

Aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Sergij Goerdts)

Bcl-2-Inhibition alleine und in Kombination mit dem NF- κ B-Inhibitor
Dimethylfumarat als therapeutischer Ansatz bei kutanen T-Zell-
Lymphomen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Tabea Constanze Fröhlich

aus
Oldenburg (Oldb)
2020

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Jan P. Nicolay

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
1 EINLEITUNG.....	6
1.1 Kutane T-Zell-Lymphome (CTCL).....	6
1.1.1 Ätiologie und Pathophysiologie	7
1.1.2 Klinik.....	8
1.1.3 Diagnostik.....	9
1.1.4 Aktuelle Therapieleitlinien	10
1.2 Neue therapeutische Zielstrukturen der CTCL.....	13
1.2.1 CTCL-Charakteristika und neue therapeutische Strategien.....	13
1.3 Zelltodresistenz als therapeutische Aufgabe bei CTCL	16
1.3.1 Apoptose-Signalwege und -resistenzen bei CTCL.....	16
1.3.2 NF- κ B-Inhibition mittels Dimethylfumarat	18
1.3.3 Bcl-2-Inhibition zur Lösung der Zelltodbremse	20
1.4 Zielsetzung der Arbeit	22
1.5 Studiendesign	23
2 MATERIAL UND METHODEN.....	25
2.1 Material	25
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	25
2.1.2 Geräte	26
2.1.3 Antikörper	27
2.1.4 Chemikalien.....	29
2.2 Zellkultur.....	32
2.2.1 Zelllinien	32
2.2.2 Mediumswechsel.....	32
2.2.3 Kontamination und Fremdwuchs.....	32
2.2.4 Einfrieren und Auftauen.....	33
2.3 Probanden.....	34
2.3.1 Ethikvotum.....	34

2.3.2	Patientenauswahl und Einwilligung	34
2.3.3	Isolation der CTCL-Zellen	34
2.4	Zelltodassay	36
2.5	Western Blot.....	37
2.5.1	Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung	37
2.5.2	Gelelektrophorese	37
2.5.3	Immunoblotting und Detektion.....	38
2.6	ROS-Bestimmung	38
2.7	Bcl-2 Knockdown	39
2.8	quantitative PCR	39
2.9	Proximity Ligation Assay	40
2.10	Xenograft CTCL Mausmodell und Behandlung der Versuchstiere	41
2.10.1	NSG Mäuse	41
2.10.2	Injektion von SeAx-Zellen.....	42
2.10.3	Behandlung der Versuchstiere	42
2.10.4	Ende des Beobachtungszeitraumes und Auswertung.....	43
2.10.5	Histologische und immunhistochemische Färbungen	43
2.10.6	Mikroskopie	43
2.11	Statistik	44
3	ERGEBNISSE	45
3.1	Zelltodauslösung in CTCL-Zelllinien und primären CTCL-Zellen durch Bcl-2-Inhibitoren.....	45
3.1.1	Zelllinien	45
3.1.2	Primäre CD4 ⁺ Zellen	48
3.2	Synergistische Zelltodauslösung in CTCL-Zellen durch Kombinationsbehandlung mit Bcl-2-Inhibitoren und dem NF-κB-Inhibitor DMF	50
3.3	Mechanistische Untersuchung der Zelltodauslösung durch Bcl-2-Inhibitoren und DMF.....	53
3.4	Synergismus der Bcl-2 und NF-κB-Inhibition durch Blockade zweier unabhängiger Signalwege.....	58
3.5	Verringertes Tumorwachstum und gesteigertes Überleben durch die Kombinationsbehandlung mit ABT-199 und DMF im Xenograft-Mausmodell.....	61
3.6	Immunhistochemische Charakterisierung und Verifikation der SeAx Tumoren im Xenograft Mausmodell.....	63
3.7	Histologische Zeichen der Tumorresorption und Proliferationshemmung durch Bcl-2- und NF-κB-Inhibition	64

3.8 Immunistochemische Analyse der Apoptoseauslösung durch Bcl-2- und NF- κ B- Inhibitoren	67
4 DISKUSSION	68
4.1 Bcl-2 als neue therapeutische Zielstruktur zur Wiederherstellung der Apoptosesensitivität von CTCL	68
4.2 Etablierung eines stabilen Xenograft Mausmodells mit SeAx-Zellen	70
4.3 Die kombinierte Inhibition von NF- κ B und Bcl-2 als vielversprechender Therapieansatz zur zielgerichteten Apoptoseauslösung bei CTCL.....	73
4.4 Ausblick.....	74
5 ZUSAMMENFASSUNG	77
6 LITERATURVERZEICHNIS	78
6.1 Publikationsliste	91
7 LEBENSLAUF	92
8 DANKSAGUNG.....	94

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
A	Ampère
APC	antigene presenting cells, Antigen präsentierende Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
Bad	Bcl-2-Antagonist of Cell Death, Bcl-2-Antagonist des Zelltods
Bcl-2	B-cell lymphoma 2, B-Zell-Lymphom 2
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large
BH3	Bcl-2 homology domain, Bcl-2 Homologie Domäne
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
Bim	Bcl-2-like protein 11, Bcl-2-ähnliches Protein 11
BSA	Bovine serum albumine, Rinderserumalbumin
ca.	circa
CCR4	C-C Chemokinrezeptor 4
CD	Cluster of Differentiation, Differenzierungscluster
CD4	Cluster of Differentiation 4, Oberflächenmarker von Monozyten, Makrophagen und T-Helfer-Zellen
clCaspase-3	Cleaved caspase 3, aktivierte, „geschnittene“ Caspase 3 (clCaspase-3)
cm ³	Kubikzentimeter
Ct	threshold cycle, Schwellenzyklus
CTCL	cutaneous T-cell lymphoma, kutanes T-Zell-Lymphom
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4, zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4
d	day(s), Tag(e)
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMF	Dimethylfumarat
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECP	extracorporal photopheresis, extrakorporale Photopherese
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer, Europäische Organisation für die Erforschung und Behandlung von Krebs
FACS	Fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FADD	Fas-associated protein with death domain
FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H2DCF-DA	2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat
HCl	Salzsäure
HDAC	Histon-Deacetylasen
HDACi	Histon-Deacetylase-Inhibitor
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HRK	Activator of apoptosis harakiri
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
i.d.	intradermal
IFN- α	Interferon-alpha
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
ISCL	International Society of Cutaneous Lymphoma, Internationale Gesellschaft für kutane Lymphome
JAK	Januskinase
KG	Körpergewicht
Ki-67	Kiel 67, Protein, welches in sich teilenden Zellen vorhanden ist und als Proliferationsmarker verwendet werden kann
L	Liter
mA	Milliampère
MAP	Molecule Activity Predictor, Molekül-Aktivitäts-Prädiktor
MAPK	Mitogen-activated protein kinase, Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mcl-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein, induziertes myeloische Leukämie Zelldifferenzierungsprotein
MF	Mycosis fungoides
min	Minute(n)
ml	Milliliter

mM	Millimol/Liter
MMF	Monomethylfumarat
Mo	Monate
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, nukleärer Faktor "kappa-Leichtketten-Enhancer" der aktivierten B-Zellen
nm	Nanometer
nM	Nanomol/Liter
NOD/SCID	Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency
NRAS	neuroblastoma RAS, "Neuroblastom" RAS
NSG	NOD/SCID gamma chain knockout
O ₂	Sauerstoff
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis, Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	Peripheral Blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate-Buffered Saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS ⁺⁺	PBS plus 1 mM MgCl ₂ und 0,1 mM CaCl ₂
PBST ⁺⁺	500 ml PBS ⁺⁺ plus 500 μ l TritonX100
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	Programmed cell death protein 1, programmierter Zelltod Protein 1
PE	Phycoerythrin
PLA	Proximity Ligation Assay
PUVA	Psoralen plus UVA
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction, quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma protein oder rat fibrosarcoma protein, schnell akzelerierendes Fibrosarkom Protein oder Ratten Fibrosarkom Protein
RAS	Rat sarcoma protein, Ratten Sarkom Protein

RIPA	Radioimmunpräzipitation-Assay
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction, Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
SCID	severe combined immunodeficiency, schwerer kombinierter Immundefekt
SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA, kleine eingreifende RNA
SMAC	Supramolekularer Adhäsionskomplex
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription, Signalwandler und Aktivator der Transkription
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3, Signalumwandler und Aktivator der Transkription 3
STAT5B	Signal transducer and activator of transcription 5B, Signalumwandler und Aktivator der Transkription 5B
Std.	Stunde(n)
tBid	truncated Bid, gekürztes Bid
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGS	Tris/Glycine/SDS
TH2	T-Helfer 2
TNMB-Klassifikation	Klassifikation zur Einteilung der kutanen Lymphome nach Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Metastasierung und Beteiligung im peripheren Blut (T: <i>tumor</i> , Umfang der Hautbeteiligung, N: <i>node</i> , Lymphknotenbeteiligung, M: <i>metastasis</i> , Manifestation an viszeralen Organen, B: <i>blood</i> , Tumorlast im peripheren Blut)
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein, Tumornekrosefaktor Rezeptor Typ 1-assoziiertes Todesdomäne Protein
TTNT	time to next treatment, Zeit bis zur nächsten Behandlung
UVA	Ultraviolett A
UVB	Ultraviolett B
V	Volt

Vol.-%	Volumenprozent
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
x g	mal Erdbeschleunigung g (9,81 m/s ²)
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein, X-gebundener Inhibitor des Apoptoseproteins
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

1 EINLEITUNG

1.1 Kutane T-Zell-Lymphome (CTCL)

Kutane T-Zell-Lymphome (CTCL) beschreiben eine Gruppe von Tumorentitäten, die sich primär in der Haut manifestieren. Die häufigste Entität ist die Mycosis fungoides (MF) mit 44 % aller CTCL, während das Sézary Syndrom (SS) mit 3 % der CTCL die aggressivste Form der CTCL darstellt¹. 2005 einigten sich die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) und die Europäische Organisation für Krebsforschung und -behandlung (European Organization for Research and Treatment of Cancer, EORTC) auf eine Einteilung der CTCL, die zuletzt 2016 revidiert wurde^{2,3}. Während die T-Zell-Lymphome mit Hauptmanifestation an der Haut zunächst nach indolenten und aggressiven CTCL klassifiziert wurden, werden sie heute geschlossen zu den reifen T-Zell Neoplasien gezählt^{3,1}. Als primäre kutane T-Zell-Lymphome werden nach der aktuellen Klassifikation nur solche bezeichnet, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung auf die Haut beschränkt sind, sowie das Sézary Syndrom^{3,4}. Nach wie vor werden die MF und das SS als die häufigsten und bestbeschriebenen CTCL häufig synonym zu dem Begriff der kutanen T-Zell-Lymphome verwendet. Die vorliegende Arbeit untersucht die Mycosis fungoides und das Sézary Syndrom. Mit dem Begriff CTCL sind im Folgenden diese Tumorentitäten zusammengefasst.

Die Inzidenz der CTCL ist in den letzten Jahren kontinuierlich angestiegen. Zwischen 1973 und 1979 erkrankten 2,8 pro 1.000.000 Einwohner pro Jahr, während die Neuerkrankungen zwischen 2005 und 2009 bei 10,2 pro 1.000.000 Einwohner pro Jahr lagen⁵. Daten aus Deutschland zeigen einen Diagnosegipfel zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr⁶. Es handelt sich um eine seltene Erkrankung, die jedoch mit einer enormen Beeinträchtigung der Lebensqualität und eingeschränkten Lebenserwartung der Patienten einhergeht. Zu den Hauptsymptomen gehören in fortgeschrittenen Stadien häufig ulzerierende Hauttumoren und ein generalisierter Pruritus⁷. CTCL gehen mit einem erhöhten Risiko für sekundäre Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome, sowie für nicht-hämatologische Erkrankungen wie das maligne Melanom und Malignome des Harnsystems einher⁸. Das mediane Gesamtüberleben im Stadium IVA der MF und des SS beträgt 47,5 Monate, im Stadium IVB 33,3 Monate⁹. Hohe

Zahlen von Sézary-Zellen, der Verlust von Oberflächenantigenen und chromosomale Veränderungen verschlechtern die Prognose zusätzlich¹⁰. Zu den häufigsten Todesursachen gehören Folgen der systemischen Beteiligung und Infektionen¹.

Die Erweiterung therapeutischer Konzepte gestaltet sich als schwierig. Durch die geringen Fallzahlen sind große Studien kaum umsetzbar. Die heterogene Biologie und Prognose der verschiedenen Ausprägungsformen führen zu einer hohen Komplexität der wissenschaftlichen Ansätze.

Aktuell bestehen keine kurativen oder ausreichend effektiven Therapieansätze, die zu einer anhaltenden Remission führen. Daher besteht dringender Bedarf an weiteren, möglichst spezifischen und nebenwirkungsarmen Therapiekonzepten.

1.1.1 Ätiologie und Pathophysiologie

Die Ätiologie der CTCL ist noch nicht endgültig geklärt. Im Laufe der Jahre wurden verschiedene Ansätze diskutiert, die eine chronische Antigenstimulation und damit einhergehende dauerhafte T-Zell-Aktivierung, eine Selbststimulation durch antigenpräsentierende Zellen, sowie die Beteiligung von bakteriellen Infektionen umfassen^{11,12,13}. Im Zuge inzwischen verfügbarer Technologien ist ein detaillierteres Verständnis der Tumorbiologie möglich, wodurch heute molekulargenetische Ansätze in Bezug auf die Tumorentstehung in den Vordergrund rücken.

Das umgebende Mikromilieu der CTCL ist neben dendritischen Zellen durch weitere Immunzellen, wie Makrophagen, CD8-positive (CD8+) zytotoxische T-Zellen und regulatorische FOXP3-positive (FOXP3+) T-Zellen charakterisiert. FOXP3 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression bestimmter Proteine bewirkt, die von regulatorischen T-Zellen benötigt werden. In weiter fortgeschrittenen Läsionen verändert sich das Zellbild. Während zu Beginn der Krankheitsprogression ein tumorkontrollierendes Milieu mit Dominanz der regulatorischen CD8+ und T-Helfer-1-Zellen (TH1) charakteristisch ist, fallen in späteren Stadien geringe Zahlen von CD8+ und FOXP3+ Zellen auf.^{14,15} Zudem verändert sich die Zytokinzusammensetzung zugunsten TH2-aktivierenden Zytokinen, die unter anderem durch autokrine Chemokin-Freisetzung der malignen T-Zellen zu erklären ist^{16,17}. Die Tumorumgebung spielt in der Tumorentstehung und -entwicklung eine entscheidende Rolle. Durch Verständnis der Signalwege können Therapien entwickelt werden, die

eine tumorfördernde Kommunikation zwischen malignen CTCL-Zellen und den Zellen des Mikromilieus durchbrechen. Die Mechanismen der CTCL, der Zerstörung durch das körpereigene Immunsystem zu entgehen, gelten hier als besonders vielversprechende Therapieziele.¹⁸

Aktuelle Publikationen befassen sich intensiv mit Signalwegen und Molekülen, die an der Tumorgenese der CTCL beteiligt sind. In einer Arbeit von Shono et al. von 2019 wurde die Expression der C-C-Chemokinrezeptor Typen 3 und 4 in Bezug auf den klinischen Verlauf der CTCL untersucht und ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von CCR3 und CCR4 und einem ungünstigen Prognose festgestellt¹⁹. Hierdurch entstanden in der Folge neue Therapieansätze für CTCL. Durch Sequenzierungsarbeiten konnten in den letzten Jahren einige charakteristische Mutationen entdeckt werden. Es zeigten sich aberrante Expressionsmuster von Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind.²⁰ Mithilfe der Next Generation-Sequenzierung können Aberrationen heute schneller und zuverlässiger identifiziert werden. Häufig von Mutationen betroffen ist der JAK-STAT-Signalweg, der eine wichtige Rolle für das Zellwachstum und die Zellentwicklung spielt²¹. Weitere betroffene Signalwege sind der MAPK-Signalweg (Zelldifferenzierung, -wachstum, Apoptose-Regulation) und der T-Zell-Rezeptor/ NF-κB-Signalweg (Zellproliferation, Apoptose-Regulation)^{22,23,24}. Daneben wurden einige weitere Mutationen gefunden, die an der Entstehung von CTCL beteiligt sein könnten, und potentiell von therapeutischem Nutzen sein könnten. Zudem stellen epigenetische Veränderungen des Chromatins einen möglichen Motor der Lymphom-Entstehung dar.²⁵ Die bessere Charakterisierung der CTCL ist ein entscheidender Schritt für präventive Überlegungen, Entwicklung neuer Therapien und die Therapieauswahl.

1.1.2 Klinik

Die klassische MF tritt meist an nicht-sonnenexponierten Stellen des Körpers auf. Sie zeichnet sich durch einen indolenten Verlauf mit langsamer Progression aus¹. Es können mehrere Stadien unterschieden werden:

Ekzemstadium/ Patchstadium: Es zeigen sich gerötete, pityriasiforme oder psoriasiforme, schuppige und scharf begrenzte Makulä mit häufig atropher Oberfläche, die Juckreiz auslösen können. In diesem Stadium ist die Abgrenzung von anderen dermatologischen Krankheitsbildern klinisch besonders schwierig.

Plaquestadium: Die Plaques weisen eine bräunlich-rötliche Farbe auf und können auf der Basis ekzematöser Herde oder *de novo* entstehen. Typisch sind Areale gesunder Haut innerhalb der betroffenen Bereiche (Nappes claires). Klinisch zeichnet sich dieses Stadium insbesondere durch den starken Juckreiz aus.

Tumorstadium: Innerhalb der MF-Areale bilden sich schwammartige Tumoren aus, welche häufig Ulzerationen aufweisen.

Generalisiertes Lymphomstadium: Ab dem Plaquestadium können Lymphknoten und viszerale Organe betroffen sein. Eine Organbeteiligung tritt jedoch eher selten auf.^{1,26}

Wichtig ist die Abgrenzung der MF von non-MF-Subtypen, die darauf basiert, dass dem Tumorstadium der MF stets das Ekzem- oder Plaquestadium vorangeht¹⁰.

Im Kontrast zur MF entwickelt sich das SS *de novo* mit einer kurzen Entstehungsdauer²⁷. Die Hautläsionen ähneln denen der MF, die sich jedoch zu einer massiven Hautinfiltration mit Erythrodermie (>80% der Körperoberfläche befallen) mit häufiger Hyperpigmentierung erweitern²⁶. Definitiv treten eine generalisierte Erythrodermie, Ödeme und oft extremer Pruritus auf. Weitere häufige Symptome sind eine Lymphadenopathie, Hepatomegalie, Alopezie, Onychodystrophie und eine Hyperkeratose im Palmar- und Plantarbereich.⁷

1.1.3 Diagnostik

Zur Diagnostik des CTCL gehört neben einer detaillierten Anamnese die klinische Untersuchung mit vollständiger Hautinspektion und der genauen Erhebung des Lymphknotenstatus. Die endgültige Diagnosestellung erfolgt durch die Kombination des führenden klinischen Befundes mit der histologischen Untersuchung repräsentativer Hautbiopsien, immunhistochemischen Verfahren und – bei unklarer Differentialdiagnose – molekularbiologischen Klonalitätsanalysen.⁴ Zusätzlich zu der Erhebung einer orientierenden Blutanalyse wird bei erythrodermischen CTCL ein Blutausschrieb auf Sézary-Zellen, eine FACS-Analyse mit Bestimmung des CD4/CD8 Verhältnisses und der CD4⁺CD7⁻ Zellen (typische Oberflächencharakteristik der Sézary-Zellen) sowie ein Klonalitätsnachweis im Blut erhoben. Zur Beurteilung einer möglichen extrakutanen Beteiligung wird die Diagnostik durch bildgebende Verfahren ergänzt.⁴

Histopathologisch typisch für Makulä und Plaques sind bandförmige, lymphozytische Infiltrate in der Papillarschicht. Häufig sieht man eine Exozytose von Lymphozyten in die Epidermis (Epidermotropismus), wo sie sogenannte Pautrier Mikroabzesse bilden, die Clustern von malignen Lymphozyten entsprechen. Letztere sind pathognomonisch für die MF, kommen allerdings nur in 25 % der Fälle vor^{1,2}. In Tumorläsionen findet man keinen oder einen nur noch schwach ausgebildeten Epidermotropismus²⁸. Bei der frühen MF sind die histologischen Merkmale oft weniger eindeutig und können anderen dermatologischen Krankheitsbildern ähneln. Definierte histopathologische Kriterien erleichtern hier eine möglichst frühzeitige Diagnose.²⁹ Bei den erythrodermischen CTCL können histologische Merkmale schwach ausgeprägt sein. Hier sind häufig Lymphknoten-Biopsien und der Nachweis von Sézary-Zellen im peripheren Blut entscheidend.^{30,31}

In der Immunhistochemie fällt häufig der Verlust von Oberflächenantigenen wie CD2, CD5 oder CD7 auf. Ein Fehlen des Markers CD7 wird als spezifischer und sensitiver Hinweis auf CTCL diskutiert, ebenso wie beim Sézary Syndrom das Fehlen von CD26 und die Expression von CD158k.^{28,32}

MF und SS werden nach der von der Internationalen Gesellschaft für kutane Lymphome (International Society of Cutaneous Lymphoma; ISCL) und der EORTC überarbeiteten TNMB-Klassifikation bewertet. Diese bezieht die Hautläsionen (T), den Befall von Lymphknoten (N), die Beteiligung viszeraler Organe (M) sowie die Anzahl entarteter Zellen im Blut (B) ein.¹⁰ Stadium IV wird definiert über eine hohe Tumorlast im peripheren Blut (IVA1), eine ausgedehnte Lymphknotenmanifestation (IVA2) oder die Beteiligung viszeraler Organe (IVB).⁴

1.1.4 Aktuelle Therapieleitlinien

Die Therapie kutaner T-Zell-Lymphome richtet sich maßgeblich nach der Art und dem Stadium der Erkrankung³³. In der Regel werden die Therapieoptionen mit der Zielsetzung einer dauerhaften Remission eingesetzt. Man verwendet stadiengerecht lokale und/oder systemische Therapien²⁸.

Lokal werden insbesondere in frühen Stadien topische Kortikosteroide verabreicht. Als Zweitlinientherapie stehen Carmustin oder Chlormethin zur Verfügung, welche zur

Alkylierung von Nukleinsäuren führen. In fortgeschrittenen Stadien der CTCL kommen topische Retinoide wie Bexaroten zum Einsatz, die apoptosefördernd wirken und die Differenzierung der Zellen beeinflussen. Zentraler Bestandteil der Therapie ist außerdem häufig die UV-Phototherapie, entweder mit Psoralen und UVA-Strahlen (PUVA) oder eine UVB-Therapie mit einer Wellenlänge von 311 nm (UVB-311 nm), die in frühen MF-Stadien eine komplette Remission erzielen können.³⁴

Systemisch kommt beim erythrodermischen CTCL die extrakorporale Photopherese (ECP) zum Einsatz. Deren Prinzip basiert darauf, dass das Blut außerhalb des Körpers UVA-Licht in Kombination mit Methoxsalen ausgesetzt und dann dem Körper zurückgeführt wird, wodurch die Apoptose von Tumorzellen ausgelöst werden kann. Ab Stadium III der MF und bei dem SS kommen systemisches Bexaroten und Interferon alpha (IFN- α), häufig in Kombination mit der ECP, zum Einsatz. Bexaroten führt bei der systemischen Gabe oft zu Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Hypercholesterinämie und Hypothyreoidismus, kann aber auch zu schwerwiegenderen Problemen wie u.a. Neutropenie, Leukopenie, Pankreatitis führen.³⁴ Zu den typischen Nebenwirkungen von IFN- α zählen Kopfschmerzen, grippe-ähnliche Symptome, Fatigue, Anorexie, Gewichtsverlust, Depressionen und periphere Neuropathien³⁵. Beim SS und bei der MF ab Stadium III kann zudem Alemtuzumab eingesetzt werden, ein monoklonaler Antikörper, der über CD52 an B- und T-Zellen inklusive der malignen CTCL-Zellen bindet und deren Zerstörung bewirkt. Allerdings wird im Zusammenhang mit Alemtuzumab von einer anhaltenden Immunsuppression berichtet.^{28,34,36} Histone-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) lösen ein reduziertes Wachstum aus und begünstigen die Apoptose. Einige Studien berichten von schweren Nebenwirkungen der HDACi wie gastrointestinale Beschwerden, Fatigue, hämatologische Abnormalitäten wie Thrombozyto-, Lymphozyto- und Neutropenien, opportunistischen Infektionen sowie kardiologische Komplikationen²⁸.

Bisher stehen nur zwei zielgerichtete Therapien für die Indikation der CTCL zur Verfügung³⁴. Als erste zielgerichtete Therapie wurde 2017 Brentuximab-Vedotin als Konjugatwirkstoff aus einem CD30-Antikörper mit einem gebundenen Chemotherapeutikum zugelassen^{37,38,39}. 2018 wurde als zweite bisher verfügbare zielgerichtete Therapie der Antikörper Mogamulizumab zugelassen, der sich gegen den häufig auf CTCL-Zellen exprimierten CCR4 (C-C-Chemokinrezeptor Typ 4)

richtet⁴⁰. (Siehe auch Kapitel 1.2.1: Spezielle CTCL-Charakteristika und neue therapeutische Strategien.)

Des Weiteren stehen ab dem Stadium IIB einige Chemotherapeutika zur Verfügung, die insbesondere als Zweitlinientherapie eingesetzt werden³⁴. Der kurative Therapieansatz mittels allogener Stammzelltransplantation zeigte sich in Studien als geeignete Therapiestrategie bei jungen Patienten mit fortgeschrittenen Stadien^{34,41}.

Eine retrospektive Analyse der zugelassenen Therapieoptionen von Hughes et al.⁴² untersuchte die Effektivität der aktuellen Therapieoptionen durch Analyse der Dauer bis zur Notwendigkeit einer Therapieumstellung (time to next treatment, TTNT). Hierzu wurden die Daten von 198 Patienten mit MF/SS des Peter MacCallum Krebszentrums und des St. Vincent's Krankenhaus in Melbourne, Australien von einem Zeitraum von 39 Jahren ausgewertet. Es zeigte sich eine insgesamt hohe und frühe Rezidiv- und Progressionsrate mit der Notwendigkeit häufiger Therapieumstellungen. Über alle gängigen Therapien ergab sich eine TTNT von 5,4 Monaten, dabei konnte keine der medikamentösen Therapielinien eine TTNT von über 9 Monaten bewirken. In der Betrachtung der unterschiedlichen Therapeutika schnitten insbesondere die Chemotherapeutika mit einer medianen TTNT von nur 3,9 Monaten ungünstig ab. (Tabelle 1) Die Studie zeigt, dass aktuelle Standardtherapien häufig nur zu einer kurzen Progressionsfreiheit mit früher Resistenzbildung führen und daher oft mehrere therapeutische Ansätze notwendig sind, um eine langfristige Krankheitskontrolle zu erreichen.⁴²

Tabelle 1: Mediane Dauer bis zur nächsten Therapielinie der gängigsten medikamentösen Therapien nach Hughes et al.⁴² TTNT: Time to next treatment, Mo: Monate, 95 % KI: 95%-Konfidenzintervall

	Mediane TTNT (Mo)	TTNT 95 % KI (Mo)	Mediane Therapielinie	Größe Patientenkollektiv
Chemotherapie	3,9	3,2 – 5,1	4	144
Interferon- α	8,7	6,0 – 18,0	2	68
HDAC-Inhibitoren	4,5	4,0 – 6,1	3	74
Bexaroten	7,3	2,6 – 110,8	2	20
Alemtuzumab	4,1	2,7 – 6,5	2	16

1.2 Neue therapeutische Zielstrukturen der CTCL

1.2.1 CTCL-Charakteristika und neue therapeutische Strategien

2000 publizierten Hanahan und Weinberg erstmals Eigenschaften, die über die unterschiedlichen Tumorentitäten hinweg bösartige Erkrankungen auszeichnen⁴³. 2011 wurden die ursprünglichen sechs „hallmarks of cancer“ durch vier weitere ergänzt⁴⁴. Viele Mechanismen, die bei malignen Erkrankungen gefunden werden, betreffen mehrere dieser Kennzeichen bösartiger Erkrankungen und wurden vielfältig auch bei CTCL entdeckt^{24,45,46}. Heutzutage stellen diese molekularen Entdeckungen wichtige Ansatzpunkte der CTCL-Therapie dar. (Abbildung 2)

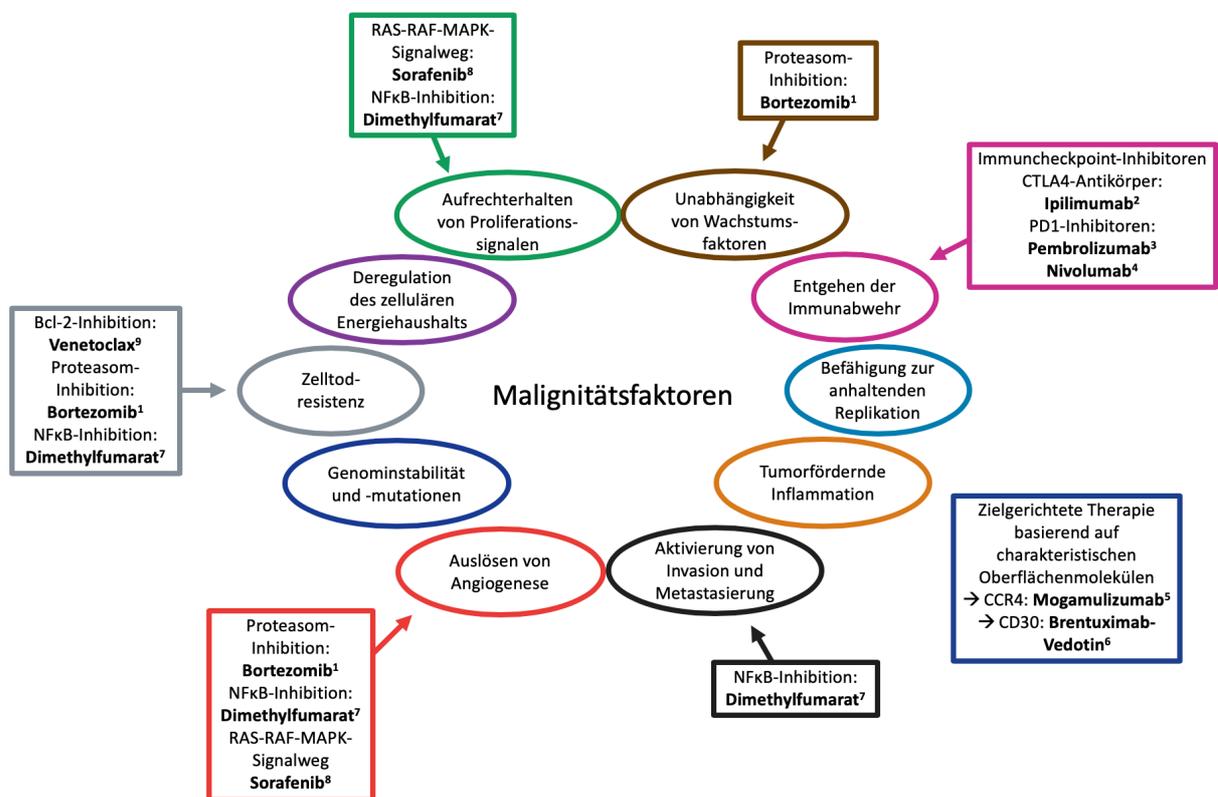


Abbildung 1: Beispiele neuer therapeutischer Zielstrukturen bei CTCL in Bezug auf die „hallmarks of cancer“, angelehnt an Hanahan und Weinberg, 2011⁴⁴

¹⁾Tan et al. 2018⁴⁷, ²⁾Sekulic et al. 2015⁵⁰, ³⁾Khodadoust et al. 2019⁵¹, ⁴⁾Lesokhin et al. 2016⁵², ⁵⁾Kim et al. 2018⁴⁰, ⁶⁾Prince et al. 2017³⁹, ⁷⁾Nicolay et al. 2016⁷⁸, ⁸⁾Willhelm et al. 2004⁵³, Kießling, Nicolay et al. 2017⁵⁵, ⁹⁾Fröhlich et al. 2019¹⁰²

Im Folgenden sollen einige Beispiele der jüngsten Bemühungen zu neuen Therapieoptionen beim CTCL vorgestellt werden. Viele dieser Substanzen, die sich als geeignet für den Einsatz bei CTCL herauskristallisiert haben, können nicht nur als

Einzeltherapeutikum, sondern auch in Kombinationsbehandlungen interessante Therapiebestandteile darstellen. Die Beziehungen der neuen Therapiemöglichkeiten zu einem oder mehreren „hallmarks of cancer“ werden in Abbildung 2 dargestellt.

