



Gregor Lohmann (Autor)

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



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

Copyright:

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

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



# Inhaltsverzeichnis

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



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

X



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



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



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