteristischer Nachweis der Apoptose bzw. des programmierten Zelltods (McConkey et al. 1991). Agarosegele erlauben die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe und ermöglichen so eine ungefähre Abschätzung des Ausmaßes der Fragmentation.

DNA-Extraktion

Ca. 25×10^6 Zellen wurden geerntet, bei 600 g und 4 °C abzentrifugiert, einmal in 4 °C kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Zur Disruption der Membranen wurde 200 µl DNA-Lysis-Puffer zugegeben und leicht geschüttelt. Zur Stabilisierung der DNA wurde dann NaCl in einer Endkonzentration von 50 mM sowie 4,5 µl Proteinase K zugegeben. Daraufhin wurden die Proben 5 h bei 50 °C auf einem Schüttler inkubiert, was zur Spaltung aller DNA-bindenden Proteine führt. Nach Zugabe eines TE-gesättigten Phenol-Chloroform-Gemisches wurde erneut zentrifugiert und die oberste, wasserklare Phase abgenommen und mit 1 x Volumen Isopropanol versetzt. Durch Einfrieren dieses Gemisches für mindestens 1 h bei -70 °C kommt es zur

Fällung der DNA. Nach erneutem Auftauen wurde die gefällte DNA in Ethanol gewaschen, in DNase-freiem Wasser gelöst und 30-60 min bei 37 °C mit 5 µl RNase (DNase-frei) inkubiert.

Konzentrationsbestimmung von DNA

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

Agarosegele zur Trennung von DNA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde ein 1,6 %iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 3,2 g Agarose mit 200 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle zum Kochen gebracht bis keine Schlieren mehr zu erkennen waren. Nach Zugabe von 7,5 µl Ethidiumbromid wurde es in die vorgegebene Gelwanne gegossen und 1 h lang abgekühlt.

Gelelektrophorese

Durch Einbringen in die Elektrophorese-Kammer wird das Gel mit TAE-Puffer überschichtet. Nach Entfernen des Kammes können die DNA-Proben mit 5x Ladepuffer in die Geltaschen geladen werden. Der Ladepuffer enthält einen Farbstoff, der das Einpipettieren erleichtert, und Glycerin, welches aufgrund seiner höheren Dichte das rasche Absinken in die Taschen zur Folge hat. Nun erfolgt das Anlegen eines elektrischen Feldes, welches durch Einstellen der Stromstärke auf 90-100 mA und Wahl eines nicht begrenzenden Spannungswertes festgelegt wird.

Da der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in die Nukleotidstränge interkaliert, kann die Auftrennung der DNA-Fragmente im Ultraviolett (UV)-Licht (366 nm) kontrolliert werden. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele im UV-Licht mit einer Polaroidsofortbildkamera fotografiert.

2.5.2. Transfer von Protein aus Tris-HCl-Gelen auf PVDF-Membranen (Western-Blot)

Bei der Western-Blot-Analyse wird aus Zellen Protein isoliert, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Durch spezifische Antikörper ist es nun möglich einzelne Proteine quantitativ nachzuweisen (Towbin et al. 1979).

2.5.2.1. Probenvorbereitung

Die Zellen wurden in Medium geerntet, bei 500 *g* abzentrifugiert, in 200 μ l Western-Blot Lyse-Puffer resuspendiert und 30 min auf Eis gestellt. Danach wurde erneut zentrifugiert und der Überstand bei -20 °C eingefroren.

2.5.2.2. Bradford Proteinbestimmung

Um quantitative Aussagen über die Expression der verschiedenen Proteine machen zu können, müssen gleiche Gesamtproteinmengen in die einzelnen Geltaschen eingebracht werden. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte colorimetrisch mit Serva Blau nach der von Bradford und Mitarbeitern, vorgeschriebenen Methode (Bradford 1976). Dazu wurde eine Stammlösung aus 0,1 g/ml BSA mit Aqua dest. zu 50, 100, 200, 400, 600, 800 und 1000 μ g/ml Standardlösungen verdünnt. Das Bradford-Reagenz wurde zu vier Teilen mit Aqua dest. gemischt. Nun wurden 10 μ l des Standards bzw. der Proben auf eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert und mit 200 μ l verdünntem Bradford-Reagenz vermischt. Nach 5 min wurden die Konzentrationen mit einem ELISA-Reader (OD 595 nm) bestimmt. Die Werte der Proteinkonzentration lagen zwischen 400 und 800 μ g/ml.

2.5.2.3. Western-Blot

Der Western-Blot verlief in folgenden Schritten:

Proteinseparation mit Hilfe von HCl-Gel-Elektrophorese

Die Auftrennung der Proteine wurde nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970) mittels denaturierender Gelelektrophorese durchgeführt. Im elektrischen Feld erfolgt die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe durch den Zusatz von SDS, das sich an die Proteine anlagert. Die Proteinladung wird hierbei

Waschen

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

Inkubation mit dem zweiten Antikörper

Der zweite Meerrettichperoxidase-markierte (Horseradish Peroxidase, HRP) Antikörper wurde je nach Erstantikörper anti-Maus oder anti-Hase gewählt und in PBS-Tween 1 : 1000 verdünnt. Die PVDF-Membran wurde nun 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurden die Membranen wie beschrieben erneut gewaschen.

ECL-Nachweis

Die PVDF-Membran wurde 1 min vollständig mit einem 1 : 1 Gemisch aus ECL Lösung A und B bedeckt. Hierbei kommt es an den Stellen, wo das gesuchte Protein vorhanden ist, zu einer Chemilumineszenz Reaktion. Chemisch kommt es zur Oxidation des Luminols (zyklisches Diacylhydrazin) bei Anwesenheit von Peroxidase und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Durch diese Reaktion kommt es zur Aussendung von Licht, welches den Proteinnachweis ermöglicht. Danach wurde der Blot in Saran Film eingeschlagen und in einer Fotokammer befestigt. Der Film wurde je nach nötiger Belichtungszeit in die Kammer eingelegt und anschließend automatisch entwickelt.

Quantitative Auswertung

Nach der Entwicklung wurden die Filme eingescannt und densitometrisch nach der Schwärze der Banden ausgewertet.

2.6. Statistik

Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel angegeben. Die Streuung wird als Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of mean*, SEM) angegeben. Um die statistische Signifikanz der Unterschiede einzelner Ergebnisse zu bestimmen, wurde der zweiseitige Student-t-Test für paarige Stichproben durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten $< 0,050$ angenommen. Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe der Software

StatView D-4.5 (Abacus Concepts, CA, USA) durchgeführt. Die grafische Darstellung der Daten erfolgte mittels der Programme Excel und PowerPoint (Microsoft, USA).

3. Ergebnisse

3.1. Apoptoseinduktion durch spezifische PDE-Inhibitoren

3.1.1. Apoptoseinduktion durch den PDE-Typ-4-Inhibitor Rolipram

B-CLL-Zellen wurden für 48 h mit ansteigenden Konzentrationen Rolipram (0 μ M, 100 μ M, 1 mM und 10 mM) inkubiert. Die Apoptoserate wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt und die Annexin V⁺/PI⁻-Zellen verglichen (Abbildung 7). Zehn mM Rolipram führte zu einem Anstieg der Annexin V⁺/PI⁻-Zellen auf 19 ± 2 % verglichen mit der Kontrolle $5,2 \pm 1,2$ % ($p = 0,001$, $n = 19$ Spender). Es wurde für Rolipram eine dosisabhängige Apoptoseinduktion nachgewiesen. Dies entspricht Ergebnissen, die in der Literatur beschrieben wurden (Kim et al. 1998).

3.1.2. Apoptoseinduktion durch den PDE-Typ-3-Inhibitor Enoximon

Durch die Inkubation von B-CLL-Zellen mit dem spezifischen PDE-Typ-3-Inhibitor Enoximon konnte keine dosisabhängige Apoptoseinduktion nachgewiesen werden. Die Zellen wurden für 48 h mit ansteigenden Konzentrationen Enoximon (0 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M) inkubiert. Ein μ M Enoximon führte zu einer Apoptoserate von 6,7 %, im Vergleich dazu, konnte durch Zugabe von 100 μ M Enoximon lediglich eine Steigerung auf 7,6 % ($n = 3$ Spender) erreicht werden (keine Abbildung).

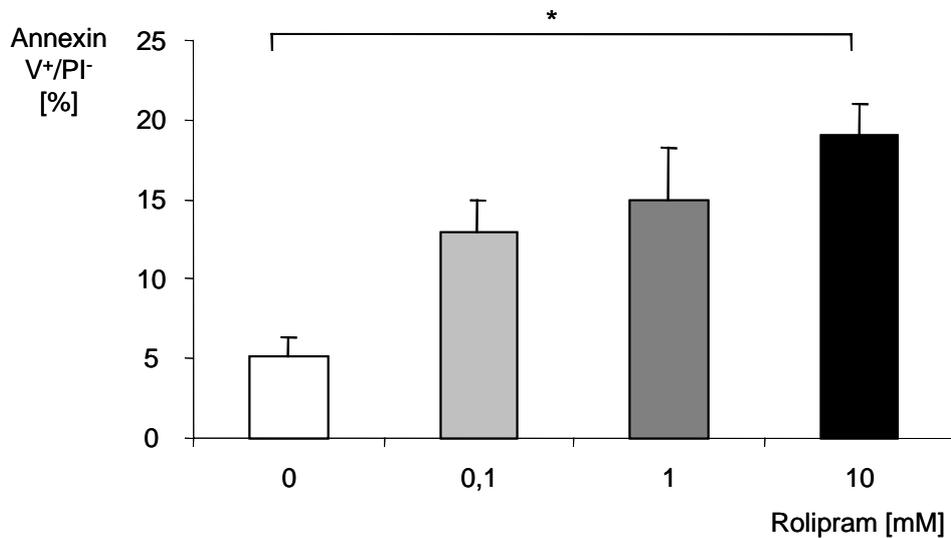


Abbildung 7. Dosisabhängiger Anstieg der Apoptoserate durch den spezifischen PDE-Typ-4-Inhibitor Rolipram. B-CLL-Zellen ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen Rolipram inkubiert. Die Apoptoserate wurde durchflusszytometrisch mittels Annexin V/PI-Doppelfärbung bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM von 19 verschiedenen Spendern dargestellt.

3.2. Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika

3.2.1. Apoptoseinduktion durch das Purinanalogon Fludarabin

Als nächstes wurde das Purinanalogon Fludarabin bezüglich seiner Apoptose induzierenden Wirkung auf B-CLL-Zellen untersucht. Diese wurden über 48 h mit verschiedenen in der Literatur vorbeschriebenen Konzentrationen (Bellosillo et al. 1999) Fludarabin ($0 \mu\text{M}$, $1,7 \mu\text{M}$ und $5 \mu\text{M}$) inkubiert (Abbildung 8). $1,7 \mu\text{M}$ Fludarabin führte zu einem Anstieg der Apoptoserate auf $20,5 \pm 1,2 \%$, verglichen mit einer Apoptoserate von $5,2 \pm 1,2 \%$ in unbehandelten Zellen ($n = 19$ Spender, $p < 0.05$). Fünf μM Fludarabin führte zu einem weiteren Anstieg der Apoptoserate auf $24,9 \pm 3,1 \%$ ($n = 19$ Spender). Es konnte damit eine dosisabhängige Apoptoseinduktion nachgewiesen werden.

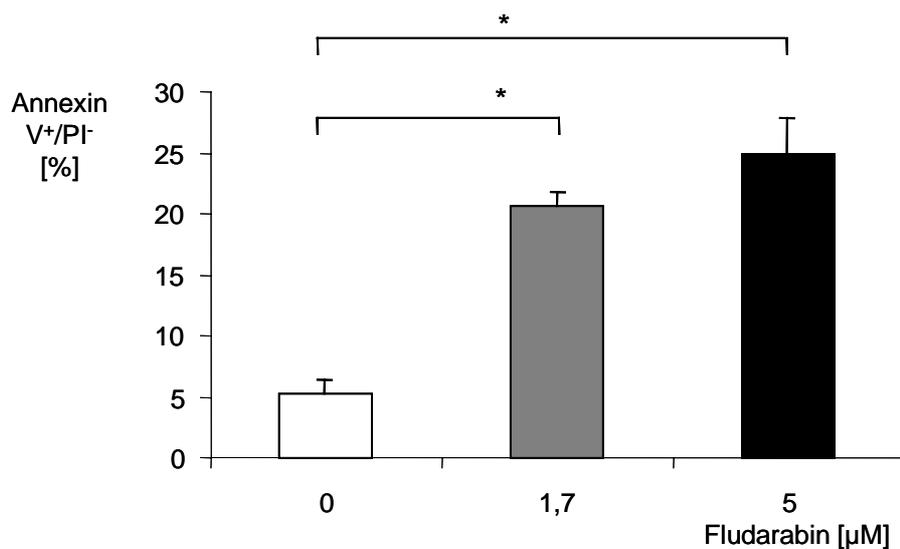


Abbildung 8. Dosisabhängige Erhöhung der Apoptoserate durch das Purinanalogen Fludarabin. B-CLL-Zellen ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden für 48 h mit ansteigenden Konzentrationen Fludarabin inkubiert. Die Apoptoserate wurde durchflusszytometrisch mittels Annexin V/PI-Doppelfärbung bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM von 19 verschiedenen Spendern dargestellt.

3.2.2. Apoptoseinduktion durch das Antrachinon-Derivat Mitoxantron

B-CLL-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen Mitoxantron (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), für 48 h inkubiert (Abbildung 9). Die Inkubation der Zellen mit 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Mitoxantron führte zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate auf $19,7 \pm 5,0$ % ($n = 19$ Spender) im Vergleich zur Kontrollapoptoserate von $5,2 \pm 1,2$ %. Durch die Zugabe von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Mitoxantron konnte ein weiterer Anstieg der apoptotischen Zellen auf $27,6 \pm 1,3$ % ($n = 19$ Spender) erreicht werden. Diese dosisabhängige Apoptoseinduktion stimmt mit Daten aus der Literatur überein (Bellosillo et al. 1998).

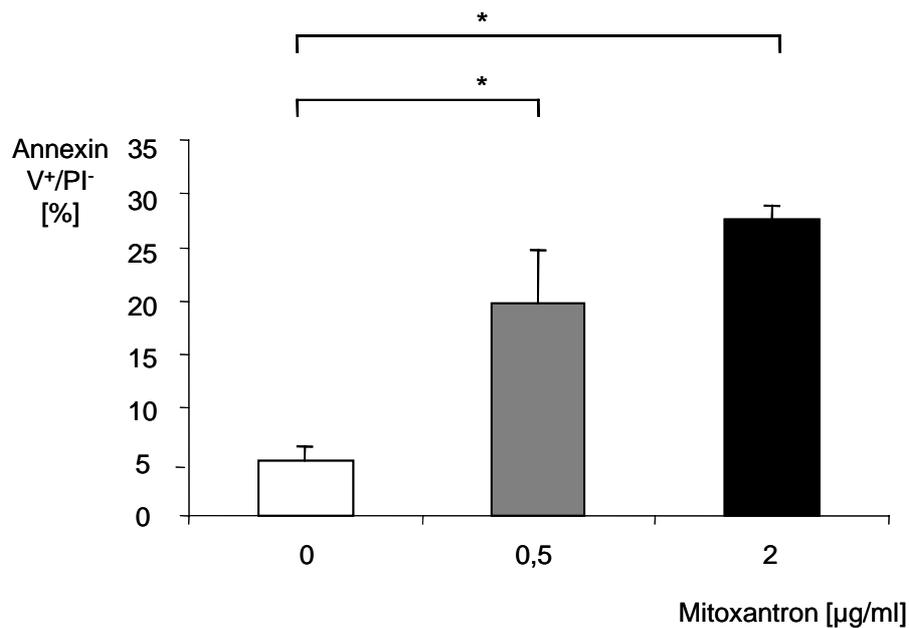


Abbildung 9. Mitoxantron induziert dosisabhängig Apoptose in B-CLL-Zellen. Diese wurden für 48 h mit Mitoxantron (0 µg/ml, 0,5 µg/ml, 2 µg/ml) inkubiert. Danach wurde die Apoptoserate mittels Annexin V/PI-Färbung in der Durchflusszytometrie bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte ± SEM von 19 verschiedenen Spendern dargestellt.

3.3. Apoptoseinduktion durch die Kombination von PDE-Typ-4-Inhibitoren und Chemotherapeutika

3.3.1. Wirkung der Kombination von Rolipram und Fludarabin auf B-CLL-Zellen

Als nächstes wurde untersucht, ob sich durch die Kombination von Fludarabin mit dem PDE-Typ-4-Inhibitor Rolipram eine weitere Steigerung der Apoptoserate erzielen lässt. Hierzu wurden die B-CLL-Zellen mit 1 µM Rolipram und 1,7 µM Fludarabin inkubiert. Nach 48 h konnte bei der Kombination der beiden Substanzen eine signifikant höhere Apoptoserate ($25,0 \pm 1,4$ % Annexin V⁺/PI⁻ Zellen) gemessen werden, verglichen zu Rolipram ($14,9 \pm 3,1$ % Annexin V⁺/PI⁻ Zellen; n = 19 Spender, p < 0,05) bzw. Fludarabin alleine ($20,5 \pm 1,2$ % Annexin V⁺/PI⁻ Zellen; n = 19 Spender, p < 0,05), (Abbildung 10A/B).

Abbildung 10 A.