Proteasom-Inhibition: Bortezomib

Der Proteasom-Komplex der Zelle reguliert Prozesse der Apoptose, des Zellzyklus, der Angiogenese und der Proliferation und spielt somit an mehreren Schlüsselementen der Tumorentstehung eine Rolle⁴⁷. Bortezomib wurde in anderen hämatologischen Erkrankungen bereits in der Kombinationsbehandlung erfolgreich eingesetzt⁴⁸. Erste klinische Studien untersuchen die Effektivität von Proteasom-Inhibitoren wie Bortezomib als therapeutische Option bei CTCL⁴⁹.

Immuncheckpoint-Inhibitoren: Ipilimumab, Pembrolizumab und Nivolumab

Viele bösartige Neoplasien nutzen Mechanismen, um der Immunkontrolle zu entkommen. In gesunden Zellen inhibiert das Protein CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4) die Zellproliferation und hat somit eine protektive Funktion. In CTCL konnte eine Fusion von CTLA4 und CD28 festgestellt werden, wodurch der proliferationshemmende Einfluss von CTLA4 aufgehoben wird, und das CTLA4-CD28-Fusionsprotein die Proliferation fördert. Aufgrund dieser Mutation kann der CTLA4-Antikörper Ipilimumab eine weitere Option bei der personalisierten CTCL-Behandlung darstellen, indem das Proliferationssignal durch CTLA4-CD28 blockiert wird.⁵⁰

Die Bindung zwischen dem Oberflächenprotein PD1 und dem PD1-Liganden bewirkt ein inhibitorisches Signal auf tumorbekämpfende T-Zellen. Der PD1-Ligand wird in einigen Tumorentitäten verstärkt gebildet um der Immunantwort gegen die malignen Zellen zu entgehen. PD1-Inhibitoren sollen diese Bindung verhindern und so die Immunabwehr gegen maligne Zellen reaktivieren. Erste Studien weisen auf das therapeutische Potenzial der PD1-Inhibitoren Pembrolizumab und Nivolumab hin.^{51,52}

RAS-RAF-MAPK-Signalweg-Inhibition: Sorafenib

Dass spezielle Mutationen CTCL für eine zielgerichtete Therapie sensibilisieren können, zeigt auch der Einsatz des Multi-Kinase-Inhibitors Sorafenib. Sorafenib inhibiert den RAS-RAF-MAPK-Signalweg, über den Angiogenese, Zellinvasion und -proliferation angestoßen werden kann und der bei hoher Aktivität die Tumorprogression fördert.⁵³ In einigen Studien zeigte Sorafenib bei unterschiedlichen

Tumorentitäten jedoch eine unzureichende Wirksamkeit. Beim CTCL konnte gezeigt werden, dass Sorafenib bei Veränderungen des NRAS-Gens, das einen wichtigen Baustein im RAS-RAF-MAPK-Signalweges darstellt, eine deutlich höhere Effektivität zeigt.^{54,55}

CCR4-Antikörper: Mogamulizumab

Neben therapeutischen Konzepten, die auf den klassischen Merkmalen maligner Prozesse beruhen, ist es im Rahmen einer zielgerichteten Therapie sinnvoll, Oberflächen-Merkmale zu nutzen, die auf den Tumorzellen vermehrt exprimiert werden. Der Oberflächen-Marker C-C Chemokinrezeptor 4 (CCR4) kommt bei CTCL häufig vor und ermöglicht therapeutischen Substanzen, die an diese Struktur binden, eine zielgerichtete Therapie einzuleiten. Durch den Einsatz des humanisierten monoklonalen Antikörpers gegen CCR4 Mogamulizumab konnte eine deutliche antikörper-vermittelte Zytotoxizität in CTCL-Zellen gezeigt werden, die sich besonders stark in leukämischen Varianten der CTCL zeigt.⁵⁶ In einer 2018 publizierte Phase III Studie zeigte sich in Patienten mit refraktärem oder rezidiviertem CTCL ein progressionsfreies Überleben von durchschnittlich 7,7 Monaten im Vergleich zu 3,1 Monaten in der mit Vorinostat behandelten Kontrollgruppe. Die Zulassung von Mogamulizumab in Deutschland erfolgte im Jahr 2018.⁴⁰

CD30-Antikörper gekoppelte Chemotherapie: Brentuximab Vedotin

Brentuximab Vedotin ist ein Konjugat aus dem gegen CD30 gerichteten Antikörper Brentuximab und dem Zytostatikum Monomethylauristatin E. Nach Kontakt mit dem häufig von CTCL-Zellen exprimierte Oberflächenmarker CD30 wird Brentuximab Vedotin über Endozytose aufgenommen und der Wirkstoff so gezielt in die CTCL-Zellen eingebracht.³⁹ 2017 konnte in einer Phase III Studie der vorteilhafte Effekt von Brentuximab Vedotin bei CTCL Patienten dargestellt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde Brentuximab Vedotin für CD30 positive CTCL in Europa Ende 2017 zugelassen.⁵⁷

Neue Therapiestrategien beruhen größtenteils auf genetischen Aberrationen, die zwar bei CTCL gehäuft vorkommen, jedoch bei jedem Patienten individuell ausgeprägt sein oder fehlen können. Daher basiert eine erfolgreiche Behandlungsstrategie im Sinne der personalisierten Medizin darauf, dass möglichst viele typische Expressionsmuster

und dazugehörige therapeutische Konzepte identifiziert und entwickelt werden, um für jeden Patienten eine effektive und nebenwirkungsarme Therapie zusammenstellen zu können. In den jüngsten Forschungsbestrebungen im Bereich der Tumorthherapie zeigte sich immer wieder, dass die Verwendung neuer Substanzen in einer Kombinationstherapie viele Vorteile mit sich bringt. Zum einen können mehrere Zielstrukturen gleichzeitig erfasst werden, wodurch synergistische Effekte ausgelöst werden können. Zum anderen können durch die Kombinationstherapie in vielen Fällen geringere Einzeldosen verwendet werden, was zu einer Reduktion der Auftretenswahrscheinlichkeit und des Ausmaßes von Nebenwirkungen führt.⁵⁵

Im Fokus dieser Arbeit steht die Zelltodresistenz der CTCL-Zellen und Veränderungen in der Genexpression, die zu charakteristischen Eigenschaften auf Proteinebene führen, welche als therapeutische Angriffspunkte für effektive neue Therapiemodelle dienen können. Hierzu soll im folgenden Kapitel die Apoptoseresistenz als wichtiger Malignitätsfaktor und die sich daraus ergebenden therapeutischen Überlegungen vorgestellt werden.

1.3 Zelltodresistenz als therapeutische Aufgabe bei CTCL

1.3.1 Apoptose-Signalwege und -resistenzen bei CTCL

Apoptose beschreibt den Vorgang eines programmierten Zelltodes. Er wird durch verschiedene Gene gesteuert und resultiert in der Aktivierung abbauender und steuernder Enzyme (proteolytische Enzyme und Caspasen). Hierdurch kommt es zu Membranveränderungen, einer Chromatin-Verdichtung, der Zellkernfragmentation und der Abnahme des Zellvolumens. Zellbestandteile werden kontrolliert abgebaut und von Phagozyten entfernt.⁵⁸ Zwei verschiedene Signalwege, die in einer gemeinsamen Endstrecke münden, können die Apoptose auslösen: Der extrinsische, Todesrezeptor-abhängige Signalweg, wird durch Rezeptoren der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie vermittelt. Bekannte Vertreter sind der Fas-Rezeptor/Fas-Ligand, sowie der CD95/CD95-Ligand.^{59,60} (Abbildung 3) Im Gegensatz dazu wird der intrinsische, mitochondriale Signalweg durch zelluläre Stressreaktionen ausgelöst, die z.B. aufgrund von Hypoxie, Strahlung, Infektionen oder DNA-Mutationen entstehen können. Dieser Prozess wird unter anderem durch Proteine der sogenannten Bcl-2-Familie gesteuert. Hierzu zählen auf der einen Seite pro-

apoptotische Moleküle wie Bad, Bim, Bid und HRK (BH3-only Proteine), die die Effektorproteine Bax und Bak aktivieren und zum anderen die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-XL, A1 und Mcl-1, welche pro-apoptotische Proteine binden und abbauen. Normalerweise sitzt Bak in der äußeren Mitochondrienmembran, während Bax im Zytosol der Zelle lokalisiert ist. Apoptotische Triggersignale führen zu der Insertion von Bax in die äußere Mitochondrienmembran, wodurch Bax und Bak Oligomere bilden können. Gemeinsam formen Bax und Bak Poren. Cytochrom c kann das Mitochondrium verlassen und seinerseits Caspasen aktivieren (die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7). Diese setzen verschiedene Apoptose-Prozesse um, wodurch die Zell-DNA zerlegt wird und die Zellbestandteile nach Fragmentation im Zellinneren nach und nach in Vesikeln abgeschnürt werden und so von Makrophagen aufgenommen werden können.^{61,62,63,64}

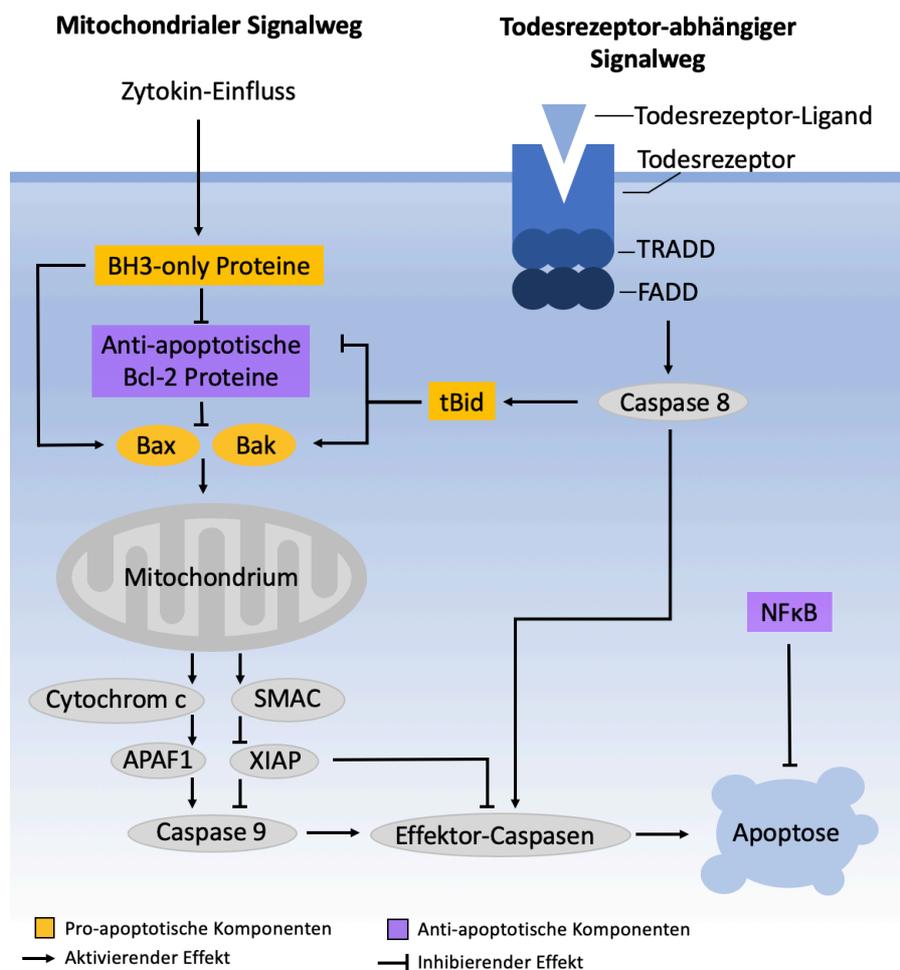


Abbildung 2: Signalwege der Apoptose mit pro- und anti-apoptotischen Komponenten. Angelehnt an Mihalyova, Jelinek et al. 2018⁸⁸
 TRADD: Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein, FADD: Fas-associated protein with death domain, SMAC, APAF1, XIAP: Proteine der Apoptosekaskade, tBID: truncated p15 BID

Diese Apoptosemechanismen spielen in CTCL insbesondere daher eine Rolle, da gezeigt werden konnte, dass die Malignität der CTCL-Zellen weniger auf einer gesteigerten Proliferationsrate, sondern eher auf einer Zelltodresistenz beruht^{11,65}. Mechanismen dieser Resistenz können verschiedene Punkte der Apoptose-Signalwege betreffen. Neben der Aktivierung des extrinsischen Signalweges, spielt insbesondere die Hochregulation anti-apoptotischer Moleküle wie Bcl-2 oder NF-κB eine Rolle^{66,67}.

1.3.2 NF-κB-Inhibition mittels Dimethylfumarat

NF-κB ist ein Transkriptionsfaktor, der eine zentrale Rolle in vielen Prozessen der Zelle einnimmt. Die vielfältigen

Regulationseinflüsse von NF-κB sind in Abbildung 3 dargestellt. Bei dem Großteil maligner Erkrankungen ist NF-κB konstitutiv aktiviert und stellt dadurch einen Progressionsfaktor dar.^{68,69,70} Die Rolle von NF-κB bei CTCL wurde bereits beschrieben und wird als

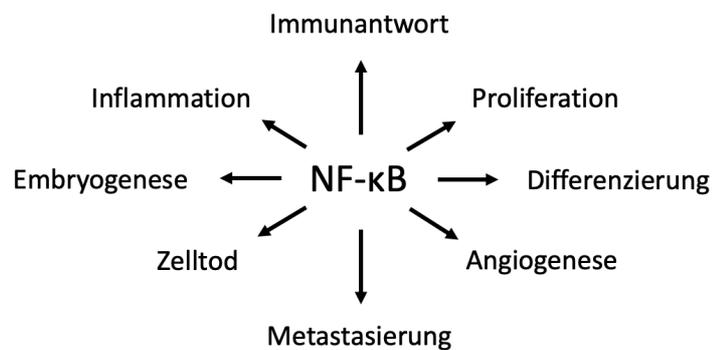


Abbildung 3: Regulationseinflüsse von NF-κB⁷¹

mitverantwortlich für die beobachtete Zelltodresistenz und die Proliferationsneigung angesehen⁷¹. Daher kristallisierte sich in den letzten Jahren NF-κB zunehmend als vielversprechende Zielstruktur in der Behandlung von CTCL heraus. Als ein Mechanismus der Zelltodauslösung durch NF-κB-Inhibition in CTCL konnte die Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) gefunden werden⁷². Verschiedene Substanzen wie Bortezomib, Kurkumin oder nicht-steroidale Antirheumatika wurden bereits in Studien bei CTCL eingesetzt, um den NF-κB-Signalweg in therapeutischer Intention zu inhibieren, wobei sich die Primärwirkung nicht auf NF-κB bezieht und die therapeutische Wirkung häufig nicht ausreichend war^{49,73,74}. Direkte NF-κB-Inhibitoren zeigten *in vitro* eine gute Wirksamkeit, die getesteten Substanzen kamen allerdings aufgrund starker Nebenwirkungen bisher nicht für den klinischen Einsatz in Frage^{72,75}.

Dimethylfumarat (DMF) gehört ebenfalls zu den direkten NF- κ B-Inhibitoren und wird in der Klinik bereits erfolgreich bei der Behandlung der Psoriasis und der Multiplen Sklerose eingesetzt. Die vielversprechende Wirkung in der Tumorthherapie wurde zunächst in Melanom- und Glioblastom-Zellen nachgewiesen.^{76,77}

2016 ist es gelungen, den vielversprechenden Effekt von DMF auf CTCL-Zellen zu zeigen⁷⁸. Es zeigte sich, dass DMF in CTCL-Zelllinien und primären CD4⁺ Zellen von CTCL Patienten und gesunden Probanden signifikant Zelltod auslösen kann und die durch NF- κ B stimulierten Genprodukte durch die Behandlung mit DMF deutlich weniger exprimiert wurden. Zudem wurden die behandelten Zellen in Hinblick auf den Mechanismus der Zelltodauslösung untersucht. Passend zu der Auslösung einer Apoptose konnte in den CTCL-Zellen eine deutliche Verminderung des mitochondrialen Membranpotenzials festgestellt werden, welche im Zusammenhang mit einer erhöhten Permeabilität der Mitochondrienmembran und einer daraus resultierenden Cytochrom c Freisetzung steht.⁷⁹ Weiter stromabwärts in der Apoptosekaskade zeigte sich, dass in den Zellen, korrelierend mit dem Grad der Zelltodauslösung, eine Caspase 3-Spaltung und eine DNA Fragmentation stattfindet⁷⁸.

Neben der Analyse der NF- κ B-Inhibition *in vitro*, konnte erstmals der therapeutische Effekt von DMF in einem Xenograft-Mausmodell mit der CTCL Zelllinie HH *in vivo* dargestellt werden. In den Experimenten zeigte sich ein signifikanter Überlebensvorteil in der mit DMF behandelten Gruppe (70 % überlebende Tiere in der DMF Gruppe gegenüber 40 % überlebenden Tieren in der Kontrollgruppe an Tag 29 nach Behandlungsbeginn mit täglicher Gabe DMF oral). Des Weiteren konnte ein verzögertes Tumorwachstum und eine verringerte Häufigkeit von Organmetastasen festgestellt werden. Auch *in vivo* konnte eine erhöhte Apoptoseaktivität als vermuteter Mechanismus der Zelltodauslösung durch den Nachweis von gespaltener Caspase 3 gezeigt werden.⁷⁸

Mit der NF- κ B-Inhibition durch DMF wurde somit erstmals ein therapeutischer Ansatz vorgestellt, der sich auf die beobachtete Zelltodresistenz in CTCL-Zellen bezieht und *in vitro* und *in vivo* signifikant Zelltod auslösen konnte.

1.3.3 Bcl-2-Inhibition zur Lösung der Zelltodbremse

Neben dem NF- κ B-Signalweg als Faktor der beobachteten Zelltodresistenz in CTCL-Zellen, spielt der Bcl-2-Signalweg eine große Rolle in der Steuerung der Apoptose-Sensitivität der Zelle. Die Proteine der Bcl-2-Familie sind charakterisiert durch verschiedene „bcl-2 homology domains“ (BH). Neben Molekülen mit vielen unterschiedlichen BH-Domänen wie Bcl-2 und Bcl-XL, gibt es die „BH3-only“ Proteine, wie beispielsweise Bad und Bid, welche ausschließlich pro-apoptotische Funktionen aufweisen. In der Zelle binden pro-apoptotische Moleküle über die BH3-Bindungsstelle an Bcl-2, wodurch Bcl-2 inhibiert und der anti-apoptotische Effekt ausgeschaltet wird.^{62,64}

Bcl-2 beeinflusst als anti-apoptotisches Molekül einen Großteil der hämatologisch-onkologischen Neoplasien. Während zunächst angenommen wurde, dass Bcl-2 als Onkogen Zellwachstum und -proliferation steigert, konnte Bcl-2 im Verlauf als „Überlebenssignal“ der Zelle charakterisiert werden. Als solches fungiert Bcl-2 als Zelltodbremse in malignen Zellen, wodurch die Zelle widerstandsfähiger gegenüber Zelltodsignalen des Immunsystems und therapeutischer Substanzen wird.^{80,81} Dass die Bcl-2 Überexpression auch in CTCL eine Rolle spielt, konnte bereits 1995 von Dummer et al. beschrieben werden⁸².

Dieser Mechanismus wurde genutzt, um eine Reihe von BH3-Mimetika zu entwickeln, die Bcl-2 und ähnliche Moleküle der Zelle inaktivieren⁸³. Das erste BH3-Mimetikum, das zu diesem Zweck entwickelt wurde, war ABT-737. ABT-737 bindet an Bcl-XL, Bcl-2, und Bcl-w und zeigte eine starke Apoptose-Auslösung in Tumoren. Mechanistische Experimente haben gezeigt, dass ABT-737 nicht aktiv Apoptose auslöst, sondern vielmehr die Zelle gegenüber Zelltod-auslösenden Signalen sensibilisierte und somit die Zelltodbremse löste.⁸⁴ Als nächste Generation der BH3-Mimetika wurde ABT-263 (Navitoclax) entwickelt, da ABT-737 eine zu geringe Löslichkeit und unzureichende Bioverfügbarkeit aufweist, um in der Klinik angewendet werden zu können. ABT-263 konnte in lymphatischen Malignomen zwar starke Effekte bezüglich der Apoptose-Auslösung zeigen, induzierte allerdings als relevante und limitierende Nebenwirkung in klinischen Studien einen starken Abfall der Thrombozyten.⁸⁵ 2013 wurde ABT-199 (Venetoclax) beschrieben, ein BH3-Mimetikum, das selektiv Bcl-2 inhibiert und nicht mehr den starken Thrombozyten-Abfall wie unter ABT-263 zeigt, da es eine geringfügig andere Struktur aufweist, die eine Bindung an Bcl-XL verhindert, welche

für die Thrombozytopenie verantwortlich ist^{86,87}. Aktuell steht ABT-199 im Mittelpunkt der Forschung zur Bcl-2-Inhibition bei malignen Erkrankungen. ABT-199 wurde 2016 erstmals als Monotherapie für spezielle Unterformen der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) zugelassen.⁸⁸ In klinischen Studien zeigte sich bei CLL-Patienten ein gut kontrollierbares Nebenwirkungsprofil bei sehr guten Ansprechraten. Zu den Nebenwirkungen gehörten in dieser Studie Diarrhoen (52%), respiratorische Atemwegsinfekte (48%), Übelkeit (47%) und Neutropenie (41%)⁸⁹. Phase-I-Studien mit ABT-199 wurden inzwischen bei weiteren hämatologischen Neoplasien wie verschiedenen Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) oder dem Multiplen Myelom durchgeführt. Auch hier zeigten sich ein tolerables Nebenwirkungsprofil und insbesondere bei speziellen Risikokonstellationen gute therapeutische Effekte.^{88,90,91} Bei einigen Krankheitsentitäten wie z.B. dem follikulären Lymphom oder dem diffus-großzelligen B-Zell-Lymphom konnte ABT-199 in der Monotherapie jedoch nur unzureichende Effekte erzielen, weswegen ABT-199 inzwischen häufig als potentieller Bestandteil von Kombinationstherapien untersucht wird^{48,88,90,92}.

In CTCL wurde insbesondere in leukämischen und fortgeschrittenen Tumorstadien sowohl eine Bcl-2-Überexpression entdeckt, als auch verschiedene Mutationen, die mit der Expression von Bcl-2 in Zusammenhang stehen^{93,94,95}. Dazu gehören STAT3-Amplifikationen, STAT5B-Amplifikationen, P53-Deletionen und CTLA4-Deletionen^{24,96,97,98}. 2017 wurden Bcl-2-Inhibitoren erstmals *in vitro* bei CTCL eingesetzt. Hier konnte in isolierten Zellen von CTCL-Patienten insbesondere bei fortgeschrittenen Tumorstadien ein signifikantes Ansprechen auf ABT-199 beobachtet werden, während untersuchte CTCL-Zelllinien eine wesentlich schwächere Apoptose-Auslösung zeigten. Zudem wurde ein Zusammenhang zwischen der Bcl-2-Expression der Zellen und den Ansprechraten auf ABT-199 beobachtet. Neben dem alleinigen Einsatz von ABT-199 untersuchte diese Studie die Kombinationstherapie des Bcl-2-Inhibitors mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren. Hier konnten synergistische Effekte der beiden Substanzklassen in den malignen Zellen von Patienten nachgewiesen werden, die bei CTCL-Zelllinien jedoch nicht beobachtet wurden.⁹⁹ Auch wenn die ersten Daten Hinweise auf eine erfolgreiche Apoptoseauslösung durch den Bcl-2-Inhibitor ABT-199 in verschiedenen hämatologischen Neoplasien liefern, ist Bcl-2 als Vermittler der Zelltodresistenz in CTCL bisher kaum explizit untersucht worden. Daher ist es essentiell, dass die genauen Wirkmechanismen und der Nutzen von Bcl-2-Inhibitoren in CTCL tiefergehend erforscht werden.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Trotz vielfältiger wissenschaftlicher Bemühungen sind die therapeutischen Möglichkeiten bei CTCL nach wie vor begrenzt. Da es aktuell keinen regelhaft einsetzbaren kurativen Therapieansatz gibt und viele CTCL Resistenzen gegenüber eingesetzten Substanzen zeigen, werden neuartige Therapiestrategien benötigt, die klinisch verträglich sind und den Krankheitsverlauf besser kontrollieren.

Als ein elementarer Malignitätsfaktor der CTCL hat sich die Zelltodresistenz der malignen Zellen herausgestellt. Ein erster erfolgreicher Ansatz, diese Resistenz in der Therapie CTCL zu unterbinden, war die effektive Zelltodauslösung mit dem NF- κ B-Inhibitor DMF. Bcl-2 beeinflusst maßgeblich die Sensitivität einer Zelle gegenüber Apoptosesignalen. Inhibitoren dieses Proteins zeigten in ersten Studien vielversprechende Ergebnisse in anderen hämatologischen Neoplasien. In der vorliegenden Arbeit wurde daher neben NF- κ B der Bcl-2-Signalweg als potenzielle neue therapeutische Zielstruktur für CTCL untersucht. Dabei wurden Bcl-2-Inhibitoren sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit DMF eingesetzt. Es wurden sowohl die Auswirkungen der Behandlung untersucht, als auch die Mechanismen der Zelltodauslösung beleuchtet.

Zusammenfassend standen im Fokus der Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Können Bcl-2-Inhibitoren in CTCL-Zellen *in vitro* und *in vivo* effektiv und spezifisch Apoptose auslösen?
2. Kann durch die Kombination von Bcl-2-Inhibitoren und DMF als NF- κ B-Inhibitor *in vitro* und *in vivo* ein synergistischer Effekt in der Zelltodauslösung erreicht werden?
3. Welche Mechanismen vermitteln die Zelltodauslösung von Bcl-2-Inhibitoren in CTCL?
4. Welche zusätzlichen therapeutischen Effekte der CTCL-Zelltodauslösung können durch Bcl-2-Inhibitoren im Tiermodell ausgelöst werden?

1.5 Studiendesign

Der Aufbau der vorliegenden Arbeit wird in Abbildung 4 zusammengefasst. Dargestellt sind die Analysen der Zelltodauslösung durch Bcl-2- und NF- κ B-Inhibition, sowie die angeschlossenen mechanistischen Experimente. Es wurden sowohl Zelltodanalysen *in vitro* durchgeführt, als auch ein Xenograft Mausmodell etabliert und die Effekte der Inhibition von Bcl-2 und NF- κ B *in vivo* untersucht.

