

Strategien zur Überwindung apoptotischer Resistenz in der chronischen lymphatischen Leukämie

Autor: Nils Lilienthal

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL), die häufigste Leukämie in der westlichen Welt, wird bis zum heutigen Tage als unheilbar durch konventionelle therapeutische Ansätze betrachtet. Obwohl die CLL biologisch und klinisch gesehen eine sehr heterogene Erkrankung ist, vereint sie ein besonderes Merkmal – eine ausgesprochen niedrige Rate an spontanem und medikamentös-induziertem Zelltod. Dieses Merkmal verleiht ihr einen breit angelegten Schutz gegen eine Vielzahl verfügbarer Chemotherapeutika. Da dies die Therapie der CLL nachhaltig negativ beeinflusst, sind Strategien, die diese apoptotische Resistenz überwinden können von besonderem Interesse.

Es wird vermutet, dass der Tumorsuppressor Death-associated protein kinase 1 (DAPK1) eine Schlüsselrolle bei der Verleihung dieser stark ausgeprägten Resistenz in der CLL einnimmt. Die DAPK1 Aktivität ist durch epigenetische Mechanismen und Mutationen in etwa 98% der CLL Patienten über alle molekularen und klinischen Subgruppen hinweg gestört. Als ein weiterer häufiger Grund für die abnormale Überlebensfähigkeit von Tumorzellen in der CLL wird die Überexpression des Onkogens T-cell leukemia 1 (TCL1) angenommen. Dieses Molekül agiert als Co-Aktivatoren der überlebensfördernden AKT Kinase. Folglich bedeutet dies, dass die apoptotische Resistenz der CLL Zellen von der Defizienz des DAPK1 Tumorsuppressors und der Aktivierung der onkogenen TCL1/AKT Achse abhängt. Strategien, die auf eine Wiederherstellung der apoptotischen Sensitivität durch Unterbrechung dieser malignen Signalwege hinzielen, wird daher großes therapeutisches Potential beigemessen. Diese Doktorarbeit zeigt anhand von vielsprechenden Daten neue Wege und Strategien auf diese zentralen apoptotische Resistenz-vermittelnden Signalwege in der CLL zu stören.

Im Einzelnen konnte nachgewiesen werden, dass TCL1 die Chemotherapeutikaresistenz erhöht. Um TCL1 in seiner AKT co-aktivierenden Aktivität entgegen zu wirken wurden 20AA-lange Peptide entwickelt, die der TCL1-Interaktionsdomäne mit AKT nachempfunden wurden. Diese Peptide waren in der Lage: (1) die AKT-Kinaseaktivität *in vitro* in Kinaseassays zu reduzieren, (2) die onkogene TCL1-AKT Interaktion zu behindern, und (3) Zelltod in primären CLL-Zellen sowie TCL1(+) und TCL1(-) Zelllinien zu induzieren.

Um dem Fehlen von DAPK1 therapeutisch zu begegnen wurde in einem Ansatz zur Machbarkeit und Nachweises des Wirkungsprinzips DAPK1 CLL-spezifisch rekonstituiert.

Hierbei wurde zunächst die fehlende DAPK1 und DAPK2 Proteinexpression in der Mehrzahl der getesteten CLL Proben nachgewiesen, eine ganze Reihe konstitutiv aktiver DAPK Mutanten (u.a. DK1KD) erzeugt und ihre Fähigkeit zur Zelltod-Induktion nach Überexpression in B-Tumorzelllinien bewiesen. Um die potenteste DAPK1 Mutante DK1KD spezifisch ins Innere von CLL-Zellen einzubringen, wurde diese mit verschiedenen internalisierenden Liganden fusioniert (u.a. anti-CD22 scFv SGIII). Das resultierende Fusionsprotein DK1KD-SGIII (1) wurde über FPLC-basierte IMAC und CEC aufgereinigt, (2) anschließend in der Massenspektrometrieanalyse eindeutig nachgewiesen und (3) konnte Zielzell-spezifisch an CD22(+)-Zellen binden und internalisieren. (4) Darüber hinaus zeigte rekombinante, aufgereinigte DK1KD-SGIII Kinaseaktivität in *in vitro* Kinaseaktivitätsassays und (5) konnte dosis-abhängig in verschiedenen B-Zelllinien und primären CLL Proben, unabhängig derer Resistenz gegenüber dem konventionellen Therapeutikum Fludarabin, Apoptose induzieren.

Zusammenfassend lässt sich daher festhalten, dass unsere Ergebnisse eindrucksvoll zeigen, dass sowohl die Inhibition der TCL1/AKT Interaktion als auch die Rekonstitution des Tumorsuppressors DAPK1 in CLL Zellen die apoptotische Resistenz überwinden können und somit großes Potential für die Behandlung der CLL zeigen.