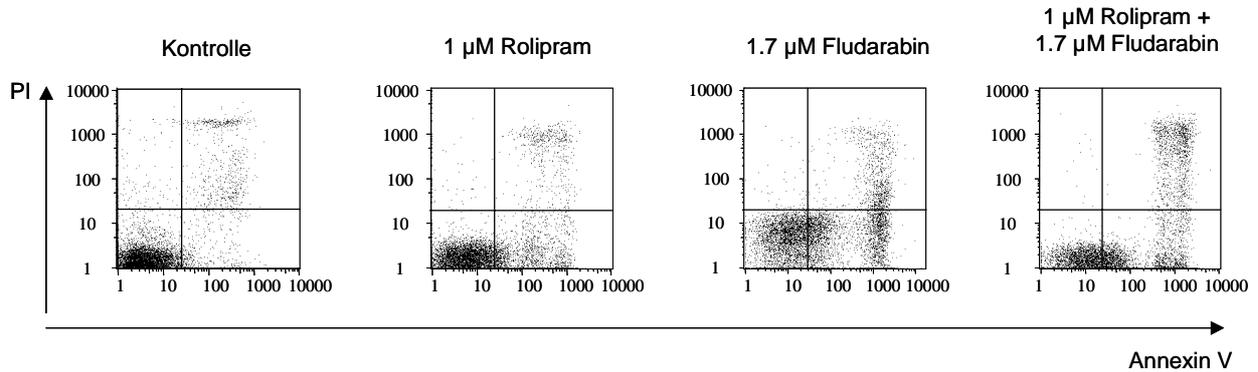


Abbildung 10 B.

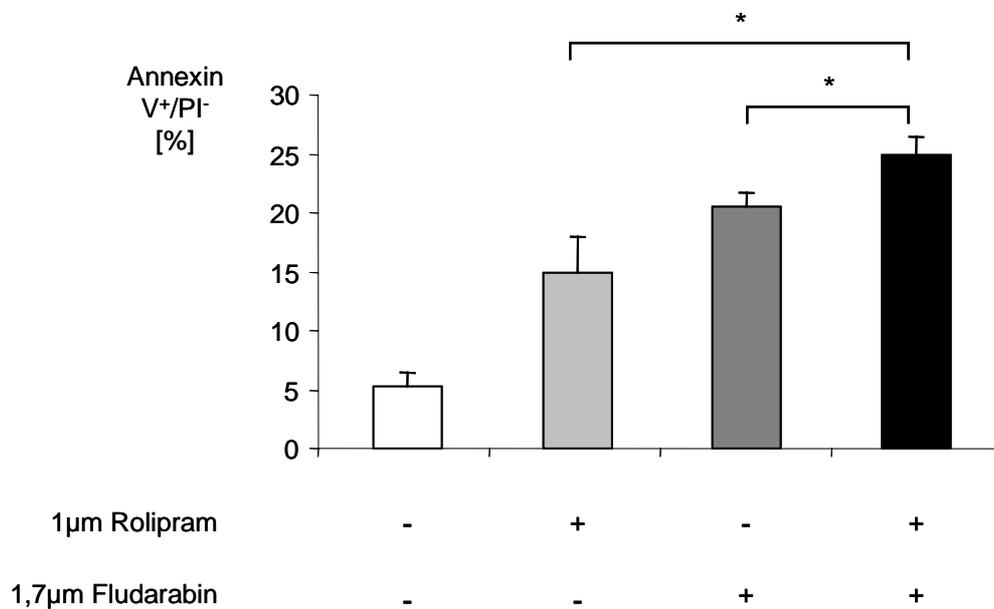


Abbildung 10 (A.) Durchflusszytometrische Analyse der durch Rolipram- und Fludarabin-induzierten Apoptose. Die X-Achse repräsentiert Annexin V, die Y-Achse die PI-Fluoreszenz. Frühapoptotische Zellen sind durch eine alleinige Aufnahme von Annexin V gekennzeichnet, während spätapoptotische Zellen zusätzlich PI positiv zur Darstellung kommen. Hier handelt es sich um ein repräsentatives Beispiel der insgesamt 19 untersuchten Patienten. **(B.)** Signifikante Zunahme der Apoptoserate durch die Kombination von Rolipram und Fludarabin. B-CLL-Zellen ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden für 48 h inkubiert. Die danach ermittelte Apoptoserate zeigte für die Kombination der beiden Substanzen eine weitere signifikante Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zu 1 µM Rolipram oder 1,7 µM Fludarabin alleine. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM von 19 verschiedenen Spendern dargestellt.

3.3.2. Wirkung der Kombination von Rolipram und Mitoxantron auf B-CLL-Zellen

Ob sich, ähnlich wie bei Fludarabin, auch bei dem Antrachinon-Derivat Mitoxantron durch die Zugabe des selektiven PDE-Typ-4-Inhibitors Rolipram eine signifikante Zunahme der Apoptoserate erzielen lässt, wurde im Folgenden untersucht. Hierzu wurden B-CLL-Zellen für 48 h mit 1 μ M Rolipram sowie 0,5 μ g/ml Mitoxantron inkubiert. Danach zeigte sich, dass im Vergleich zu 0,5 μ g/ml Mitoxantron alleine ($19,7 \pm 5$ % Annexin V^+ /PI $^-$ -Zellen; $n = 19$ Spender) durch die Kombination mit 1 μ M Rolipram ($23,5 \pm 8,2$ % Annexin V^+ /PI $^-$ -Zellen; $n = 19$ Spender) keine signifikante Erhöhung der Apoptoserate erzielt werden konnte (Abbildung 11).

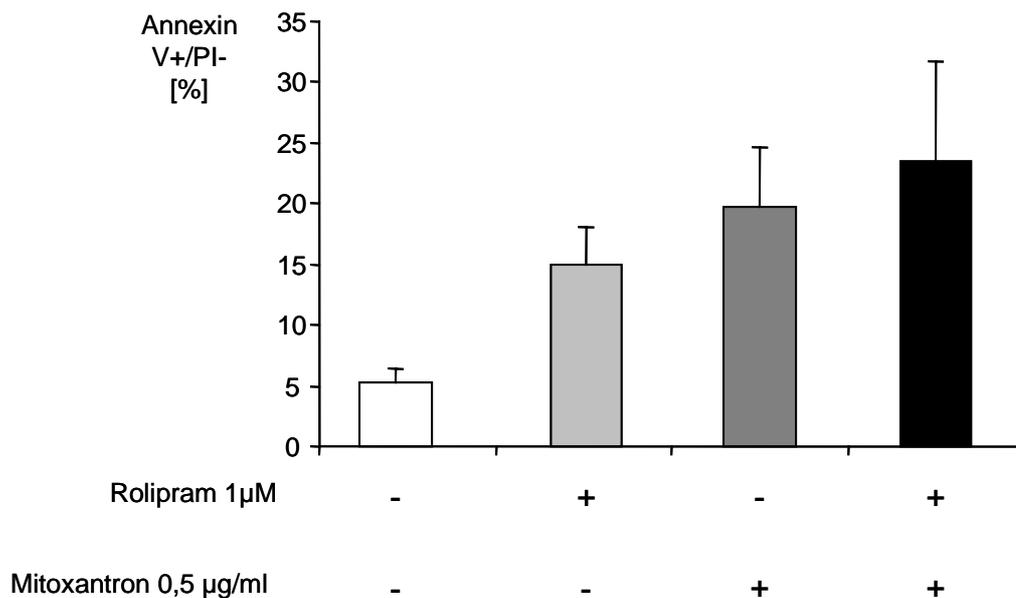
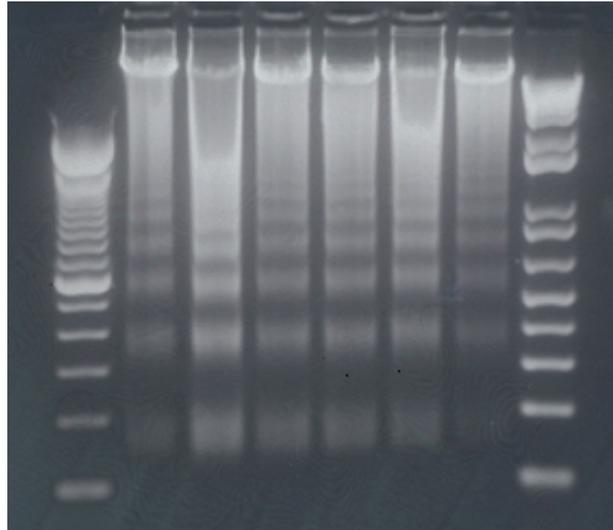


Abbildung 11. Keine signifikante Zunahme der Apoptoserate durch die Kombination von Rolipram und Mitoxantron. B-CLL-Zellen (5×10^6 /ml) wurden für 48 h inkubiert. Die danach ermittelte Apoptoserate zeigte für die Kombination der beiden Substanzen, im Vergleich zu 0,5 μ g/ml Mitoxantron alleine, keinen signifikanten Anstieg der Apoptoserate. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM von 19 verschiedenen Spendern dargestellt.

3.4. Nachweis der Rolipram-induzierten Apoptose durch DNA-Fragmentation

Um mit einer zweiten Methode einen Apoptosenachweis durchzuführen, wurde die DNA-Fragmentation mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Es wurden hier die Konzentrationen verwendet, die für die Elektrophorese die deutlichsten Unterschiede ergaben. Insgesamt wurden 8 verschiedene Patienten untersucht, wobei exemplarisch ein repräsentatives Beispiel abgebildet wird. Hierzu wurden die B-CLL-Zellen für 72 h mit einer Mediumkontrolle, Rolipram (10 μ M), Fludarabin (5 μ M), Mitoxantron (0,5 μ g/ml) sowie den Kombinationen des PDE-Typ-4-Inhibitors mit Fludarabin und Mitoxantron, inkubiert. Die DNA wurde isoliert und 10 bis 15 μ g mittels Gelelektrophorese separiert. Die Visualisierung erfolgte nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht (Abbildung 12). Die Zellen der Kontrolle, die nur in Medium inkubiert wurden, zeigten keine Fragmentation, während alle anderen Substanzen sowie die Kombinationen, beweisend für die Apoptose, eine Fragmentation induzierten.



Rolipram 10 μ M	-	+	-	+	-	+
Fludarabine 5 μ M	-	-	+	+	-	-
Mitoxantrone 0.5 μ g/ml	-	-	-	-	+	+

Abbildung 12. Rolipram induziert DNA-Fragmentation. Mononukleäre Zellen von B-CLL-Patienten wurden über 72 h mit verschiedenen Konzentrationen Rolipram, Fludarabin, Mitoxantron und den Kombinationen aus Rolipram mit Fludarabin bzw. Mitoxantron inkubiert. In der Mediumkontrolle konnte nach Separation mittels Gelelektrophorese keine signifikante DNA-Fragmentation nachgewiesen werden, während alle anderen Substanzen eine deutliche DNA-Fragmentation induzierten. Hier handelt es sich um ein repräsentatives Beispiel der 8 insgesamt untersuchten Patienten.

3.5. Rolle von IL-10 in Bezug auf die Rolipram-induzierte Apoptose

Es wurde vorbeschrieben, dass Rolipram die endogene IL-10-Synthese bei gesunden Spendern zumindest teilweise cAMP-abhängig induziert (Kambayashi et al. 1995; Platzer et al. 1995; Eigler et al. 1998).

3.5.1. Messung der IL-10-Konzentration nach Inkubation mit Rolipram

Um die Möglichkeit einer IL-10-Abhängigkeit der Rolipram-induzierten Apoptose zu überprüfen, wurde mittels ELISA die IL-10-Konzentrationen im Überstand sowie im Lysat der B-CLL-Zellen ermittelt. Die B-CLL-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen von Rolipram (0 nM, 100 nM, 1 μ M und 10 μ M)

in Kombination mit 10 ng/ml LPS, 0,85 μ M Fludarabin und 0,1 μ g/ml Mitoxantron für 48 h inkubiert. Der Zeitpunkt 48 h wurde gewählt, da hier in früheren Kinetik-Untersuchungen das IL-10-Plateau nachgewiesen wurde (Eigler et al. 1998). Eine Stimulation mit LPS wurde durchgeführt, da für Rolipram nur in Kombination mit einem zweiten Stimulus ein signifikanter IL-10-Anstieg gemessen wurde. Nach 48 h konnte weder im Überstand, noch im Lysat eine signifikante Menge von IL-10 detektiert werden (Abbildung 13).

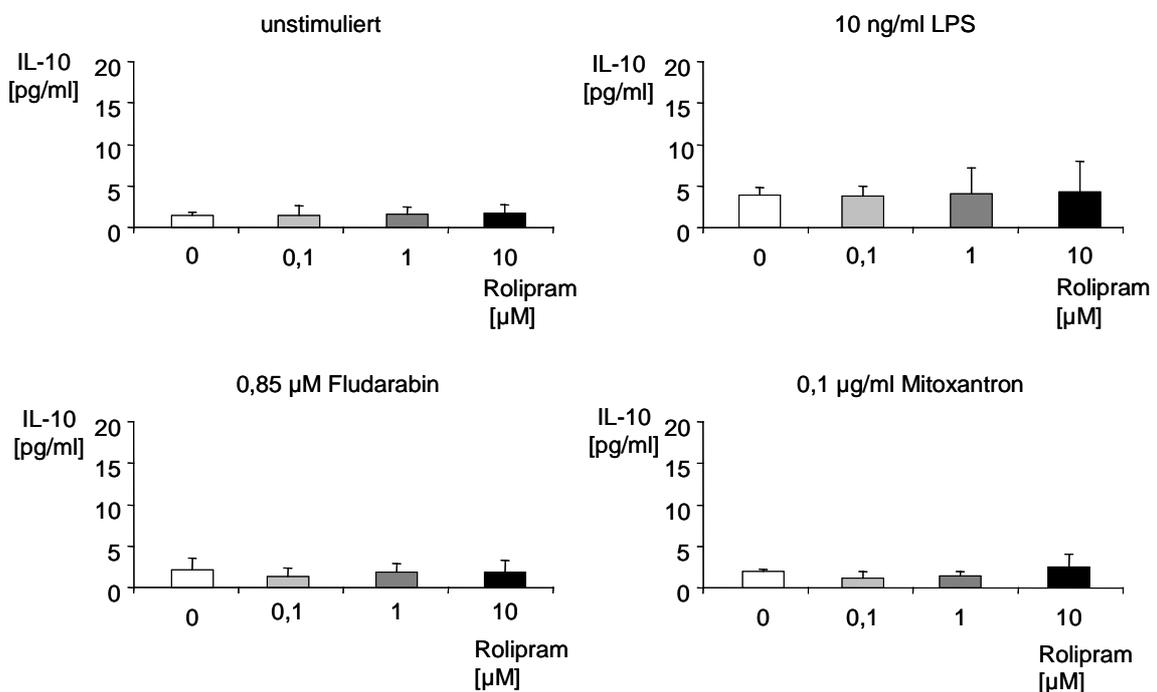


Abbildung 13. Rolipram induziert kein IL-10 in B-CLL-Zellen. 5×10^6 /ml Zellen wurden mit Rolipram alleine, sowie in Kombination mit LPS, Fludarabin und Mitoxantron für 48 h inkubiert. Es konnte keine signifikante Menge IL-10 gemessen werden.

3.5.2 Wirkung eines IL-10 neutralisierenden Antikörpers auf die Rolipram-induzierte Apoptose

Um eine IL-10-abhängige Apoptoseinduktion durch Rolipram sicher ausschließen zu können, wurde diese in Gegenwart neutralisierender IL-10-Antikörper durchgeführt. Hierfür wurden die B-CLL-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen Rolipram (0 nM, 100 nM, 1 μ M und 10 μ M) sowie einem neutralisierenden IL-10 Antikörper für 48 h inkubiert. Es konnte durch die Zugabe des IL-10 neutralisierenden Antikörpers ($74,3 \pm 4,4$ % Annexin V⁺/PI⁺-Zellen) kein signifikanter Rückgang der Apoptoserate im Vergleich zu 10 μ M Rolipram ($69,2 \pm 10,2$ Annexin V⁺/PI⁺-Zellen, n = 5 Spender) bzw. niedrigeren Konzentrationen beobachtet werden (Abbildung 14).

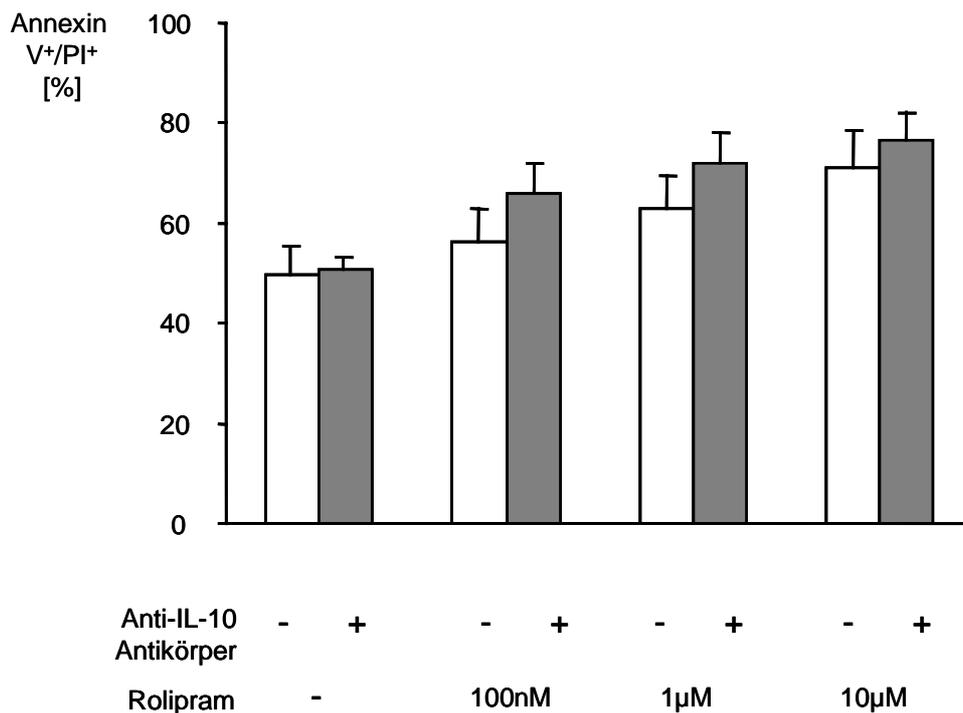


Abbildung 14. Keine Inhibition der Rolipram-induzierten Apoptose durch IL-10 Blockade. B-CLL-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen Rolipram allein und in Kombination mit einem IL-10 neutralisierenden Antikörper inkubiert. Danach wurde die Apoptoserate durchflusszytometrisch mittels Annexin V/PI-Färbung bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM von n = 5 verschiedenen Spendern dargestellt.