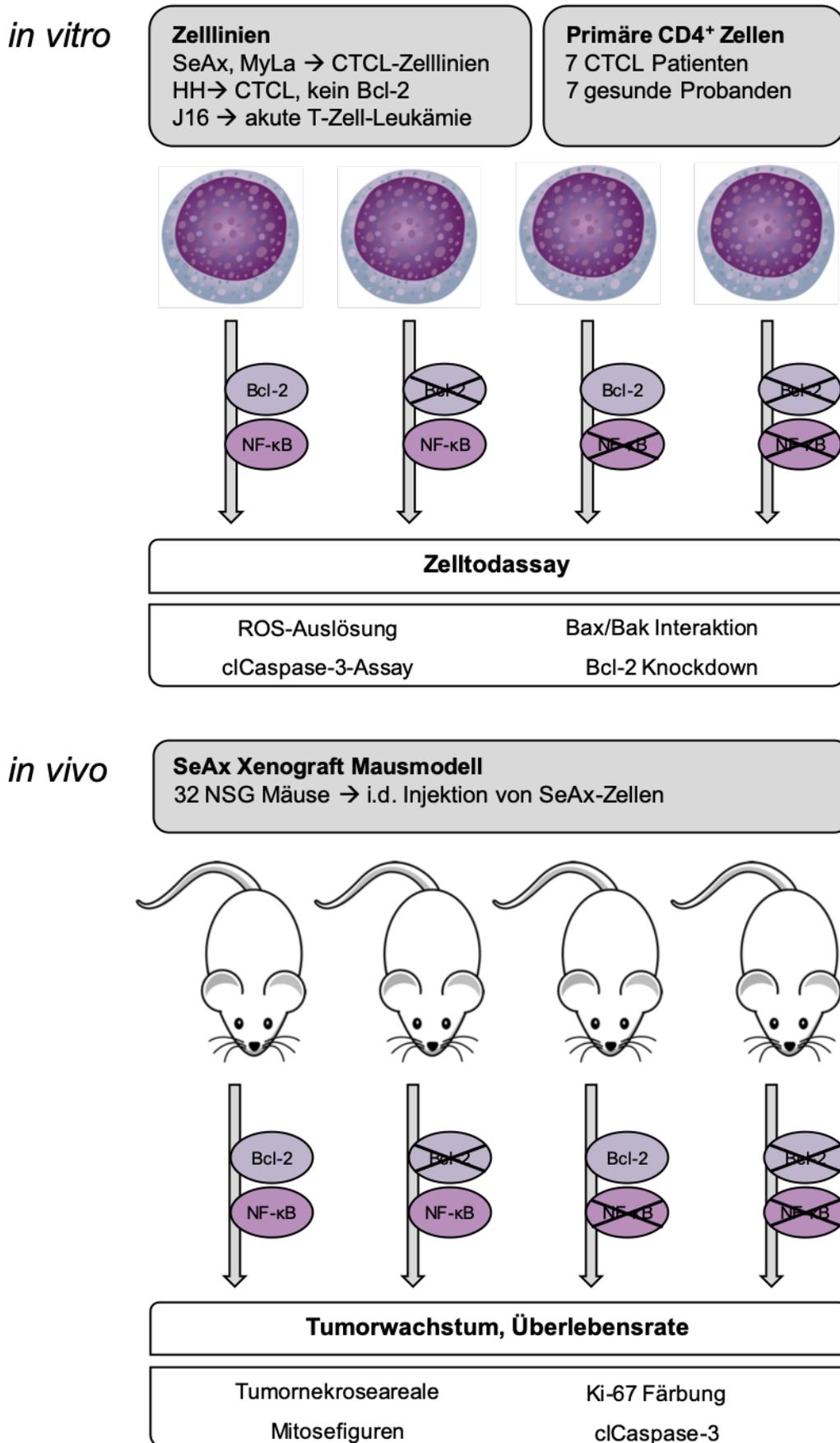


Abbildung 4: Schematisches Studiendesign der Arbeit.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller, Sitz
Desinfektionsmittel	Biocidal ZF™, WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach, Deutschland antifect® N liquid, schülke, Norderstedt, Deutschland
Einfrier-Röhrchen	Cryo.s™, 2 ml, Round Bottom, Starfoot Base, greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Einmalpipetten	Transferpipette 1ml #86.1170, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
FACS-Röhrchen	Corning™ Falcon™ Round-Bottom Polystyrene Tubes #14-959-6, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Filter-Papier	Whatman® cellulose chromatography papers, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Handschuhe	Semperguard® Nitrile Xtra lite powder-free, sempermed (Semperit AG Holding), Wien, Österreich
Heparin-Röhrchen	S-Monovette® 7.5ml LH, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kulturflaschen	CELLSTAR® Filter Cap Cell Culture Flasks #82050-856, greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Membran für Western Blots	Immun-Blot® PVDF Membrane, Roll, 26 cm x 3.3 m #1620177, Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Parafilm	PARAFILM®, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten

Pipettenspitzen	Falcon™ Disposable Polystyrene Serological Pipets, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Separations-Filter	Pre-Separation Filters (30 µm), Militenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Separations-Säulen	LS-Columns, Militenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Titrierplatten	CELLSTAR® Cell Culture Multiwell Plates, greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Zentrifugen-Röhrchen (Falcon-Tubes)	Tube, 15 ml und 30 ml, PP, Screw Cap, greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich

2.1.2 Geräte

Bezeichnung	Hersteller, Sitz
Absaugpumpe	BVC control, vacuubrand, Wertheim, Deutschland
Analysewaage	Entris® Präzisionswaage, sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav	5075 ELV, Tuttnauer, Breda, Niederlande
Blotting Gerät	Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Durchflusszytometer	BD FACSCanto II, BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten
Einfrierbox	Nalgene Mr. Frosty™ Gefrierbehälter, ThermoFisher scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Fluoreszenzgerät	Infinite® 200 Pro NanoQuant, Tecan, Männedorf, Schweiz
Fotogerät für Western Blots	ChemoStar Elektrochemilumineszenz und Fluoreszenz Imager, Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland

Gelelektrophorese Gerät	Multigel-Long 846-010 - 330 und Zubehör, Analytik Jena Biometra, Jena, Deutschland
Große Zentrifuge	Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heizblock	Eppendorf ThermoMixer® C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland® C, Hamburg, Deutschland
Kleine Zentrifuge	Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Konfokalmikroskop	LSM710, Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Lichtmikroskop	Leica DM IL, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Magnetwand	QuadroMACS Separator, Militenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mini-Zentrifuge	VWR® Mini Centrifuge, VWR International, Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten
Schüttler	Polymax 1040, Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Werkbank der Klasse II HeraSafe™ KS12, ThermoFisher scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Vortex-Schüttler	Vortex-Schüttler, VWR International, Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten
Wasserbad	TW8 Wasserbad, Julabo, Seelbach, Deutschland
Zellzählgerät	TC20™ Automated Cell Counter, Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten

2.1.3 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller, Sitz
Anti-Bak	Bak-Antikörper, Kaninchen, IgG, ab69404, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-Bax	Bax-Antikörper, Kaninchen, IgG, ab53154, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

Anti-Bcl-2	Bcl-2 Antikörper (C-2), Maus, IgG, sc-7382, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, Vereinigte Staaten (Abbildung 9) Bcl-2 Antikörper, Kaninchen, IgG, SAB4500006, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten (Abbildung 7, 17, 19)
Anti-Bim	Bim Antikörper, Kaninchen, IgG, K.912.7, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Anti-Caspase 3	polyklonaler Antikörper gegen die komplette Form von Caspase 3, sowie das große Fragment der geschnittenen Caspase 3, Kaninchen, #9662, Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-cleaved Caspase 3	monoklonaler Antikörper gegen das große Fragment der geschnittenen Caspase 3, Kaninchen, #9661, Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-GAPDH	GAPDH Antikörper (FL-335), Kaninchen, IgG, sc-25778, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, Vereinigte Staaten
Anti-Kaninchen (sekundär)	Amersham ECL Kaninchen Antikörper, Esel, IgG, GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich
Anti-Ki-67	Novocastra Antikörper gegen Ki-67, Kaninchen, NCL-Ki-67p, Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Anti-Maus (sekundär)	Amersham ECL Maus Antikörper, Schaf, IgG, GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich
Anti-Mcl-1	Mcl-1 Antikörper, Maus, IgG, MA5-15236, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten

Anti-Cytochrom c Anti-Cytochrom c Antikörper, Maus, IgG, 556433, BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten

2.1.4 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller, Sitz
0.5 M Tris-Puffer	Stacking Gel Buffer for PAGE, 0.5 M Tris HCl, pH 6.8, Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
1.5 M Tris-Puffer	Resolving Gel Buffer for PAGE, 1.5 M Tris HCl, pH 8.8, Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
30% Acrylamid Mix	30% Acrylamide/Bis Solution, 29:1, Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
ABT-199	ABT-199, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, Vereinigte Staaten
ABT-263	ABT-263, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, Vereinigte Staaten
APS	Ammonium persulfate, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
BSA	BSA FRACTION V, Fitzgerald, Acton, Massachusetts, Vereinigte Staaten
CD4-Isolations-Kit	CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit, human, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Destilliertes Wasser	Ampuwa Sterilwasser, Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
DMF	Dimethyl fumarate, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
DMSO	Dimethyl sulfoxide, Hybri-Max™, sterile-filtered, BioReagent, suitable for hybridoma, ≥99.7%, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten

EDTA	UltraPure™ 0.5M EDTA, pH 8.0, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Eindeckmittel	Eukitt® Lösung, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
FACS Eichungs-Kit	Cytometer Setup & Tracking Beads, BD Bioscience, Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten
FCS	Fetal Bovine Serum, qualified, E.U.-approved, South America origin, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Ficoll	Biocoll, Biochrom, Berlin, Deutschland
H2DCF-DA	2',7'-Dichlorofluorescein diacetate, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Horseradish-peroxidase (HRP) Substratlösung	DAB/H ₂ O ₂ , Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Lämmli-Puffer	2x Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Luminol	Luminata Forte Western HRP substrate, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Medium	RPMI-1640 Medium with L-glutamine and sodium bicarbonate, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Milch	Milchpulver, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MMF	Monomethyl fumarate, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Molekulargewichts-Marker	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Mowiol	Mowiol® 4-88, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten

Natriumchlorid	Natriumchlorid BioChemica, Applichem, Darmstadt, Deutschland
Natriumdesoxychlorat	Natriumdesoxychlorat, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, Vereinigte Staaten
NP-40	Nonidet™ P 40 Substitute, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
PBS	DPBS, no calcium, no magnesium, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Penicillin-Streptomycin	Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL), Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Protein-Assay	DC™ Protein Assay Kit II, Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
RNAqueous™-Micro Kit	RNAqueous™-Micro Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
SDS	SDS / Natriumlaurylsulfat, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
siRNA gegen Bcl-2	FlexiTube GeneSolution GS596, Quiagen, Venlo, Niederlande
TEMED	TEMED - N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin, Genaxxon bioscience, Ulm, Deutschland
TGS-Puffer	10x Tris/Glycine/SDS, Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Trypan Blau Lösung	Trypan Blue solution 0.4%, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Tween-Puffer	TWEEN® 20, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2 aufgeführt. Bei allen verwendeten Zelllinien handelt es sich um nicht-adhärenente Suspensions-Zellen.

Tabelle 2: verwendete CTCL-Zelllinien

J16	akute T-Zell-Leukämie-Zelllinie aus dem peripheren Blut eines männlichen Patienten; ATCC® TIB-152™
SeAx	CTCL-Zelllinie, keine Details über Ursprung verfügbar, normale Bcl-2-Aktivität, moderate NF-κB-Aktivität, keine MAPK-Mutation; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Gniadecki (Bispebjerg Krankenhaus, Kopenhagen, Dänemark) und Dr. Kaltoft (Aarhus Universität, Aarhus, Dänemark)
MyLa	CTCL-Zelllinie aus dem peripherem Blut eines kaukasischen, männlichen Patienten; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Eichmüller (DKFZ Heidelberg, Deutschland)
HH	CTCL-Zelllinie aus dem peripheren Blut eines kaukasischen, männlichen Patienten; ATCC® CRL-2105™

2.2.2 Mediumswechsel

Alle Zelllinien wurden in Kulturmedium kultiviert, das aus kommerziell erworbenem RPMI Medium mit L-Glutamin- und Natriumbikarbonat-Zusatz sowie 10% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin hergestellt wurde. Die Suspensionen wurden alle 2-3 Tage gezählt und je nach Zellzahl mit frischem Medium verdünnt, sodass eine Konzentration von ca. 10^6 Zellen/ml bestand. Alle zwei Wochen fand ein vollständiger oder teilweiser Mediumswechsel statt. Dafür wurden die Suspensionen 5 min bei 100 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen mit frischem Medium in eine Kulturflasche überführt.

2.2.3 Kontamination und Fremdwuchs

2.2.3.1 Prävention von Kontaminationen

Zur Prävention von Kontaminationen der Zelllinien wurde unter möglichst sterilen Bedingungen gearbeitet. Die Hände wurden vor der Arbeit an der Zellkultur gewaschen

und desinfiziert, zudem wurden grundsätzlich Handschuhe getragen. Gearbeitet wurde an einer Sicherheitswerkbank, die vor und nach dem Arbeiten desinfiziert wurde. Um die Möglichkeit einer Kontamination weitestgehend auszuschließen, wurde zudem vor und nach dem Arbeiten in der Sterilbank in Abwesenheit von Kulturzellen ultraviolettes Licht der Wellenlänge 254 nm für 30 min eingesetzt. Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden entweder aus einer sterilen Verpackung entnommen oder vor Benutzung autoklaviert.

2.2.3.2 Erkennen von Kontaminationen

Um mögliche Kontaminationen der Zelllinien zu erkennen, wurden die Zellkulturen vor jedem Arbeiten lichtmikroskopisch untersucht. Zudem wurde in regelmäßigen Abständen, sowie vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen, eine standardisierte Testung auf Mycoplasmen mittels PCR durchgeführt. Zusätzlich wurde eine bakterielle oder mykotische Kontamination durch die Multiplexion GmbH (Friedrichshafen, Deutschland) ausgeschlossen.

Im Falle einer Kontamination wurden die Zellen verworfen und für weitere Experimente eine frühere Passage aufgetaut und getestet.

2.2.3.3 Testung des genetischen Fußabdrucks

Damit sichergestellt werden konnte, dass die Zelllinien ihre Charakteristik nicht im Laufe der Zeit durch Mutationen verändern, wurden die Zelllinien durch das Leibniz Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) genetisch getestet.

2.2.4 Einfrieren und Auftauen

Zum Einfrieren der Zellen wurde die Vitalität lichtmikroskopisch geprüft und die Dichte der Zellen ermittelt. Anschließend wurde ein Suspensionsvolumen, das 5×10^6 Zellen enthielt, 5 min bei $100 \times g$ zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 1000 μ l Einfriermedium, welches sich aus 90% FCS und 10% DMSO zusammensetzte, resuspendiert und in ein Kryo-Röhrchen überführt. Danach wurden die Röhrchen in einem Einfrierbehälter zunächst 24-48 Stunden bei -80°C und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte im 37°C warmen Wasserbad. Sofort im Anschluss wurde die Suspension in 10 ml auf 37°C vorgewärmtes Medium gegeben, vorsichtig resuspendiert und 5 min bei 100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frisches, 37°C warmes Medium überführt. In den folgenden Tagen wurden die Zellen täglich lichtmikroskopisch untersucht und je nach Zellzahl und Vitalität ein teilweiser oder vollständiger Mediumswechsel durchgeführt. Experimente wurden durchgeführt, sobald die Zellen in ihr typisches Wachstumsverhalten zurückgekehrt sind.

2.3 Probanden

2.3.1 Ethikvotum

Die Medizinisch Ethik-Kommission II der Medizinischen Fakultät Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg hat die eingereichten Unterlagen zum Forschungsvorhaben hinsichtlich ethischer und berufsrechtlicher Bedenken geprüft. Die Kommission erhob einstimmig keine Einwände gegen die Durchführung der Studie, sodass der Antrag am 20.06.2016 positiv beschieden wurde.

2.3.2 Patientenauswahl und Einwilligung

Für die Studie wurden sieben Patienten mit Sézary Syndrom ausgewählt, die nach der Klassifikation der ISCL und EORTC diagnostiziert wurden¹⁰. (siehe Kapitel 1.1.1) Als Kontrolle dienten Blutproben von gesunden Spendern mit normalen Blutwerten und ohne relevante Begleiterkrankungen. (n=7) Alle Patienten wurden über den Ablauf der Studie und die Verwendung ihrer Daten aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligung.

2.3.3 Isolation der CTCL-Zellen

2.3.3.1 Isolation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Bei einer Blutentnahme wurde den CTCL-Patienten und gesunden Probanden 70-100 ml Vollblut in Heparin-Röhrchen abgenommen. Anschließend wurde das heparinisierte Vollblut 1:1 mit PBS verdünnt. Für die Aufreinigung von CD4⁺ Zellen, in deren Fraktion sich bei erkrankten Patienten die Sézary-Zellen befinden, wurden zunächst die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells,

PBMC) isoliert. Hierfür wurden 30 ml Zentrifugen-Röhrchen mit jeweils 10 ml Biocoll-Trennlösung bestückt und darauf vorsichtig mit einer Einmalpipette das verdünnte Blut (15-20 ml pro Zentrifugen-Röhrchen) aufgetragen. Die Trennung erfolgte durch Zentrifugation bei 1200 x g für 20 min mit ausgeschalteter Zentrifugenbremse. Die Lymphozyten wurden in der Schicht zwischen Plasma und Trennlösung mit einer Einmalpipette in ein 15 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt und zweimal mit PBS gewaschen, indem die Röhrchen jeweils mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert wurden. Beim ersten Waschschrift wurde 10 min bei 300 g zentrifugiert, beim zweiten 10 min bei 200 g. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Zellpellets in 2 ml PBS resuspendiert. Die Zellzahlen der PBMC wurden mit einem Zellzählgerät ermittelt.¹⁰⁰

2.3.3.2 Isolation der CD4⁺ T-Zellen

Die Isolation der CD4⁺ Zellen aus den PBMC erfolgte mithilfe eines Isolations-Kits von Miltenyi Biotec. In dem Kit sind ein Isolations-Puffer, ein Biotin-Antikörper-Cocktail, zum Herausfiltern von nicht-CD4⁺ Zellen, sowie anti-Biotin-MicroBeads enthalten, welche die Voraussetzung für die Magnetseparation schaffen. Während der Separation wurde auf Eis gearbeitet, um eine unspezifische Antikörper-Bindung zu vermeiden. Vor der Auftrennung wurde die Zellsuspension durch einen Separations-Filter geführt, um Zellaggregate herauszufiltern. Damit das Kit richtig eingesetzt werden konnte, wurde sichergestellt, dass jede Probe zwischen 10⁷ und 10⁸ PBMC enthält, bei höheren Zellzahlen wurden die Zellen entsprechend aufgeteilt. Die Zellen wurden bei 300 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand komplett entfernt. Es wurden 40 µl Isolations-Puffer pro 10⁷ Zellen hinzugefügt und die Zellen resuspendiert. Anschließend wurden 10 µl des Biotin-Antikörper-Cocktails/10⁷ Zellen hinzugefügt und die Proben 10 min bei 4-8°C inkubiert. Dann wurden 30 µl Isolations-Puffer und 20 µl Anti-Biotin-MicroBeads/10⁷ Zellen hinzugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Proben weitere 15 min bei 4-8 °C inkubiert. Es folgte ein Waschschrift, indem die 10 bis 20-fache Menge des Probenvolumens an Isolationspuffer zugegeben wurde und die Mischung 10 min bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen wurde. Anschließend wurden die Zellpellets in jeweils 500 µl Isolationspuffer resuspendiert.

Für die Magnetseparation wurden an der Magnetwand entsprechend der Anzahl der Proben Separationssäulen installiert und diese mit jeweils 3 ml Isolations-Puffer

vorbereitet. Danach wurden die Proben auf die Säulen aufgetragen und die Säulen dreimal mit je 3 ml Isolations-Puffer gewaschen. Durch die Micro-Beads, die durch die Antikörper an nicht-CD4⁺ Zellen gebunden wurden, können nur die CD4⁺ Zellen die Säulen durchwandern und in Zentrifugen-Röhrchen aufgefangen werden. Die aufgefangenen Zellen wurden gezählt und für weitere Experimente in Zellkultur-Medium gegeben und im Kulturschrank aufbewahrt.

2.4 Zelltodassay

Zur Ermittlung der Zelltodraten nach Behandlung mit den eingesetzten Substanzen wurden die Zelllinien und isolierte Patientenzellen zunächst bei 37°C kultiviert bzw. primäre Zellen zeitnah nach Isolation verwendet. Es wurden 10³ Zellen in einem Volumen von 500 µl in einer 12-Well-Plate ausgesät. Die Stammlösungen der verwendeten Substanzen wurden entsprechend der gewünschten Zielkonzentrationen in DMSO verdünnt und jeweils in einem Volumen von 5 µl den Proben zugegeben. Zu den Kontrollproben wurden 5 µl DMSO pipettiert. Anschließend wurden die Platten bei 37°C kultiviert. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden die Zellen lichtmikroskopisch untersucht und 200 µl für die Messung mittels Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting, FACS) in FACS-Röhrchen transferiert. In allen Versuchsansätzen wurden Triplikate verwendet.

Der Durchflusszytometer wurde nach Herstellerangaben gestartet und kalibriert, sowie die empfohlenen Spülschritte vor Beginn der Messung durchgeführt. Die Proben wurden im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht gemessen, wobei die Zellpopulation mit vermindertem Signal im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, entsprechend einer Reduktion des Volumens und der Granularität, als nicht vitale Zellen interpretiert wurden. Die prozentuale Verteilung der Hauptpopulation und der Volumen- und Granularitäts-reduzierten Population wurde dokumentiert. Es wurden nur eingrenzbare Populationen gewertet und nur Experimente gewertet, in denen mindestens 85 % der Gesamtsignale in den eingegrenzten Bereichen lagen. Der spezifische Zelltod in Prozent wurde durch die Formel $\frac{(\% \text{ Zelltod} - \% \text{ spontaner Zelltod})}{(100 \% - \% \text{ spontaner Zelltod})} \times 100$ errechnet.

2.5 Western Blot

2.5.1 Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung

Zur Analyse der Proteincharakteristik der verwendeten Zellen wurden Proteinlysate hergestellt. Dafür wurde eine Zellsuspension mit $3-6 \times 10^6$ Zellen 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation für 10 min bei $500 \times g$ wurde der Überstand abgenommen und je nach erwarteter Zellzahl 100-200 μ l RIPA-Lyse-Puffer hinzugefügt. Der Ripa-Lyse-Puffer setzte sich zusammen aus 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Natriumdesoxychlorat, 0,1% SDS und 50 mM Tris-Puffer in destilliertem Wasser und wurde mit HCl auf einen pH von 8 eingestellt. Die Proben wurden mindestens 20 min auf Eis lysiert und anschließend 30 min bei $2000 \times g$ bei 4°C zentrifugiert. Vom Überstand wurden 10 μ l für die Konzentrationsbestimmung abgenommen und der restliche Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der DC™ Protein Assay mit dem unter Kapitel 2.1.4 aufgeführten Kit verwendet. Dazu wurden verschiedene Verdünnungen des Proteinstandards zwischen 0,2-1,5 mg/ml Protein angefertigt. Auf eine Titerplatte wurden 5 μ l jeder Proteinstandard-Verdünnung und Probe aufgetragen. Es wurden jeweils 25 μ l Reagenz A' hinzugefügt, welches sich aus 20 μ l Reagenz S pro Milliliter Reagenz A zusammensetzt. Anschließend wurden 200 μ l Reagenz B in jede Vertiefung gegeben und die Proben vorsichtig gemischt. Nach Inkubation unter Lichtabschirmung für 15 min wurden die Absorption der Proben bei 750 nm gemessen und die Proteinkonzentrationen in Bezug auf die Standard-Proben berechnet.

2.5.2 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden 12%ige Polyacrylamid-Gele hergestellt. Für das Separationsgel wurden je 10 ml 3,3 ml destilliertes Wasser, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl Puffer, 4,0 ml 30% Acrylamid Mix, 100 μ l 10% SDS, 100 μ l 10% APS und 4 μ l TEMED verwendet. Das 5 %ige Sammelgel setzte sich aus 2,7 ml destilliertem Wasser, 0,5 ml 1,0 M Tris-HCl Puffer, 0,67 ml 30% Acrylamid Mix, 40 μ l 10% SDS, 40 μ l 10% APS und 4 μ l TEMED je 4 ml zusammen. Der eingesetzte Kamm zum Einbringen der

Probenkammern wurde nach 30 min bei vollständiger Polymerisation des Gels entfernt.

Einem 30-50 µg Protein entsprechendem Volumen der Proben wurde dieselbe Menge 2x Lämmli-Puffer zugegeben und die Proben 5 min bei 95 °C denaturiert und gemeinsam mit dem Molekulargewichtsmarker auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 25-55 mA für 1-2 Stunden mit TGS-Puffer als Laufpuffer.

2.5.3 Immunoblotting und Detektion

Zur Übertragung auf die Membran wurde die Membran für 1 min mit Methanol aktiviert. Dann wurde auf eine Lage Filterpapier das Gel und die Membran sowie eine weitere Lage Filterpapier geschichtet und mögliche Luftblasen vorsichtig entfernt. Der Blotting-Schritt erfolgte bei 0,4 A und 35 V für 35 min.

Nach dem Blotting wurde die Membran in aus Milchpulver und PBS angerührte Milch gegeben und für eine Stunde fixiert. Der Primär-Antikörper wurde nach Herstellergaben zu der Membran in 50 % Milch und 50 % PBS über Nacht inkubiert. Danach folgten vier Waschschriffe je 3 min mit Tween-Puffer und zwei mit PBS. Der Sekundär-Antikörper wurde nach Herstellerangaben hinzugefügt und inkubiert und die oben genannten Waschschriffe wiederholt. Anschließend wurde die Membran 5 min in Luminol entwickelt und auf eine Folie transferiert. Die Detektion erfolgte mit einem ChemoStar®- Elektrochemilumineszenz und Fluoreszenz Fotogerät.

2.6 ROS-Bestimmung

Um das Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies als Zeichen für oxidativen Stress in den Zellansätzen mit und ohne Stimulation durch die verwendeten Inhibitoren zu messen, wurden 10 ml der Zellsuspension mit 10 µl einer 5 mM Lösung DCFH-DA versetzt. DCFH-DA ist ein Oxidations-sensitiver Farbstoff und wurde hier als Marker für das Auftreten von ROS verwendet⁷². Anschließend wurde der Versuchsansatz mit 500 µl je Probe pipettiert. (s. Kapitel 2.4) Nach 3 Stunden wurde zu jede Probe 500 µl eiskaltes PBS hinzugefügt, um die Reaktion zu beenden. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei 300 x g zentrifugiert und mit 500 µl PBS resuspendiert. Die

Auswertung der Signalstärke wurde mit dem Durchflusszytometer im PE-Kanal gemessen.

2.7 Bcl-2 Knockdown

Für den Bcl-2 Knockdown in den Zelllinien wurde das AMAXA® Cell Line Nucleofactor® Kit T (Lonza) verwendet. Es wurden zunächst aus einer logarithmisch wachsenden Kultur 4×10^6 Zellen ausgesät. Für die Trypsinierung wurden die Zellen zunächst für 10 min bei $300 \times g$ abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen ca. 5 min bei 37°C mit der Trypsinierungslösung (0,5 mg/ml Trypsin und 0,2 mg/ml EDTA in PBS) inkubiert. Um die Trypsinierung zu beenden, wurde Medium mit Zusätzen (vgl. Kapitel 2.2.2) hinzugegeben.

Für die Nucleofektion® wurde eine Titerplatte mit jeweils 1 ml vorgewärmten (37°C) Medium vorbereitet. Es wurden 1×10^9 trypsinisierte Zellen pro Ansatz bei $90 \times g$ für 10 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Danach wurden die Zellen in 100 μl Nucleofactor® Lösung resuspendiert. Die siRNA Stammlösung wurde aus vier siRNAs für Bcl-2 hergestellt und die Zellsuspension mit 2 μl der Lösung versetzt. Und in eine Küvette transferiert. Anschließend wurde die Nucleofektion® mit dem Programm X-001 des Amaxa Gerätes durchgeführt.

Nach Abschluss des Programms wurde die Zelllösung mit 500 μl vorgewärmten Medium gemischt und für entsprechend der jeweiligen Experimente weiterverwendet.

2.8 quantitative PCR

Die zelluläre RNA wurde mithilfe des RNAqueous™-Micro Kit isoliert und 5 μl RNA revers transkribiert. Die quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) wurde nach den Herstellerangaben des RNAqueous™-Micro Kits durchgeführt. Mit dem 7.500 Real-Time PCR System und der Sequence Detection Software Version 2.0.1 von Applied Biosystems wurde die Genexpression analysiert. Die relative Expression wurde durch die Ct-Werte (engl. *cycle threshold* für Schwellenwert-Zyklus) ermittelt und mit Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) oder Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgene normalisiert.

2.9 Proximity Ligation Assay

Die Darstellung von Protein-Protein-Oligomerisationen wurde durch einen Proximity Ligation Assay ermöglicht. Hierbei werden miteinander interagierende Proteine mit Primärantikörpern gekoppelt, anschließend zu Immunkomplexen konjugiert, über Adapter-Nukleotide markiert und letztendlich mittels Immunfluoreszenz detektiert. Abbildung 5 zeigt das Prinzip der Methode. Die in der Arbeit vorgestellten Proximity Ligation Assays wurden in Kooperation mit der Abteilung Immungenetik des DKFZ (Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurde das Duolink® PLA System von Sigma-Aldrich verwendet.

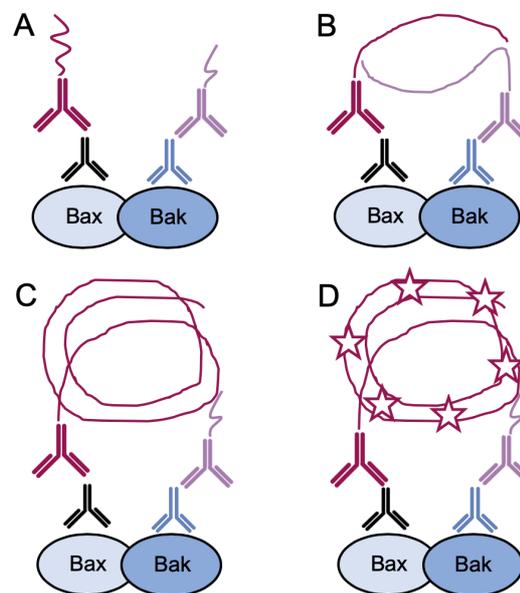


Abbildung 5: Prinzip des Proximity Ligation Assay am Beispiel der Oligomerisation von Bax und Bak: (A) Sondierungsantikörper mit gebundenen Oligonukleotiden binden an die gegen die Zielstrukturen gerichtete Antikörper. (B) Nach Zugabe einer Ligase bilden die Oligonukleotide einen Ring. (C) Amplifikation des Oligonukleotidrings mithilfe einer Polymerase. (D) Detektion der mit der Protein-Protein-Interaktion korrelierenden Fluoreszenz.

Zur Vorbereitung wurden die Zellen wie für die Zelltodassays (vgl. Kapitel 2.4) entsprechend der jeweiligen Konzentrationen von ABT-199 bzw. DMF für 24 Stunden behandelt und anschließend zunächst bei 500 x g abzentrifugiert. Um die Zellen zu fixieren, wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 500 µl PBS++ (bestehend aus PBS plus 1 mM MgCl₂ und 0,1 mM CaCl₂) und 62,5 µl Paraformaldehyd (16 %) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert, 5 min bei 500 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um die Zellpermeabilität zu steigern, damit intrazelluläre Antigen-Interaktionen detektiert werden können, wurde das Zellpellet in 500 µl PBST++ (500 ml PBS++ plus 500 µl

TritonX100) gelöst. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 min auf dem Schüttler. Nach Zentrifugation und Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen in 500 µl 50 mM NH₄Cl in PBS++ resuspendiert, 5 min inkubiert und anschließend zentrifugiert.

Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wurde das Zellpellet mit 100 µl einer Blockierlösung (1 % BSA in PBST++) resuspendiert und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 500 x g wurden die Primärantikörper zugegeben und der Ansatz über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Proben einmal mit PBST++ gewaschen und anschließend mit 500 µl PBST++ resuspendiert. Entsprechend der Herstellerangaben wurde die Sekundärantikörperlösung aufgetragen und die Proben in der Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Sondierlösung vorbereitet und nach zwei Waschschritten mit dem Waschpuffer A aufgetragen. Nach Inkubation für 1 Std. bei 37°C folgte der Ligierungsschritt. Dafür wurde der 5x Duolink® Ligierungspuffer mit destilliertem Wasser 1:5 verdünnt. Nachdem das Zellpellet erneut zweimal gewaschen wurde, (2x 5 min mit dem Waschpuffer A) wurde die Ligase zu dem Ligierungspuffer im Verhältnis 1:40 gegeben. Nach Auftragen des Ligierungspuffers wurden die Ansätze 30 min bei 37 °C inkubiert.

Für die Amplifikation wurde die Polymerase zu dem 1x Amplifikationspuffer in einem Verhältnis von 1:80 gegeben und nach zwei Waschschritten hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation für 100 min bei 37°C. Im letzten Waschschriff wurden alle Ausstriche für 1 min in dem 1x Waschpuffer B und 1 min in dem 0,01x Waschpuffer B gewaschen. Zuletzt erfolgte die Resuspension in der Einbett-Lösung Mowiol. Die Zellen wurden auf einen Objektträger pipettiert und ein Deckgläschen aufgelegt. Im nächsten Schritt wurde die Fluoreszenz mit einem Konfokalmikroskop (LSM710, Zeiss) detektiert.

2.10 Xenograft CTCL Mausmodell und Behandlung der Versuchstiere

2.10.1 NSG Mäuse

Das vorgestellte Mausmodell wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung Tumormodelle unter der Leitung von Frau PD Dr. Karin Müller-Decker durchgeführt. Für sämtliche Tierversuche wurden die Richtlinien des Regierungspräsidiums Karlsruhe (Lizenznummer G282/15) beachtet und eingehalten. Die Mäuse wurden in

einem 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus gehalten mit uneingeschränktem Zugang zu Futter (Zuchtfutter 3307, Kliba-Nafag, Kaiseraugst, Schweiz) und Wasser.

Für die Versuche wurden 6-7 Wochen alte weibliche NOD SCID gamma (NSG) Mäuse des Zentrums für präklinische Forschung des DKFZ verwendet. Bei diesen Mäusen wird ein nicht-fettleibig-diabetischer Typ (non-obese Diabetic, NOD) mit einer Mutation für einen schweren kombinierten Immundefekt (severe combined immunodeficiency, SCID) kombiniert. Zusätzlich fehlt diesen Mäusen die IL-2 Rezeptor gamma Kette, wodurch sich ein Defizit in der Zytokin-Reaktion ergibt. NSG Mäuse sind eine eingetragene Marke von immundefizienten Mäusen, denen reife T-Zellen, B-Zellen und natürliche Killerzellen fehlen. Jeder Versuchsgruppe wurden jeweils 8 Tiere zugeordnet.