3.6. Rolle der Caspasen in Bezug auf die Rolipram-induzierte Apoptose

3.6.1. Wirkung des Pan-Caspase Inhibitors z-VAD-fmk auf die Rolipram-induzierte Apoptose

Um eine Caspaseabhängigkeit für die Rolipram-induzierte Apoptose zu evaluieren, wurden B-CLL-Zellen mit Rolipram (0 μM , 1 μM und 10 μM) sowie dem Pan-Caspase-Inhibitor (z-VAD-fmk; 0 μM , 50 μM und 200 μM) für 24 h inkubiert. Die eingesetzten Mengen z-VAD-fmk entsprechen den in der Literatur vorgeschriebenen Konzentrationen (Mateo et al. 1999). Ohne Zugabe des Pan-Caspase-Inhibitors induzierte Rolipram wie vorgeschrieben eine dosisabhängige Apoptose. Durch 50 μM z-VAD-fmk konnte die spontane Apoptoserate der Mediumkontrolle von $12,1 \pm 2,3 \%$ auf $12,5 \pm 2,2 \%$, bei 1 μM Rolipram von $16,9 \pm 2,8 \%$ auf $14,8 \pm 3,0 \%$ und bei 10 μM Rolipram von $19,8 \pm 3,5 \%$ auf $14,6 \pm 1,9 \%$ Annexin V⁺/PI⁻-Zellen reduziert werden (Abbildung 15). Die Inkubation über 24 h mit 200 μM z-VAD-fmk führte sogar dazu, dass die Apoptoserate unter die der spontanen Apoptoserate der Mediumkontrolle fiel.

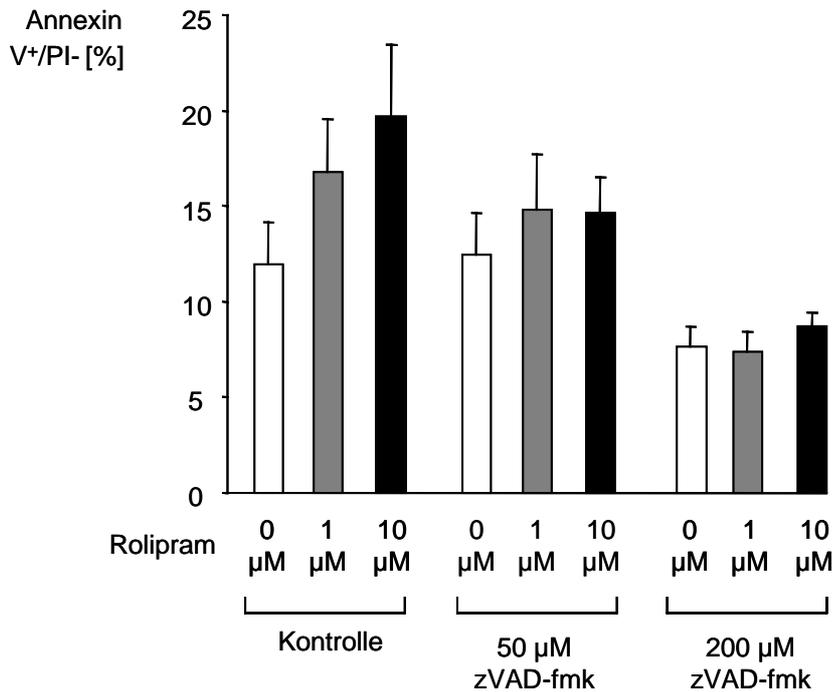


Abbildung 15. Reduktion der Rolipram-induzierten Apoptose in Anwesenheit des Pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk. B-CLL-Zellen wurden über 24 h mit Rolipram (0 µM, 1 µM und 10 µM) sowie ansteigenden Konzentrationen z-VAD-fmk (0 µM, 50 µM und 200 µM) inkubiert. Die Apoptoserate wurde mittels Annexin V/PI-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 7$ verschiedenen Spendern dargestellt.

3.6.2. Bestimmung der Caspase-3-Aktivität unter Rolipram und z-VAD-fmk

Als nächstes wurde die Rolipram-abhängige Caspase-3-Aktivität mittels eines colorimetrischen Assays bestimmt. In Abwesenheit des Pan-Caspase-Inhibitors konnte eine dosisabhängige Erhöhung der Caspase-3-Aktivität durch Rolipram beobachtet werden. Die relative Caspase-3-Aktivität der Mediumkontrolle nach 24 h betrug $1,0 \pm 0,2$ im Vergleich zu $1,3 \pm 0,2$ bei 1 µM Rolipram und $1,9 \pm 0,3$ bei 10 µM Rolipram ($p < 0,05$, $n = 4$, im Vergleich zur Kontrolle). Bei Zugabe von 50 µM z-VAD-fmk wurde die Caspase-3-Aktivität reduziert, jedoch war eine dosisabhängige Erhöhung durch Rolipram immer noch erkennbar (Abbildung 16). In Anwesenheit von 200 µM z-VAD-fmk blieb die Caspase-3-Aktivität jedoch auch durch Zugabe von Rolipram unter der Mediumkontrolle. Eine erneute Messung nach 48 h zeigte eine Zunahme der

Apoptoserate und Caspase-3-Aktivität im Vergleich zum 24 h Wert. Dies ist vermutlich auf den Aktivitätsverlust des Pan-Caspase-Inhibitors zurückzuführen.

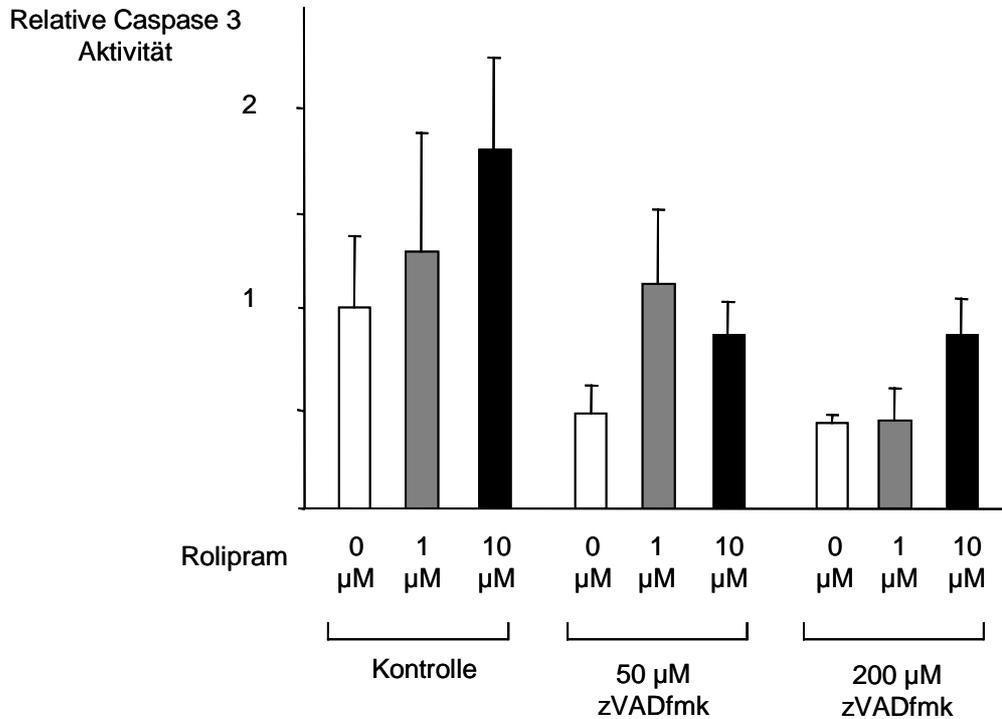


Abbildung 16. Ansteigende Konzentrationen z-VAD-fmk führen zu zunehmender Abnahme der Caspase-3-Aktivität. B-CLL-Zellen wurden über 24 h mit ansteigenden Konzentrationen Rolipram (0 µM, 1 µM und 10 µM) sowie dem Pan-Caspase-Inhibitor (0 µM, 50 µM und 200 µM) inkubiert. Die Caspase-3-Aktivität wurde mittels eines colorimetrischen Assays bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 4$ verschiedenen Spendern dargestellt.

3.7. Veränderung verschiedener Mitglieder der *Bcl-2*-Familie im Rahmen der Rolipram- und Fludarabin-induzierten Apoptose

Es wurde vorbeschrieben, dass in B-CLL-Zellen anti-apoptotische Mitglieder der *Bcl-2*-Familie (*Bcl-2*, *Bcl-x*) besonders stark und pro-apoptotische Mitglieder schwach exprimiert werden (Caligaris-Cappio et al. 1992; Schena et al. 1992; Hanada et al. 1993; Kitada et al. 1998). Es konnte ebenfalls in verschiedenen Studien eine Korrelation zwischen einer hohen *Bcl-2/Bax*-Ratio und einer erniedrigten Chemosensibilität beobachtet werden (Thomas et al. 1996; Pepper et al. 1999). Folgende Versuche wurden durchgeführt, um zu klären, ob die Rolipram-induzierte Apoptose in B-CLL-Zellen durch eine Verschiebung der Mitglieder der *Bcl-2* Familie (*Bcl-2*, *Bax* und *Bcl-x*) hin zu einem pro-apoptotischen Expressionsmuster mitbegründet ist.

3.7.1. Veränderung der *Bcl-2/Bax*-Ratio unter Rolipram und Fludarabin

B-CLL-Zellen wurden für 48 h mit einer Mediumkontrolle, Rolipram (10 μ M), Fludarabin (5 μ M) und der Kombination aus beiden, inkubiert. Danach wurden *Bcl-2* und *Bax* mittels Western Blot nachgewiesen. Um eine quantitative Aussage treffen zu können, wurden die Banden densitometrisch ausgewertet und aus den Ergebnissen die *Bcl-2/Bax*-Ratio errechnet. Es konnte durch die Zugabe von 10 μ M Rolipram eine signifikante Reduktion der Ratio von $1,0 \pm 0$ in der Mediumkontrolle auf $0,6 \pm 0,1$ ($n = 7$ Spender, $p < 0,001$) erreicht werden. Fünf μ M Fludarabin senkten die Ratio auf $0,5 \pm 0,1$ ($n = 7$ Spender, $p < 0,001$) und die Kombination führte zu einer weiteren Reduktion auf $0,4 \pm 0,1$ ($n = 7$ Spender) (Abbildung 17 A/B).

Abbildung 17 A.

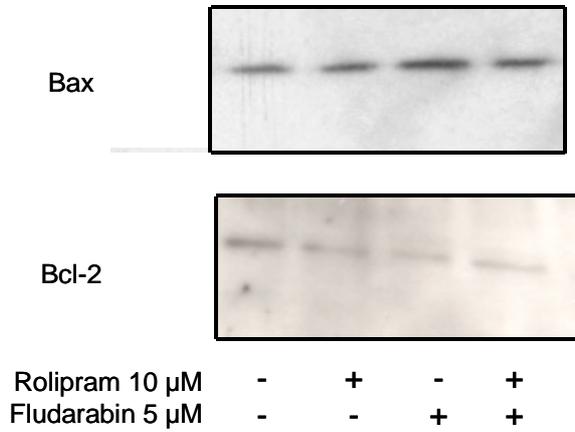


Abbildung 17 B.

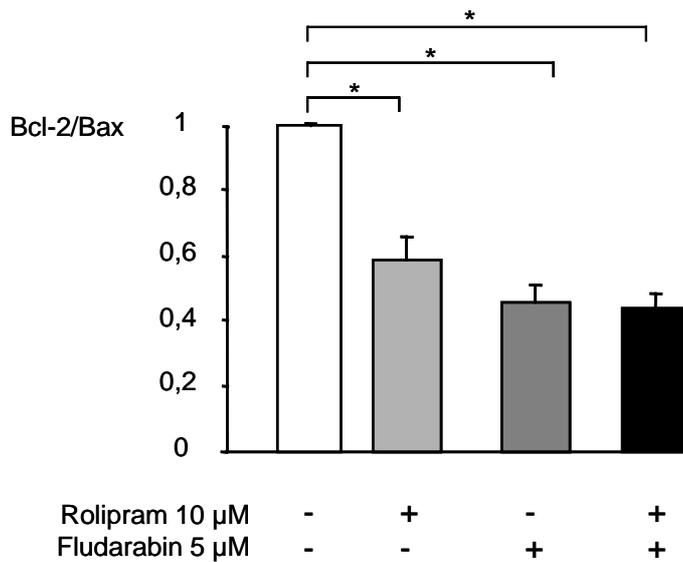


Abbildung 17 (A.) Repräsentatives Beispiel eines *Bcl-2* und *Bax*-Western Blots. Die Abbildungen zeigen nach 48 h Inkubation eine Abnahme der *Bcl-2*-Expression und eine Zunahme der *Bax*-Expression. Es handelt sich um eine Untersuchung aus $n = 7$ verschiedenen Spendern. **(B.)** Reduktion der *Bcl-2/Bax*-Ratio durch Rolipram. Die B-CLL-Zellen wurden über 48 h in Medium, Rolipram (10 μ M), Fludarabin (5 μ M) sowie der Kombination, inkubiert. Die Abbildung zeigt die, nach densitometrischer Messung der Western-Blot-Banden, berechnete Ratio. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 7$ verschiedenen Spendern dargestellt.

3.7.2. Suppression des anti-apoptotischen *Bcl-X* unter Rolipram

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die Expression des anti-apoptotische *Bcl-X* durch die Inkubation mit Rolipram reduzieren lässt.

Für diese Experimente wurden ansteigende Konzentrationen Rolipram (0 μ M, 100 μ M, 1 mM und 10 mM) verwendet, um einen dosisabhängigen Effekt bestimmen zu können. B-CLL-Zellen wurden für 48 h inkubiert und *Bcl-X* im Anschluss durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 18 A/B). Die maximale MFI wurde in der Mediumkontrolle ($11,4 \pm 2,2$) bestimmt. Sie konnte durch die Inkubation mit 10 μ M Rolipram signifikant reduziert werden ($4,6 \pm 0,3$; n = 4 Spender, p = 0,027).

Abbildung 18 A.

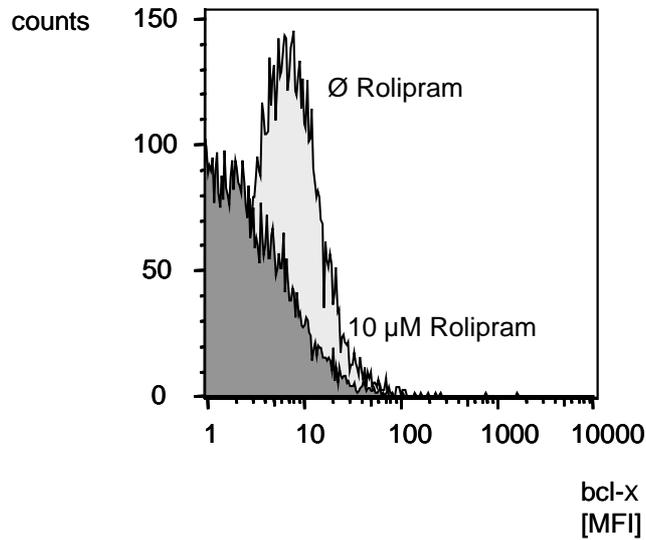


Abbildung 18 B.