2.10.2 Injektion von SeAx-Zellen

In Vorbereitung für das Xenograft Mausmodell wurden SeAx-Zellen aus einer logarithmisch wachsenden Zellkultur bei 485 x g für 10 min bei 20 °C zentrifugiert und zweimal in jeweils 50 ml PBS gewaschen. Alle Zellen wiesen vor Injektion *in vitro* eine Zelltoderate von < 5-10 % auf. Anschließend wurden die Zellen in der entsprechenden Konzentration in PBS suspendiert und maximal 1 Std. bis zur Injektion auf Eis bewahrt. Die Mäuse wurden mit einer Isofluran Inhalation anästhesiert (1-1,5 % in O₂, 0,5 l/min). Anschließend wurden 3x10⁶ SeAx-Zellen in 30 µl PBS/Matrigel® (1:1, Vol-%) intradermal (i.d.) in die rechte Flanke appliziert

2.10.3 Behandlung der Versuchstiere

Die Randomisierung der Versuchstiere in die Behandlungsgruppen erfolgte nach dem Erreichen einer tastbaren Tumorgroße (im Mittel 0,025 cm³). ABT-199 wurde in einer Trägerlösung mit 60 % Propylenglycol, 30 % Polyethylenglycol 400 und 10 % Ethanol mit einer Konzentration von 10 µg/µl gelöst. Es erfolgte die einmalige orale Gabe entsprechend der Versuchsgruppen von 10 µl/g Körpergewicht (KG) oder der Trägerlösung alleine. Diese Dosierung entsprach einer Konzentration von 100 mg Wirkstoff pro kg KG. Einen Tag später wurde DMF einmal täglich für 28 Tage intraperitoneal (i.p.) appliziert. Dazu wurde DMF mit einer Konzentration von 3 mg/ml in 20°C vorgewärmten PBS gelöst und 10 µl/g KG mit einer Dosierung von 30 mg/kg KG verabreicht. Als Kontrolle wurden 10 µl/g KG PBS injiziert.

2.10.4 Ende des Beobachtungszeitraumes und Auswertung

Die Tumoren wurden 2-3 Mal pro Woche mit einem Kaliper gemessen. Das Tumolvolumen wurde daraus mithilfe der Formel $V = \frac{\text{Länge (mm)} \times \text{Breite}^2 (\text{mm}^2)}{2}$ berechnet¹⁰¹. Sobald ein Durchmesser von 1,5 cm oder ein Abbruchkriterium der Gesellschaft für Versuchstierkunde (Society of Laboratory Animal Science; GV-SOLAS) erreicht wurde, wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Tumoren reseziert. Für die histologische Auswertung wurde die Leber und ein Viertel des Tumorgewebes in 4 % PBS-gepufferten Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden Schnitte von 5 µm für die Hämatoxylin/Eosin (HE) Färbung bzw. für die immunhistochemischen Analysen verwendet.

2.10.5 Histologische und immunhistochemische Färbungen

Für die Detektion von Ki-67 als Proliferationsmarker wurde das Gewebe für 20 min bei Siedetemperatur in 10 mM Natriumcitrat (pH 6,0) deparaffinisiert. Anschließend wurden die endogenen Peroxidasen in 3 % Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in PBS für 10 min und eine Stunde in 100 % Ziegen Serum bei Raumtemperatur blockiert. Die Inkubation des anti-Ki-67 Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C in einer 1:250 Lösung des anti-Ki-67 Antikörpers. Danach wurden die Schnitte mit einem entsprechenden Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelten Sekundärantikörper (1:200) für 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Detektion wurden die Schnitte dann mit einer HRP Substratlösung inkubiert.

Die Nuclei wurden mit Hämatoxylin für 1 min angefärbt. Die Festigung der Färbungen erfolgten mit dem Eindeckmittel Eukitt®.

Die Schnitte, die nicht mit einem Primärantikörper behandelt wurden, dienten als Negativkontrolle.

2.10.6 Mikroskopie

Zur mikroskopischen Auswertung der Schnitte wurden Nikon Objektivlinsen verwendet. Dabei kamen die Nikon Plan Apoλ 2x/0.1 und die Nikon Plan Apoλ 20x/0.75 Linse zum Einsatz. Die Mikroskopie erfolgte bei 22°C. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurde Phycoerythrin (PE, rot), Fluorescein-Isothiocyanat (FITC, grün) und 4,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI, blau) eingesetzt. Die Abbildungen der

mikroskopischen Auswertungen wurden mit einer Nikon DS-Fi2 Kamera und der Nikon DS-L3 Software erstellt.

Das Maß der Tumornekroseausdehnung wurde semiquantitativ dargestellt, indem je nach prozentualer Ausbreitung ein Punktwert zugeordnet wurde. (0-25% der Tumorfläche betroffen durch Nekrose → 0; 25-50 % der Tumorfläche betroffen durch Nekrose → 1; 50-75 % der Tumorfläche betroffen durch Nekrose → 2; 75-100 % der Tumorfläche betroffen durch Nekrose → 3)

2.11 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde ein zweiseitiger Test verwendet. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse gewertet, bei denen die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler der 1. Art p unter 0,05 lag. Für univariate Vergleiche wurde der Zweistichproben-T-Test oder der Mann-Whitney U Test je nach Eignung verwendet.

3 ERGEBNISSE

Vorwort

Teilergebnisse und mehrere Abbildungen der vorgestellten Ergebnisse wurden zuvor veröffentlicht in¹⁰²:

Froehlich TC, Müller-Decker K, Braun JD, Albrecht T, Schroeder A, Gülow K, Goerd S, Krammer PH, Nicolay JP: Combined inhibition of Bcl-2 and NFκB synergistically induces cell death and limits xenograft mouse tumor growth in CTCL. *Blood* 134: blood.2019001545, 2019

3.1 Zelltodauslösung in CTCL-Zelllinien und primären CTCL-Zellen durch Bcl-2-Inhibitoren

3.1.1 Zelllinien

Um das Ausmaß der Zelltodauslösung in CTCL-Zellen durch Bcl-2-Inhibition *in vitro* zu testen, wurden zunächst drei charakteristische Zelllinien mit den Bcl-2-Inhibitoren ABT-263 und ABT-199 behandelt. Dabei handelt es sich um die gut etablierte CTCL-Zelllinie SeAx, die durch eine Bcl-2-Expression charakterisiert ist, sowie um die Bcl-2-negative CTCL-Zelllinie HH. Zusätzlich wurden die Effekte auf die nicht-CTCL-Zelllinie J16 untersucht.

Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der BH-3-Mimetika inkubiert. Da in den Vorexperimenten eine höhere Potenz des Bcl-2-Inhibitors ABT-263 festgestellt werden konnte, wurde die Konzentration von ABT-199 bis 10.000 nM gesteigert, die von ABT-263 bis 1.000 nM. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Zelltodauslösung durchflusszytometrisch gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt.

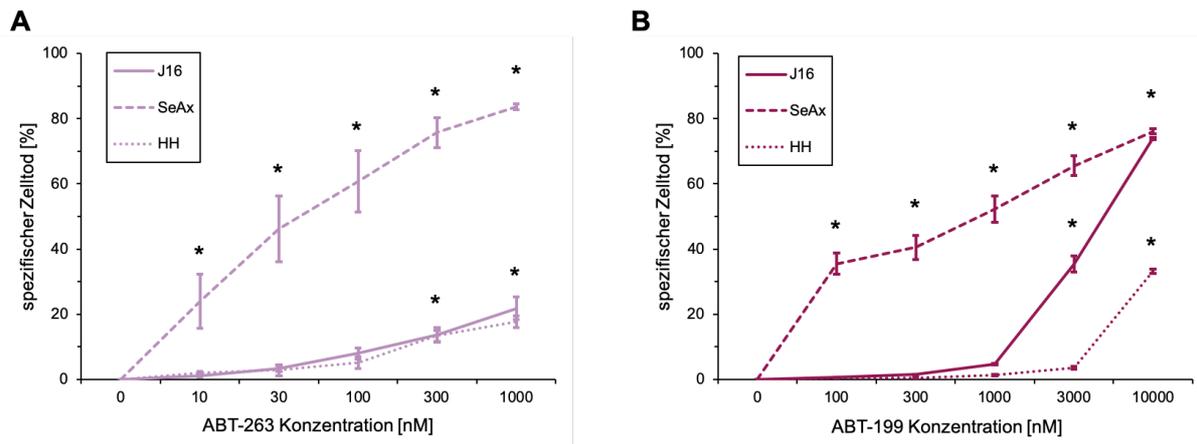


Abbildung 6: Spezifische Zelltodraten in den Zelllinien SeAx, J16 und HH durch unterschiedliche Konzentrationen der Bcl-2-Inhibitoren ABT-263 (A) und ABT-199 (B) (jeweils $n = 4$) nach 24 Stunden. Die Sternchen (*) markieren eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $< 0,05$ in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle. Die Fehlerindikatoren entsprechen der einfachen Standardabweichung. Eine modifizierte Version dieser Abbildung wurde zuvor publiziert¹⁰².

In der CTCL-Zelllinie SeAx zeigte sich eine hohe Zelltodrate von bis zu 83,7 % unter 1.000 nM ABT-263 und 76,1 % unter 10.000 nM ABT-199. Eine Zelltodauslösung von über 50 % der Zellen bestand bereits bei 100 nM ABT-263 bzw. 1.000 nM ABT-199. Im Gegensatz dazu stand eine deutlich schwächere Zelltodauslösung in der Nicht-CTCL-Zelllinie J16. Hier konnte unter der Maximaldosierung von 1.000 nM ABT-263 ein spezifischer Zelltod von lediglich 21,8 % ausgelöst werden, unter 10.000 nM ABT-199 wurde eine Zelltodrate von 73,9 % gemessen. Bei einer geringeren Konzentration von ABT-199 konnten in diesen Zellen im Vergleich zu den SeAx-Zellen keine Zelltodraten über 50 % ausgelöst werden. Beide Bcl-2-Inhibitoren zeigten in der Bcl-2-negativen Zelllinie HH eine sehr geringe Zelltodauslösung. Dies macht eine Spezifität der Zelltodauslösung in Bezug auf die Bcl-2-Aktivität wahrscheinlich.

Um die Korrelation zwischen der Zelltodauslösung und dem Bcl-2-Gehalt der Zellen genauer zu untersuchen, wurde zunächst die Bcl-2-Expression auf mRNA-Ebene mithilfe einer quantitativen RT-PCR untersucht. (Abbildung 7) Hier zeigt sich gegenüber der Zelllinie J16 keine veränderte Bcl-2-Expression der CTCL-Linie SeAx, sowie eine kaum vorhandene Bcl-2-mRNA Expression in den Zellen der HH-Linie. Folglich korrelierten höhere Level der Bcl-2-Expression mit einer stärkeren Zelltodauslösung durch BH3-Mimetika in den verwendeten Zelllinien.

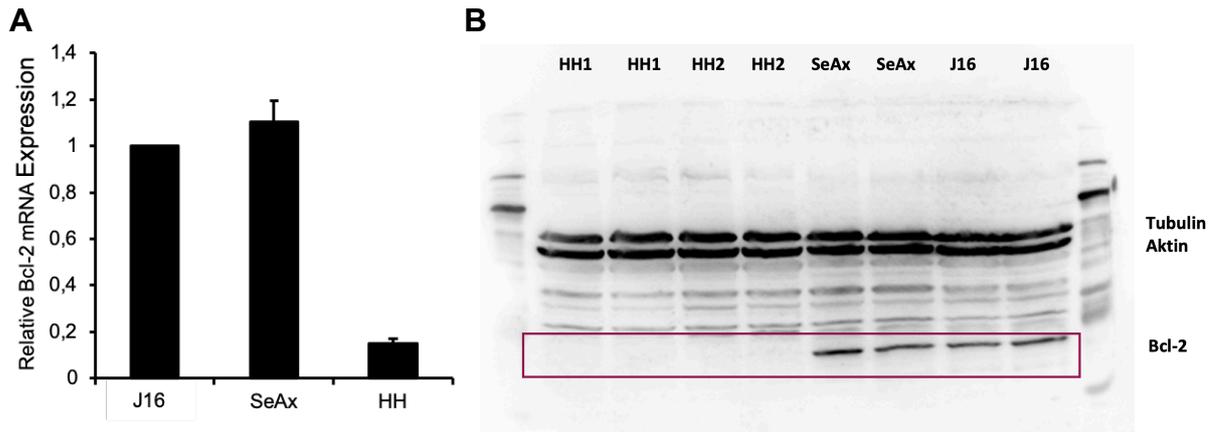


Abbildung 7: Quantifizierung des Bcl-2-Gehalts der Zelllinien. (A) Relative Expression von Bcl-2-mRNA in J16, SeAx- und HH-Zellen ermittelt durch eine qRT-PCR. Die Fehlerindikatoren entsprechen der einfachen Standardabweichung. (B) Repräsentativer Western Blot der Bcl-2 Expression auf Proteinebene in den verwendeten Zelllinien, darunter zwei verschiedene Proben der HH-Zelllinie. Tubulin und Aktin fungierten als Ladekontrollen. Eine modifizierte Version dieser Abbildung wurde zuvor publiziert¹⁰².

Im Anschluss wurden die Experimente mit der CTCL-Zelllinie MyLa unter denselben Bedingungen wiederholt, um den Effekt in einer weiteren Zelllinie zu verifizieren. Auch in diesen Zellen konnte eine gesteigerte Zelltodauslösung im Vergleich zu den Zelllinien J16 und HH beobachtet werden, was die bisherigen Ergebnisse unterstützt. (Abbildung 8) Die Zelltodraten blieben dabei jedoch insbesondere bei der Behandlung mit ABT-199 unter denen der SeAx-Reihe (13,6 % unter 1.000 nM ABT-199 im Vergleich zu 52,2 % in den SeAx-Zellen, sowie 35,6 % unter 100 nM ABT-263 im Vergleich zu 60,8 % in den SeAx-Zellen).

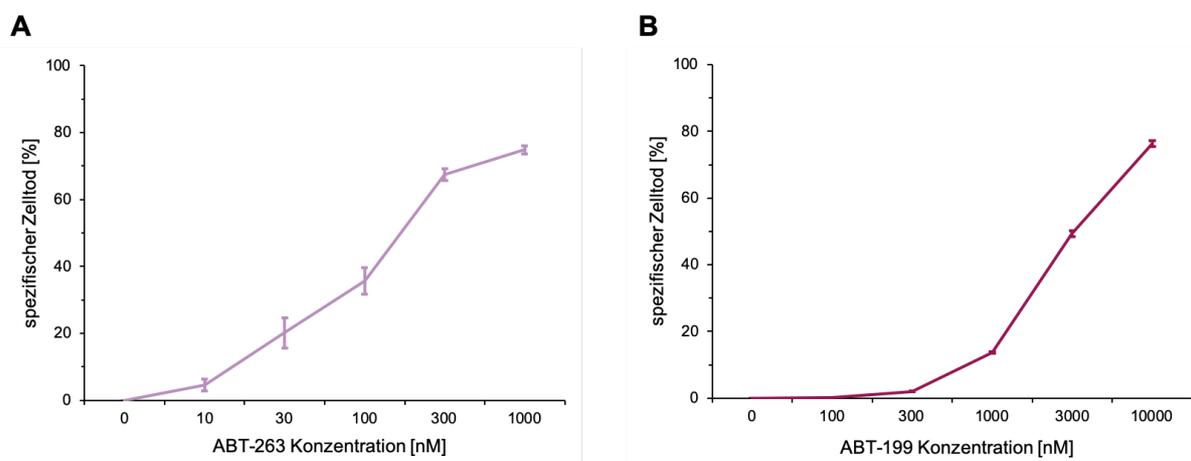


Abbildung 8: Zelltodauslösung in der CTCL-Zelllinie MyLa durch unterschiedliche Konzentrationen der Bcl-2-Inhibitoren ABT-263 (A) und ABT-199 (B) (jeweils n = 4) nach 24 Stunden. Die Fehlerindikatoren entsprechen der einfachen Standardabweichung. Eine modifizierte Version dieser Abbildung wurde zuvor publiziert¹⁰².

Um die Korrelation zwischen der Bcl-2 Expression und der Stärke der Zelltodauslösung auch für die Zelllinie MyLa zu ermitteln, führten wir eine erneute Western Blot Analyse zur Bestimmung des Bcl-2-Gehalts in allen vier Zelllinien durch.

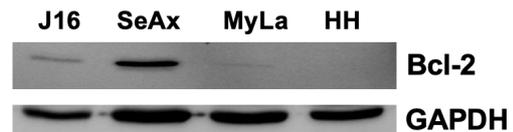


Abbildung 9: Repräsentativer Western Blot der Bcl-2 Expression in den Zelllinien J16, SeAx, MyLa und HH.

(Abbildung 9) In diesem Ansatz wurde ein monoklonaler Mausantikörper gegen Bcl-2 verwendet, während für die Abbildung 7B ein polyklonaler Kaninchenantikörper benutzt wurde. Es zeigte sich ein geringerer Bcl-2-Gehalt in den MyLa-Zellen als in SeAx, wodurch die schwächere Zelltodauslösung erklärt werden könnte. Die HH-Zelllinie zeigte als Negativkontrolle keine Bcl-2-Expression auf Proteinebene.

Die Ergebnisse der Zelltodassays und der Experimente zur Bcl-2-Expression der Zellen sprechen für eine spezifische Zelltodauslösung in den verwendeten Zelllinien in Abhängigkeit von der Entität (CTCL- vs. Nicht-CTCL-Zellen) und dem Bcl-2-Gehalt.

3.1.2 Primäre CD4⁺ Zellen

Um zu verifizieren, ob sich unsere Ergebnisse auch auf CTCL-Zellen von Patienten übertragen lassen, untersuchten wir die Wirksamkeit der Bcl-2-Inhibitoren auf primäre CD4⁺ Zellen von sieben CTCL-Patienten im Stadium IV ihrer Erkrankung, sowie von sieben gesunden Probanden. Eine Charakterisierung der Patienten ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Klinische und laborchemische Charakteristika von sieben CTCL-Patienten. Zur Stadieneinteilung wurde die EORTC-ISCL Klassifikation genutzt (T = Tumorstadium, N = Lymphknotenstaus, M = Metastasenstatus, B = Blutbeteiligung). M = männlich, W = weiblich, KÖF = Körperoberfläche, ECP = extrakorporale Photopherese, IFN = Interferon alpha, Bex = Bexaroten, MTX = Methotrexat; Eine modifizierte Version dieser Tabelle wurde zuvor publiziert¹⁰².

Patient	Geschlecht, Alter	TNM	Leukozyten /nl	T- Lymphozyten	CD4 ⁺ T- Zellen/ μ l	Sézary- Zellen/ μ l	CD4/CD8	% KÖF Beteiligung	Behandlung
1	W, 83	T4NxM0B2	17,58	96,0 %	6407	5578	122,6	100	ECP, IFN
2	M, 65	T4NxM0B2	6,8	91,7 %	1754	1366	8,9	80	ECP, Bex
3	M, 69	T4NxM0B2	9,76	95,9 %	3144	2889	12,1	100	ECP, IFN
4	M, 72	T4NxM0B2	12,37	91,9 %	4785	3674	19,2	90	ECP, IFN
5	M, 68	T4NxM0B2	11,08	86,3 %	3900	1881	82,1	80	ECP, IFN
6	M, 60	T4NxM0B2	10,82	97,4 %	3167	2843	331,7	80	ECP, MTX
7	W, 40	T4NxM0B2	12,33	19,7 %	501	2772	1,9	90	ECP, IFN
Norm			4,2 - 10,2	60 - 83 %	528 - 1495	<1000	1 - 2,8		

Die Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen der Bcl-2-Inhibitoren durchflusszytometrisch untersucht. In Abbildung 10 sind die spezifischen Zelltodraten der primären CD4⁺ Zellen der Patienten und gesunden Probanden dargestellt. Es zeigte sich eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Zelltodauslösung in den Zellen der CTCL-Patienten als in denen der gesunden Kontrollen. Unter Behandlung mit der maximal eingesetzten Dosierung von 1.000 nM zeigte sich in den Patientenzellen eine Zelltodauslösung von 12,7 % gegenüber 3,6 % in den Zellen der gesunden Probanden unter ABT-263 und 22,8 % in den Patientenzellen gegenüber 13,7 % in den Zellen der gesunden Probanden unter ABT-199.

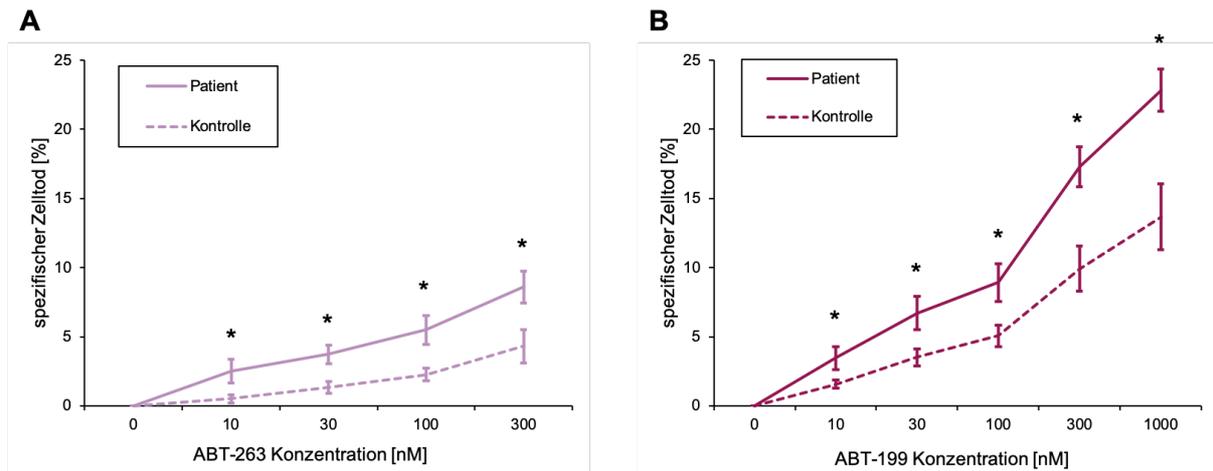


Abbildung 10: Zelltodauslösung in den CD4⁺ Zellen von 6 Sézary Syndrom Patienten und 6 gesunden Kontrollen durch unterschiedliche Konzentrationen der Bcl-2-Inhibitoren ABT-263 (A) und ABT-199 (B) nach 24 Stunden. Die Sternchen (*) markieren eine Fehlerwahrscheinlichkeit von < 0,05 in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle. Die Fehlerindikatoren entsprechen der einfachen Standardabweichung. Eine modifizierte Version dieser Abbildung wurde zuvor publiziert¹⁰².

Die unterschiedliche Potenz der Bcl-2-Inhibitoren, die in den Experimenten mit den Zelllinien beobachtet wurde, zeigte sich in den primären CD4⁺ Zellen nicht. Hier konnte sogar ein geringfügig stärkerer Effekt des Bcl-2-Inhibitors ABT-199 im Vergleich zu ABT-263 gezeigt werden.

Zusammenfassend zeigte sich *in vitro* eine signifikante und konzentrationsabhängige Zelltodauslösung durch Bcl-2-Inhibitoren, die mit dem Gehalt der Bcl-2-Expression korrelierte. Zusätzlich konnten in den Nicht-CTCL-Zellen der Zelllinie J16 und der gesunden Probanden deutlich geringere Zelltodraten beobachtet werden, die einen geringen Effekt auf die nicht betroffenen T-Zellen von Patienten bei einer möglichen Bcl-2-Inhibitor-Therapie vermuten lassen.

3.2 Synergistische Zelltodauslösung in CTCL-Zellen durch Kombinationsbehandlung mit Bcl-2-Inhibitoren und dem NF-κB-Inhibitor DMF

Wie in Kapitel 1.3 beschrieben existiert neben der Zelltodbremse durch Bcl-2-Überexpression der ebenfalls anti-apoptotisch wirksame NF-κB-Signalweg. Die Wirksamkeit des NF-κB-Inhibitors DMF zur Apoptoseauslösung in CTCL-Zellen konnte bereits zuvor nachgewiesen werden.⁷⁸ Um zu untersuchen, ob eine simultane Hemmung der beiden Signalwege eine additive oder sogar synergistische Zelltodauslösung *in vitro* auslösen kann, wurde in den Zelllinien und primären CD4⁺ Zellen die Zelltodauslösung der Kombinationsbehandlung gegenüber der Einzelbehandlung gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

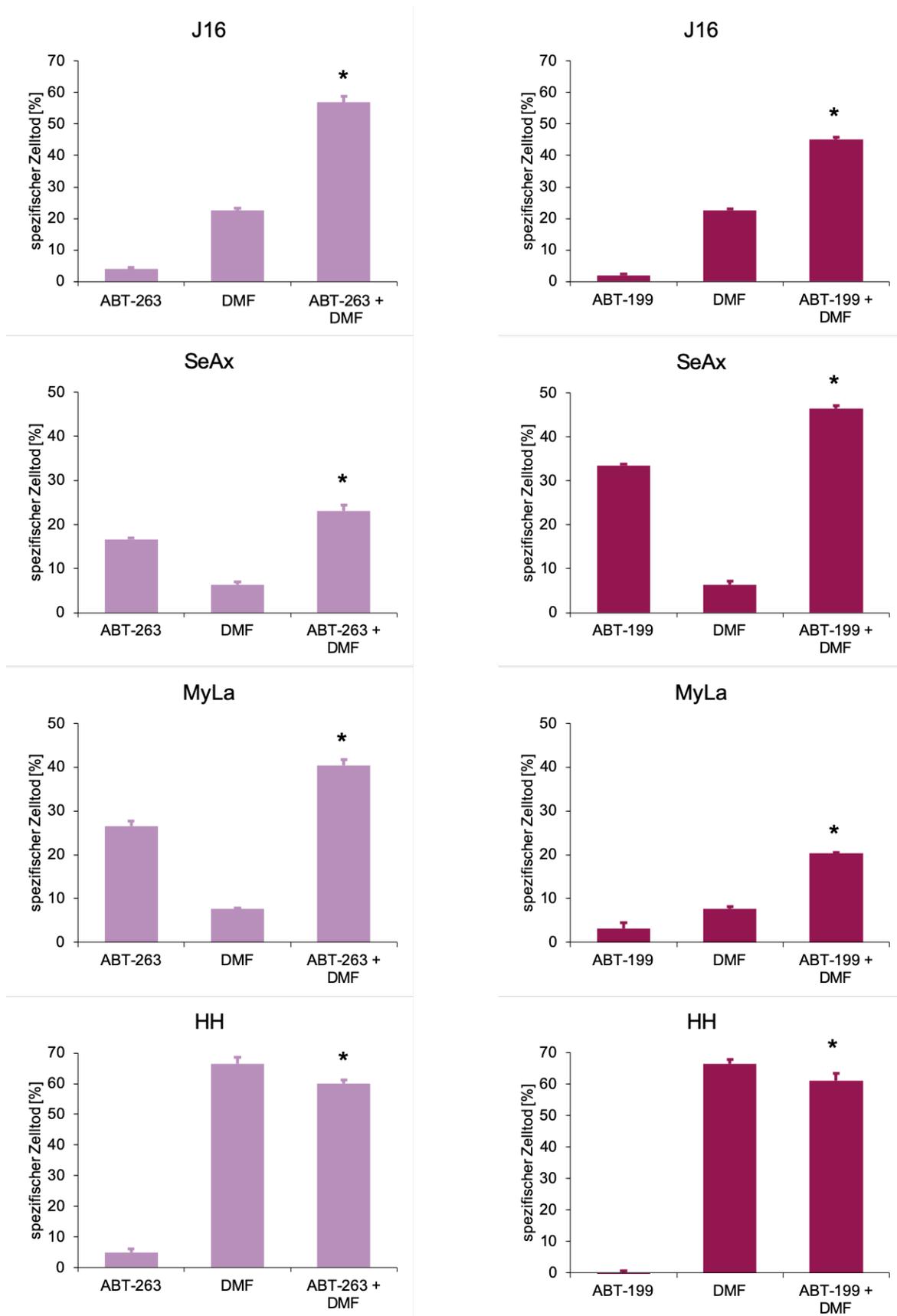


Abbildung 11: Zelltodauslösung in den Zelllinien SeAx, MyLa, J16 und HH unter Einzelbehandlung mit 100 nM der Bcl-2-Inhibitoren ABT-263 bzw. ABT-199 und 30 µM des NF-κB-Inhibitors DMF und der Kombinationsbehandlung mit einem Bcl-2-Inhibitor und DMF (n=4). Die Sternchen (*) markieren eine Fehlerwahrscheinlichkeit von < 0,05 in Bezug auf die Einzelbehandlung mit ABT-263 bzw. ABT-199. Die Fehlerindikatoren entsprechen der einfachen Standardabweichung. Eine modifizierte Version dieser Abbildung wurde zuvor publiziert¹⁰².

In den beiden untersuchten CTCL-Zelllinien SeAx und MyLa konnte ein additiver bis überadditiver Effekt in der Zelltodausrösung bei der Kombinationsbehandlung gezeigt werden. So gab es nach 24-stündiger Inkubation in der Zelllinie SeAx unter ABT-263 eine Zelltodausrösung von 23,0 %, welche in etwa der Summe der spezifischen Zelltodraten von ABT-263 (16,6 %) bzw. DMF (6,3 %) entspricht. Unter der Behandlung mit ABT-199 zeigt sich in den SeAx-Zellen ein überadditiver Effekt mit einer spezifischen Zelltodrate von 46,4 % gegenüber 39,7 % als Summe der Einzelbehandlungen (33,8 % unter ABT-199 plus 6,3 % unter DMF). In der Zelllinie MyLa konnten unter der Verwendung beider Generationen der Bcl-2-Inhibitoren synergistische Effekte gezeigt werden (40,3 % spezifischer Zelltod gegenüber der erwartbaren Summe von 34,2 % unter ABT-263 respektive 20,4 % spezifischer Zelltod gegenüber der erwartbaren Summe von 10,9 % unter ABT-199). Ein ähnlicher synergistischer Effekt war auch in den J16-Zellen zu beobachten. Während DMF ein ähnlich starkes Ansprechen in J16 wie in den CTCL-Zelllinien zeigt, blieb die Zelltodrate durch die Einzelbehandlung mit den Bcl-2-Inhibitoren ähnlich wie in Abbildung 6 dargestellt geringer. Die Zelltodausrösung, die durch die Einzelbehandlung mit DMF in HH-Zellen ausgelöst werden konnte, konnte nicht durch die Kombinationsbehandlung mit den Bcl-2-Inhibitoren gesteigert werden.

Wir reproduzierten im Folgenden den Versuchsaufbau mit primären CD4⁺ Zellen von fünf Patienten mit Sézary Syndrom und fünf gesunden Probanden. (Abbildung 12) Auch in den Zellen der Sézary-Patienten zeigte sich ein signifikanter kooperativer Effekt der Kombinationsbehandlungen gegenüber den Einzelwirkstoffen. So löste die Kombinationsbehandlung von ABT-263 und DMF in den Patientenzellen in der Kombinationsbehandlung eine Zelltodrate von 15,1 % aus. Die Zelltodrate durch ABT-263 alleine lag bei 5,5 % und die von DMF 2,7 %. In der Kombinationsbehandlung mit dem Bcl-2-Inhibitor ABT-199 und DMF zeigte sich eine Zelltodausrösung von 20,4 % und 8,9 % (ABT-199) bzw. 1,3 % (DMF) in der Einzelbehandlung.