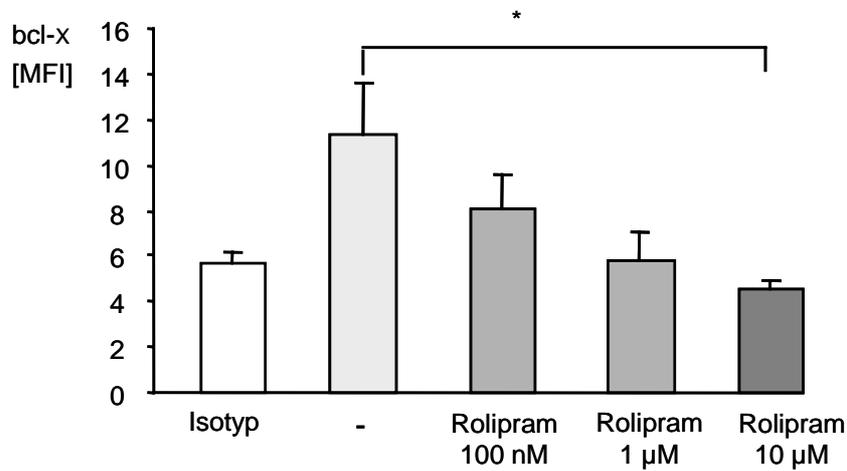


Abbildung 18 (A.) Repräsentatives Beispiel der durchflusszytometrischen *Bcl-x*-Bestimmung. Die Abbildungen zeigen nach 48 h Inkubation eine deutliche Reduktion der *Bcl-2*-Expression. Es handelt sich um ein repräsentatives Beispiel aus $n = 4$ verschiedenen Spendern. **(B.)** Dosisabhängige Suppression der *Bcl-x*-Expression durch Rolipram. B-CLL-Zellen wurden über 48 h mit ansteigenden Konzentrationen Rolipram (0 µM, 100 µM, 1 mM und 10 mM) inkubiert. Danach wurde die *Bcl-x*-Expression mit der Durchflusszytometrie ermittelt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 4$ verschiedenen Spendern dargestellt.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Apoptose-induzierende Wirkung des spezifischen PDE-Typ-4-Inhibitors Rolipram auf B-CLL-Zellen *in vitro* untersucht. Die quantitative Bestimmung der Apoptoserate erfolgte mittels der Durchflusszytometrie in Annexin V/PI-Doppelfärbung. Außerdem wurde, als weiterer Nachweis der beginnenden Apoptose, die DNA-Fragmentation, durch Gelelektrophorese durchgeführt. Zur genaueren Untersuchung der Rolipram-vermittelten Apoptose wurden die Expression verschiedener Mitglieder der *Bcl-2*-Familie (*Bax*, *Bcl-2* und *Bcl-x*), die Rolle von IL-10 sowie die Caspase-Abhängigkeit des induzierten Zelltods untersucht.

Es zeigte sich, dass der spezifische PDE-Typ-4-Inhibitor Rolipram *in vitro* dosisabhängig Apoptose induziert, während durch die Inkubation der B-CLL-Zellen mit dem spezifischen PDE-Typ-3-Inhibitor Enoximon keine Apoptose vermittelt werden konnte.

Die Kombination des Chemotherapeutikums Fludarabin mit dem spezifischen PDE-Typ-4-Inhibitor Rolipram ermöglichte den Nachweis eines signifikanten Anstiegs der Apoptoserate im Sinne eines synergistischen Effektes der beiden Substanzen. Durch die Kombination von Rolipram mit Mitoxantron war ebenfalls ein Anstieg der Apoptoserate zu verzeichnen, jedoch war dieser nicht signifikant. Die DNA-Fragmentation bestätigte die Daten der Annexin V/PI-Durchflusszytometrie. Die Zellen der Mediumkontrolle zeigten keine Fragmentation, während durch alle anderen Substanzen sowie durch die Kombinationen eine Fragmentation induziert wurde.

Des Weiteren wurde der Einfluss von IL-10 auf die Rolipram-induzierte Apoptose untersucht. Hierbei zeigte sich nach Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen Rolipram in Kombination mit LPS, Fludarabin und Mitoxantron, keine Induktion signifikanter Mengen IL-10. Auch bei der Koinkubation von B-CLL-Zellen mit Rolipram und einem IL-10-neutralisierenden Antikörper konnte kein signifikanter Rückgang der Apoptoserate nachgewiesen werden.

Als nächstes wurde die Caspaseabhängigkeit der PDE-Typ-4-Inhibitor-induzierten Apoptose untersucht. Es zeigte sich, dass durch die Zugabe des Pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk die Apoptoserate deutlich reduziert werden kann. Durch höhere Konzentration z-VAD-fmk kam es sogar zu einem Absinken unter die spontane Apoptoserate der Mediumkontrolle. Weiterhin wurden die Veränderung der Caspase-3-Aktivität unter Einfluss des Pan-Caspase-Inhibitors untersucht. In niedriger Konzentration war noch eine von der Rolipram-Dosis abhängige Erhöhung der Caspase-3-Aktivität zu beobachten. Bei Einsatz von hohen Konzentrationen des Caspase-Inhibitors blieb die Aktivität jedoch immer unter der der Mediumkontrolle.

Zur Prüfung der Auswirkungen auf die Mitglieder der *Bcl-2*-Familie wurde nach Inkubation mit Rolipram und Fludarabin die *Bcl-2/Bax*-Ratio errechnet. Hierbei konnte durch Rolipram, Fludarabin sowie durch deren Kombination eine signifikante Reduktion der Ratio erzielt werden. Für *Bcl-x* konnte ebenfalls eine dosisabhängige, signifikante Reduktion durch den PDE-Typ-4-Inhibitor Rolipram nachgewiesen werden.

4.2. Diskussion der Methoden

4.2.1. B-CLL-Zellen *in vitro*

Werden B-CLL-Zellen aus dem peripher venösen Blut *in vitro* kultiviert, neigt ein beträchtlicher Teil, im Gegensatz zur langen *in vivo*-Halbwertszeit, zur spontanen Apoptose (Robertson et al. 1993a). Dies ist möglicherweise auf die Rolle extrinsischer/parakriner Faktoren bei der Aufrechterhaltung der Erkrankung zurückzuführen, deren Mangel *in vitro* zum apoptotischen Zelltod führt (McConkey et al. 1991; Robertson et al. 1993b). Diese Form des Zelltodes lässt sich morphologisch wie biochemisch deutlich von der Nekrose abgrenzen. Nach 30 h können Apoptoseraten bis zu 20 % nachgewiesen werden, die unabhängig von T-Zell-Depletion und Zellkonzentration in Kultur sind (Collins et al. 1989). Verschiedene Zytokine scheinen hierbei eine wichtige Rolle zu spielen; so zeigt die Zugabe von IL-2 einen proliferationsfördernden Effekt auf

B-CLL-Zellen in Kultur. IL-4 und IL-10 (Kitabayashi et al. 1995) reduzieren die Apoptoserate, wobei IL-4 auch minimal die Proliferation fördert. IL-5 hingegen führt zu einer deutlichen Erhöhung der Apoptoserate (Mainou-Fowler et al. 1995). Vergleiche unterschiedlicher Kulturbedingungen konnten für die Zugabe von autologem Serum einen deutlich protektiven Effekt bezüglich der Spontanapoptose feststellen (Bomstein et al. 2003).

Isolierte mononukleäre Zellen aus dem Blut von B-CLL-Patienten haben sich jedoch als *in vitro*-Zellsystem etabliert und ermöglichen so eine gute Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit mit Ergebnissen anderer Gruppen. Die Zellen lassen sich aus dem peripheren Blut in ausreichender Menge isolieren. Pro Versuch wurde den Patienten, nach der Information und Einwilligung, 20 ml Blut aus einer Armvene entnommen. Diese geringe Menge, stellt für die Patienten kaum eine Belastung dar und bietet aufgrund der meist deutlich erhöhten Blutleukozytenzahl, ausreichende Zellen.

4.2.2. Messung der Apoptose

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Apoptosebestimmung, die Annexin V/PI-Doppelfärbung und das DNA-Laddering, weisen unterschiedliche Veränderungen im Rahmen des Zelltodes nach.

Die Färbung mit Annexin V/PI beruht auf dem Nachweis von Veränderungen im Bereich der Zusammensetzung der Zellmembran. Phosphatidylserine lassen sich in vitalen Zellen lediglich auf der inneren Membranschicht nachweisen. Diese Asymmetrie wird jedoch bereits sehr früh im Verlauf der Apoptose aufgehoben (van Engeland et al. 1998) und dient der Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen (Fadok et al. 1993). Diese Methode bietet somit einen einfach durchzuführenden, spezifischen Test, der unabhängig von der apoptoseinduzierenden Substanz ist (Martin et al. 1995). Zur Differenzierung spätapoptotischer bzw. nekrotischer Zellzustände, die aufgrund erschöpfter ATP-Speicher ihre Membranintegrität verloren haben, und somit ebenfalls Annexin positiv zur Darstellung kommen, dient die PI-Gegenfärbung (Koopman et al. 1994).

Das Protein Annexin V (35,8 kDa) gehört zur Familie der Annexine, die Ca^{2+} -abhängig Phospholipide binden. Das verwendete Annexin V bindet spezifisch an Phosphatidylserin. Die Auswertung des fluoreszenzmarkierten Antikörpers erfolgte mittels der Durchflusszytometrie (Martin et al. 1995).

Die zweite verwendete Methode des Apoptosenachweises, das DNA-Laddering, beruht auf der Darstellung der für die Apoptose typischen DNA-Fragmentierung. Diese Spaltung entsteht spätapoptotisch durch enzymatische Verdauung der Nukleinsäuren durch Ca^{2+} - und Mg^{2+} -abhängige Endonukleasen (NUC-18, DNase I, DNase II) (Ucker et al. 1992; Barry et al. 1993; Wyllie 1997). Die so entstandenen Fragmente zeigen eine Länge von 180 - 200 Basenpaaren, lassen sich elektrophoretisch auftrennen und mittels Ethidiumbromid nachweisen. Der Vorteil dieser Untersuchung liegt somit im qualitativ eindeutigen Nachweis der Apoptose. Native DNA wandert aufgrund des vielfach höheren Molekulargewichtes nur minimal im elektrischen Feld, während nekrotische DNA keine Fragmente gleicher Größe zeigt. Eine quantitative Aussage ist nur sehr eingeschränkt möglich.

Die DNA-Fragmentierung als unabdingbarer Teil der Apoptose konnte jedoch in den letzten Jahren widerlegt werden. So war es möglich morphologisch apoptotische Zellen ohne erkennbares DNA-Laddering nachzuweisen (Tomei et al. 1993; Walker et al. 1997).

4.3. Bewertung der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur

4.3.1. cAMP-induzierte Apoptose

Die ersten Beobachtungen bezüglich der Zytolyse durch cAMP-Erhöhung wurden von Tomkins und Kollegen bereits 1973 gemacht. Sie konnten zeigen, dass die Exposition einer murinen Lymphomzelllinie mit einer Kombination aus dem Zell-permeablen cAMP-Analogon Dibutyryl-cAMP (dbcAMP) und Theophyllin innerhalb von 48 h zum Zelltod führt (Daniel et al. 1973). Weitere Untersuchungen ergaben, dass die induzierte Zytolyse durch Phosphorylierung unbekannter lymphoider Zielproteine zustande kommt (Coffino et al. 1975). McConkey und Kollegen konnten für die dbcAMP-induzierte Zytolyse in Ratten

Thymozyten erstmals die DNA-Fragmentation, als Ausdruck des apoptotischen Zelltodes, nachweisen (McConkey et al. 1990).

Die Suszeptibilität lymphoider Zellen zur cAMP-vermittelten Apoptose variiert beträchtlich abhängig von der Abstammung und dem Reifegrad der Zellen. So finden sich in B-Zellen des Keimzentrums, die *in vivo* hohe Raten an Spontanapoptose zeigen, durchwegs höhere cAMP-Konzentrationen als in anderen B-Zell-Populationen (Knox et al. 1993).

Basierend auf einer Fallbeschreibung wurde 1995 der unspezifische PDE-Inhibitor Theophyllin als potenter Apoptoseinduktor bei B-CLL nachgewiesen (Mentz et al. 1995). *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass Theophyllin die spontane Apoptoserate von 10 % im Mittel um 90 % erhöht, und dass sich diese, durch den cAMP-Antagonisten Rp-adenosine-3',5'-cyclic phosphorothioate (RpcAMPS), zumindest teilweise aufheben lässt. Robertson und Kollegen gelang es die Theophyllin-induzierte Apoptose mit der intrazellulären Konzentration von cAMP zu korrelieren (Robertson et al. 1993a). Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass sich durch die Kombination von Theophyllin mit dem bei B-CLL häufig verwandten Chemotherapeutikum Chlorambucil ein synergistischer Effekt bezüglich der Apoptoseinduktion erzielen lässt (Mentz et al. 1996). Die verwendeten Konzentrationen von Theophyllin (unter 20 µg/ml) gelten weithin als therapeutisch sicher. Lerner und Kollegen war es jedoch nicht möglich diese Daten zu reproduzieren. Ihnen gelang es erst ab 100 µg/ml eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate nachzuweisen (Lerner et al. 2000). Eine Konzentration die sich deutlich ausserhalb des therapeutischen Fensters (10 – 20 µg/ml) befindet. Binet und Kollegen konnten für Theophyllin in der Monotherapie keine Aktivität feststellen, jedoch zeigte die Kombination mit Chlorambucil bzw. Cyclophosphamid ein Ansprechen in 11 von 12 Fällen einer Alkylantien-refraktären B-CLL (Binet et al. 1995b). Eine Monotherapie scheint somit nur effektiv zu sein, wenn die Zellen über eine genügende basale Adenylatzyklase-Aktivität verfügen, um in Anwesenheit des PDE-Inhibitors die cAMP-Konzentration signifikant zu erhöhen (Houslay et al. 1997). Jedoch scheinen die Möglichkeiten der klinischen Anwendung aufgrund der benötigten Konzentration und der zusätzlichen

Aktivität von Theophyllin als Adenosin-Rezeptor-Antagonist sehr eingeschränkt (Iannone et al. 1989).

Um die in B-CLL-Zellen vorhandenen Isoenzyme der PDE selektiver und effektiver hemmen zu können, wurden deren Expressionsmuster genauer untersucht. In mononukleären Zellen werden vor allem PDE-Typ-3 und -4 exprimiert (Beavo 1995; Fujishige et al. 1999). PDE-1B1, PDE-3B, PDE-4A, PDE-4B, PDE-4D und PDE-7A1 sind die vorherrschenden Isoenzyme in B-CLL-Zellen (Kim et al. 1998; Lee et al. 2002). Kim und Kollegen konnten weiterhin zeigen, dass der spezifische PDE-Typ-4-Inhibitor Rolipram die cAMP-Level in B-CLL-Zellen erhöht und dosisabhängig Apoptose induziert. Eine spezifische Hemmung von PDE-1 zeigte keinen vergleichbaren Effekt (Kim et al. 1998). Die Sensitivität der B-CLL-Zellen gegenüber Rolipram korreliert nicht mit dem klinischen Stadium oder dem Ansprechen auf Standard-Chemotherapeutika.

Diese Daten konnten durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Rolipram-induzierte Apoptose *in vitro* dem Ausmaß der Fludarabin-induzierten Apoptose entspricht. Zusätzlich ließ sich durch die Kombination von Rolipram mit dem Purinanalogon Fludarabin eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate nachweisen. Dies war für die Kombination von Rolipram und Mitoxantron nicht der Fall.

Für den spezifischen PDE-Typ-3-Inhibitor Enoximon konnte keine dosisabhängige Apoptoseinduktion nachgewiesen werden.

Trotz der nachgewiesenen Apoptoseinduktion durch PDE-Typ-4-Inhibitoren *in vitro* bleibt anzunehmen, dass die klinischen Effekte des Theophyllins nicht lediglich auf der Hemmung dieses Isoenzym beruhen, sondern dass es multiple pharmakologische Angriffspunkte gibt.

4.3.2. Die Rolle von IL-10 im Rahmen der B-CLL

IL-10 erhöht die Lebensfähigkeit normaler CD40 aktivierter B-Zellen und steigert deren Differenzierung zu Antikörper-produzierenden Zellen (Khatri et al.

1998). Burdin und Kollegen postulieren eine mögliche Rolle von IL-10 als autokriner Wachstums- und Differenzierungsfaktor (Burdin et al. 1995).

Über die Rolle von IL-10 im Rahmen der B-CLL gibt es widersprüchliche Aussagen in der Literatur. Fluckinger und Kollegen (Fluckiger et al. 1994) konnten zeigen, dass IL-10 in B-CLL-Zellen dosisabhängig Apoptose induziert. Verschiedene Anteile der Kultur zeigten unterschiedlich schnelles Ansprechen auf den apoptotischen Stimulus, was auf das Alter der Zellen bzw. den unterschiedlichen Phänotyp zurückgeführt wurde. Jedoch kam es bei sämtlichen B-CLL-Zellen zur Induktion von Apoptose. Castejon und Kollegen konnten einen Apoptose induzierenden Effekt von IL-10 nur für das frühe Stadium (Rai 0) feststellen (Castejon et al. 1999). B-CLL-Zellen von Patienten in späteren Stadien (Rai I und II) zeigten kein ähnliches Ansprechen.

Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen von Kitabayashi und Kollegen, die beschreiben IL-10 hätte auf B-CLL-Zellen, ähnlich wie auf normale B-Zellen, die Wirkung eines autokrinen Wachstumsfaktors und würde somit den apoptotischen Zelltod verhindern (Kitabayashi et al. 1995). Sie fanden in den Kulturen wie auch im Serum von 45 % der B-CLL-Patienten erhöhte IL-10-Spiegel. Diese Ergebnisse widersprechen denen von Finke und Kollegen, die in 10 von 11 Fällen CD5⁺ B-CLL-Zellen nur eine minimale Expression von IL-10 mRNA nachweisen konnten (Finke et al. 1993).

Dies entspricht den vorliegenden Ergebnissen für die Kultur von B-CLL in Medium bzw. unter Stimulation (LPS), für die ebenfalls keine signifikante IL-10-Induktion beobachtet werden konnten. Ebenso konnte gezeigt werden, dass es unter Inkubation mit Rolipram sowie den Chemotherapeutika zu keiner Induktion der IL-10-Produktion kommt. Dies steht in Einklang mit den Beobachtungen, dass die Rolipram-induzierte Apoptose durch einen IL-10-neutralisierenden Antikörper nicht reduziert wurde. Somit konnte eine Rolle von IL-10 in der Rolipram-induzierten Apoptose weitgehend ausgeschlossen werden.

4.3.3. Die Rolle der Caspasen im Rahmen der B-CLL

Der Pan-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk wurde verwendet, um die Rolle der Caspase-Abhängigkeit der Rolipram-induzierten Apoptose genauer zu untersuchen. Der Einsatz von z-VAD-fmk hatte sich bereits zur Klärung ähnlicher Fragestellungen bewährt (Mateo et al. 1999; Stoetzer et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass sich durch die Inkubation mit z-VAD-fmk die Rolipram-induzierte Apoptose dosisabhängig vollständig inhibieren lässt. Ebenso wurde die dosisabhängige Caspase-3-Aktivierung im Rahmen der PDE-Typ-4-Inhibition durch den Pan-Caspase-Inhibitor vollständig aufgehoben.

Sarfati und Kollegen erzielten ähnliche Ergebnisse bezüglich der Caspase-Abhängigkeit für die durch den PDE-Typ-5-Inhibitor Sildenafil bzw. den PDE-Typ-6-Inhibitor Vardenafil induzierte Apoptose bei B-CLL-Zellen (Sarfati et al. 2003).

Moon und Kollegen konnten zeigen, dass durch den PDE-Typ-4-Inhibitor Rolipram sowie durch den Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin eine mitochondriale Depolarisation ausgelöst wird (Moon et al. 2003). Weiterhin kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C ins Zytosol, zur Caspase-3- und Caspase-9-Aktivierung sowie zur Spaltung der Poly-(Adenosine Diphosphate [ADP]-Ribose)-Polymerase. Sie konnten zeigen, dass die Rolipram-induzierte Apoptose durch einen Caspase-9, nicht aber durch einen Caspase 8 Inhibitor blockiert werden kann.

Diese neueren Forschungsergebnisse stehen in Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen und weisen auf eine zentrale Rolle der Caspasen im Ablauf der durch PDE-Inhibitoren induzierten Apoptose bei B-CLL hin.

4.3.4. Die Rolle der *Bcl-2* Familie im Rahmen der B-CLL

B-CLL-Zellen zeigen, im Vergleich zu normalen Blutlymphozyten, häufig eine hohe Expression des anti-apoptotischen *Bcl-2*-Proteins sowie eine erniedrigte Expression des pro-apoptotischen *Bax*-Proteins. Der Mechanismus dieser Dysregulation bleibt unbekannt (Pepper et al. 1996). Für das anti-apoptotisch

wirksame *Bcl-x* wurde eine verstärkte Expression in B-CLL-Zellen nachgewiesen (Christodoulouopoulos et al. 1997). Die hierbei überwiegende Form des *Bcl-x* ist das *Bcl-xL* (Agarwal et al. 2002).

Eine erhöhte *Bcl-2/Bax*-Ratio korreliert *in vivo* deutlich mit einer erniedrigten Chemosensitivität (Skena et al. 1992; Hanada et al. 1993; Pepper et al. 1998; Pepper et al. 1999). Veränderungen des Expressionsmusters im Rahmen der Therapie mit dem Chemotherapeutikum Chlorambucil konnten nachgewiesen werden. Das pro-apoptotische Mitglied *Bax* zeigte hierbei eine deutliche Zunahme der Expression (Pepper et al. 1998). Bellosillo und Kollegen beschrieben für die Therapie mit Fludarabin einen Rückgang des anti-apoptotischen *Bcl-2* und *Mcl-1* sowie eine Zunahme des pro-apoptotischen *Bax* (Bellosillo et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnte für den spezifischen PDE-Typ-4-Inhibitor Rolipram eine signifikante Reduktion von *Bcl-2* sowie eine signifikante Zunahme des Proteins *Bax* nachgewiesen werden. Unter Rolipram kam es somit zu einer Veränderung der *Bcl-2/Bax*-Ratio hin zu einem pro-apoptotischen Expressionsmuster. Mentz und Kollegen konnten für die Theophyllin-induzierte Apoptose bei B-CLL einen ähnlichen Effekt auf das *Bcl-2*-Protein nachweisen (Mentz et al. 1996). Sie zeigten, dass durch die Inkubation mit Theophyllin ein signifikanter Rückgang von *Bcl-2* erzielt werden kann, der im Ausmaß dem des Chlorambucil entspricht. Die beobachteten Veränderungen der *Bcl-2*- und *Bax*-Expression unter Fludarabin entsprechen der bereits in der Literatur beschriebenen (Pepper et al. 1999). Erstmals konnte jedoch gezeigt werden, dass es unter der Kombination eines spezifischen PDE-Typ-4-Inhibitor mit Fludarabin zu einem weiteren Rückgang der *Bcl-2/Bax*-Ratio kommt. Weiterhin konnte in dieser Arbeit für *Bcl-x*, unter Inkubation mit dem PDE-Typ-4-Inhibitors Rolipram eine dosisabhängige Reduktion der Expression nachgewiesen werden.

Bezüglich der Expression Apoptose-regulierender Proteine und dem Binet-Stadium der Patienten konnte keine Korrelation hergestellt werden. Dies entspricht bereits bekannten Daten aus der Literatur (Kitada et al. 1998).

4.4. Klinische Relevanz

4.4.1. PDE-Typ-4-Inhibitoren in klinischen und tierexperimentellen Studien

Rolipram ist die Referenzsubstanz der spezifischen PDE-Typ-4-Inhibitoren. In seiner ursprünglichen Anwendung als Antidepressivum wurde es bereits detailliert in klinischen Phase II- und III-Studien untersucht (Wachtel 1983). Rolipram ist säurestabil und eignet sich somit sowohl für die orale als auch für die parenterale Verabreichung. Nach oraler Verabreichung von 1 mg Rolipram liegt die Bioverfügbarkeit bei 73 % bei einer erreichten Plasmakonzentration von 123 ± 15 nM ($n = 6$). Die Plasmahalbwertszeit beträgt 2 h bei einer renalen Gesamtklärung von 2 ml/min pro kg (Krause et al. 1990).

In zahlreichen klinischen und tierexperimentellen Studien wurde Rolipram bereits erfolgreich bei den unterschiedlichsten Krankheitsbildern und Krankheitsmodellen eingesetzt (Tabelle 11/12).

Tabelle 11. Übersicht zum Einsatz von PDE-Typ-4-Inhibitoren in tierexperimentellen Studien.

Erkrankung	Literaturzitat
ARDS	Turner et al. 1993 Howell et al. 1995
Arthritis	Elliot et al. 1994 Nyman et al. 1997 Francischi et al. 2000
Asthma	Manabe et al. 2000 Santing et al. 2001
COPD	Rickards et al. 2000 Toward et al 2002
Kolitis	Hartmann et al. 2000

Tabelle 12. Übersicht zum Einsatz von PDE-Typ-4-Inhibitoren in klinischen Studien.

Erkrankung	Literaturzitat
Antidepressivum	Wachtel et al. 1983 Zeller et al. 1984 Hebenstreit et al. 1989
Morbus Parkinson	Parkes et al. 1984
ARDS	Miotla et al. 1998
Multiple Sklerose	Rudick et al. 1997 Navikas et al. 1998
Asthma	Ashton et al. 1994 Wang et al. 2003

Um die Möglichkeit des therapeutischen Einsatzes spezifischer PDE-Typ-4-Inhibitoren bei B-CLL in Betracht zu ziehen, ist die genauere Untersuchung der Wirkung auf die normale Lymphozytenpopulation unerlässlich. Hierbei hat sich gezeigt, dass periphere T-Zellen vollständig resistent gegenüber der Rolipram-induzierten Apoptose sind, während periphere B-Zellen eine minimale Sensitivität zeigen. Dieser Unterschied scheint unabhängig von der Höhe der induzierten cAMP-Konzentrationen zu sein, da diese in T-Zellen und in B-Zellen sehr ähnlich sind (Lerner et al. 2000).

Im Rahmen der klinischen Studien zu Rolipram als Antidepressivum zeigten sich zahlreiche Nebenwirkungen. Die Limitierung ergab sich hierbei vor allem durch die zentralnervösen Symptome. Ebenfalls häufig von Nebenwirkungen betroffen war der Gastrointestinaltrakt. Neben Übelkeit und Erbrechen kam es durch Erhöhung der Säuresekretion im Magen zu Dyspepsiebeschwerden (Hebenstreit et al. 1989). Weitere Untersuchungen ließen vermuten, dass es für die PDE-Typ-4 zwei Subtypen mit unterschiedlicher Konformation gibt. Diese zwei Subtypen unterscheiden sich in ihrer Affinität zu Rolipram. Die IC_{50} der niedrig-affinen Form liegt bei 2 nM, die IC_{50} der hoch-affinen Form bei 200 - 2000 nM. Die beobachteten gastrointestinalen Beschwerden ließen sich auf den PDE-Typ-4-Subtyp mit hoher Affinität zu Rolipram zurückführen (Torphy et al. 1992; Souness et al. 1997).

Von großem Interesse war somit die Suche nach einem spezifischen PDE-Typ-4-Inhibitor, der hauptsächlich die niedrig-affine Form hemmt und

somit die Nebenwirkung minimiert. SB 207499 (Ariflo, SmithKline Beecham) zeigt *in vitro* einen anti-inflammatorischen Effekt mit ähnlicher Potenz wie Rolipram, bei gleichzeitig 100fach niedrigerer Fähigkeit zur Stimulation der gastralen Säuresekretion (Barnette et al. 1998). Ob SB 207499 ähnliche Effekte bezüglich der Apoptoseinduktion besitzt wie Rolipram wurde bisher noch nicht untersucht.

4.4.2. Fludarabin in klinischen Studien

Fludarabin ist ein Adenin-Nukleosid-Analogon mit hohen Ansprechraten bei B-CLL. Bergmann und Kollegen erzielten komplette Remissionsraten von 50 - 60 % bei bereits vorbehandelten Patienten und Raten bis 80 % bei unbehandelten Patienten (Bergmann et al. 1993). Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählten neben der Übelkeit die Infektionen, welche vor allem auf den ausgeprägten Rückgang der CD4⁺-Zellen während der Fludarabintherapie zurückzuführen sind.

Eine große französische Multicenter-Studie verglich die Effektivität von CAP mit Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison (CHOP) sowie Fludarabin (FDB). Nach sechs Monaten betragen die kompletten Remissionsraten bzw. das Ansprechen insgesamt 7 % und 72 % in der CAP-Gruppe, 11 % und 75 % in der CHOP-Gruppe und 19 % und 94 % in der FAB-Gruppe (1993). Ob durch die Therapie mit Fludarabin ein Überlebensvorteil besteht, blieb offen. Eine weitere prospektive Multicenter-Studie verglich CAP mit FDB bei Patienten mit fortgeschrittener B-CLL. Hier konnte ebenfalls eine deutlich höhere Ansprechrate von FDB (60 %) verglichen mit CAP (44 %) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse waren unabhängig davon, ob die Patienten bereits vortherapiert waren oder nicht. Lediglich die Dauer der Remission war bei nicht vorbehandelten Patienten unter FDB-Therapie signifikant länger als unter CAP (Johnson et al. 1996).

Schulz und Kollegen untersuchten die Wirkung einer Kombinationstherapie aus Fludarabin und Rituximab bei Patienten, die bislang keine Therapie mit einem

Nukleotid-Analogen oder Anthrazyklinen bekommen hatten (Schulz et al. 2002). Die Ansprechrate lag bei 87 %, wobei 32 % eine komplette Remission erreichten. Die mittlere Dauer des Ansprechens lag bei 75 Wochen. Eine andere Studie untersuchte eine Kombinationstherapie aus Fludarabin plus Rituximab mit einer Fludarabin-Monotherapie. Beide Schemata wurden gefolgt von einem Rituximab-Konsolidationskurs, der dem ersten Kurs mit vier Wochen Abstand folgte. Die Kombinationstherapie erzielte Ansprechraten von 90 %, bei 47 % kompletter Remission. Im Vergleich dazu erreichte der Fludarabin-Arm lediglich eine Ansprechrate von 77 %, bei 28 % kompletter Remission (Byrd et al. 2003).

4.4.3. Mitoxantron in klinischen Studien

Bellosillo und Kollegen untersuchten die Wirkung der Einzelsubstanzen Mitoxantron und Fludarabin auf B-CLL-Zellen und verglichen sie mit der Kombination beider Stoffe (Bellosillo et al. 1998). Hier konnte ein additiver Effekt bezüglich der Apoptoseinduktion nachgewiesen werden. In B-CLL-Zellen wird das Isoenzym Topoisomerase II α kaum exprimiert, während die Topoisomerase II β sehr stark exprimiert wird (Beck et al. 1994). Dies erklärt die unterschiedliche Wirksamkeit verschiedener Topoisomerase-II-Inhibitoren bei B-CLL-Zellen (Kirkpatrick et al. 1990; Bosanquet et al. 1996). Adriamycin hat keine Wirkung auf B-CLL-Zellen (Potmesil et al. 1988), während Doxorubicin und andere Anthracycline einen starken zytotoxischen Effekt aufweisen (Twentyman et al. 1989).

Die zusätzliche Gabe von Mitoxantron zu einem Schema aus Fludarabin und Cyclophosphamid führte bei 60 % der Patienten zu einer Zunahme des zytotoxischen Effektes (Bellosillo et al. 1999). Robak und Kollegen konnten zeigen, dass bei Patienten mit fortgeschrittener und vortherapierter B-CLL die Kombination von Cladribine, Mitoxantron und Cyclophosphamid (CMC-Regime) gute Ansprechraten von 49 % erzielt, bei jedoch ausgeprägten Nebenwirkungen. Neben der Myelotoxizität mit ausgeprägter Neutropenie und Thrombozytopenie kam es häufig zu unklarem Fieber und Infektionen (Robak et al. 2001). Weide und Kollegen untersuchten die Kombination von Bendamustin, Mitoxantron und

Rituximab (BMR) refraktärer B-CLL und konnten mit Ansprechraten bis zu 95 %, bei 35 % kompletter Remission, sehr gute Ergebnisse erzielen (Weide et al. 2002). Symptomatische, reversible Myelotoxizität wurde in 20 % der Fälle beobachtet.

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Konzentration von 0,5 µg/ml Mitoxantron entsprechen einer zellulären Konzentration, die durch eine Gabe von 8 mg/m² erreicht wird (Canal et al. 1993).

5. Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von Phosphodiesterase-Inhibitoren (PDE-Inhibitoren), insbesondere des spezifischen PDE-Typ-4-Inhibitors Rolipram, auf chronische lymphatische Leukämie-Zellen zu untersuchen. Die Versuche wurden an, über Gradientenzentrifugation isolierten, humanen B-CLL-Zellen durchgeführt. Hintergrund der Arbeit war die Beobachtung, dass durch die Gabe unspezifischer PDE-Inhibitoren (Theophyllin) der Prozentsatz apoptotischer Zellen im Blut von B-CLL-Patienten deutlich erhöht wird. Darüber hinaus blieben die mit Theophyllin behandelten Patienten länger in frühen, prognostisch günstigen Stadien.

In dieser experimentellen Arbeit wurde nun die Apoptoseinduktion durch unterschiedliche spezifische PDE-Inhibitoren alleine und in Kombination mit Chemotherapeutika untersucht, die im Rahmen der B-CLL Anwendung finden. Des Weiteren sollte der Apoptosemechanismus charakterisiert werden. Hierfür wurde die Caspase-Abhängigkeit, die Rolle von IL-10 sowie die Veränderung unterschiedlicher Mitglieder der Bcl-2-Familie untersucht.

Folgende fünf Hauptbefunde konnten erhoben werden:

Erstens konnte durch die Inkubation der B-CLL-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen des PDE-Typ-4-Inhibitors Rolipram eine signifikante, dosisabhängige Apoptose induziert werden. Der spezifische PDE-Typ-3-Inhibitor Enoximon induzierte keine signifikante Apoptose.

Zweitens konnte durch die Zugabe des PDE-Typ-4-Inhibitors Rolipram zu dem Purinanalogon Fludarabin eine additive Steigerung der Apoptoserate gezeigt werden. Für Mitoxantron konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden.

Drittens konnte sowohl eine IL-10-Induktion durch den PDE-Typ-4-Inhibitor Rolipram, sowie eine Abhängigkeit der Rolipram-induzierten Apoptose von IL-10 weitgehend ausgeschlossen werden.

Viertens wurde die Caspase-Abhängigkeit der Rolipram-induzierten Apoptose nachgewiesen. Einerseits konnte durch die Hemmung der Caspaseaktivität mittels eines Pan-Caspaseinhibitors (z-VAD-fmk) die Rolipram-induzierte Apoptose reduziert werden. Andererseits ließ sich ein deutlicher Anstieg der Caspase-3-Konzentration während der Inkubation mit Rolipram nachweisen.

Fünftens konnte bezüglich der Mitglieder der *Bcl-2*-Familie eine Veränderung des Expressionsmusters beobachtet werden. Die anti-apoptotischen Mitglieder *Bcl-2* und *Bcl-X* wiesen einen deutlichen Rückgang auf, während das pro-apoptotische *Bax* eine vermehrte Expression zeigte. Die *Bcl-2/Bax*-Ratio zeigte somit eine signifikante Reduktion.

Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse die potenzielle Rolle Typ-4-spezifischer PDE-Inhibitoren im Rahmen der Therapie der chronisch lymphatischen B-Zell-Leukämie. Die Nutzung des proapoptotischen Effektes ist sowohl in der Monotherapie, als auch in Kombination mit Chemotherapeutika denkbar.

6. Literatur

Comparison of fludarabine, cyclophosphamide/doxorubicin/prednisone, and cyclophosphamide/doxorubicin/vincristine/prednisone in advanced forms of chronic lymphocytic leukemia: preliminary results of a controlled clinical trial. The French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *Semin Oncol* (1993) **20** (5 Suppl 7): 21-3.

Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta- analysis of the randomized trials. CLL Trialists' Collaborative Group. *J Natl Cancer Inst* (1999) **91** (10): 861-8.

Adachi M., Tefferi A., Greipp P. R., Kipps T. J., Tsujimoto Y. Preferential linkage of bcl-2 to immunoglobulin light chain gene in chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* (1990) **171** (2): 559-64.

Adams J. M., Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* (1998) **281** (5381): 1322-6.

Agarwal B., Naresh K. N. Bcl-2 family of proteins in indolent B-cell non-Hodgkin's lymphoma: study of 116 cases. *Am J Hematol* (2002) **70** (4): 278-82.

Alnemri E. S., Livingston D. J., Nicholson D. W., Salvesen G., Thornberry N. A., Wong W. W., Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* (1996) **87** (2): 171.

Angelopoulou M. K., Kontopidou F. N., Pangalis G. A.

Adhesion molecules in B-chronic lymphoproliferative disorders.

Semin Hematol (1999) **36** (2): 178-97.

Antonsson B., Conti F., Ciavatta A., Montessuit S., Lewis S., Martinou I., Bernasconi L., Bernard A., Mermod J. J., Mazzei G., Maundrell K., Gambale F., Sadoul R., Martinou J. C.

Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2.

Science (1997) **277** (5324): 370-2.

Antonsson B., Martinou J. C.

The Bcl-2 protein family.

Exp Cell Res (2000) **256** (1): 50-7.

Armitage R. J., Macduff B. M., Spriggs M. K., Fanslow W. C.

Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines.

J Immunol (1993) **150** (9): 3671-80.

Arpin C., Dechanet J., Van Kooten C., Merville P., Grouard G., Briere F., Banchereau J., Liu Y. J.

Generation of memory B cells and plasma cells in vitro.

Science (1995) **268** (5211): 720-2.

Atkinson E. A., Barry M., Darmon A. J., Shostak I., Turner P. C., Moyer R. W., Bleackley R. C.

Cytotoxic T lymphocyte-assisted suicide. Caspase 3 activation is primarily the result of the direct action of granzyme B.

J Biol Chem (1998) **273** (33): 21261-6.

Baer R., Bankier A. T., Biggin M. D., Deininger P. L., Farrell P. J., Gibson T. J., Hatfull G., Hudson G. S., Satchwell S. C., Seguin C. und Kollegen

DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome.

Nature (1984) **310** (5974): 207-11.

Barnette M. S., Christensen S. B., Essayan D. M., Grous M., Prabhakar U.,
Rush J. A., Kagey-Sobotka A., Torphy T. J.

SB 207499 (Ariflo), a potent and selective second-generation
phosphodiesterase 4 inhibitor: in vitro anti-inflammatory actions.

J Pharmacol Exp Ther (1998) **284** (1): 420-6.

Barry M. A., Eastman A.

Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis.

Arch Biochem Biophys (1993) **300** (1): 440-50.

Beavo J. A.

Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple
isoforms.

Physiol Rev (1995) **75** (4): 725-48.

Beavo J. A., Conti M., Heaslip R. J.

Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases.

Mol Pharmacol (1994) **46** (3): 399-405.

Beavo J. A., Reifsnyder D. H.

Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the
design of selective inhibitors.

Trends Pharmacol Sci (1990) **11** (4): 150-5.

Beck J., Niethammer D., Gekeler V.

High *mdr1*- and *mrp*-, but low topoisomerase II alpha-gene expression in B-cell
chronic lymphocytic leukaemias.

Cancer Lett (1994) **86** (1): 135-42.

Bellosillo B., Colomer D., Pons G., Gil J.

Mitoxantrone, a topoisomerase II inhibitor, induces apoptosis of B- chronic
lymphocytic leukaemia cells.

Br J Haematol (1998) **100** (1): 142-6.

Bellosillo B., Villamor N., Colomer D., Pons G., Montserrat E., Gil J.

In vitro evaluation of fludarabine in combination with cyclophosphamide and/or mitoxantrone in B-cell chronic lymphocytic leukemia.

Blood (1999) **94** (8): 2836-43.

Benjamin D., Knobloch T. J., Dayton M. A.

Human B-cell interleukin-10: B-cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukin-10.

Blood (1992) **80** (5): 1289-98.

Bergmann L., Fenchel K., Jahn B., Mitrou P. S., Hoelzer D.

Immunosuppressive effects and clinical response of fludarabine in refractory chronic lymphocytic leukemia.

Ann Oncol (1993) **4** (5): 371-5.

Binet J. L., Auquier A., Dighiero G., Chastang C., Piguët 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., Belabbès S., Gremy F.

A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis.

Cancer (1981) **48** (1): 198-206.

Binet J. L., Mentz F., Baudet S., Ouaz F., Merle-Béral H.

[In vitro induction of apoptosis in chronic lymphoid leukemia B lymphocytes by theophylline: therapeutic applications].

Bull Acad Natl Med (1995a) **179** (7): 1379-91; discussion 1391-2.

Binet J. L., Mentz F., Leblond V., Merle-Béral H.

Synergistic action of alkylating agents and methylxanthine derivatives in the treatment of chronic lymphocytic leukemia.

Leukemia (1995b) **9** (12): 2159-61.

Boise L. H., Gonzalez-Garcia M., Postema C. E., Ding L., Lindsten T., Turka L. A., Mao X., Nunez G., Thompson C. B.

bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death.

Cell (1993) **74** (4): 597-608.

Boise L. H., Thompson C. B.

Bcl-x(L) can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation.

Proc Natl Acad Sci U S A (1997) **94** (8): 3759-64.

Bomstein Y., Yuklea M., Radnay J., Shapiro H., Afanasyev F., Yarkoni S., Lishner M.

The antiapoptotic effects of blood constituents in patients with chronic lymphocytic leukemia.

Eur J Haematol (2003) **70** (5): 290-5.

Borgerson K. L., Bretz J. D., Baker J. R., Jr.

The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid autoimmune disease.

Autoimmunity (1999) **30** (4): 251-64.

Bosanquet A. G., Bell P. B.

Enhanced ex vivo drug sensitivity testing of chronic lymphocytic leukaemia using refined DiSC assay methodology.

Leuk Res (1996) **20** (2): 143-53.

Bossy-Wetzel E., Newmeyer D. D., Green D. R.

Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization.

EMBO J (1998) **17** (1): 37-49.

Boyum A.

Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood .

Scan J Clin Lab Invest (1968) **21**:77-89.

Bradford M. M.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal Biochem (1976) **72**: 248-54.

Burdin N., Van Kooten C., Galibert L., Abrams J. S., Wijdenes J., Banchereau J., Rousset F.

Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40- activated human B lymphocytes.

J Immunol (1995) **154** (6): 2533-44.

Byrd J. C., Peterson B. L., Morrison V. A., Park K., Jacobson R., Hoke E., Vardiman J. W., Rai K., Schiffer C. A., Larson R. A.

Randomized phase 2 study of fludarabine with concurrent versus sequential treatment with rituximab in symptomatic, untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 9712 (CALGB 9712).

Blood (2003) **101** (1): 6-14.

Byrd J. C., Waselenko J. K., Keating M., Rai K., Grever M. R.

Novel therapies for chronic lymphocytic leukemia in the 21st century.

Semin Oncol (2000) **27** (5): 587-97.

Caligaris-Cappio F., Ghia P., Gottardi D., Parvis G., Gregoret M. G., Nilsson K., Schemm M.

BCL-2 in B-chronic lymphocytic leukemia.

Curr Top Microbiol Immunol (1992) **182**: 279-86.

Canal P., Attal M., Chatelut E., Guichard S., Huguet F., Muller C., Schlaifer D., Laurent G., Houin G., Bugat R.

Plasma and cellular pharmacokinetics of mitoxantrone in high-dose chemotherapeutic regimen for refractory lymphomas.

Cancer Res (1993) **53** (20): 4850-4.

Capalbo S., Trerotoli P., Ciancio A., Battista C., Serio G., Liso V.

Increased risk of lymphoproliferative disorders in relatives of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: relevance of the degree of familial linkage.

Eur J Haematol (2000) **65** (2): 114-7.

Castejon R., Vargas J. A., Romero Y., Briz M., Munoz R. M., Durantez A.

Modulation of apoptosis by cytokines in B-cell chronic lymphocytic leukemia.

Cytometry (1999) **38** (5): 224-30.

Catovsky D., Murphy R. L.

Key issues in the treatment of chronic lymphocytic leukaemia (CLL).

Eur J Cancer (1995) **31A** (13-14): 2146-54.

Cheson B. D., Bennett J. M., Grever M., Kay N., Keating M. J., O'Brien S., Rai K. R.

National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment.

Blood (1996) **87** (12): 4990-7.

Chittenden T., Harrington E. A., O'Connor R., Flemington C., Lutz R. J., Evan G. I., Guild B. C.

Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak.

Nature (1995) **374** (6524): 733-6.

Choi S. S., Park I. C., Yun J. W., Sung Y. C., Hong S. I., Shin H. S.

A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow.

Oncogene (1995) **11** (9): 1693-8

Christodouloupoulos G., Fotouhi N., Krajewski S., Reed J. C., Alaoui-Jamali M., Panasci L.

Relationship between nitrogen mustard drug resistance in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and protein expression of Bcl-2, Bax, Bcl- X and p53.

Cancer Lett (1997) **121** (1): 59-67.

Coffino P., Bourne H. R., Tomkins G. M.

Mechanism of lymphoma cell death induced by cyclic AMP.

Am J Pathol (1975) **81** (1): 199-204.

Cohen G. M.

Caspases: the executioners of apoptosis.

Biochem J (1997) **326** (Pt 1): 1-16.

Collins R. J., Verschuer L. A., Harmon B. V., Prentice R. L., Pope J. H., Kerr J. F.

Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro.

Br J Haematol (1989) **71** (3): 343-50.

Cordone I., Masi S., Mauro F. R., Soddu S., Morsilli O., Valentini T., Vegna M. L., Guglielmi C., Mancini F., Giuliacci S., Sacchi A., Mandelli F., Foa R.

p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis.

Blood (1998) **91** (11): 4342-9.

Cuttner J.

Increased incidence of hematologic malignancies in first-degree relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia.

Cancer Invest (1992) **10** (2): 103-9.

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., Chiorazzi N.

Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia.

Blood (1999) **94** (6): 1840-7.

Daniel V., Litwack G., Tomkins G. M.

Induction of cytolysis of cultured lymphoma cells by adenosine 3':5'- cyclic monophosphate and the isolation of resistant variants.

Proc Natl Acad Sci U S A (1973) **70** (1): 76-9.

Datta S. R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., Greenberg M. E.

Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery.

Cell (1997) **91** (2): 231-41.

de Jong D., Prins F. A., Mason D. Y., Reed J. C., van Ommen G. B., Kluin P. M. Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells.

Cancer Res (1994) **54** (1): 256-60.

de Lima M., O'Brien S., Lerner S., Keating M. J.

Chronic lymphocytic leukemia in the young patient.

Semin Oncol (1998) **25** (1): 107-16.

De Rossi G., Zarcone D., Mauro F., Cerruti G., Tenca C., Puccetti A., Mandelli F., Grossi C. E.

Adhesion molecule expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: malignant cell phenotypes define distinct disease subsets.

Blood (1993) **81** (10): 2679-87.

de Waal Malefyt R., Abrams J., Bennett B., Figdor C. G., de Vries J. E.
Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an
autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes.

J Exp Med (1991a) **174** (5): 1209-20.

de Waal Malefyt R., Haanen J., Spits H., Roncarolo M. G., te Velde A., Figdor
C., Johnson K., Kastelein R., Yssel H., de Vries J. E.

Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T
cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes
via downregulation of class II major histocompatibility complex expression.

J Exp Med (1991b) **174** (4): 915-24.

Decaudin D., Geley S., Hirsch T., Castedo M., Marchetti P., Macho A., Kofler
R., Kroemer G.

Bcl-2 and Bcl-XL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear
apoptosis induced by chemotherapeutic agents.

Cancer Res (1997) **57** (1): 62-7.

Defrance T., Vanbervliet B., Briere F., Durand I., Rousset F., Banchereau J.
Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-
CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A.

J Exp Med (1992) **175** (3): 671-82.

Del Prete G., De Carli M., Almerigogna F., Giudizi M. G., Biagiotti R.,
Romagnani S.

Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T
cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine
production.

J Immunol (1993) **150** (2): 353-60.

Dighiero G., Maloum K., Desablens B., Cazin B., Navarro M., Leblay R., Leporrier M., Jaubert J., Lepeu G., Dreyfus B., Binet J. L., Travade P.
Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia.
N Engl J Med (1998) **338** (21): 1506-14.

Dighiero G., Travade P., Chevret S., Fenaux P., Chastang C., Binet J. L.
B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions.
French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia.
Blood (1991) **78** (8): 1901-14.

Dinter H., Onuffer J., Faulds D., Perez H. D.
Phosphodiesterase type IV inhibitors in the treatment of multiple sclerosis.
J Mol Med (1997) **75** (2): 95-102.

Dohner H., Fischer K., Bentz M., Hansen K., Benner A., Cabot G., Diehl D., Schlenk R., Coy J., Stilgenbauer S. und Kollegen
p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias.
Blood (1995) **85** (6): 1580-9.

Dohner H., Stilgenbauer S., Benner A., Leupolt E., Krober A., Bullinger L., Dohner K., Bentz M., Lichter P.
Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia.
N Engl J Med (2000) **343** (26): 1910-6.

Dohner H., Stilgenbauer S., Dohner K., Bentz M., Lichter P.
Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis.
J Mol Med (1999) **77** (2): 266-81.

Domingo A., Gonzalez-Barca E., Castellsague X., Fernandez-Sevilla A., Granena A., Crespo N., Ferran C.

Expression of adhesion molecules in 113 patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship with clinico-prognostic features.

Leuk Res (1997) **21** (1): 67-73.

Earnshaw W. C., Martins L. M., Kaufmann S. H.

Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis.

Annu Rev Biochem (1999) **68**: 383-424.

Eigler A., Siegmund B., Emmerich U., Baumann K. H., Hartmann G., Endres S. Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production.

J Leukoc Biol (1998) **63** (1): 101-7.

Eistere W., Hilbe W., Stauder R., Bechter O., Fend F., Thaler J.

An aggressive subtype of B-CLL is characterized by strong CD44 expression and lack of CD11c.

Br J Haematol (1996) **93** (3): 661-9.

Fadok V. A., Laszlo D. J., Noble P. W., Weinstein L., Riches D. W., Henson P. M.

Particle digestibility is required for induction of the phosphatidylserine recognition mechanism used by murine macrophages to phagocytose apoptotic cells.

J Immunol (1993) **151** (8): 4274-85.

Farrow S. N., White J. H., Martinou I., Raven T., Pun K. T., Grinham C. J., Martinou J. C., Brown R.

Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K.

Nature (1995) **374** (6524): 731-3.

Fawcett L., Baxendale R., Stacey P., McGrouther C., Harrow I., Soderling S., Hetman J., Beavo J. A., Phillips S. C.

Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A.

Proc Natl Acad Sci U S A (2000) **97** (7): 3702-7.

Fenaux P., Preudhomme C., Lai J. L., Quiquandon I., Jonveaux P., Vanrumbeke M., Sartiaux C., Morel P., Loucheux-Lefebvre M. H., Bauters F. und Kollegen

Mutations of the p53 gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a report on 39 cases with cytogenetic analysis.

Leukemia (1992) **6** (4): 246-50.

Finke J., Ternes P., Lange W., Mertelsmann R., Dolken G.

Expression of interleukin 10 in B lymphocytes of different origin.

Leukemia (1993) **7** (11): 1852-7.

Fiorentino D. F., Bond M. W., Mosmann T. R.

Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones.

J Exp Med (1989) **170** (6): 2081-95.

Fiorentino D. F., Zlotnik A., Vieira P., Mosmann T. R., Howard M., Moore K. W., O'Garra A.

IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells.

J Immunol (1991) **146** (10): 3444-51.

Fisher D. A., Smith J. F., Pillar J. S., St Denis S. H., Cheng J. B.

Isolation and characterization of PDE8A, a novel human cAMP-specific phosphodiesterase.

Biochem Biophys Res Commun (1998a) **246** (3): 570-7.

Fisher D. A., Smith J. F., Pillar J. S., St Denis S. H., Cheng J. B.
Isolation and characterization of PDE9A, a novel human cGMP-specific phosphodiesterase.

J Biol Chem (1998b) **273** (25): 15559-64.

Fluckiger A. C., Durand I., Banchereau J.
Interleukin 10 induces apoptotic cell death of B-chronic lymphocytic leukemia cells.

J Exp Med (1994) **179** (1): 91-9.

Fujishige K., Kotera J., Michibata H., Yuasa K., Takebayashi S., Okumura K., Omori K.

Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A).

J Biol Chem (1999) **274** (26): 18438-45.

Galanos C., Freudenberg M. A.

Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity.

Immunobiology (1993) **187** (3-5): 346-56.

Galanos C., Roppel J., Weckesser J., Rietschel E. T., Mayer H.

Biological activities of lipopolysaccharides and lipid A from Rhodospirillaceae.

Infect Immun (1977) **16** (2): 407-12.

Gibson L., Holmgren S. P., Huang D. C., Bernard O., Copeland N. G., Jenkins N. A., Sutherland G. R., Baker E., Adams J. M., Cory S.

bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival.

Oncogene (1996) **13** (4): 665-75.

Gilman A. G.

G proteins and dual control of adenylate cyclase.

Cell (1984) **36** (3): 577-9.

Go N. F., Castle B. E., Barrett R., Kastelein R., Dang W., Mosmann T. R., Moore K. W., Howard M.

Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells.

J Exp Med (1990) **172** (6): 1625-31.

Gonzalez-Garcia M., Perez-Ballesteros R., Ding L., Duan L., Boise L. H., Thompson C. B., Nunez G.

bcl-XL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria.

Development (1994) **120** (10): 3033-42.

Hallek M., Kuhn-Hallek I., Emmerich B.

Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia.

Leukemia (1997) **11 Suppl 2**: S4-13.

Hamblin T. J., Davis Z., Gardiner A., Oscier D. G., Stevenson F. K.

Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia.

Blood (1999) **94** (6): 1848-54.

Han T., Barcos M., Emrich L., Ozer H., Gajera R., Gomez G. A., Reese P. A., Minowada J., Bloom M. L., Sadamori N. und Kollegen

Bone marrow infiltration patterns and their prognostic significance in chronic lymphocytic leukemia: correlations with clinical, immunologic, phenotypic, and cytogenetic data.

J Clin Oncol (1984) **2** (6): 562-70.

Han Z., Bhalla K., Pantazis P., Hendrickson E. A., Wyche J. H.

Cif (Cytochrome c efflux-inducing factor) activity is regulated by Bcl- 2 and caspases and correlates with the activation of Bid.

Mol Cell Biol (1999) **19** (2): 1381-9.

Hanada M., Delia D., Aiello A., Stadtmauer E., Reed J. C.

bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia.

Blood (1993) **82** (6): 1820-8.

Hartfield P. J., Bilney A. J., Murray A. W.

Neurotrophic factors prevent ceramide-induced apoptosis downstream of c- Jun N-terminal kinase activation in PC12 cells.

J Neurochem (1998) **71** (1): 161-9.

Hebenstreit G. F., Fellerer K., Fichte K., Fischer G., Geyer N., Meya U., Sastre-y-Hernandez M., Schony W., Schratzer M., Soukop W. und Kollegen

Rolipram in major depressive disorder: results of a double-blind comparative study with imipramine.

Pharmacopsychiatry (1989) **22** (4): 156-60.

Hengartner M. O.

The biochemistry of apoptosis.

Nature (2000) **407** (6805): 770-6.

Hirotsani M., Zhang Y., Fujita N., Naito M., Tsuruo T.

NH₂-terminal BH4 domain of Bcl-2 is functional for heterodimerization with Bax and inhibition of apoptosis.

J Biol Chem (1999) **274** (29): 20415-20.

Hjelle B., Mills R., Swenson S., Mertz G., Key C., Allen S.

Incidence of hairy cell leukemia, mycosis fungoides, and chronic lymphocytic leukemia in first known HTLV-II-endemic population.

J Infect Dis (1991) **163** (3): 435-40.

Hockenberry M. J., Coody D. K., Bennett B. S.

Childhood cancers: incidence, etiology, diagnosis, and treatment.

Pediatr Nurs (1990) **16** (3): 239-46.

Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C. C.

p53 mutations in human cancers.

Science (1991) **253** (5015): 49-53.

Houslay M. D., Milligan G.

Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity.

Trends Biochem Sci (1997) **22** (6): 217-24.

Hsu D. H., Moore K. W., Spits H.

Differential effects of IL-4 and IL-10 on IL-2-induced IFN-gamma synthesis and lymphokine-activated killer activity.

Int Immunol (1992) **4** (5): 563-9.

Hsu S. Y., Kaipia A., McGee E., Lomeli M., Hsueh A. J.

Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members.

Proc Natl Acad Sci U S A (1997a) **94** (23): 12401-6.

Hsu Y. T., Wolter K. G., Youle R. J.

Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis.

Proc Natl Acad Sci U S A (1997b) **94** (8): 3668-72.

Iannone M. A., Wolberg G., Zimmerman T. P.

Chemotactic peptide induces cAMP elevation in human neutrophils by amplification of the adenylate cyclase response to endogenously produced adenosine.

J Biol Chem (1989) **264** (34): 20177-80.

Inskip P. D., Kleinerman R. A., Stovall M., Cookfair D. L., Hadjimichael O., Moloney W. C., Monson R. R., Thompson W. D., Wactawski-Wende J., Wagoner J. K. und Kollegen

Leukemia, lymphoma, and multiple myeloma after pelvic radiotherapy for benign disease.

Radiat Res (1993) **135** (1): 108-24.

Jaattela M., Benedict M., Tewari M., Shayman J. A., Dixit V. M.
Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of
phospholipase A2 in breast carcinoma cells.

Oncogene (1995) **10** (12): 2297-305.

Jacobson M. D., Weil M., Raff M. C.
Programmed cell death in animal development.

Cell (1997) **88** (3): 347-54.

Johnson S., Smith A. G., Loffler H., Osby E., Juliusson G., Emmerich B., Wyld
P. J., Hiddemann W.

Multicentre prospective randomised trial of fludarabine versus
cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (CAP) for treatment of
advanced-stage chronic lymphocytic leukaemia. The French Cooperative Group
on CLL.

Lancet (1996) **347** (9013): 1432-8.

Johnston J. B., Daeninck P., Verburg L., Lee K., Williams G., Israels L. G.,
Mowat M. R., Begleiter A.

P53, MDM-2, BAX and BCL-2 and drug resistance in chronic lymphocytic
leukemia.

Leuk Lymphoma (1997) **26** (5-6): 435-49.

Jurlander J.

The cellular biology of B-cell chronic lymphocytic leukemia.

Crit Rev Oncol Hematol (1998) **27** (1): 29-52.

Jurlander J., Lai C. F., Tan J., Chou C. C., Geisler C. H., Schriber J.,
Blumenson L. E., Narula S. K., Baumann H., Caligiuri M. A.

Characterization of interleukin-10 receptor expression on B-cell chronic
lymphocytic leukemia cells.

Blood (1997) **89** (11): 4146-52.

Kalachikov S., Migliazza A., Cayanis E., Fracchiolla N. S., Bonaldo M. F., Lawton L., Jelenc P., Ye X., Qu X., Chien M., Hauptschein R., Gaidano G., Vitolo U., Saglio G., Resegotti L., Brodjansky V., Yankovsky N., Zhang P., Soares M. B., Russo J., Edelman I. S., Efstratiadis A., Dalla-Favera R., Fischer S. G.

Cloning and gene mapping of the chromosome 13q14 region deleted in chronic lymphocytic leukemia.

Genomics (1997) **42** (3): 369-77.

Kambayashi T., Jacob C. O., Zhou D., Mazurek N., Fong M., Strassmann G. Cyclic nucleotide phosphodiesterase type IV participates in the regulation of IL-10 and in the subsequent inhibition of TNF-alpha and IL-6 release by endotoxin-stimulated macrophages.

J Immunol (1995) **155** (10): 4909-16.

Karmiris T., Rohatiner A. Z., Love S., Carter M., Ganjoo R. K., Amess J., Norton A. J., Lister T. A.

The management of chronic lymphocytic leukemia at a single centre over a 24-year period: prognostic factors for survival.

Hematol Oncol (1994) **12** (1): 29-39.

Kemp B. E., Graves D. J., Benjamini E., Krebs E. G.

Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase.

J Biol Chem (1977) **252** (14): 4888-94.

Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R.

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.

Br J Cancer (1972) **26** (4): 239-57.

Khatri V. P., Caligiuri M. A.

A review of the association between interleukin-10 and human B-cell malignancies.

Cancer Immunol Immunother (1998) **46** (5): 239-44.

Kim D. H., Lerner A.

Type 4 cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia.

Blood (1998) **92** (7): 2484-94.

Kim J. M., Brannan C. I., Copeland N. G., Jenkins N. A., Khan T. A., Moore K. W.

Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes.

J Immunol (1992) **148** (11): 3618-23.

Kirkpatrick D. L., Duke M., Goh T. S.

Chemosensitivity testing of fresh human leukemia cells using both a dye exclusion assay and a tetrazolium dye (MTT) assay.

Leuk Res (1990) **14** (5): 459-66.

Kitabayashi A., Hirokawa M., Miura A. B.

The role of interleukin-10 (IL-10) in chronic B-lymphocytic leukemia: IL-10 prevents leukemic cells from apoptotic cell death.

Int J Hematol (1995) **62** (2): 99-106.

Kitada S., Andersen J., Akar S., Zapata J. M., Takayama S., Krajewski S., Wang H. G., Zhang X., Bullrich F., Croce C. M., Rai K., Hines J., Reed J. C.
Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses.

Blood (1998) **91** (9): 3379-89.

Knox K. A., Johnson G. D., Gordon J.

Distribution of cAMP in secondary follicles and its expression in B cell apoptosis and CD40-mediated survival.

Int Immunol (1993) **5** (9): 1085-91.

Koopman G., Reutelingsperger C. P., Kuijten G. A., Keehnen R. M., Pals S. T., van Oers M. H.

Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis.

Blood (1994) **84** (5): 1415-20.

Korsmeyer S. J.

Bcl-2: an antidote to programmed cell death.

Cancer Surv (1992a) **15**: 105-18.

Korsmeyer S. J.

Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death.

Blood (1992b) **80** (4): 879-86.

Krajewski S., Krajewska M., Shabaik A., Wang H. G., Irie S., Fong L., Reed J. C.

Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression.

Cancer Res (1994) **54** (21): 5501-7.

Krajewski S., Tanaka S., Takayama S., Schibler M. J., Fenton W., Reed J. C.

Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes.

Cancer Res (1993) **53** (19): 4701-14.

Krause W., Kuhne G.

Pharmacokinetics of rolipram in the rhesus and cynomolgus monkeys, the rat and the rabbit. Studies on species differences.

Xenobiotica (1988) **18** (5): 561-71.

Krause W., Kuhne G., Matthes H.

Pharmacokinetics of the antidepressant rolipram in healthy volunteers.

Xenobiotica (1989) **19** (6): 683-92.

Krause W., Kuhne G., Sauerbrey N.

Pharmacokinetics of (+)-rolipram and (-)-rolipram in healthy volunteers.

Eur J Clin Pharmacol (1990) **38** (1): 71-5.

Laemmli U. K.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature (1970) **227** (259): 680-5.

Lee R., Wolda S., Moon E., Esselstyn J., Hertel C., Lerner A.

PDE7A is expressed in human B-lymphocytes and is up-regulated by elevation of intracellular cAMP.

Cell Signal (2002) **14** (3): 277-84.

Lerner A., Kim D. H., Lee R.

The cAMP signaling pathway as a therapeutic target in lymphoid malignancies.

Leuk Lymphoma (2000) **37** (1-2): 39-51.

Levine A. J., Momand J., Finlay C. A.

The p53 tumour suppressor gene.

Nature (1991) **351** (6326): 453-6.

Levine E. G., Arthur D. C., Frizzera G., Peterson B. A., Hurd D. D., Bloomfield C. D.

There are differences in cytogenetic abnormalities among histologic subtypes of the non-Hodgkin's lymphomas.

Blood (1985) **66** (6): 1414-22.

Lichter P., Ward D. C.

Is non-isotopic in situ hybridization finally coming of age?

Nature (1990) **345** (6270): 93-4.

Lin E. Y., Orlofsky A., Berger M. S., Prystowsky M. B.

Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2.

J Immunol (1993) **151** (4): 1979-88.

Linnet M. S., Cartwright R. A.

Chronic lymphocytic leukemia: epidemiology and etiologic findings.

Nouv Rev Fr Hematol (1988) **30** (5-6): 353-7.

Lucio P. J., Faria M. T., Pinto A. M., da Silva M. R., Correia Junior M. E., da Costa R. J., Parreira A. B.

Expression of adhesion molecules in chronic B-cell lymphoproliferative disorders.

Haematologica (1998) **83** (2): 104-11.

Mainou-Fowler T., Copplestone J. A., Prentice A. G.

Effect of interleukins on the proliferation and survival of B cell chronic lymphocytic leukaemia cells.

J Clin Pathol (1995) **48** (5): 482-7.

Makower D., Malik U., Novik Y., Wiernik P. H.

Therapeutic efficacy of theophylline in chronic lymphocytic leukemia.

Med Oncol (1999) **16** (1): 69-71.

Martin S. J., Reutelingsperger C. P., McGahon A. J., Rader J. A., van Schie R. C., LaFace D. M., Green D. R.

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 (1995) **182** (5): 1545-56.

Mateo V., Lagneaux L., Bron D., Biron G., Armant M., Delespesse G., Sarfati M.
CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia.

Nat Med (1999) **5** (11): 1277-84.

McConkey D. J., Aguilar-Santelises M., Hartzell P., Eriksson I., Mellstedt H., Orrenius S., Jondal M.

Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells.

J Immunol (1991) **146** (3): 1072-6.

McConkey D. J., Orrenius S., Jondal M.

Agents that elevate cAMP stimulate DNA fragmentation in thymocytes.

J Immunol (1990) **145** (4): 1227-30.

McKnight G. S.

Cyclic AMP second messenger systems.

Curr Opin Cell Biol (1991) **3** (2): 213-7.

Mentz F., Merle-Beral H., Dalloul A. H.

Theophylline-induced B-CLL apoptosis is partly dependent on cyclic AMP production but independent of CD38 expression and endogenous IL-10 production.

Leukemia (1999) **13** (1): 78-84.

Mentz F., Merle-Beral H., Ouaz F., Binet J. L.

Theophylline, a new inducer of apoptosis in B-CLL: role of cyclic nucleotides.

Br J Haematol (1995) **90** (4): 957-9.

Mentz F., Mossalayi M. D., Ouaz F., Baudet S., Issaly F., Ktorza S., Semichon M., Binet J. L., Merle-Beral H.

Theophylline synergizes with chlorambucil in inducing apoptosis of B- chronic lymphocytic leukemia cells.

Blood (1996) **88** (6): 2172-82.

Montserrat E., Rozman C.

Chronic lymphocytic leukemia: present status.

Ann Oncol (1995) **6** (3): 219-35.

Moon E. Y., Lerner A.

PDE4 inhibitors activate a mitochondrial apoptotic pathway in chronic lymphocytic leukemia cells that is regulated by protein phosphatase 2A.

Blood (2003) **101** (10): 4122-30.

Moore K. W., O'Garra A., de Waal Malefyt R., Vieira P., Mosmann T. R.
Interleukin-10.

Annu Rev Immunol (1993) **11**: 165-90.

Moore K. W., Rousset F., Banchereau J.

Evolving principles in immunopathology: interleukin 10 and its relationship to Epstein-Barr virus protein BCRF1.

Springer Semin Immunopathol (1991) **13** (2): 157-66.

Moore K. W., Vieira P., Fiorentino D. F., Trounstein M. L., Khan T. A., Mosmann T. R.

Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1.

Science (1990) **248** (4960): 1230-4.

Morabito F., Filangeri M., Callea I., Sculli G., Callea V., Fracchiolla N. S., Neri A., Brugiattelli M.

Bcl-2 protein expression and p53 gene mutation in chronic lymphocytic leukemia: correlation with in vitro sensitivity to chlorambucil and purine analogs.

Haematologica (1997) **82** (1): 16-20.

Mori C., Nakamura N., Kimura S., Irie H., Takigawa T., Shiota K.

Programmed cell death in the interdigital tissue of the fetal mouse limb is apoptosis with DNA fragmentation.

Anat Rec (1995) **242** (1): 103-10.

Mosmann T. R., Moore K. W.

The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses.

Immunol Today (1991) **12** (3): A49-53.

Nicholson D. W., Thornberry N. A.

Caspases: killer proteases.

Trends Biochem Sci (1997) **22** (8): 299-306.

Nishiyama H., Mokuno J., Inoue T.

Relative frequency and mortality rate of various types of leukemia in Japan.

Gann (1969) **60** (1): 71-81.

O'Brien S., del Giglio A., Keating M.

Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia.

Blood (1995) **85** (2): 307-18.

O'Garra A., Chang R., Go N., Hastings R., Haughton G., Howard M.

Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10.

Eur J Immunol (1992) **22** (3): 711-7.

O'Garra A., Stapleton G., Dhar V., Pearce M., Schumacher J., Rugo H., Barbis D., Stall A., Cupp J., Moore K., et al.

Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10.

Int Immunol (1990) **2** (9): 821-32.

Oltvai Z. N., Milliman C. L., Korsmeyer S. J.

Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death.

Cell (1993) **74** (4): 609-19.

Pangalis G. A., Angelopoulou M. K., Vassilakopoulos T. P., Siakantaris M. P., Kittas C.

B-chronic lymphocytic leukemia, small lymphocytic lymphoma, and lymphoplasmacytic lymphoma, including Waldenstrom's macroglobulinemia: a clinical, morphologic, and biologic spectrum of similar disorders.

Semin Hematol (1999) **36** (2): 104-14.

Pangalis G. A., Nathwani B. N., Rappaport H.

Malignant lymphoma, well differentiated lymphocytic: its relationship with chronic lymphocytic leukemia and macroglobulinemia of Waldenstrom.

Cancer (1977) **39** (3): 999-1010.

Pangalis G. A., Roussou P. A., Kittas C., Kokkinou S., Fessas P.

B-chronic lymphocytic leukemia. Prognostic implication of bone marrow histology in 120 patients experience from a single hematology unit.

Cancer (1987) **59** (4): 767-71.

Pangalis G. A., Roussou P. A., Kittas C., Mitsoulis-Mentzikoff C., Matsouka-Alexandridis P., Anagnostopoulos N., Rombos I., Fessas P.

Patterns of bone marrow involvement in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic (well differentiated) non-Hodgkin's lymphoma. Its clinical significance in relation to their differential diagnosis and prognosis.

Cancer (1984) **54** (4): 702-8.