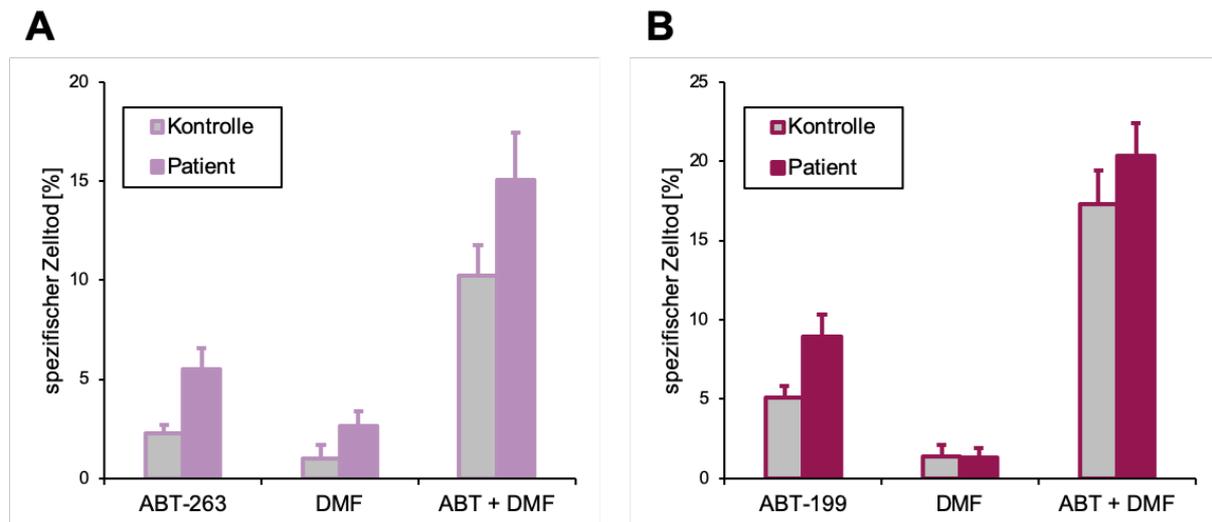


Abbildung 12: Zelltodauslösung in primären CD4⁺ Zellen von fünf Sézary Syndrom Patienten und fünf gesunden Kontrollprobanden unter Einzelbehandlung mit 100 nM der Bcl-2-Inhibitoren ABT-263 (A) bzw. ABT-199 (B) und 30 µM des NF-κB-Inhibitors DMF und der Kombinationsbehandlung mit dem jeweiligen Bcl-2-Inhibitor und DMF. Die Fehlerindikatoren entsprechen der einfachen Standardabweichung.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die Kombinationsbehandlung von Bcl-2-Inhibitoren und DMF bei CTCL-Zellen *in vitro* effektiv Zelltod auslösen konnte und die Kombinationsbehandlung hier eine deutlich gesteigerte Zelltodrate gegenüber der Behandlung mit den einzelnen Wirkstoffen erzielte.

3.3 Mechanistische Untersuchung der Zelltodauslösung durch Bcl-2-Inhibitoren und DMF

Um herauszufinden, ob es sich bei der Zelltodauslösung durch die verwendeten Substanzen um Apoptose oder um einen ungerichteten Zelltod handelt, und welche Mechanismen hieran beteiligt sind, führten wir Experimente zur Charakterisierung der Zelltodauslösung durch. Da aktuell zunehmend der Bcl-2-Inhibitor ABT-199 in den Fokus der Forschungsbemühungen steht, konzentrierten wir uns bei der Untersuchung der mechanistischen Vorgänge auf diesen Inhibitor. (vgl. Kapitel 1.3.3)

Frühere Daten zeigten, dass durch Inhibition von NF-κB verstärkt reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) in der Zelle gebildet werden. Diese führen über oxidativen Stress zu einer gesteigerten Zelltodauslösung, die vor allem über ungerichtete Zelltodmechanismen vermittelt wird, jedoch auch eine gesteigerte Apoptoserate auslöst. Im Vergleich zu herkömmlichen NF-κB-Inhibitoren, zeigte DMF

eine vorrangig spezifische Zelltosauslösung über Apoptose.⁷² Um zu untersuchen, ob eine erhöhte Bildung von ROS an der beobachteten Zelltodauslösung durch Bcl-2- und NF- κ B-Inhibition beteiligt ist, haben wir das Auftreten von ROS in den behandelten Zelllinien mittels eines DCFH-DA-Assays untersucht.

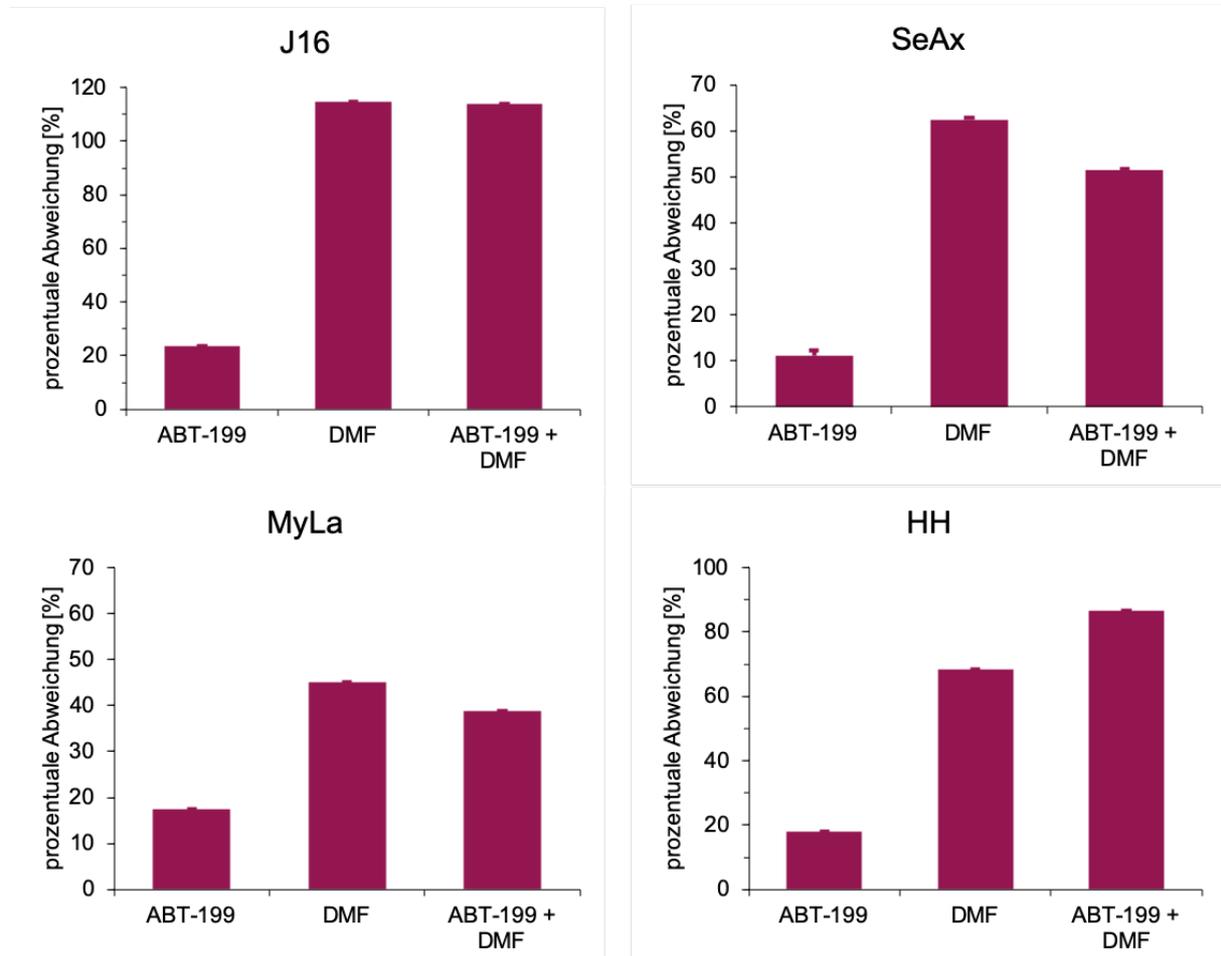


Abbildung 13: Auftreten von ROS entsprechend der DCFH-DA-Signale in mit 100 nM ABT-199, 50 μ M DMF oder beiden Wirkstoffen behandelten Zelllinien (n = 3). Dargestellt ist die prozentuale Abweichung der DCFH-DA Signale im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle. Die Fehlerindikatoren entsprechen der einfachen Standardabweichung.

Wie in Abbildung 13 dargestellt, zeigte sich durch die Inkubation der Zellen mit DMF eine statistisch signifikant gesteigerte Produktion von ROS (normalisiert gegenüber einer unbehandelten Kontrolle). Die Behandlung mit ABT-199 alleine zeigte im Vergleich zu DMF keine deutliche Bildung von ROS. Die Kombination der Wirkstoffe konnte ebenfalls keine wesentliche Steigerung des DCFH-DA Signals im Vergleich zur Einzelgabe von DMF zeigen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Bildung von ROS als Parameter für oxidativen Stress keinen vorrangigen Anteil an der Zelltodauslösung durch Bcl-2-Inhibition hatte.

Um diese Hypothese zu prüfen, untersuchten wir zunächst mittels einer Western Blot Analyse den Anteil der inaktiven Effektor-Caspase 3 (Caspase-3), sowie der aktivierten, „geschnittenen“ (engl. cleaved) Caspase 3 (clCaspase-3) in den Zelllinien SeAx und HH. Ein höherer intrazellulärer Anteil an der clCaspase-3 in Kombination mit einem verringerten Anteil an Caspase-3 erlaubt hier einen Rückschluss auf eine stattgefundene Aktivierung der Apoptose in der Zelle (vgl. Kapitel 1.3.1). Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Bcl-2-Inhibitors ABT-199, sowie mit DMF und der Kombination aus ABT-199 und DMF für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Proteinanalyse mittels Western Blot durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.

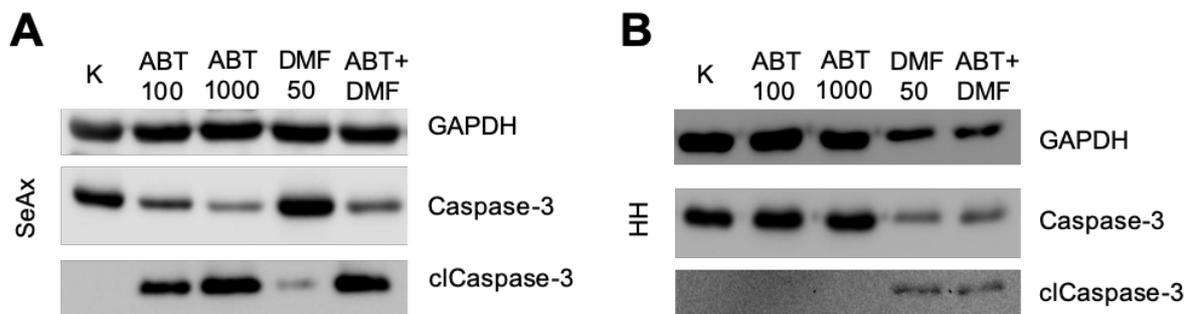


Abbildung 14: Repräsentativer Western Blot zur Detektion des Gehalts von Caspase-3 und clCaspase-3 in SeAx (A) und HH (B) Zellen nach Behandlung mit PBS als Kontrolle (K), 100 nM ABT-199, 1000 nM ABT-199, 50 μ M DMF und der Kombination aus 100 nM ABT-199 und 50 μ M DMF. Eine modifizierte Version dieser Abbildung wurde zuvor publiziert¹⁰².

In beiden Zelllinien zeigte sich eine gegenläufige Beziehung des Caspase-3 und clCaspase-3 Gehalts der Zellen. Dies spricht für die Aktivierung des Apoptose-Signalweges in den Zellen. In den SeAx-Zellen stieg der Anteil der clCaspase-3 mit der höheren ABT-199-Konzentration. Die DMF-Einzelbehandlung führte zu einem geringen Signal der clCaspase-3. Das stärkste Signal der clCaspase-3 zeigte sich bei der Kombinationsbehandlung von ABT-199 und DMF. Dies lässt vermuten, dass das Ausmaß der Apoptoseaktivierung in der Kombinationsbehandlung stärker war als in der alleinigen Behandlung mit ABT-199 oder DMF und korreliert mit unseren Beobachtungen in den Zelltodassays. (Abbildung 11) Nach der Behandlung der HH-Zellen zeigte sich keine Signalauslösung für die clCaspase-3 durch ABT-199. In den Zellen, die mit DMF alleine bzw. in Kombination mit ABT-199 behandelt wurden, zeigte sich kein Unterschied im Ausmaß des cl-Caspase-3-Signals.

Um zu verifizieren, ob es im Rahmen der Bcl-2-Inhibition zu einer verstärkten Interaktion von pro-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie kommt, führten wir in Kooperation mit der Abteilung Immungenetik des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) einen Proximity Ligation Assay (PLA) zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen durch, die im Rahmen des Apoptose-Signalweges auftreten (vgl. Kapitel 1.3.1).

Dazu ermittelten wir die Interaktion zwischen Bax und Bak in SeAx- und HH-Zellen nach Behandlung mit ABT-199, DMF bzw. der Kombination der Substanzen. Im Gegensatz zu der Caspase-3 Aktivierung steht die Bax/Bak Oligomerisation an einem frühen Schritt der Apoptosekaskade. Bcl-2 bindet diese Proteine an der Mitochondrienmembran und verhindert so die Interaktion zwischen den Proteinen Bax und Bak, sodass diese keine Poren in der Mitochondrienmembran bilden können, und die Freisetzung von Cytochrom c verhindert wird.^{62,63} In Abbildung 15 sind die Ergebnisse des PLA dargestellt. Zur Markierung der Zellkerne wurde die DNA mithilfe des blau fluoreszierenden Hoechst Farbstoffes angefärbt. Als Kontrolle wurde die Bax/Bak Signalstärke in der Bcl-2-negativen HH Zelllinie getestet.

Hier zeigte sich ein stärkeres grünes Fluoreszenzsignal in den mit ABT-199 behandelten SeAx-Zellen, welches eine verstärkte Bax/Bak Interaktion visualisiert. Im Gegensatz dazu löste DMF alleine keine signifikant gesteigerte Bax/Bak Oligomerisation aus.

Auch die Quantifizierung der Signalstärke der Bax/Bak Interaktion in SeAx-Zellen zeigte nur bei Einzel- oder Kombinationsbehandlung mit ABT-199 eine signifikant gesteigerte Oligomerisation. (Abbildung 16)

Im Einklang mit den bisherigen Ergebnissen konnte nachgewiesen werden, dass die Apoptoseauslösung durch die Bcl-2-Inhibition auf einer verstärkten Interaktion von den pro-apoptotischen Molekülen Bax und Bak in diesen Zellen beruht. Da die verwendeten BH3-Mimetika spezifisch Bcl-2 in der Zelle hemmen, fördern sie die Initiierung der Apoptosekaskade über diesen Mechanismus.

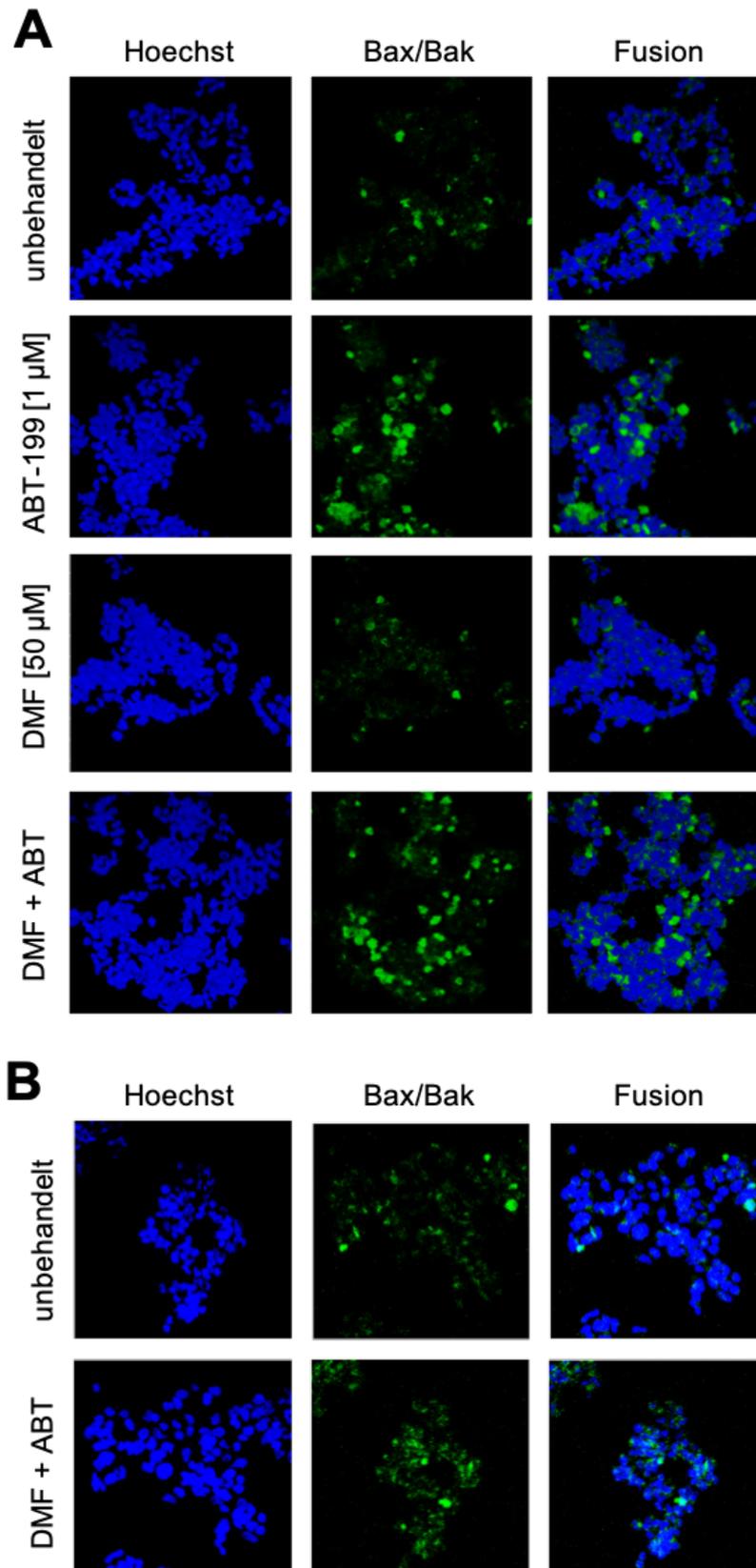


Abbildung 15: Proximity Ligation Assay zur Darstellung der Bax/Bak Interaktionen nach Behandlung mit ABT-199, DMF oder der Kombinationsbehandlung in SeAx (A) und HH (B) Zellen. Die Bax/Bak Oligomerisation zeigt sich durch ein grünes Fluoreszenzsignal, Die DNA der Zellkerne ist durch Färbung mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff Hoechst markiert. Eine modifizierte Version dieser Abbildung wurde zuvor publiziert¹⁰².

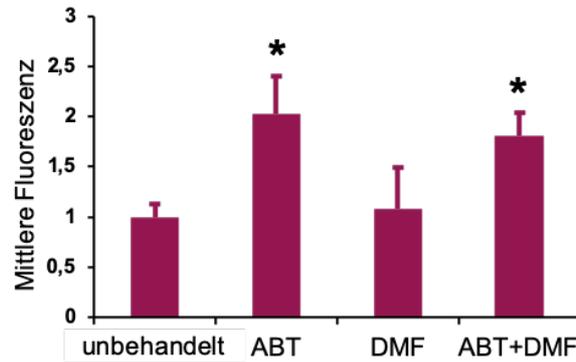


Abbildung 16: Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität der PLA Signale in Relation zur unbehandelten Kontrolle nach Behandlung mit 1 μ M ABT-199, 50 μ M DMF oder der Kombination in SeAx-Zellen (n=4). Die Sternchen (*) markieren eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $< 0,05$ in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle. Die Fehlerindikatoren entsprechen der einfachen Standardabweichung. Eine modifizierte Version dieser Abbildung wurde zuvor publiziert¹⁰².

3.4 Synergismus der Bcl-2 und NF- κ B-Inhibition durch Blockade zweier unabhängiger Signalwege

Aufgrund der vorherigen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Apoptose fördernden Effekte von Bcl-2-Inhibitoren und DMF gemeinsam stärker waren als jeweils in der Einzelbehandlung in CTCL-Zellen *in vitro*. Nun stellt sich die Frage, ob sich die Bcl-2- und NF- κ B-Signalwege gegenseitig beeinflussen, oder ob beide Signalwege unabhängig voneinander durch die beiden Substanzen gehemmt werden. Um dies genauer zu untersuchen, führten wir Experimente mit Bcl2-supprimierten Zellen durch.

Hierzu wurde eine AMAXA Transfektion von SeAx-Zellen mit vier unterschiedlichen siRNAs gegen Bcl-2 durchgeführt und der Bcl-2-Gehalt nach 24 Stunden durch einen Western Blot gemessen. In Abbildung 17 ist ein repräsentativer Western Blot sowie die Quantifizierung der Signal Intensitäten dargestellt. Es zeigt sich, dass durch die unterschiedlichen siRNAs eine unterschiedlich starke Bcl-2-Reduktion in den SeAx-Zellen ausgelöst wurde. Durch die siRNA 3 konnte keine Minderung von Bcl-2 erreicht werden, der Bcl-2-Gehalt der transfizierten Zellen mit den siRNAs 1,2 und 4 reicht von ca. 60 bis 75 % im Vergleich zu der Behandlung mit der Test siRNA (scrambled siRNA). Anschließend sollte überprüft werden, ob die Wirksamkeit von DMF von der Wirkung der Bcl-2-Inhibitoren und damit von der effektiv verringerten Bcl-2 Aktivität abhängt oder ob sich die Bcl-2-Inhibitoren und DMF direkt gegenseitig beeinflussen. Dazu wurden die transfizierten Zellen für 24 Stunden mit 30 μ M DMF inkubiert und anschließend die spezifische Zelltodrate gemessen.

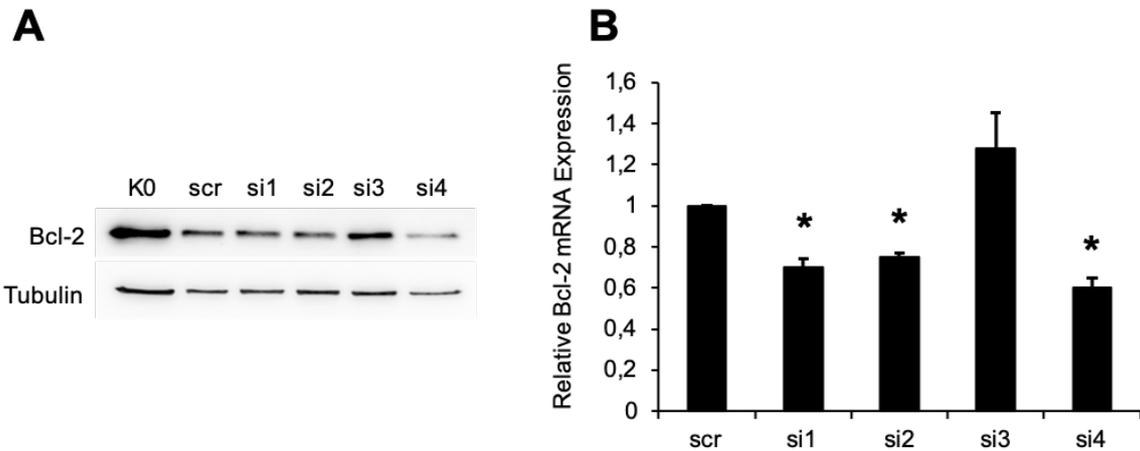


Abbildung 17: (A) Repräsentativer Western Blot mit der Darstellung des Bcl-2-Gehalts in SeAx-Zellen nach Transfektion mit einer Test siRNA (scrambled siRNA) und vier unterschiedlichen siRNAs gegen Bcl-2 nach 24 Stunden. (B) Quantitative Darstellung des Bcl-2-Gehalts durch Western Blot Analyse (n=4). Die Sternchen (*) markieren eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $< 0,05$ in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle. Die Fehlerindikatoren entsprechen der einfachen Standardabweichung. Eine modifizierte Version dieser Abbildung wurde zuvor publiziert¹⁰².

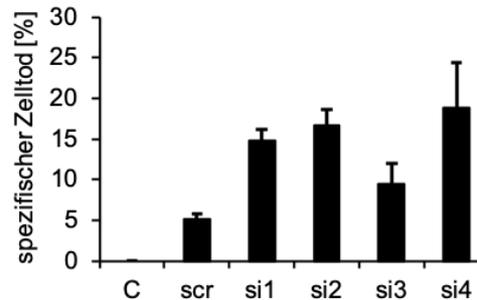


Abbildung 18: Spezifischer Zelltod in SeAx-Zellen nach Transfektion mit verschiedenen siRNAs gegen Bcl-2 für 24 Stunden und Behandlung mit 30 μM DMF für weitere 24 Stunden (n=4). Die Sternchen (*) markieren eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $< 0,05$ in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle. Die Fehlerindikatoren entsprechen der einfachen Standardabweichung. Eine modifizierte Version dieser Abbildung wurde zuvor publiziert¹⁰².

Tatsächlich zeigte sich eine Korrelation zwischen dem Grad der Zelltodauslösung durch DMF und dem vorhandenen Bcl-2-Gehalt der Zellen. So konnte in den Zellen, die mit der siRNA 3 transfiziert wurden, keine signifikante Zelltodrate ausgelöst werden. In den anderen Versuchsansätzen korrelierte die Zelltodrate negativ mit dem Bcl-2-Gehalt der Zellen.

Um zu untersuchen, ob sich Bcl-2 und NF- κ B in der Zelle direkt gegenseitig beeinflussen, wurde die relative I κ B α mRNA Expression in den transfizierten Zellen

gemessen. I κ B α inhibiert NF- κ B durch Bindung im Zytoplasma. Zusätzlich ist I κ B α ein Zielgen des Transkriptionsfaktors NF- κ B und fungiert somit als Aktivitätsmarker für NF- κ B.^{103,104} Die Daten zeigten keinen Effekt des Bcl-2-Knockdowns auf die I κ B α Expression der Zellen, was dafür spricht, dass Bcl-2 NF- κ B nicht direkt reguliert.

Um zu analysieren, ob DMF die Expression von Bcl-2 beeinflusst, behandelten wir die Zelllinien J16, SeAx und HH mit DMF und dessen inaktivem Metabolit MMF. Im Anschluss stellten wir den Proteingehalt von Bcl-2 und Mcl-1 als weiteres anti-apoptotisches Protein in den behandelten Zellen dar. Wie im Abbildung 19 zu sehen, zeigt sich keine Änderung des Bcl-2- und Mcl-1- Gehalts der Zellen nach der Behandlung.

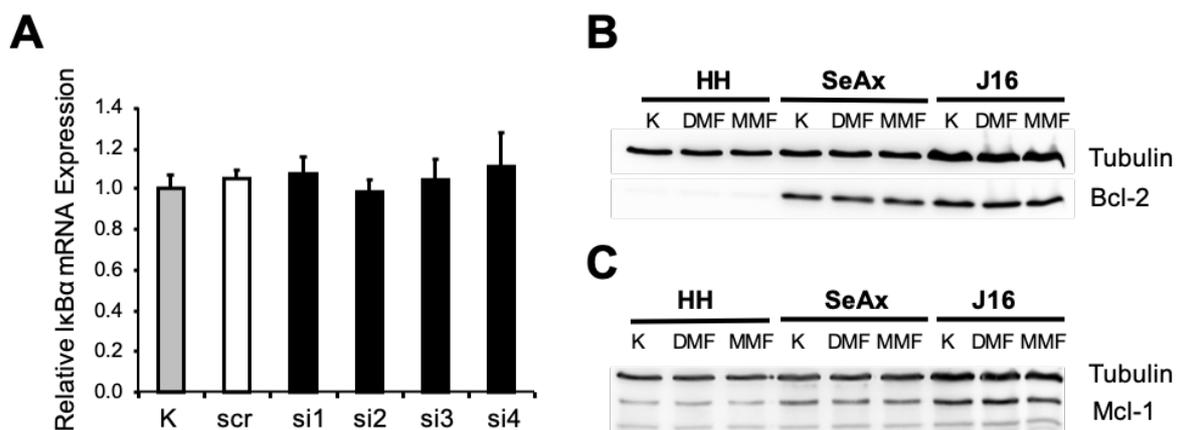


Abbildung 19: (A) Relative I κ B α mRNA Expression in mit unterschiedlichen siRNAs gegen Bcl-2 transfizierten Zellen nach 24 Stunden (n=4). Die Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Fehlerindikatoren entsprechen der einfachen Standardabweichung. (B) Repräsentativer Western Blot mit Darstellung der Bcl-2 Konzentration der Zelllinien J16, SeAx und HH nach Behandlung mit 30 μ M DMF bzw. dem inaktiven Metabolit MMF für 24 Stunden. (C) Repräsentativer Western Blot mit Darstellung der Mcl-1 Konzentration der Zelllinien J16, SeAx und HH nach Behandlung mit 30 μ M DMF bzw. dem inaktiven Metabolit MMF für 24 Stunden. Eine modifizierte Version dieser Abbildung wurde zuvor publiziert¹⁰².

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse der mechanistischen Experimente stark dafür, dass sich der Bcl-2- und NF- κ B-Signalweg der Zellen nicht direkt gegenseitig beeinflussen.

3.5 Verringertes Tumorwachstum und gesteigertes Überleben durch die Kombinationsbehandlung mit ABT-199 und DMF im Xenograft-Mausmodell

Um zu testen, wie sich Bcl-2- und NF- κ B-Inhibition einzeln und kombiniert auf CTCL in einem Organismus auswirken, entwickelten wir in Kooperation mit der Abteilung Tumormodelle des DKFZ Heidelberg ein Xenograft Mausmodell. Dafür wurden NSG Mäusen SeAx-Zellen intradermal injiziert und die Effekte der Bcl-2- und NF- κ B-Inhibition gemessen, sobald Tumoren detektierbar waren. Die Mäuse wurden in vier Versuchsgruppen mit jeweils acht Mäusen unterteilt. Die Versuchsgruppen bestanden aus einer mit PBS behandelten Kontrollgruppe, einer ABT-199 und einer DMF Monotherapie-Gruppe und einer Kombinationstherapiegruppe. Als aktuellsten und klinisch erprobten Bcl-2-Inhibitor verwendeten wir für die *in vivo* Experimente ABT-199. Untersucht wurden zunächst das Tumorwachstum und die Überlebensraten, welche in Abbildung 20 dargestellt werden.

Wir konnten in den Versuchsgruppen, die mit ABT-199 bzw. DMF alleine behandelt wurden, einen schwachen, statistisch nicht signifikanten Effekt auf das Tumorwachstum beobachten. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Kombinationsgruppe eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums ab Tag 7 des Beobachtungszeitraums. An Tag 18 lag die Tumorgröße der Kombinationsgruppe 40 % unterhalb der Kontrollgruppe (0,45 cm in der Kombinationsgruppe gegenüber 0,76 cm in der Kontrollgruppe). Analog zu den *in vitro* Ergebnissen zeigte sich gegenüber der Einzeltherapien ein überadditiver Effekt in der Reduktion des Tumorwachstums durch die Kombinationstherapie (- 40,8 % gegenüber einem summierten Effekt von 36,8 % aus der Summe der Effekte durch ABT-199 bzw. DMF).