Pangalis G. A., Vassilakopoulos T. P., Dimopoulou M. N., Siakantaris M. P., Kontopidou F. N., Angelopoulou M. K.

B-chronic lymphocytic leukemia: practical aspects.

Hematol Oncol (2002) **20** (3): 103-46.

Pepper C., Bentley P., Hoy T.

Regulation of clinical chemoresistance by bcl-2 and bax oncoproteins in B-cell chronic lymphocytic leukaemia.

Br J Haematol (1996) **95** (3): 513-7.

Pepper C., Hoy T., Bentley D. P.

Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance.

Br J Cancer (1997) **76** (7): 935-8.

Pepper C., Hoy T., Bentley P.

Elevated Bcl-2/Bax are a consistent feature of apoptosis resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia and are correlated with in vivo chemoresistance.

Leuk Lymphoma (1998) **28** (3-4): 355-61.

Pepper C., Thomas A., Hidalgo de Quintana J., Davies S., Hoy T., Bentley P.

Pleiotropic drug resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia-- the role of Bcl-2 family dysregulation.

Leuk Res (1999) **23** (11): 1007-14.

Platzer C., Meisel C., Vogt K., Platzer M., Volk H. D.

Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs.

Int Immunol (1995) **7** (4): 517-23.

Potmesil M., Hsiang Y. H., Liu L. F., Bank B., Grossberg H., Kirschenbaum S., Forlenza T. J., Penziner A., Kanganis D., Forlenzar T. J. und Kollegen

Resistance of human leukemic and normal lymphocytes to drug-induced DNA cleavage and low levels of DNA topoisomerase II.

Cancer Res (1988) **48** (12): 3537-43.

Praz F., Karsenty G., Binet J. L., Lesavre P.

Complement alternative pathway activation by chronic lymphocytic leukemia cells: its role in their hepatosplenic localization.

Blood (1984) **63** (2): 463-7.

Raghoebier S., van Krieken J. H., Kluin-Nelemans J. C., Gillis A., van Ommen G. J., Ginsberg A. M., Raffeld M., Kluin P. M.

Oncogene rearrangements in chronic B-cell leukemia.

Blood (1991) **77** (7): 1560-4.

Rai K. R., Peterson B. L., Appelbaum F. R., Kolitz J., Elias L., Shepherd L., Hines J., Threatte G. A., Larson R. A., Cheson B. D., Schiffer C. A.

Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia.

N Engl J Med (2000) **343** (24): 1750-7.

Rai K. R., Sawitsky A., Cronkite E. P., Chanana A. D., Levy R. N., Pasternack B. S.

Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia.

Blood (1975) **46** (2): 219-34.

Reed J. C.

Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia.

Semin Oncol (1998) **25** (1): 11-8.

Reed J. C., Zha H., Aime-Sempe C., Takayama S., Wang H. G.

Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death.

Adv Exp Med Biol (1996) **406**: 99-112.

Robak T., Gora-Tybor J., Lech-Maranda E., Blonski J. Z., Kasznicki M.

Cladribine in combination with mitoxantrone and cyclophosphamide(CMC) in the treatment of heavily pre-treated patients with advanced indolent lymphoid malignancies.

Eur J Haematol (2001) **66** (3): 188-94.

Roberts D. S., Miller S. A.

Apoptosis in cavitation of middle ear space.

Anat Rec (1998) **251** (3): 286-9.

Robertson L. E., Chubb S., Meyn R. E., Story M., Ford R., Hittelman W. N., Plunkett W.

Induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia by 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 9-beta-D-arabinosyl-2-fluoroadenine.

Blood (1993a) **81** (1): 143-50.

Robertson L. E., Plunkett W.

Apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia.

Leuk Lymphoma (1993b) **11** (Suppl 2): 71-4.

Rodriguez I., Araki K., Khatib K., Martinou J. C., Vassalli P.

Mouse vaginal opening is an apoptosis-dependent process which can be prevented by the overexpression of Bcl2.

Dev Biol (1997) **184** (1): 115-21.

Rousset F., Garcia E., Defrance T., Peronne C., Vezzio N., Hsu D. H., Kastelein R., Moore K. W., Banchereau J.

Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes.

Proc Natl Acad Sci U S A (1992) **89** (5): 1890-3.

Rozman C., Montserrat E.

Chronic lymphocytic leukemia.

N Engl J Med (1995) **333** (16): 1052-7.

Rozman C., Montserrat E., Rodriguez-Fernandez J. M., Ayats R., Vallespi T., Parody R., Rios A., Prados D., Morey M., Gomis F. und Kollegen

Bone marrow histologic pattern--the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases.

Blood (1984) **64** (3): 642-8.

Sarfati M., Mateo V., Baudet S., Rubio M., Fernandez C., Davi F., Binet J. L., Delic J., Merle-Beral H.

Sildenafil and vardenafil, types 5 and 6 phosphodiesterase inhibitors, induce caspase-dependent apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells.

Blood (2003) **101** (1): 265-9.

Schena M., Larsson L. G., Gottardi D., Gaidano G., Carlsson M., Nilsson K., Caligaris-Cappio F.

Growth- and differentiation-associated expression of bcl-2 in B-chronic lymphocytic leukemia cells.

Blood (1992) **79** (11): 2981-9.

Schramm M., Selinger Z.

Message transmission: receptor controlled adenylate cyclase system.

Science (1984) **225** (4668): 1350-6.

Schulz H., Klein S. K., Rehwald U., Reiser M., Hinke A., Knauf W. U., Aulitzky W. E., Hensel M., Herold M., Huhn D., Hallek M., Diehl V., Engert A.

Phase 2 study of a combined immunochemotherapy using rituximab and fludarabine in patients with chronic lymphocytic leukemia.

Blood (2002) **100** (9): 3115-20.

Schulze-Osthoff K., Ferrari D., Los M., Wesselborg S., Peter M. E.

Apoptosis signaling by death receptors.

Eur J Biochem (1998) **254** (3): 439-59.

Schwabe U., Ukena D., Lohse M. J.

Xanthine derivatives as antagonists at A1 and A2 adenosine receptors.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol (1985) **330** (3): 212-21.

Sedlak T. W., Oltvai Z. N., Yang E., Wang K., Boise L. H., Thompson C. B., Korsmeyer S. J.

Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax.

Proc Natl Acad Sci U S A (1995) **92** (17): 7834-8.

Shimizu S., Eguchi Y., Kamiike W., Itoh Y., Hasegawa J., Yamabe K., Otsuki Y., Matsuda H., Tsujimoto Y.

Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL.

Cancer Res (1996a) **56** (9): 2161-6.

Shimizu S., Eguchi Y., Kamiike W., Waguri S., Uchiyama Y., Matsuda H., Tsujimoto Y.

Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors.

Oncogene (1996b) **13** (1): 21-9.

Sjoberg J., Aguilar-Santelises M., Sjogren A. M., Pisa E. K., Ljungdahl A., Bjorkholm M., Jondal M., Mellstedt H., Pisa P.

Interleukin-10 mRNA expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia inversely correlates with progression of disease.

Br J Haematol (1996) **92** (2): 393-400.

Soderberg O.

Growth and survival of B-chronic lymphocytic leukaemia cells.

Med Oncol (1998) **15** (2): 73-8.

Soderling S. H., Bayuga S. J., Beavo J. A.

Identification and characterization of a novel family of cyclic nucleotide phosphodiesterases.

J Biol Chem (1998) **273** (25): 15553-8.

Soderling S. H., Beavo J. A.

Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions.

Curr Opin Cell Biol (2000) **12** (2): 174-9.

Sorensen J. M., Vena D. A., Fallavollita A., Chun H. G., Cheson B. D.
Treatment of refractory chronic lymphocytic leukemia with fludarabine
phosphate via the group C protocol mechanism of the National Cancer Institute:
five-year follow-up report.

J Clin Oncol (1997) **15** (2): 458-65.

Souness J. E., Rao S.

Proposal for pharmacologically distinct conformers of PDE4 cyclic AMP
phosphodiesterases.

Cell Signal (1997) **9** (3-4): 227-36.

Stoetzer O. J., Pogrebniak A., Scholz M., Pelka-Fleischer R., Gullis E., Darsow
M., Nussler V., Wilmanns W.

Drug-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia.

Leukemia (1999) **13** (11): 1873-80.

Tang W. J., Gilman A. G.

Adenylyl cyclases.

Cell (1992) **70** (6): 869-72.

Tangye S. G., Weston K. M., Raison R. L.

Interleukin-10 inhibits the in vitro proliferation of human activated leukemic
CD5+ B-cells.

Leuk Lymphoma (1998) **31** (1-2): 121-30.

Taylor S. S., Buechler J. A., Yonemoto W.

cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory
enzymes.

Annu Rev Biochem (1990) **59**: 971-1005.

Thomas A., El Rouby S., Reed J. C., Krajewski S., Silber R., Potmesil M., Newcomb E. W.

Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance.

Oncogene (1996) **12** (5): 1055-62.

Tomei L. D., Shapiro J. P., Cope F. O.

Apoptosis in C3H/10T1/2 mouse embryonic cells: evidence for internucleosomal DNA modification in the absence of double-strand cleavage.

Proc Natl Acad Sci U S A (1993) **90** (3): 853-7.

Torphy T. J., Stadel J. M., Burman M., Cieslinski L. B., McLaughlin M. M., White J. R., Livi G. P.

Coexpression of human cAMP-specific phosphodiesterase activity and high affinity rolipram binding in yeast.

J Biol Chem (1992) **267** (3): 1798-804.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J.

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

Proc Natl Acad Sci U S A (1979) **76** (9): 4350-4.

Tsujimoto Y., Cossman J., Jaffe E., Croce C. M.

Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma.

Science (1985) **228** (4706): 1440-3.

Tsujimoto Y., Croce C. M.

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 (1986) **83** (14): 5214-8.

Tsujimoto Y., Shimizu S.

Bcl-2 family: life-or-death switch.

FEBS Lett (2000) **466** (1): 6-10.

Twentyman P. R., Fox N. E., Rees J. K.

Chemosensitivity testing of fresh leukaemia cells using the MTT colorimetric assay.

Br J Haematol (1989) **71** (1): 19-24.

Ucker D. S., Obermiller P. S., Eckhart W., Apgar J. R., Berger N. A., Meyers J.
Genome digestion is a dispensable consequence of physiological cell death mediated by cytotoxic T lymphocytes.

Mol Cell Biol (1992) **12** (7): 3060-9.

van Engeland M., Nieland L. J., Ramaekers F. C., Schutte B., Reutelingsperger C. P.

Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure.

Cytometry (1998) **31** (1): 1-9.

Vieira P., de Waal-Malefyt R., Dang M. N., Johnson K. E., Kastelein R., Fiorentino D. F., deVries J. E., Roncarolo M. G., Mosmann T. R., Moore K. W.
Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRFI.

Proc Natl Acad Sci U S A (1991) **88** (4): 1172-6.

Wachtel H.

Potential antidepressant activity of rolipram and other selective cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase inhibitors.

Neuropharmacology (1983) **22** (3): 267-72.

Wachtel H., Schneider H. H.

Rolipram, a novel antidepressant drug, reverses the hypothermia and hypokinesia of monoamine-depleted mice by an action beyond postsynaptic monoamine receptors.

Neuropharmacology (1986) **25** (10): 1119-26.

Walker P. R., Sikorska M.

New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis.

Biochem Cell Biol (1997) **75** (4): 287-99.

Walsh D. A., Perkins J. P., Krebs E. G.

An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle.

J Biol Chem (1968) **243** (13): 3763-5.

Wang H. G., Pathan N., Ethell I. M., Krajewski S., Yamaguchi Y., Shibasaki F., McKeon F., Bobo T., Franke T. F., Reed J. C.

Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD.

Science (1999) **284** (5412): 339-43.

Wang K., Yin X. M., Chao D. T., Milliman C. L., Korsmeyer S. J.

BID: a novel BH3 domain-only death agonist.

Genes Dev (1996) **10** (22): 2859-69.

Wattel E., Preudhomme C., Hecquet B., Vanrumbeke M., Quesnel B., Dervite I., Morel P., Fenaux P.

p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies.

Blood (1994) **84** (9): 3148-57.

Weide R., Heymanns J., Gores A., Koppler H.

Bendamustine mitoxantrone and rituximab (BMR): a new effective regimen for refractory or relapsed indolent lymphomas.

Leuk Lymphoma (2002) **43** (2): 327-31.

Williams R. H., Walsh S. A., Hepp D. K., Ensinck J. W.

Method for measuring hormonal effects on conversion of adenosine triphosphate to adenosine 3', 5'-monophosphate by isolated lipocytes.

Metabolism (1968) **17** (8): 653-68.

Wolter K. G., Hsu Y. T., Smith C. L., Nechushtan A., Xi X. G., Youle R. J.
Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis.
J Cell Biol (1997) **139** (5): 1281-92.

Wyllie A. H.
Apoptosis: an overview.
Br Med Bull (1997) **53** (3): 451-65.

Yang E., Zha J., Jockel J., Boise L. H., Thompson C. B., Korsmeyer S. J.
Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes
cell death.
Cell (1995) **80** (2): 285-91.

Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C. N., Ibrado A. M., Cai J., Peng T. I., Jones D.
P., Wang X.
Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria
blocked.
Science (1997) **275** (5303): 1129-32.

Yssel H., De Waal Malefyt R., Roncarolo M. G., Abrams J. S., Lahesmaa R.,
Spits H., de Vries J. E.
IL-10 is produced by subsets of human CD4⁺ T cell clones and peripheral blood
T cells.
J Immunol (1992) **149** (7): 2378-84.

Yunis J. J.
Multiple recurrent genomic rearrangements and fragile sites in human cancer.
Somat Cell Mol Genet (1987) **13** (4): 397-403.

Zhou P., Qian L., Kozopas K. M., Craig R. W.
Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a
variety of apoptosis-inducing conditions.
Blood (1997) **89** (2): 630-43.

Zimmermann K. C., Bonzon C., Green D. R.

The machinery of programmed cell death.

Pharmacol Ther (2001) **92** (1): 57-70.

Zwiebel J. A., Cheson B. D.

Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognostic factors.

Semin Oncol (1998) **25** (1): 42-59.

Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. Stefan Endres möchte ich mich für die Überlassung des Themas, sowie für die Aufnahme in eine Arbeitsgruppe mit herausragender Atmosphäre, die ein einerseits eigenständiges, andererseits kontinuierlich, engagiert betreutes Arbeiten ermöglichte, bedanken. Auch für die Möglichkeit zum Besuch internationaler Kongresse möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Für die hervorragende Betreuung und Anleitung zum eigenständig wissenschaftlichen Arbeiten geht mein spezieller Dank an meine Betreuerin Dr. Britta Siegmund. Weiterhin möchte ich mich bei PD Dr. Andreas Eigler und Dr. Florian Loher bedanken, die bei experimentellen und wissenschaftlichen Fragen stets eine große Hilfe waren.

Bei Herrn Professor Dr. B. Emmerich möchte ich mich sehr herzlich bedanken für die Anregung des Themas sowie ihm und seinen Mitarbeitern für die große Hilfsbereitschaft und den Zugang zu den Patienten.

Für die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und grenzenlose Geduld danke ich Frau Rosemarie Kiefl, MTA, die mir bei vielen experimentellen Hindernissen eine große Hilfestellung war.

Für die gute Zusammenarbeit danke ich all meinen Mitdoktoranden.

Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Teilen auf folgenden Kongressen vorgestellt und als Abstracts veröffentlicht worden:

1. **Welsch J.**, Siegmund B., Meinhardt G., Loher F., Emmerich B., Endres S., Eigler A.

Phosphodiesterase type 4 inhibitor Rolipram induces caspase- and IL-10-independent apoptosis in B-CLL.

Research Festival, Grosshadern 2000, P 77

2. **Welsch J.**, Siegmund B., Meinhardt G., Emmerich B., Endres S., Eigler A.

Inhibition of phosphodiesterase type 4 suppresses expression of antiapoptotic members of the Bcl-2 family and induces caspase- and IL-10-independent apoptosis.

42nd Meeting of the *American Society of Hematology* 2000, San Francisco

Die Kongressreise wurde finanziert durch ein Reisestipendium der "American Society of Hematology".

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgender internationaler Fachzeitschrift als Originalarbeit veröffentlicht:

1. Siegmund B., **Welsch J.**, Meinhardt G., Emmerich B., Endres S., Eigler A.

Phosphodiesterase type 4 inhibitor suppresses expression of antiapoptotic members of the Bcl-2 family in B-CLL cells and induces caspase-dependent apoptosis.

Leukemia 2001; 15:1564-1571. (*JIF* 3,2)

Lebenslauf

- 02.11.1975 Julia Pauline Welsch, geboren in München als Tochter von Inge und Horst Welsch
- 1982 – 84 Besuch der Deutschen Schule, Den Haag
- 1985 – 94 Besuch der Europäischen Schule, München
- 1994 Abitur an der Europäischen Schule, München
- 1995 – 1996 Studium der Volkswirtschaft an der London School of Economics, London
- 1996 Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Aug. 1998 Ärztliche Vorprüfung
- Aug. 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Sep. 1999 Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. med. S. Endres, Abteilung für Klinische Pharmakologie, Medizinische Klinik, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität, München
- März 2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2002/2003 Praktisches Jahr :
1. Terial: Medizinische Klinik III, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität, München
 2. Terial: Departement Chirurgie, Universitätsspital der Universität Zürich, Schweiz
 3. Terial: Institut für Klinische Radiologie, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität, München

April 2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und
Teilapprobation

seit Dez. 2003 ÄIP an der Klinik für Nuklearmedizin,
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität, München