Ähnliche Effekte konnten in der Analyse der Überlebensraten beobachtet werden: An Tag 30 hatten 50 % der Versuchstiere der Kombinationsgruppe noch keinen Endpunkt erreicht, während die DMF Gruppe eine Überlebensrate von 13 % aufwies und kein Versuchstier der ABT-199 und Kontrollgruppe überlebt hatte. Zudem mussten in der Kontrollgruppe bereits an Tag 22 die ersten Tiere aufgrund des Erreichens eines Endpunktes (Tumorvolumen > 1,5 cm oder Abbruchkriterium nach der Deutschen Gesellschaft für Versuchstierkunde) getötet werden. In der Kombinationsgruppe war dieser Zeitpunkt erst an Tag 26 erreicht. Der Effekt der Kombinationsbehandlung zeigt sich auch in der Auswertung der mittleren Überlebensrate nach 30 Tagen, welche sich

in der Kombinationsgruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe um 17,5 %, von 24,7 auf 30 Tage erhöhte.

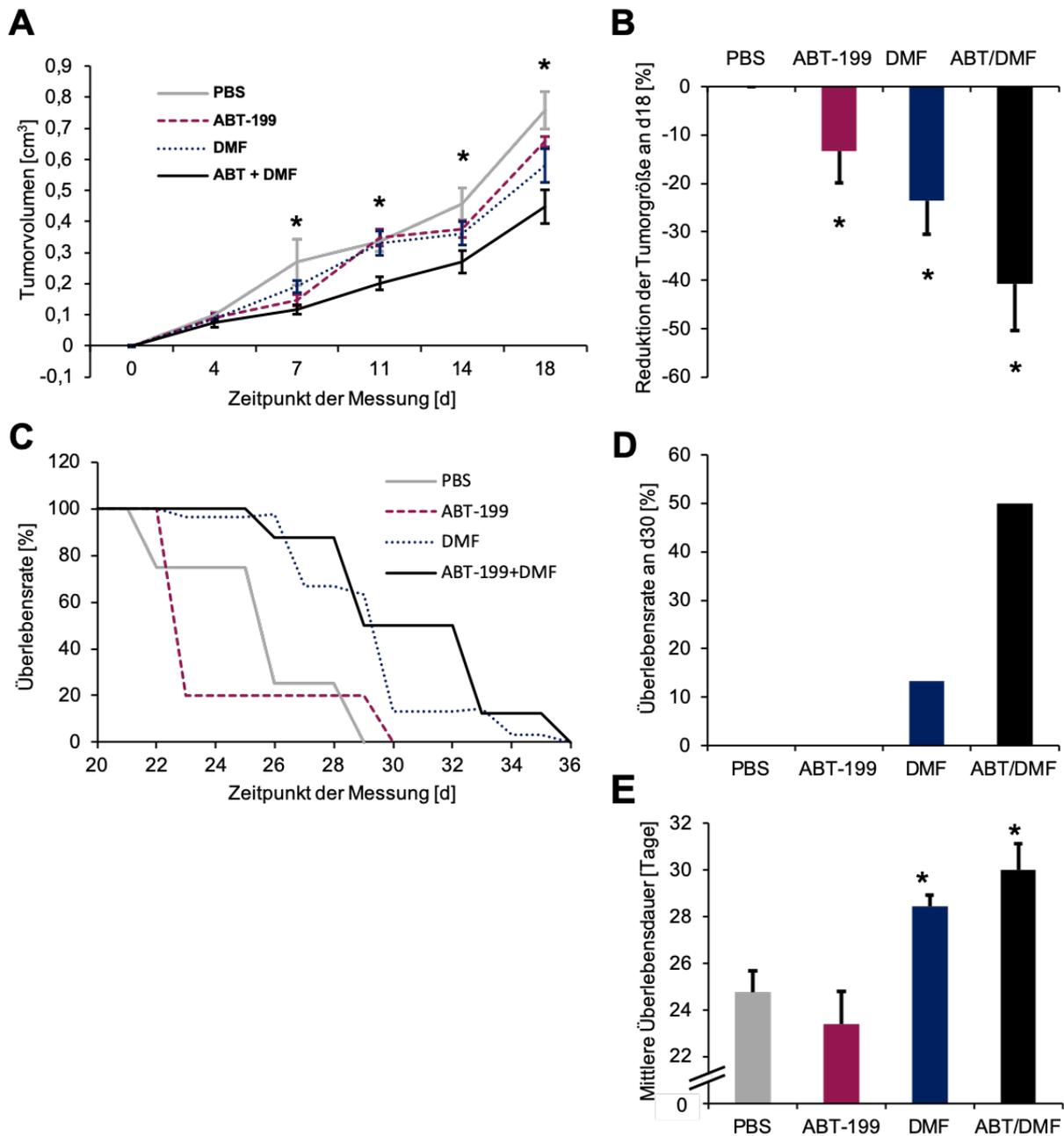


Abbildung 20: Tumorvolumen und Überlebensraten nach Behandlung mit ABT-199 oder DMF bzw. der Kombinationsbehandlung. SeAx-Zellen wurden i.d. in die NSG Mäuse injiziert und mit PBS, einer einmaligen Gabe von ABT-199, täglicher Gabe von DMF für 28 Tage bzw. der Kombination der beiden Monotherapien behandelt. (n=8 je Versuchsgruppe) (A) Entwicklung des Tumorvolumens über die ersten 18 Tage nach Start der Behandlung. (B) Prozentuale Reduktion des Tumorwachstums an Tag 18 in vier Behandlungsgruppen. (C) Prozentuale Überlebensrate der Behandlungsgruppen zwischen Tag 20 und 36 nach Therapiestart. Die Endpunkte, die zum Ausscheiden der Versuchstiere führen, werden im Kapitel 2.10 definiert. (E) Mittlere Überlebenszeit der Versuchstiere in den vier Behandlungsgruppen. Die Sternchen (*) markieren eine Fehlerwahrscheinlichkeit von < 0,05 in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle. Die Fehlerindikatoren entsprechen der einfachen Standardabweichung. Eine modifizierte Version dieser Abbildung wurde zuvor publiziert¹⁰².

Auch wenn ABT-199 im Xenograft Mausmodell als Monotherapeutikum nur eine geringe Reduktion des Tumorumens bewirkte, gab es einen supportiven Effekt der Bcl-2-Inhibition auf die Gesamteffektivität in der Kombinationsbehandlung mit DMF. Auch im Vergleich zu der bereits beschriebenen Apoptoseauslösung durch DMF in CTCL-Zellen⁷⁸ zeigten sich in der Kombination mit ABT-199 deutlich gesteigerte Apoptose anstoßende Effekte.

Zusammenfassend konnte der synergistische Effekt der Kombinationsbehandlung mit Bcl-2- und NF- κ B-Inhibition in CTCL-Zellen nicht nur am *in vitro* Zellmodell, sondern auch unter *in vivo* Bedingungen beobachtet werden.

3.6 Immunhistochemische Charakterisierung und Verifikation der SeAx Tumoren im Xenograft Mausmodell

Nach Erreichen eines der Endpunkte wurden die Tumoren der Versuchstiere entnommen und histologisch aufbereitet. Als Erfolgskontrolle des konzipierten Xenograft Mausmodells mit Injektion der SeAx-Zellen führten wir eine Charakterisierung der Tumorzellen durch. Dafür wurden die Tumorzellen durchflusszytometrisch auf das Vorhandensein der typischen Oberflächenmarker CD3, CD25 und HLA-DR geprüft, die der ursprünglichen Charakterisierung der SeAx Zelllinie entsprechen¹⁰⁵. In drei unabhängigen Proben zeigte sich ein positives Signal für die geprüften Marker. Eine exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Signale ist in Abbildung 21 dargestellt. CD3 wurde mit einem an den Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppeltem Antikörper detektiert, CD25 und HLA-DR mit an den Farbstoff PE gekoppelten Antikörpern. Zusätzlich wurden in den histologischen Präparaten immunhistochemisch die Oberflächenmoleküle CD3, CD25, HLA-DR, CD8 und CD20 angefärbt. Entsprechend der ursprünglichen Charakterisierung der SeAx Zelllinie durch Kaltoft et al. ergab sich das Oberflächenprofil positiv für CD3, CD25 und HLA-DR und negativ für CD8 und CD20. Diese für SeAx typische Charakterisierung verifiziert die Tumorbildung durch SeAx-Zellen in dem verwendeten Xenograft Mausmodell.

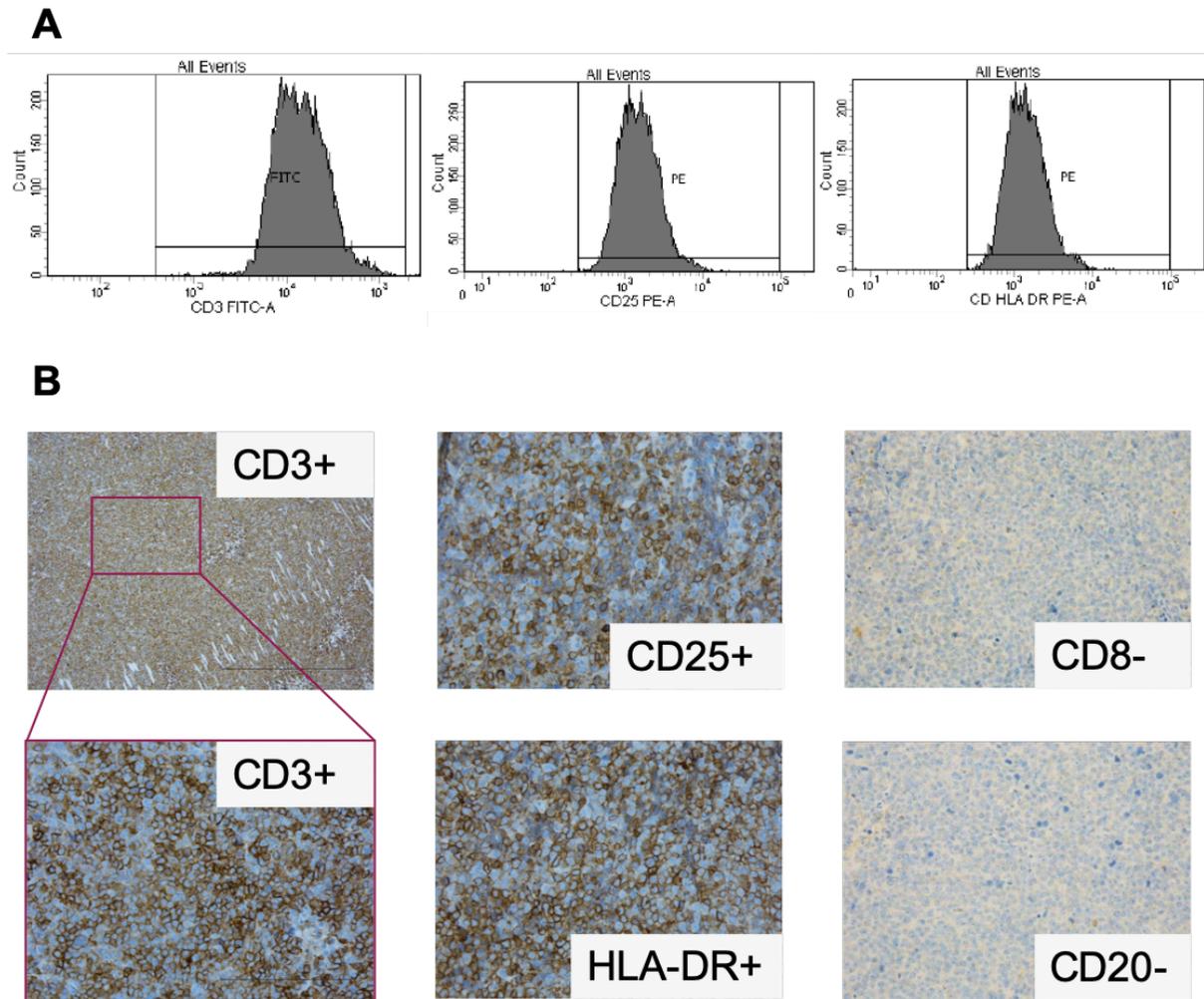


Abbildung 21: (A) Beispielhafte Darstellung der durchflusszytometrischen Messung der Oberflächenmarker CD3, CD25 und HLA-DR anhand einer repräsentativen Probe. Insgesamt wurden drei Proben aus verschiedenen Tumoren getestet. (B) Repräsentative Ausschnitte der Maustumoren mit immunhistochemischer Markierung der Oberflächenmarker CD3, CD25, HLA-DR, CD8 und CD20. (Vergrößerung oben links 100-fach, die weiteren Abbildungen entsprechen einer 400-fachen Vergrößerung) Eine modifizierte Version dieser Abbildung wurde zuvor publiziert¹⁰².

3.7 Histologische Zeichen der Tumorresorption und Proliferationshemmung durch Bcl-2- und NF- κ B-Inhibition

In der histomorphologischen Beurteilung der resezierten Tumoren, zeigten sich in der Kombinationsgruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant größere Tumornekroseareale als Zeichen der Tumorrückbildung. (Abbildung 22) Wir entwickelten ein semi-quantitatives Auswertungssystem zur Darstellung der Ausdehnung der betroffenen Areale durch die Behandlung mit ABT-199, DMF und derer Kombination.⁷⁸ Bereits in der ABT-199 und in der DMF Gruppe zeigt sich eine gesteigerte mittlere Tumornekroseausdehnung (1 Punkt im Tumornekrosescore in der

ABT-199 Gruppe bzw. 1,13 Punkte in der DMF Gruppe, dagegen 0,63 Punkte in der Kontrollgruppe). In der Kombinationspopulation zeigte sich zudem eine statistisch signifikante Steigerung der Tumornekroseareale mit einem Punktwert von 1,63.

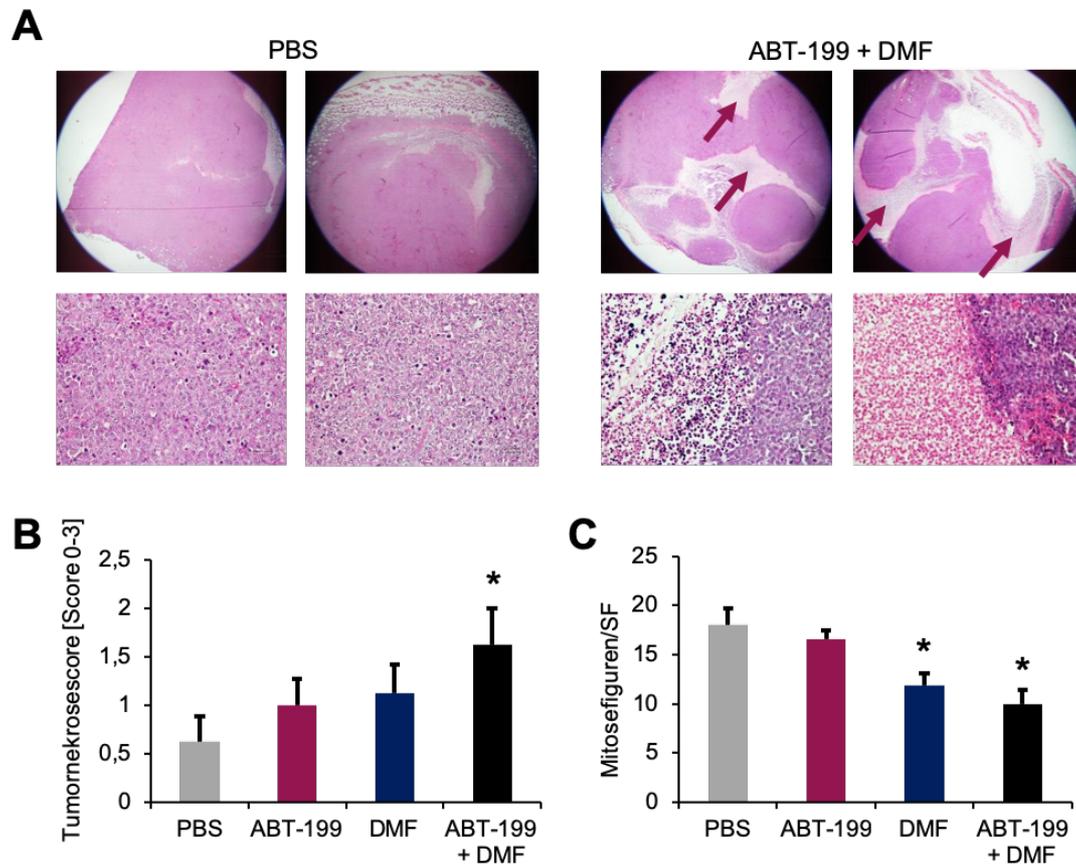


Abbildung 22: (A) Repräsentative Ausschnitte der Tumoren durch Injektion von SeAx-Zellen in NSG Mäuse behandelt mit der Trägerlösung (PBS) oder der Kombinationsbehandlung mit ABT-199 und DMF. Die violetten Pfeile markieren Bereiche der Tumornekrose. (HE-Färbung, obere Abbildungen 20-fache Vergrößerung, untere Abbildungen 200-fache Vergrößerung) (B) Semiquantitative Darstellung der Tumornekroseausdehnung (0-25% der Tumorfläche betroffen durch Nekrose → 0; 25-50 % der Tumorfläche betroffen durch Nekrose → 1; 50-75 % der Tumorfläche betroffen durch Nekrose → 2; 75-100 % der Tumorfläche betroffen durch Nekrose → 3) (C) Anzahl der Mitosefiguren pro Sichtfeld (SF) bei 200-facher Vergrößerung in den vier Behandlungsgruppen. Die Sternchen (*) markieren eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $< 0,05$ in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle. Eine modifizierte Version dieser Abbildung wurde zuvor publiziert¹⁰².

Zusätzlich fiel bei 200-facher Vergrößerung eine geringere Inzidenz von Mitosefiguren in der DMF und der Kombinationsgruppe auf, was auf eine geringere Proliferationsrate schließen lässt. Neben der Anzahl der Mitosefiguren ließ sich Ki-67 als klassischer Proliferationsmarker immunhistochemisch nachweisen. Ki-67 ist ein Protein, das während der Interphase des Mitoseprozesses im Zellkern detektiert werden kann.⁸² In Abbildung 23 wurde Ki-67 immunhistochemisch markiert. Insgesamt zeigte sich eine signifikante Verringerung der Anzahl Ki-67-positiver Zellen in allen Wirkstoffgruppen. Besonders gering ausgeprägt war der Proliferationsmarker in der Kombinationsgruppe

mit 2,25 Ki-67-positiven Zellen pro Gesichtsfeld im Gegensatz zu 32,75 in der unbehandelten Gruppe und 26,42 in der ABT-199 bzw. 21,92 in der DMF Gruppe.

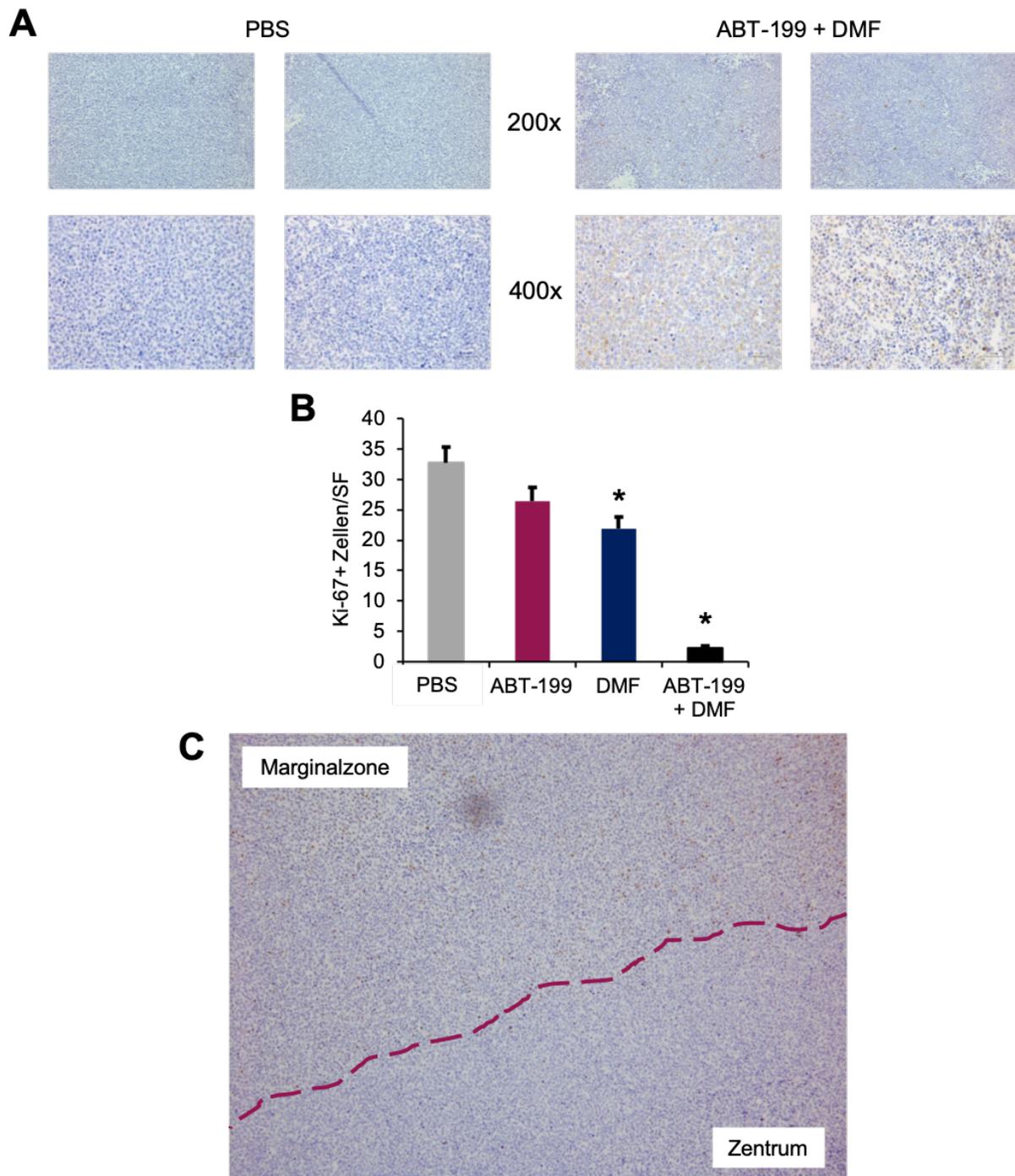


Abbildung 23: (A) Repräsentative Ausschnitte der Tumoren der Kontrollgruppe und der Kombinationsgruppe nach immunohistochemischer Markierung von Ki-67 in 200- und 400-facher Vergrößerung. (B) Quantifikation der Ki-67-positiven Zellen pro Sichtfeld (SF) bei 400-facher Vergrößerung. (C) Repräsentativer Ausschnitt eines Tumors der Kombinationsgruppe mit Darstellung der erhöhten Ki-67 Anfärbung in der Marginalzone des Tumors im Vergleich zum Zentrum. Die Sternchen (*) markieren eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $< 0,05$ in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle. Eine modifizierte Version dieser Abbildung wurde zuvor publiziert¹⁰².

Zusammenfassend zeigten sich im Mausmodell sowohl eine Vermehrung der Nekrosezonen im Tumorgewebe als auch eine geringere Ki-67 Expression als Zeichen einer verringerten Mitose- und Proliferationsrate in den behandelten Tumoren im Vergleich zu den Kontrollen. Insbesondere die Kombinationsbehandlung mit DMF und ABT-199 bewirkte stärkere Effekte auf diese Parameter im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen.

3.8 Immunistochemische Analyse der Apoptoseauslösung durch Bcl-2- und NF- κ B-Inhibitoren

Nachdem *in vitro* die Auslösung des gerichteten Zelltods durch Apoptose als Mechanismus der erhöhten Zelltodraten gezeigt werden konnte, führten wir in den resezierten Tumoren eine immunhistochemische Markierung der cIcaspase-3 durch. (Abbildung 24) Passend zu den *in vitro* Daten zeigte sich in den Tumoren der ABT-199 und DMF Gruppe eine deutlich gesteigerte cIcaspase-3 Anreicherung. In besonders starkem Ausmaß konnte die cIcaspase-3 in der Kombinationsgruppe detektiert werden. Histomorphologisch fiel zudem eine räumliche Beziehung zwischen den Bereichen der Caspase3-Spaltung und den Tumornekrosezonen auf. Dies unterstreicht eine Apoptoseauslösung in den behandelten Tumorzellen als zugrunde liegendem Mechanismus des klinischen Ansprechens der behandelten Mäuse.

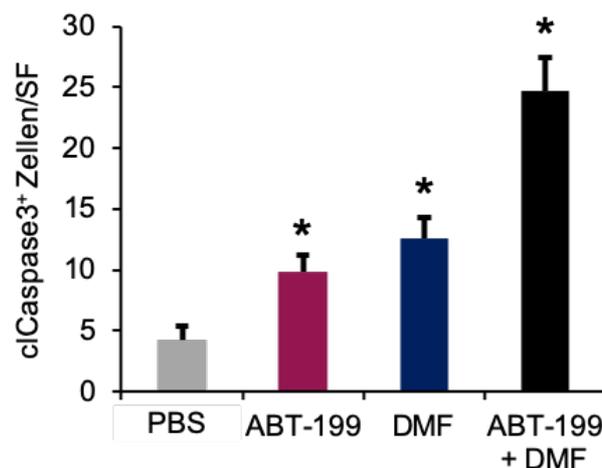


Abbildung 24: Quantifizierung der cIcaspase-3 positiven Zellen pro Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung in den vier Behandlungsgruppen. Die Sternchen (*) markieren eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $< 0,05$ in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle. Eine modifizierte Version dieser Abbildung wurde zuvor publiziert¹⁰².

4 DISKUSSION

4.1 Bcl-2 als neue therapeutische Zielstruktur zur Wiederherstellung der Apoptosesensitivität von CTCL

Die Apoptoseresistenz der CTCL-Zellen gegenüber Zelltodstimuli rückte in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der experimentellen und klinischen Forschung. Sie ist ein wesentlicher Malignitätsfaktor der CTCL und bedingt die oft früh einsetzende Resistenz dieser Tumorentitäten gegenüber den herkömmlichen Therapieoptionen.^{47,66} Durch die besseren Möglichkeiten der Charakterisierung entarteter Zellen können immer mehr Zielstrukturen identifiziert werden, die als Ansatzpunkt für neue zielgerichtete und darüber hinaus gut verträgliche Therapien genutzt werden können.

Die Entwicklung und Etablierung zielgerichteter Therapien im Sinne einer personalisierten Medizin befindet sich bei CTCL derzeit noch im Aufbau. Bisher wurden nur zwei zielgerichtete Therapien in Phase-III-Studien geprüft und zugelassen, die auf spezifische Zielstrukturen der CTCL-Zellen wirken:

Der Konjugatwirkstoff aus dem CD30-Antikörper Brentuximab und dem Zytostatikum Monomethylauristatin E sowie der CCR4-Antikörper Mogamulizumab wurden bereits in Kapitel 1.2.1 vorgestellt. Beide Therapien markieren als erste zielgerichtete Therapien, die für den klinischen Einsatz bei CTCL zugelassen sind, den Beginn einer vielversprechenden Entwicklung einer individualisierten effektiven CTCL Therapie. Aufgrund unterschiedlicher Resistenzlagen und Charakteristika bei CTCL-Zellen verschiedener Patienten ist es notwendig, aus einer möglichst breiten Palette gut verträglicher und zielgerichteter Therapien auswählen zu können. So ist z.B. der Einsatz von Brentuximab Vedotin nur möglich, wenn CD30 von den Tumorzellen exprimiert wird. Zusätzlich gilt die bei ca. zwei Dritteln der Patienten auftretende periphere Neuropathie als therapielimitierend.³⁹

Zielgerichtete Medikamente richten sich gegen ein oder mehrere typische Charakteristika maligner Erkrankungen. Aufgrund des häufig beobachteten initialen oder im Verlauf auftretenden fehlenden Ansprechens von CTCL-Zellen gegenüber herkömmlichen Therapien, wurde zunehmend die Resistenz der malignen Zellen gegenüber Zelltodsignalen genauer untersucht.⁴⁴ Tatsächlich konnte eine erhöhte Apoptoseresistenz in CTCL-Zellen nachgewiesen werden. Als Mechanismen konnten zunächst Veränderungen im MAPK- und NF-κB-Signalweg gefunden

werden.^{54,72,75,78,106,107}

Die veränderte Regulation und Aktivität der für die Apoptoseresistenz zuständigen Proteine und Signalwege ist nicht nur eine Erklärung für eine Resistenzentwicklung, sondern kann genutzt werden, um Therapiekonzepte zu entwickeln, die sich die veränderten Mechanismen der CTCL-Zellen zunutze machen, um diese gezielt zu bekämpfen. Im Sinne dieses Konzepts konnte gezeigt werden, dass DMF als NF- κ B-Inhibitor spezifisch und effektiv Apoptose in CTCL-Zellen *in vitro* und *in vivo* auslösen kann.^{72,75,78} Aktuell wird die Verwendung von DMF bei CTCL Patienten in einer Phase-IIa-Studie klinisch untersucht. (ClinicalTrials.gov Nummer NCT02546440)

Neben der veränderten Regulation der oben genannten Signalwege, scheint Bcl-2 als anti-apoptotisches Molekül ebenfalls eine wichtige Rolle in der Resistenzentwicklung zu spielen^{62,64,108}. Es wurde gezeigt, dass auch CTCL-Zellen neben vielen anderen hämatologischen Neoplasien Bcl-2 überexprimieren^{82,94}.

Um dieses Charakteristikum der CTCL-Zellen zu nutzen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Inhibition von Bcl-2 mittels den Bcl-2-Inhibitoren ABT-263 und ABT-199 in CTCL-Zellen untersucht. Da der Bcl-2-Inhibitor ABT-199 (Venetoclax) bereits für einige hämatologische Entitäten zugelassen ist und sich in vielfältigen klinischen Studien in der Prüfung befindet, gibt es bereits Daten zu dem Nebenwirkungsprofil von ABT-199. Hier präsentiert sich ABT-199 als ein Medikament mit tolerablem Nebenwirkungsprofil, sodass sich ABT-199 für den klinischen Einsatz qualifiziert.^{89,109} Aktuell wird Venetoclax zunehmend als Kombinationspartner mit weiteren Wirkstoffen eingesetzt, um einen stärkeren therapeutischen Effekt zu erzielen und die Dosierung der miteinander kombinierten einzelnen Medikamente möglichst niedrig halten zu können¹¹⁰.

2018 wurde von Cyrenne et al. eine erste Studie publiziert, die sich mit der Wirksamkeit von ABT-199 in CTCL-Zellen *in vitro* beschäftigt. Dabei wurden die Effekte von ABT-199 alleine, sowie in Kombination mit den HDAC-Inhibitoren Vorinostat und Romidepsin untersucht. Es wurden isolierte Patientenzellen und die CTCL Zelllinien MyLa, Sez4, HH und Hut78 behandelt. Unter der Therapie mit ABT-199 alleine konnten relevante Zelltodraten nur unter hohen Konzentrationen erreicht werden. Die

Zelllinie MyLa zeigte unter den behandelten Zelllinien die höchste Sensitivität auf ABT-199 mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration von 2,47 μM . Derselbe Effekt konnte in HH-Zellen erst bei 10,2 μM erreicht werden. Mechanistische Experimente bezüglich der Genese des Zelltods durch Apoptose wurden in den Zelllinien nicht durchgeführt, sodass ein unspezifischer Effekt der hohen ABT-199 Dosierungen auf HH nicht ausgeschlossen werden kann. Im Vergleich zu unseren Experimenten wurden die Zellen 72 h mit ABT-199 inkubiert und anschließend die Zelltodraten gemessen. Es zeigte sich eine sehr starke Sensitivität der isolierten CTCL-Zellen insbesondere von SS Patienten auf die Behandlung mit ABT-199. Die mittlere inhibitorische Konzentration schwankte unter den primären CTCL-Zellen von 85 pM bis 6,6 μM .

Unter der Kombinationsbehandlung von ABT-199 und den HDAC-Inhibitoren konnten in den Zellen von SS Patienten synergistische Effekte beobachtet werden. Unter den Zelllinien zeigte nur MyLa eine synergistische Zelltodausslösung durch die Behandlung mit ABT-199 und Vorinostat. Passend dazu konnte ausschließlich in den MyLa-Zellen eine gesteigerte Expression von Bcl-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Vorinostat festgestellt werden.⁹⁹

Im Einklang mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen unterstreicht die Studie von Cyrenne et al. das hohe Potenzial von ABT-199 in der Behandlung von CTCL. Darüber hinaus konnten wir in der vorliegenden Studie den Effekt von ABT-199 in CTCL-Zellen erstmals *in vivo* beleuchten.¹¹¹

Aufgrund der vielfältigen Resistenzmechanismen der CTCL-Zellen gegenüber Apoptosesignalen scheint eine simultane Blockierung mehrerer Signalwege sinnvoll. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich der NF- κB - und Bcl-2-Signalweg in der Zelle gegenseitig beeinflussen können. So kann die Zelle bei Blockierung des einen Signalweges, die Funktion durch Hochregulation des anderen bis zu einem gewissen Grad ersetzen.^{112,113} Daher scheint es strategisch sinnvoll, beide Signalwege gleichzeitig zu hemmen.

4.2 Etablierung eines stabilen Xenograft Mausmodells mit SeAx-Zellen

Um die Wirkung der Inhibition von Bcl-2 und NF- κB in CTCL-Zellen auch *in vivo* zu prüfen, entwickelten wir in Zusammenarbeit mit der Abteilung Tumormodelle des DKFZ ein SeAx Xenograft Mausmodell.

Hierfür wurden SeAx-Zellen von Dr. Gniadecki und Dr. Kaltoft von der Kopenhagen und Aarhus Universität in Dänemark zur Verfügung gestellt, die die Zelllinie ursprünglich entwickelt haben¹⁰⁵. Während das Wachstum der ersten Zellen von der Zugabe von IL-2 abhängig war, konnte im Verlauf beobachtet werden, dass die Zellen auch ohne IL-2 wachsen, sodass von den Kollegen aus Kopenhagen empfohlen wurde, die Zellen ohne Zugabe von IL-2 zu kultivieren. Zudem finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben zur Kultivierung der Zellen mit humanem oder fetalem Kälberserum.^{114,115,116} Die Tatsache, dass sich in der Literatur eine Verschiebung der Kulturbedingungen von einem Zusatz von IL-2 und humanem Serum zu einer Kultur ohne IL-2 und mit Kälberserum zeigt, spricht dafür, dass sich die Eigenschaften der SeAx-Zellen seit der Entwicklung 1987 verändert haben. Als Mechanismen kommen sowohl Mutationsereignisse in Frage, die zu einer Unabhängigkeit gegenüber exogen zugefügtem IL-2 führen, als auch eine Differenzierung der SeAx-Zellen unter der Kultivierung mit IL-2, da bekannt ist, dass IL-2 die Differenzierung von T-Zellen fördert.¹¹⁷

Mit diesen Kulturbedingungen konnten wir *in vitro* ein stabiles logarithmisches Wachstumsverhalten der SeAx-Zellen beobachten. Da nicht ausgeschlossen ist, dass sich diese Zelllinie über die Jahrzehnte verändert hat, führten wir zur Qualitätssicherung neben Fingerprintanalysen und Kontaminationstestungen die Zellen durchflusszytometrisch auf die für SeAx-Zellen charakteristischen Oberflächeneigenschaften mit der Expression von CD3, CD25 und HLA-DR und der Abwesenheit von CD8 und CD20 geprüft¹⁰⁵.

In einer Arbeit von Netchiporouk et al. 2017 wurden mehrere Mausmodelle mit CTCL-Zelllinien entwickelt. Hier zeigte sich durch die subkutane Injektion mit SeAx-Zellen jedoch kein Tumorwachstum.¹¹⁶ Dahingegen konnte die Arbeitsgruppe um Vermeer 2012 eine Arbeit publizieren, in der ein Tumorwachstum nach intrahepatischer Injektion von SeAx-Zellen beobachtet werden konnte. Allerdings konnten die SeAx-Zellen nur in Leber, Thymus, Milz, Blut und Lymphknoten gefunden werden. Es zeigte sich keine Manifestation an der Haut.¹¹⁵ Bisher konnte nur eine Arbeitsgruppe ein SeAx Xenograft Mausmodell entwickeln, in der die Zellen subkutan appliziert wurden und ein kutanes Anwachsen der Zellen beobachtet werden konnte¹¹⁴. Tabelle 4 vergleicht das für dieses Projekt etablierte Mausmodell mit anderen SeAx Mausmodellen.

Tabelle 4: Merkmale des genutzten Xenograft Mausmodells im Vergleich zu ausgewählten bisher etablierten SeAx Xenograft Mausmodellen^{114,115,116}.

	Hier genutztes Mausmodell	Kato et al. 2016 ¹¹⁴	Fits et al. 2012 ¹¹⁵	Netchiporouk et al. 2017 ¹¹⁶
Mausmodell	NSG	NOD.CB17-Prkdc scid	(PN2-7) rag2-/- gammac-/-	NSG
Alter der Mäuse	6-7 Wochen	4-6 Wochen	Neugeboren	8 Wochen
Zellkulturbedingungen	Ohne IL-2, Kälberserum	Ohne IL-2, Kälberserum	Mit IL-2, Kälberserum	Mit IL-2, Kälberserum
Transplantation	i.d. in PBS/ Matrigel (1:1, v/v)	s.c. in Matrigel	intrahepatisch	s.c. in PBS
Zellzahl	$3 * 10^6$	$2 * 10^5$	$0,5 - 6 * 10^6$	$2,5 * 10^6$
Zellkonzentration	$1 * 10^8$ /ml	$4 * 10^6$ /ml	$0,17 - 2 * 10^8$ /ml	$1,25 * 10^7$ /ml

Der größte Unterschied zu dem Mausmodell von Kato et al. liegt in der großen Anzahl und der hohen Konzentration der injizierten Zellen. Insgesamt scheint die Verwendung von Matrigel für den Erfolg des kutanen Wachstums der SeAx-Zellen von großer Bedeutung zu sein.

Die Verwendung von SeAx-Zellen für die Etablierung eines stabilen Xenograft Mausmodells hat Forschungsgruppen immer wieder vor Herausforderungen gestellt und zeigte sich insgesamt als schwierig. Auch in diesem Projekt mussten mehrere Anläufe mit minimalen Anpassungen vorgenommen werden, jedoch gelang es schließlich ein zuverlässiges SeAx Mausmodell zu entwickeln.

Um nach Abschluss der *in vivo* Experimente sicher zu stellen, dass es sich bei den angewachsenen kutanen Tumoren tatsächlich um von SeAx-Zellen ausgehende Tumoren gehandelt hat, wurden die Zellen in den exzidierten Tumoren erneut auf die charakteristischen Eigenschaften der SeAx-Zellen geprüft und so das Tumormodell retrospektiv erneut als SeAx Xenograft Modell gesichert. Die Entwicklung stabiler und reproduzierbarer Tumormodelle stellt eine wichtige Säule der präklinischen Erforschung neuer Therapieoptionen bei CTCL dar. So kann das in dieser Arbeit vorgestellt Mausmodell ebenfalls für künftige wissenschaftliche Ansätze zur

Weiterentwicklung von Therapiemöglichkeiten und des Verständnisses von CTCL dienen.

4.3 Die kombinierte Inhibition von NF- κ B und Bcl-2 als vielversprechender Therapieansatz zur zielgerichteten Apoptoseauslösung bei CTCL

In der vorliegenden Arbeit wurde das Potenzial von Bcl-2-Inhibitoren zur Zelltodauslösung in CTCL-Zellen als Einzelwirkstoff und in der Kombination mit dem NF- κ B-Inhibitor DMF untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Bcl-2-Inhibitoren *in vitro* effektiv Zelltod auslösen. In mehreren mechanistischen Experimenten stellte sich als Mechanismus der Zelltodauslösung die Einleitung der Apoptosekaskade heraus. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich der NF- κ B- und der Bcl-2-Signalweg nicht direkt gegenseitig beeinflussen. 2013 untersuchten Chang et al. den Einfluss des Proteasom-Inhibitors Bortezomib auf die Regulation von NF- κ B abhängigen Genen. Es konnte gezeigt werden, dass durch die NF- κ B-Inhibition durch Bortezomib die Expression von Bcl-2 nicht beeinflusst wird, was unseren Beobachtungen der erhaltenen Bcl-2-Expression unter NF- κ B-Inhibition entspricht.⁷¹ Umgekehrt konnten wir zeigen, dass sich durch die Bcl-2-Inhibition nicht die Expression von I κ B als Aktivitätsmarker für NF- κ B verändert.

Bei der Untersuchung der primären CD4⁺ Zellen von CTCL Patienten und gesunden Probanden zeigten die Bcl-2-Inhibitoren eine deutlich stärkere Zelltodauslösung in den Zellen der CTCL-Patienten gegenüber denen der gesunden Probanden. Hieraus ergibt sich eine gewisse Spezifität der Bcl-2-Inhibitoren für Bcl-2 überexprimierende CTCL-Zellen, was für eine gute klinische Verträglichkeit mit tolerabler Immunsuppression hinweisend sein kann.

Die vielversprechenden Ergebnisse der *in vitro* Experimente konnten wir anschließend in dem beschriebenen Xenograft Mausmodell erstmals *in vivo* testen. Hier zeigte sich ein synergistischer Effekt in der Kombinationsbehandlung von ABT-199 und DMF gegenüber DMF alleine^{78,78} Im Vergleich zu der Einzelbehandlung mit DMF konnte ABT-199 das Tumorwachstum nicht signifikant bremsen. Die Ursache hierfür könnte in der niedrigen Dosierung und einmaligen Gabe von ABT-199 gesucht werden. Insbesondere durch eine unterschiedliche Pharmakokinetik *in vivo* kann die

notwendige Dosierung *in vivo* deutlich von der *in vitro* verwendeten abweichen. Für die bisher zugelassene Indikation der CLL wird zumeist bis zu einer täglichen oralen Gabe von 400 mg ABT-199 aufdosiert und diese täglich fortgeführt. (Quelle: Fachinformation Venetoclax(European Medicines Agency, Zugriff: 22.09.19)) Auch in aktuell durchgeführten Studien zu anderen hämatologischen Entitäten, wie einer aktuell laufenden Phase-III-Studie zur Prüfung der Kombinationsbehandlung von Venetoclax und hypomethylierenden Substanzen bei nicht für eine intensive Induktionstherapie geeigneten AML Patienten, wird zumeist eine Zieldosis von 400 mg und eine tägliche Gabe eingesetzt. (ClinicalTrials.gov Nummer NCT02993523) Insbesondere angesichts der relativen Unterdosierung von ABT-199 ist der bereits bei der niedrigen Dosierung beobachtete synergistische Effekt mit DMF bemerkenswert. Die vorliegenden Daten sprechen ebenfalls dafür, dass durch die Kombination mit DMF eine deutliche Reduktion der Dosen gegenüber den notwendigen Dosierungen bei einer Monotherapie möglich ist.

In der Behandlung der Mäuse mit ABT-199 alleine zeigte sich eine erhöhte Morbidität mit einem früheren Erreichen der Endpunkte. Diese Morbidität konnte jedoch in der Kombinationsbehandlung mit DMF nicht beobachtet werden. Die Unterschiede könnten durch die begrenzte Anzahl der Versuchstiere begründet sein oder auf einen weiteren Vorteil der Kombinationsbehandlung gegenüber der alleinigen Gabe von ABT-199 hinweisen.

4.4 Ausblick

Die therapeutische Verwendung von BH3-Mimetika zur Inhibition von Bcl-2 gilt in vielen malignen Entitäten als Hoffnungsträger und konnte bereits in vielfältigen hämatologischen Neoplasien als potenter Therapiebaustein evaluiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Bcl-2-Inhibition mittels ABT-263 und ABT-199 *in vitro* und *in vivo* in CTCL getestet. Es konnte gezeigt werden, dass auch in dieser Lymphomentität Bcl-2 ein vielversprechender Angriffspunkt darstellt und die Hemmung des Bcl-2-Signalweges in diesen Zellen Apoptose auslösen kann. Bei den sich schnell entwickelnden Resistenzen von CTCL gegenüber verschiedenen Therapeutika ist die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien von hohem Stellenwert. Darüber hinaus kann eine initiale Kombinationsbehandlung sowohl Resistenzen vermeiden, als auch die therapeutische Potenz steigern. In dieser Studie

stellten sich Bcl-2-Inhibitoren mit dem NF- κ B-Inhibitor DMF als synergistisch wirkendem Partner als vielversprechende Therapieoption dar. In Abbildung 25 ist die synergistische Apoptoseauslösung gezeigt, die in den malignen T-Zellen von CTCL Patienten deutlich stärker ausgeprägt ist, als in gesunden T-Zellen.

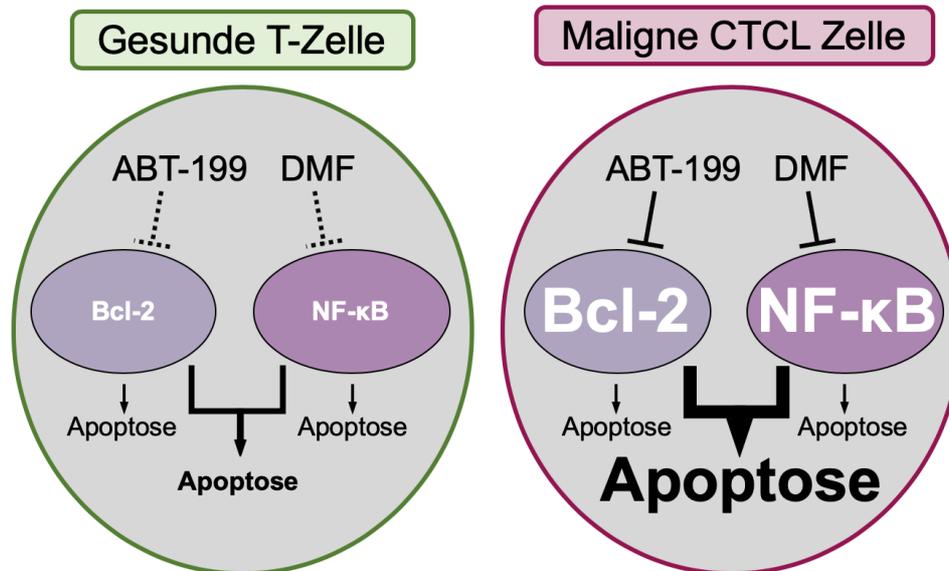


Abbildung 25: Schematische Darstellung der synergistischen Apoptoseauslösung durch ABT-199 und DMF in T-Zellen. Die Apoptoseauslösung zeigt sich deutlich stärker in den malignen CTCL-Zellen, in denen NF- κ B konstitutiv aktiviert ist und Bcl-2 überexprimiert wird, als in gesunden T-Zellen. Eine modifizierte Version dieser Abbildung wurde zuvor publiziert¹⁰².

Um die Ausbildung von Resistenzen gegenüber Bcl-2-Inhibitoren zu vermeiden, ist ein genaues Abwägen der Indikation und eine geeignete Dosierung notwendig. Aktuelle Daten konnten zeigen, dass durch die kontinuierliche Gabe von Bcl-2-Inhibitoren ein Mutationsdruck entsteht, der zu einer Resistenz gegenüber BH3-Mimetika führen kann. Als Ursache dafür, wird die hohe Affinität der Bcl-2-Inhibitoren zu Bcl-2 diskutiert.¹¹⁹ Um diesem Mutationsdruck zu minimieren sollten Wirkstoffkombinationen weiter untersucht werden, um mehrere Angriffspunkte zu erreichen und die Gesamtdosen möglichst gering zu halten. Für den erfolgreichen Einsatz von Bcl-2-Inhibitoren könnte zudem eine prätherapeutische Sensitivitätsanalyse im klinischen Alltag Einzug erhalten. So könnte z.B. eine Mutationsanalyse der BH3-Bindungsstelle eine vorbestehende Resistenz der Zellen gegenüber BH3-Mimetika bereits vor dem klinischen Einsatz aufdecken¹²⁰.

Für den Einsatz der Bcl-2-Inhibitoren ist die genauere Untersuchung der Verträglichkeit und des Sicherheitsprofils in einer klinischen Studie notwendig. In bisher untersuchten Entitäten erwies sich ABT-199 als Medikament mit einer guten Verträglichkeit. Als schwerste Nebenwirkung wurde insbesondere initial das Auftreten eines Tumorlysesyndroms beobachtet.^{109,121} Daher erscheint eine kalkulierte Prophylaxe, sowie die Anpassung der initialen Dosierung an die Tumorlast sinnvoll.

Die vorgestellte Studie konnte das therapeutische Potenzial von Bcl-2-Inhibitoren bei CTCL herausstellen, sowie BH3-Mimetika als kraftvollen Kombinationspartner charakterisieren. In Kombination mit dem NF- κ B-Inhibitor DMF konnte die Bcl-2 Inhibition sowohl *in vitro* als auch *in vivo* synergistisch Zelltod auslösen. Diese Daten sprechen stark dafür, den Einsatz von ABT-199 in Kombination mit DMF in einer klinischen Studie zu evaluieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der Behandlung kutaner T-Zell-Lymphome (CTCL) sind die therapeutischen Möglichkeiten nach wie vor begrenzt. Zudem erschweren häufig auftretende Resistenzen eine wirkungsvolle Behandlung und machen eine häufige Therapieumstellung notwendig. Daher besteht ein hoher Bedarf an neuen, zielgerichteten Strategien. In der vorliegenden Arbeit wurde die Inhibition des Moleküls Bcl-2 in CTCL untersucht, welches anti-apoptotisch wirkt und in CTCL überexprimiert ist. Da sich in der Literatur bereits eine erhöhte Effektivität von Bcl-2-Inhibitoren in einer Kombinationstherapie herauskristallisierte, untersuchte diese Studie darüber hinaus das therapeutische Potenzial der Bcl-2-Inhibition in Kombination mit dem NF- κ B-Inhibitor DMF *in vitro* und *in vivo*. DMF wurde bereits zuvor als wirksames Therapeutikum zur Apoptoseauslösung in CTCL beschrieben.

Dafür wurden die Bcl-2-Inhibitoren ABT-263 und ABT-199 und der NF- κ B-Inhibitor DMF in charakteristischen CTCL-Zelllinien, sowie in primären CD4⁺ Zellen von CTCL Patienten untersucht. Die verwendeten Bcl-2-Inhibitoren lösten spezifisch Zelltod in primären CD4⁺ Zellen von CTCL Patienten und in den Zelllinien SeAx und MyLa aus, jedoch nicht in den T-Zellen von gesunden Probanden und in der Bcl-2 defizienten Zelllinie HH. Die Kombinationsbehandlung von ABT-199 und DMF konnte *in vitro* unabhängig Zelltod auslösen. Als Mechanismus für den Zelltod konnte eine Apoptoseauslösung durch die Hemmung zweier unabhängiger Signalwege herausgestellt werden.

Um diese Ergebnisse *in vivo* zu bestätigen, wurde ein SeAx Xenograft Mausmodell etabliert. Der kombinierte Einsatz von ABT-199 und DMF konnte effektiv das Tumorwachstum bremsen und das Gesamtüberleben steigern. Dabei wurde ein stärkerer Effekt der Kombinationsbehandlung gegenüber den Einzelgaben von ABT-199 bzw. DMF beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit den beiden Wirkstoffen die Zellproliferation in den CTCL Tumoren signifikant bremst. Sowohl in Bezug auf die Wirkstärke als auch auf die Verträglichkeit zeigte sich die Kombinationstherapie als überlegen gegenüber der Behandlung mit ABT-199 allein. Zusammenfassend zeigen die Daten der vorliegenden Studie das vielversprechende therapeutische Potenzial der Inhibition von Bcl-2 in Kombination mit dem NF- κ B-Inhibitor DMF und führen zu der Empfehlung einer weiteren Untersuchung dieses Therapiekonzepts in einer klinischen Studie.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Willemze R, Jaffe ES, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, Ralfkiaer E, Chimenti S, Duncan LM, Grange F, Harris NL, Kempf W, Kerl H, Kurrer M, Knobler R, Pimpinelli N, Sander C, Santucci M, Sterry W, Vermeer MH, Wechsler J, Whittaker S, Meijer CJLM: WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Hematology* 105: 3768–3785, 2009
2. Burg G, Kempf W, Cozzio A, Feit J, Willemze R, Jaffe ES, Dummer R, Berti E, Cerroni L, Chimenti S, Diaz-Perez JL, Grange F, Harris NL, Kazakov D V., Kerl H, Kurrer M, Knobler R, Meijer CJLM, Pimpinelli N, Ralfkiaer E, Russell-Jones R, Sander C, Santucci M, Sterry W, Swerdlow SH, Vermeer MH, Wechsler J, Whittaker S: WHO/EORTC classification of cutaneous lymphomas 2005: Histological and molecular aspects. *J. Cutan. Pathol.* 32: 647–674, 2005
3. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES: The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127: 2375–2391, 2016
4. Dippel E, Assaf C, Becker JC, von Bergwelt-Baildon M, Beyer M, Cozzio A, Eich HT, Follmann M, Grabbe S, Hillen U, Klapper W, Klemke CD, Lamos C, Loquai C, Meiß F, Mestel D, Nashan D, Nicolay JP, Oschlies I, Schlaak M, Stoll C, Vag T, Weichenthal M, Wobser M, Stadler R: S2k Guidelines – Cutaneous Lymphomas Update 2016 – Part 1: Classification and Diagnosis (ICD10 C82 - C86). *JDDG - J. Ger. Soc. Dermatology* 15: 1266–1273, 2017
5. Korgavkar K, Xiong M, Weinstock M: Changing incidence trends of cutaneous T-cell lymphoma. *JAMA Dermatology* 149: 1295–9, 2013
6. Assaf C, Gellrich S, Steinhoff M, Nashan D, Weisse F, Dippel E, Coors E, Stein A, Gollin P, Henke U, Adam-Murati S, Koch A, Klemke C-D, Stadler R, Sterry W: Cutaneous lymphomas in Germany: an analysis of the Central Cutaneous Lymphoma Registry of the German Society of Dermatology (DDG). *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 5: 662–668, 2007
7. Wieselthier JS, Koh HK: Sézary syndrome: Diagnosis, prognosis, and critical review of treatment options. *J. Am. Acad. Dermatol.* 22: 381–401, 1990
8. Huang KP, Weinstock M a, Clarke C a, McMillan A, Hoppe RT, Kim YH: Second lymphomas and other malignant neoplasms in patients with mycosis fungoides and Sezary syndrome: evidence from population-based and clinical cohorts. *Arch. Dermatol.* 143: 45–50, 2007
9. Scarisbrick JJ, Prince HM, Vermeer MH, Quaglino P, Horwitz S, Porcu P, Stadler R, Wood GS, Beylot-Barry M, Pham-Ledard A, Foss F, Girardi M, Bagot M, Michel L, Battistella M, Guitart J, Kuzel TM, Martinez-Escala ME, Estrach T, Papadavid E, Antoniou C, Rigopoulos D, Nikolaou V, Sugaya M, Miyagaki T, Gniadecki R, Sanches JA, Cury-Martins J, Miyashiro D, Servitje O, Muniesa C, Berti E, Onida F, Corti L, Hodak E, Amitay-Laish I, Ortiz-Romero PL, Rodríguez-

- Peralto JL, Knobler R, Porkert S, Bauer W, Pimpinelli N, Grandi V, Cowan R, Rook A, Kim E, Pileri A, Patrizi A, Pujol RM, Wong H, Tyler K, Stranzenbach R, Querfeld C, Fava P, Maule M, Willemze R, Evison F, Morris S, Twigger R, Talpur R, Kim J, Ognibene G, Li S, Tavallae M, Hoppe RT, Duvic M, Whittaker SJ, Kim YH: Cutaneous lymphoma international consortium study of outcome in advanced stages of mycosis fungoides and sézary syndrome: Effect of specific prognostic markers on survival and development of a prognostic model. *J. Clin. Oncol.* 33: 3766–3773, 2015
10. Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, Willemze R, Kim Y, Knobler R, Zackheim H, Duvic M, Estrach T, Lamberg S, Wood G, Dummer R, Ranki A, Burg G, Heald P, Pittelkow M, Bernengo MG, Sterry W, Laroche L, Trautinger F, Whittaker S: Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sézary syndrome: A proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Ca. *Blood* 110: 1713–1722, 2007
 11. Norris D a: The pathogenesis of mycosis fungoides. *Clin. Exp. Dermatol.* 6: 77–87, 1981
 12. Jawed SI, Myskowski PL, Horwitz S, Moskowitz A, Querfeld C: Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): Part II. Prognosis, management, and future directions. *J. Am. Acad. Dermatol.* 70: 223.e1-223.e17, 2014
 13. Talpur R, Bassett R, Duvic M: Prevalence and treatment of *Staphylococcus aureus* colonization in patients with mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Br. J. Dermatol.* 159: 105–112, 2008
 14. Krejsgaard T, Odum N, Geisler C, Wasik M a, Woetmann A: Regulatory T cells and immunodeficiency in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Leukemia* 26: 424–432, 2012
 15. Krejsgaard T, Lindahl LM, Mongan NP, Wasik MA, Litvinov I V, Iversen L, Langhoff E, Woetmann A, Odum N: Malignant inflammation in cutaneous T - cell lymphoma — a hostile takeover. 269–282, 2017
 16. Sigurdsson V, Toonstra J, Bihari IC, Bruijnzeel-Koomen C a, van Vloten W a, Thepen T: Interleukin 4 and interferon-gamma expression of the dermal infiltrate in patients with erythroderma and mycosis fungoides. An immuno-histochemical study. *J. Cutan. Pathol.* 27: 429–435, 2000
 17. Campbell JJ, Clark R a, Watanabe R, Kupper TS, Dc W: Sézary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets : a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. 116: 767–771, 2012
 18. Gonzalez BR, Zain J, Rosen ST, Querfeld C: Tumor microenvironment in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Curr. Opin. Oncol.* 28: 88–96, 2016
 19. Shono Y, Suga H, Kamijo H, Fujii H, Oka T, Miyagaki T, Shishido-Takahashi N, Sugaya M, Sato S: Expression of CCR3 and CCR4 suggests a poor prognosis

- in mycosis fungoides and sézary syndrome. *Acta Derm. Venereol.* 99: 809–812, 2019
20. Navas IC, Ortiz-Romero PL, Villuendas R, Martínez P, García C, Gómez E, Rodriguez JL, García D, Vanaclocha F, Iglesias L, Piris M a, Algara P: p16(INK4a) gene alterations are frequent in lesions of mycosis fungoides. *Am. J. Pathol.* 156: 1565–1572, 2000
 21. Mcgirt LY, Jia P, Baerenwald DA, Duszynski RJ, Dahlman KB, Zic JA, Zwerner JP, Hucks D, Dave U, Zhao Z, Eischen CM: Whole-genome sequencing reveals oncogenic mutations in mycosis fungoides. 126: 508–520, 2015
 22. Abate F, Khiabani H, Guitart J, Tensen CP, Vermeer MH, Ferrando A, Palomero T, Informatics B, Medical N, Foundation F: The mutational landscape of cutaneous T-cell lymphoma and Sézary syndrome. 47: 1465–1470, 2016
 23. Ungewickell A, Bhaduri A, Rios E, Reuter J, Lee CS, Mah A, Zehnder A, Ohgami R, Kulkarni S, Armstrong R, Weng WK, Gratzinger D, Tavallae M, Rook A, Snyder M, Kim Y, Khavari PA: Genomic analysis of mycosis fungoides and Sézary syndrome identifies recurrent alterations in TNFR2. *Nat. Genet.* 47: 1056–1060, 2015
 24. Choi J, Goh G, Walradt T, Hong BS, Bunick CG, Chen K, Bjornson RD, Maman Y, Wang T, Tordoff J, Carlson K, Overton JD, Liu KJ, Lewis JM, Devine L, Barbarotta L, Foss FM, Subtil A, Vonderheid EC, Edelson RL, Schatz DG, Boggon TJ, Girardi M, Lifton RP: Genomic landscape of cutaneous T cell lymphoma. *Nat. Genet.* 47: 1011–1019, 2015
 25. Bastidas Torres AN, Najidh S, Tensen CP, Vermeer MH: Molecular advances in cutaneous T-cell lymphoma. 10–15, 2018
 26. Boonen HPJ, Coors E, Grimm M, Hadshiew I, Hauswirth U, Hofmann H, Jung EG, Kimmig W, Knußmann-Hartig E, Miller X, Moll I, Radtke M, Rauterberg A, Schulze W, Siemann-Harms U, Stangl S, Tsianakas A, Voigtländer V, Weiß J, Weißbecher R: Dermatologie. In: *Duale Reihe Dermatologie*, edited by Moll I, Jung EG, Augustin M, Bahmer FA, Bahmer J, Bayerl C, pp 330–335, 2010
 27. Vonderheid EC, Bernengo MG, Burg G, Duvic M, Heald P, Laroche L, Olsen E, Pittelkow M, Russell-Jones R, Takigawa M, Willemze R: Update on erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: Report of the International Society for Cutaneous Lymphomas. *J. Am. Acad. Dermatol.* 46: 95–106, 2002
 28. Jawed SI, Myskowski PL, Horwitz S, Moskowitz A, Querfeld C: Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sezary syndrome): Part I. Diagnosis: Clinical and histopathologic features and new molecular and biologic markers. *J. Am. Acad. Dermatol.* 70: 205.e1-205.e16, 2014
 29. Pimpinelli N, Olsen E a., Santucci M, Vonderheid E, Haeffner AC, Stevens S, Burg G, Cerroni L, Dreno B, Glusac E, Guitart J, Heald PW, Kempf W, Knobler R, Lessin S, Sander C, Smoller BS, Telang G, Whittaker S, Iwatsuki K, Obitz E, Takigawa M, Turner ML, Wood GS: Defining early mycosis fungoides. *J. Am.*

- Acad. Dermatol.* 53: 1053–1063, 2005
30. Vonderheid EC: On the diagnosis of erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma. *J. Cutan. Pathol.* 33: 27–42, 2006
 31. Russell-Jones R: Diagnosing erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma. *Br. J. Dermatol.* 153: 1–5, 2005
 32. Bergman R, Faclieru D, Sahar D, Sander C a., Kemer H, Ben-Aryeh Y, Manov L, Hertz E, Sabo E, Friedman-Birnbaum R: Immunophenotyping and T-cell receptor γ gene rearrangement analysis as an adjunct to the histopathologic diagnosis of mycosis fungoides. *J. Am. Acad. Dermatol.* 39: 554–559, 1998
 33. Stadler R, Assaf C, Klemke C, Nashan D, Wei- M: S2k - Kurzleitlinie - Kutane Lymphome (ICD10 C82 - C86) Update 2012. 1–24, 2014
 34. Dippel E, Assaf C, Becker JC, von Bergwelt-Baildon M, Beyer M, Cozzio A, Eich HT, Follmann M, Grabbe S, Hillen U, Klapper W, Klemke CD, Lamos C, Loquai C, Meiß F, Mestel D, Nashan D, Nicolay JP, Oschlies I, Schlaak M, Stoll C, Vag T, Weichenthal M, Wobser M, Stadler R: S2k Guidelines – Cutaneous Lymphomas Update 2016 – Part 2: Treatment and Follow-up (ICD10 C82 - C86). *JDDG - J. Ger. Soc. Dermatology* 16: 112–122, 2018
 35. Olsen E a, Bunn P a: Interferon in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 9: 1089–1107, 1995
 36. Watanabe R, Teague JE, Fisher DC, Kupper TS, Clark RA: Alemtuzumab therapy for leukemic cutaneous T-cell lymphoma: Diffuse erythema as a positive predictor of complete remission. *JAMA Dermatology* 150: 776–779, 2014
 37. Mehra T, Ikenberg K, Moos RM, Benz R, Nair G, Schanz U, Haralambieva E, Hoetzenecker W, Dummer R, French LE, Guenova E, Cozzio A: Brentuximab as a Treatment for CD30 + Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome. *JAMA Dermatology* 151: 73, 2015
 38. Kim YH, Tavallaee M, Sundram U, Salva KA, Wood GS, Li S, Rozati S, Nagpal S, Krathen M, Reddy S, Hoppe RT, Nguyen-Lin A, Weng WK, Armstrong R, Pulitzer M, Advani RH, Horwitz SM: Phase II investigator-initiated study of brentuximab vedotin in mycosis fungoides and Sézary syndrome with variable CD30 expression level: A multi-institution collaborative project. *J. Clin. Oncol.* 33: 3750–3758, 2015
 39. Prince HM, Kim YH, Horwitz S, Dummer R, Scarisbrick J, Quaglino P, Zinzani PL, Wolter P, Sanches JA, Ortiz-Romero PL, Akilov O, Geskin L, Trotman J, Taylor K, Dalle S, Weichenthal M, Walewski J, Fisher DC, Dréno B, Stadler R, Feldman T, Kuzel T, Wang Y, Palanca-Wessels MC, Zagadailov E, Trepicchio WL, Zhang W, Lin HM, Liu Y, Huebner D, Little M, Whittaker S, Duvic M, Joske D, Lewis ID, Jonak C, Trautinger F, Bechter O, Bron D, de Lima VCC, Klasa R, Bagot M, Beylot-Barry M, D’Incan M, Dreno B, Grange F, Nicolay J, Wobser M, Assaf C, Loquai C, Spina M, Bosi A, Fattori PP, Grzanka A, Lopez-Hernandez A, Roca JJR, Canales SN, Illidge T, Johnson R, Morris S, McKay P, Pro B,

- Lerner A, Eradat H, Sokol L, Hughey S: Brentuximab vedotin or physician's choice in CD30-positive cutaneous T-cell lymphoma (ALCANZA): an international, open-label, randomised, phase 3, multicentre trial. *Lancet* 390: 555–566, 2017
40. Kim YH, Bagot M, Pinter-Brown L, Rook AH, Porcu P, Horwitz SM, Whittaker S, Tokura Y, Vermeer M, Zinzani PL, Sokol L, Morris S, Kim EJ, Ortiz-Romero PL, Eradat H, Scarisbrick J, Tsianakas A, Elmets C, Dalle S, Fisher DC, Halwani A, Poligone B, Greer J, Fierro MT, Khot A, Moskowitz AJ, Musiek A, Shustov A, Pro B, Geskin LJ, Dwyer K, Moriya J, Leoni M, Humphrey JS, Hudgens S, Grebennik DO, Tobinai K, Duvic M, Abhyankar S, Akilov O, Alpdogan O, Beylot-Barry M, Boh E, Caballero D, Cowan R, Dreno B, Dummer R, Fenske T, Foss F, Fukuhara N, Giri P, Habe K, Hamada T, Hatake K, Iida S, Ishikawa O, Iversen L, Kiyohara E, Koga H, Korman N, Kuss BJ, Lamar Z, Lansigan F, Lechowicz MJ, Lerner A, Magnolo N, Mark L, Miyagaki T, Munoz J, Nicolay JP, Nishiwaki K, Okamoto H, Ohtsuka M, Pacheco T, Querfeld C, Rapini RP, Sano S, Tanaka M, Tharp MD, Uehara J, Wada H, Wells J, Wilcox RA, William B, Yonekura K: Mogamulizumab versus vorinostat in previously treated cutaneous T-cell lymphoma (MAVORIC): an international, open-label, randomised, controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 19: 1192–1204, 2018
41. Cudillo L, Cerretti R, Picardi A, Mariotti B, De Angelis G, Cantonetti M, Postorino M, Ceresoli E, De Santis G, Nasso D, Pisani F, Scala E, Di Piazza F, Lanti A, William Arcese for the Rome Transplant N: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in Primary Cutaneous T Cell Lymphoma. *Ann Hematol* 97: 1041–1048, 2018
42. Hughes CFM, Khot A, McCormack C, Lade S, Westerman DA, Twigger R, Buelens O, Newland K, Tam C, Dickinson M, Ryan G, Ritchie D, Wood C, Prince HM: Lack of durable disease control with chemotherapy for mycosis fungoides / Sézary syndrome: a comparative study of systemic therapy and S e. 125: 71–82, 2015
43. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57–70, 2000
44. Hanahan D, Weinberg R a: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646–74, 2011
45. Caprini E, Cristofolletti C, Arcelli D, Fadda P, Citterich MH, Sampogna F, Magrelli A, Censi F, Torreri P, Frontani M, Scala E, Picchio MC, Temperani P, Monopoli A, Lombardo GA, Taruscio D, Narducci MG, Russo G: Identification of key regions and genes important in the pathogenesis of Sézary syndrome by combining genomic and expression microarrays. *Cancer Res.* 69: 8438–8446, 2009
46. Shin J, Monti S, Aires DJ, Duvic M, Golub T, Jones DA, Kupper TS: Lesional gene expression profiling in cutaneous T-cell lymphoma reveals natural clusters associated with disease outcome.[Erratum appears in Blood. 2008 Jan 1;111(1):49]. *Blood* 110: 3015–3027, 2007
47. Tan CRC, Barta SK, Abdul-Majeed S, Cael B: Clinical Pharmacokinetics and

- Pharmacodynamics of Bortezomib. *Clin. Pharmacokinet.* 1–9, 2018
48. Moreau P, Chanan-Khan A, Roberts AW, Agarwal AB, Facon T, Kumar S, Touzeau C, Punnoose EA, Cordero J, Munasinghe W, Jia J, Salem AH, Freise KJ, Levenson JD, Enschede SH, Ross JA, Maciag PC, Verdugo M, Harrison SJ: Promising efficacy and acceptable safety of venetoclax plus bortezomib and dexamethasone in relapsed/refractory MM. *Blood* 130: 2392–2400, 2017
 49. Zinzani PL, Musuraca G, Tani M, Stefoni V, Marchi E, Fina M, Pellegrini C, Alinari L, Derenzini E, de Vivo A, Sabbatini E, Pileri S, Baccarani M: Phase II Trial of Proteasome Inhibitor Bortezomib in Patients With Relapsed or Refractory Cutaneous T-Cell Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 25: 4293–4297, 2007
 50. Sekulic A, Liang WS, Tembe W, Izatt T, Kruglyak S, Kiefer JA, Cuyugan L, Zismann V, Legendre C, Pittelkow MR, Gohmann JJ, De Castro FR, Trent J, Carpten J, Craig DW, McDaniel TK: Personalized treatment of Sézary syndrome by targeting a novel CTLA4 : CD28 fusion. *Mol. Genet. Genomic Med.* 3: 130–136, 2015
 51. Khodadoust MS, Rook AH, Porcu P, Foss F, Moskowitz AJ, Shustov A, Shanbhag S, Sokol L, Fling SP, Ramchurren N, Pierce R, Davis A, Shine R, Li S, Fong S, Kim J, Yang Y, Blumenschein WM, Yearley JH, Das B, Patidar R, Datta V, Cantu E, McCutcheon JN, Karlovich C, Williams PM, Subrahmanyam PB, Maecker HT, Horwitz SM, Sharon E, Kohrt HE, Cheever MA, Kim YH: Pembrolizumab in Relapsed and Refractory Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: A Multicenter Phase II Study. *J. Clin. Oncol.* JCO.19.01056, 2019
 52. Lesokhin AM, Ansell SM, Armand P, Scott EC, Halwani A, Gutierrez M, Millenson MM, Cohen AD, Schuster SJ, Lebovic D, Dhodapkar M, Avigan D, Chapuy B, Ligon AH, Freeman GJ, Rodig SJ, Cattry D, Zhu L, Grosso JF, Brigid Bradley Garelik M, Shipp MA, Borrello I, Timmerman J: Nivolumab in patients with relapsed or refractory hematologic malignancy: Preliminary results of a phase Ib study. *J. Clin. Oncol.* 34: 2698–2704, 2016
 53. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, Mchugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA: BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the RAF / MEK / ERK Pathway and Receptor Tyrosine Kinases Involved in Tumor Progression and Angiogenesis BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the Pr. *Cancer Res* 64: 7099–7109, 2004
 54. Kießling MK, Oberholzer PA, Mondal C, Karpova MB, Zipser MC, Lin WM, Girardi M, MacConaill LE, Kehoe SM, Hatton C, French LE, Garraway LA, Polier G, Süß D, Klemke CD, Krammer PH, Gülow K, Dummer R: High-throughput mutation profiling of CTCL samples reveals KRAS and NRAS mutations sensitizing tumors toward inhibition of the RAS/RAF/MEK signaling cascade. *Blood* 117: 2433–2440, 2011
 55. Kießling MK, Nicolay JP, Schlör T, Klemke C-D, Süß D, Krammer PH, Gülow

- K: NRAS mutations in cutaneous T cell lymphoma (CTCL) sensitize tumors towards treatment with the multikinase inhibitor Sorafenib. *Oncotarget* 8: 45687–45697, 2017
56. Duvic M, Pinter-brown LC, Foss FM, Sokol L, Jorgensen JL, Challagundla P, Dwyer KM, Zhang X, Kurman MR, Ballerini R, Liu L, Kim YH: Phase 1 / 2 study of mogamulizumab , a defucosylated anti-CCR4 antibody , in previously treated patients with cutaneous T-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 125: 1883–1890, 2015
57. European Medicines Agency: European Medicines Agency - Adcetris, Letztes Update 13.03.2019, Zugriff: 26.08.2019 [Internet]. 2019 Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000722/human_med_000865.jsp [cited 2019 Aug 26]
58. J. F. R. KERR* AHWAARCurrie: Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide- Ranging Implications in Tissue Kinetics. *J. Intern. Med.* 258: 479–517, 1972
59. Huang DCS, Hahne M, Schroeter M, Frei K, Fontana A, Villunger A, Newton K, Tschopp J, Strasser A: Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-xL. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 14871–14876, 1999
60. Guicciardi ME, Gores GJ: Life and death by death receptors. *FASEB J.* 23: 1625–1637, 2009
61. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DCS: Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell* 17: 393–403, 2005
62. Chittenden T: BH3 domains: Intracellular death-ligands critical for initiating apoptosis. *Cancer Cell* 2: 165–166, 2002
63. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM: Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 49–63, 2014
64. Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, Delft MF van, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DCS: Apoptosis Initiated When BH3 Ligands Engage Multiple Bcl-2 Homologs, Not Bax or Bak. *Science (80-.).* 315: 856–859, 2007
65. Ni X, Zhang C, Talpur R, Duvic M: Resistance to activation-induced cell death and bystander cytotoxicity via the Fas/Fas ligand pathway are implicated in the pathogenesis of cutaneous T cell lymphomas. *J. Invest. Dermatol.* 124: 741–750, 2005
66. Klemke CD, Brenner D, Weiß EM, Schmidt M, Leverkus M, Gülow K, Krammer PH: Lack of T-cell receptor-induced signaling is crucial for CD95 ligand up-regulation and protects cutaneous T-cell lymphoma cells from activation-induced

- cell death. *Cancer Res.* 69: 4175–4183, 2009
67. Giri DK, Aggarwal BB: Constitutive activation of NF-kappaB causes resistance to apoptosis in human cutaneous T cell lymphoma HuT-78 cells. Autocrine role of tumor necrosis factor and reactive oxygen intermediates. *J. Biol. Chem.* 273: 14008–14014, 1998
68. Thanos D, Maniatis T: NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* 80: 529–32, 1995
69. Didonato JA, Mercurio F, Karin M: NF-κB and the link between inflammation and cancer. *Immunol. Rev.* 246: 379–400, 2012
70. Xia Y, Shen S, Verma IM: NF- B, an Active Player in Human Cancers. *Cancer Immunol. Res.* 2: 823–830, 2014
71. Chang T, Vancurova I: NFκB function and regulation in cutaneous T-cell lymphoma. 3: 433–445, 2013
72. Kiessling MK, Klemke CD, Kamiriski MM, Galani IE, Krammer PH, Giiow K: Inhibition of constitutively activated nuclear factor-K,B induces reactive oxygen species- and iron-dependent cell death in cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Res.* 69: 2365–2374, 2009
73. Zhang C, Li B, Zhang X, Hazarika P, Aggarwal BB, Duvic M: Curcumin selectively induces apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cell lines and patients PBMCs: Potential role for STAT-3 and NF-B signaling. *J. Invest. Dermatol.* 130: 2110–2119, 2010
74. Braun FK, Al-Yacoub N, Plötz M, Möbs M, Sterry W, Eberle J: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cells and enhance their sensitivity for TNF-related apoptosis-inducing ligand. *J. Invest. Dermatol.* 132: 429–439, 2012
75. Sors A, Jean-louis F, Pellet C, Laroche L, Dubertret L, Courtois G, Bachelez H, Michel L, Dc W: Down-regulating constitutive activation of the NF- κ B canonical pathway overcomes the resistance of cutaneous T-cell lymphoma to apoptosis Down-regulating constitutive activation of the NF- □ B canonical pathway overcomes the resistance of cutaneous T-ce. 107: 2354–2363, 2012
76. Meissner M, Valesky EM, Kippenberger S, Kaufmann R: Dimethyl fumarate - only an anti-psoriatic medication? *JDDG J. der Dtsch. Dermatologischen Gesellschaft* 10: 793–801, 2012
77. Loewe R, Valero T, Kremling S, Pratscher B, Kunstfeld R, Pehamberger H, Petzelbauer P: Dimethylfumarate impairs melanoma growth and metastasis. *Cancer Res.* 66: 11888–11896, 2006
78. Nicolay JP, Müller-Decker K, Schroeder A, Brechmann M, Möbs M, Géraud C, Assaf C, Goerdts S, Krammer PH, Gülow K: Dimethyl fumarate restores apoptosis sensitivity and inhibits tumor growth and metastasis in CTCL by targeting NF-

- κB. *Blood* 128: 805–815, 2016
79. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny M V., Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Núñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G: Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 19: 107–120, 2012
 80. Vaux DL, Cory S, Adams JM: Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335: 440–442, 1988
 81. Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Levenson JD, Souers AJ: From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16: 273–284, 2017
 82. Dummer R, Michie SA, Kell D, Gould JW, Haeffner AC, Smoller BR, Warnke RA, Wood GS: Expression of bcl-2 protein and Ki-67 nuclear proliferation antigen in benign and malignant cutaneous T-cell infiltrates. *J. Cutan. Pathol.* 22: 11–17, 1995
 83. Delbridge ARD, Strasser A: The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ.* 22: 1071–1080, 2015
 84. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, Bruncko M, Deckwerth TL, Dinges J, Hajduk PJ, Joseph MK, Kitada S, Korsmeyer SJ, Kunzer AR, Letai A, Li C, Mitten MJ, Nettlesheim DG, Ng SC, Nimmer PM, O'Connor JM, Oleksijew A, Petros AM, Reed JC, Shen W, Tahir SK, Thompson CB, Tomaselli KJ, Wang B, Wendt MD, Zhang H, Fesik SW, Rosenberg SH: An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435: 677–681, 2005
 85. Wilson WH, O'Connor O a., Czuczman MS, LaCasce AS, Gerecitano JF, Leonard JP, Tulpule A, Dunleavy K, Xiong H, Chiu YL, Cui Y, Busman T, Elmore SW, Rosenberg SH, Krivoshik AP, Enschede SH, Humerickhouse R a.: Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: A phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity. *Lancet Oncol.* 11: 1149–1159, 2010
 86. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, Dayton BD, Ding H, Enschede SH, Fairbrother WJ, Huang DCS, Hymowitz SG, Jin S, Khaw SL, Kovar PJ, Lam LT, Lee J, Maecker HL, Marsh KC, Mason KD, Mitten MJ, Nimmer PM, Oleksijew A, Park CH, Park C-M, Phillips DC, Roberts AW, Sampath D, Seymour JF, Smith ML, Sullivan GM, Tahir SK, Tse C, Wendt MD, Xiao Y, Xue JC, Zhang H, Humerickhouse R a, Rosenberg SH, Elmore SW: ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* 19: 202–8, 2013

87. Davids MS, Letai A: ABT-199: Taking Dead Aim at BCL-2. *Cancer Cell* 23: 139–141, 2013
88. Mihalyova J, Jelinek T, Growkova K, Hrdinka M, Simicek M, Hajek R: Venetoclax: A new wave in hematocology. *Exp. Hematol.* 61: 10–25, 2018
89. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, Kipps TJ, Anderson MA, Brown JR, Gressick L, Wong S, Dunbar M, Zhu M, Desai MB, Cerri E, Heitner Enschede S, Humerickhouse RA, Wierda WG, Seymour JF: Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 374: 311–322, 2016
90. Davids MS, Roberts AW, Seymour JF, Pagel JM, Kahl BS, Wierda WG, Puvvada S, Kipps TJ, Anderson MA, Salem AH, Dunbar M, Zhu M, Peale F, Ross JA, Gressick L, Desai M, Kim SY, Verdugo M, Humerickhouse RA, Gordon GB, Gerecitano JF: Phase i first-in-human study of venetoclax in patients with relapsed or refractory non-hodgkin lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 35: 826–833, 2017
91. Kumar S, Kaufman JL, Gasparetto C, Mikhael J, Vij R, Pegourie B, Benboubker L, Facon T, Amiot M, Moreau P, Punnoose EA, Alzate S, Dunbar M, Xu T, Agarwal SK, Enschede SH, Levenson JD, Ross JA, Maciag PC, Verdugo M, Touzeau C: Efficacy of venetoclax as targeted therapy for relapsed/refractory t(11;14) multiple myeloma. *Blood* 130: 2401–2409, 2017
92. Seymour PJF, Ma S, Brander DM, Choi MY, Barrientos J, Davids MS, Anderson MA, Anne W, Rosen PST, Tam CS, Prine B, Suresh K: Venetoclax plus rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia: a phase 1b study. *Lancet Oncol.* 18: 230–240, 2017
93. JC R, T M, S T, HG W, T S, S K, C A-S, S B, S K, M H: BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J Cell Biochem* 60: 23–32, 1996
94. Jung JT, Kim DH, Kwak EK, Kim JG, Park TI, Sohn SK, Do YR, Kwon KY, Song HS, Park EH, Lee KB: Clinical role of Bcl-2, Bax, or p53 overexpression in peripheral T-cell lymphomas. *Ann. Hematol.* 85: 575–581, 2006
95. Nielsen M, Kæstel CG, Eriksen KW, Woetmann A, Stokkedal T, Kalsoft K, Geisler C, Röpke C, ØDum N: Inhibition of constitutively activated Stat3 correlates with altered Bcl-2/Bax expression and induction of apoptosis in mycosis fungoides tumor cells. *Leukemia* 13: 735–738, 1999
96. Weed J, Gibson J, Lewis J, Carlson K, Foss F, Choi J, Li P, Girardi M: FISH panel for leukemic CTCL Jason. 179: 95–105, 2017
97. Lindahl LM, Fredholm S, Joseph C, Nielsen BS, Jønson L, Willerslev-Olsen A, Gluud M, Blümel E, Petersen DL, Sibbesen N, Hu T, Nastasi C, Krejsgaard T, Jæhger D, Persson JL, Mongan N, Wasik MA, Litvinov I V., Sasseville D, Koralov SB, Bonfeld CM, Geisler C, Woetmann A, Ralfkiaer E, Iversen L, Odum N: STAT5 induces miR-21 expression in cutaneous T cell lymphoma. *Oncotarget*

7: 2014

98. Qin J-Z, Zhang C-L, Kamarashev J, Dummer R, Burg G, Döbbeling U: Interleukin-7 and interleukin-15 regulate the expression of the bcl-2 and c-myc genes in cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood* 98: 2778–2783, 2001
99. Cyrenne BM, Lewis JM, Weed JG, Carlson KR, Mirza FN, Foss FM, Girardi M: Synergy of BCL2 and histone deacetylase inhibition against leukemic cells from cutaneous T-cell lymphoma patients. *Blood* 130: 2073–2083, 2017
100. Anleitung Biocoll-Trennlösung, Zugriff 31.08.19 [Internet]. Available from: http://www.biochrom.de/fileadmin/user_upload/service/produktinformation/deutsch/BC_Katalog_72_73_Biocoll.pdf
101. Faustino-Rocha A, Oliveira PA, Pinho-Oliveira J, Teixeira-Guedes C, Soares-Maia R, da Costa RG, Colaço B, Pires MJ, Colaço J, Ferreira R, Ginja M: Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements. *Lab Anim. (NY)*. 42: 217–224, 2013
102. Froehlich TC, Müller-Decker K, Braun JD, Albrecht T, Schroeder A, Gülow K, Goerdts S, Krammer PH, Nicolay JP: Combined inhibition of Bcl-2 and NFκB synergistically induces cell death and limits xenograft mouse tumor growth in CTCL. *Blood* 134: blood.2019001545, 2019
103. Karin M, Ben-neriah Y: PHOSPHORYLATION MEETS UBIQUITINATION: The Control of NF-κB Activity. 621–663, 2000
104. Juvekar A, Manna S, Ramaswami S, Chang T-P, Vu H-Y, Ghosh CC, Celiker MY, Vancurova I: Bortezomib induces nuclear translocation of IκBα resulting in gene-specific suppression of NF-κB--dependent transcription and induction of apoptosis in CTCL. *Mol. Cancer Res.* 9: 183–194, 2011
105. Kaltoft K, Bisballe S, Rasmussen HF, Thestrup-Pedersen K, Thomsen K, Sterry W: A continuous T-cell line from a patient with Sézary syndrome. *Arch. Dermatol. Res.* 279: 293–298, 1987
106. Nicolay JP, Felcht M, Schledzewski K, Géraud C: Sézary syndrome: old enigmas, new targets. 256–264, 2016
107. Schroeder A, Warnken U, Röth D, Klika KD, Vobis D, Barnert A, Bujupi F, Oberacker T, Schnölzer M, Nicolay JP, Krammer PH, Gülow K: Targeting Thioredoxin-1 by dimethyl fumarate induces ripoptosome-mediated cell death. *Nat. Publ. Gr.* 1–12, 2017
108. Kießling MK, Nicolay JP, Schlör T, Klemke C-D, Süss D, Krammer PH, Gülow K: NRAS mutations in cutaneous T cell lymphoma (CTCL) sensitize tumors towards treatment with the multikinase inhibitor Sorafenib. *Oncotarget* 8: 2017
109. Li Q, Cheng L, Shen K, Jin H, Li H, Cheng Y, Ma X: Efficacy and Safety of Bcl-2 Inhibitor Venetoclax in Hematological Malignancy: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *Front. Pharmacol.* 10: 1–12, 2019

110. Fischer K, Al-Sawaf O, Bahlo J, Fink A-M, Tandon M, Dixon M, Robrecht S, Warburton S, Humphrey K, Samoylova O, Liberati AM, Pinilla-Ibarz J, Opat S, Sivcheva L, Le Dû K, Fogliatto LM, Niemann CU, Weinkove R, Robinson S, Kipps TJ, Boettcher S, Tausch E, Humerickhouse R, Eichhorst B, Wendtner C-M, Langerak AW, Kreuzer K-A, Ritgen M, Goede V, Stilgenbauer S, Mobasher M, Hallek M: Venetoclax and Obinutuzumab in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *N. Engl. J. Med.* NEJMoa1815281, 2019
111. Cyrenne BM, Lewis JM, Weed JG, Carlson KR, Mirza FN, Foss FM, Girardi M: Synergy of BCL2 and histone deacetylase inhibition against leukemic cells from cutaneous T-cell lymphoma patients. *130: 2073–2084*, 2018
112. Chu SH, Lim JW, Kim DG, Lee E-S, Kim KH, Kim H: Down-regulation of Bcl-2 is mediated by NF- κ B activation in Helicobacter pylori-induced apoptosis of gastric epithelial cells. *Scand. J. Gastroenterol.* 46: 148–155, 2011
113. Alam M, Kashyap T, Pramanik KK, Singh AK: The elevated activation of NF κ B and AP-1 is correlated with differential regulation of Bcl-2 and associated with oral squamous cell carcinoma progression and resistance. *2721–2731*, 2017
114. Kato Y, Egusa C, Maeda T, Tsuboi R: Combination of retinoid and histone deacetylase inhibitor produced an anti-tumor effect in cutaneous T-cell lymphoma by restoring tumor suppressor gene , retinoic acid receptor b 2 , via histone acetylation. *J. Dermatol. Sci.* 81: 17–25, 2016
115. Fits L Van Der, Rebel HG, Out-luizing JJ, Pouw SM, Smit F, Kim G, Zijl L Van, Tensen CP, Weijer K, Vermeer MH: Sézary Syndrome using A novel mouse model for Sézary cells into immunodeficient RAG2 Δ / Δ xenotransplantation of Se c c Δ / Δ mice. *706–709*, 2012
116. Netchiporouk E, Gantchev J, Tsang M, Thibault P, Watters AK, Hughes JM, Ghazawi FM, Ødum N, Sasseville D, Litvinov I V: Analysis of CTCL cell lines reveals important differences between lines. *8: 95981–95998*, 2017
117. Bachmann MF, Oxenius A: Interleukin 2: From immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Rep.* 8: 1142–1148, 2007
118. European Medicines Agency: Fachinformation Venetoclax, Zugriff: 22.09.2019.
119. Fresquet V, Rieger M, Carolis C, García-barchino MJ, Jose A, Fresquet V, Rieger M, Carolis C, Garc MJ, Martinez-climent JA: Acquired mutations in BCL2 family proteins conferring resistance to the BH3 mimetic ABT-199 in lymphoma Acquired mutations in BCL2 family proteins conferring resistance to the BH3 mimetic ABT-199 in lymphoma. *123: 4111–4119*, 2014
120. Tahir SK, Smith ML, Hessler P, Rapp LR, Idler KB, Park CH, Levenson JD, Lam LT: Potential mechanisms of resistance to venetoclax and strategies to circumvent it. *BMC Cancer* 17: 1–10, 2017
121. Davids MS, Hallek M, Wierda W, Roberts AW, Stilgenbauer S, Jones JA,

Gerecitano JF, Kim SY, Potluri J, Busman T, Best A, Verdugo ME, Cerri E, Desai M, Hillmen P, Seymour JF: Comprehensive Safety Analysis of Venetoclax Monotherapy for Patients with Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2018

6.1 Publikationsliste

Froehlich TC, Müller-Decker K, Braun JD, Albrecht T, Schroeder A, Gülow K, Goerd S, Krammer PH, Nicolay JP: Combined inhibition of Bcl-2 and NFκB synergistically induces cell death and limits xenograft mouse tumor growth in CTCL. *Blood* 134: blood.2019001545, 2019

Kießling MK, Nicolay JP, **Schlör T**¹, Klemke C-D, Süss D, Krammer PH, Gülow K: NRAS mutations in cutaneous T cell lymphoma (CTCL) sensitize tumors towards treatment with the multikinase inhibitor Sorafenib. *Oncotarget* 8: 45687–45697, 2017

¹Unter Geburtsnamen verfasst

7 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name: Tabea Constanze Fröhlich, geb. Schlör
Geburtsdatum: 29.08.1993
Geburtsort: Oldenburg (Oldb)
Familienstand: verheiratet
Vater: Dr. rer. nat. Rainer Schlör
Mutter: Elsa Funk-Schlör

SCHULISCHER WERDEGANG

2002 – 2011 Helmholtz-Gymnasium Bonn
24.06.2011 Allgemeine Hochschulreife, Note 1,1

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

2011 – 2018 Studium der Humanmedizin
Medizinische Fakultät Mannheim der Universität
Heidelberg, Gesamtnote gut
17.09.2013 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
06.04.2017 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
13.06.2018 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)
14.07.2018 Approbation als Ärztin

BERUFLICHER WERDEGANG

Seit 11/2018 Assistenzärztin in der Klinik für Hämatologie, Onkologie,
Hämostaseologie und Stammzelltransplantation
Medizinische Hochschule Hannover

WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG

2014 - 2015 Junior Scientific Masterclass unter der Leitung von Prof.
Dr. med. Hans-Peter Hammes, Medizinische Fakultät
Mannheim

2015 – 2020 Dissertation an der Klinik für Dermatologie, Venerologie
und Allergologie der Universitätsmedizin Mannheim unter
Prof. Dr. med. Jan P. Nicolay

09/2017 Vortrag im Rahmen des 26. Deutschen
Hautkrebskongresses „Bcl-2 als Therapieansatz bei
kutanen T-Zell-Lymphomen“

8 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. med. Sergij Goerdts und Herrn Prof. Dr. med. Peter Krammer für die Bereitstellung der Arbeitsplätze in der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universitätsmedizin Mannheim und in der Abteilung für Immungenetik des Deutschen Krebsforschungszentrums
- Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Jan P. Nicolay für die Vergabe des Forschungsthemas und die immerzu engagierte Betreuung bei den Experimenten, der Publikation und der Vollendung dieser Dissertation
- Frau PD Dr. rer. nat. Karin Müller-Decker und den Mitarbeitern der Abteilung Tumormodelle des Deutschen Krebsforschungszentrums für die Kooperation bei der Durchführung der Tierversuche
- Herrn PD Dr. rer. nat. Karsten Gülow, Frau Jana Braun, Herrn Dr. med. Thomas Albrecht und Frau Dr. rer. nat. Anne Schröder für die Mitarbeit bei der Datengenerierung und der Erstellung und Finalisierung der zugehörigen Publikation
- Hiltrud Schönhaber und Jochen Weber für die umfangreiche und geduldige Hilfe bei den ersten Laborversuchen
- Meinen Freunden, insbesondere Jonas Heckeley, Patrick Kiesewetter und Kathrin Metzger für die vielfältige Unterstützung während der Erstellung der Arbeit und darüber hinaus
- Kilian Fröhlich, Sebastian Schlör und meinen Eltern Elsa Funk-Schlör und Rainer Schlör für ihren bedingungslosen und immerwährenden Rückhalt