

Do BCL6 mutations reduce susceptibility of CLL cells to induction of apoptosis during therapy?

Besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen Mutationen von BCL6 und dem Therapieerfolg bei CLL PatientInnen?

*Ao. Univ. Prof. Dr. Jozefa Gadek-Wesierski, Univ. Prof. Dr. Ulrich Jäger,
Dr.ⁱⁿ Karin Fleiss, Dr.ⁱⁿ Roxana Komina*

Ausgangssituation

Die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) ist die häufigste Leukämieform bei Erwachsenen [1-8]. Konventionelle Medikamente haben sich als wenig wirksam erwiesen, da CLL Zellen primär einen Defekt im apoptotischen Pathway aufweisen. In den letzten Jahren wurden neue Mittel bzw. neue Kombinationsstrategien entwickelt. Trotz dieser positiven Entwicklung sprechen nicht alle Patienten auf die neuen Therapieansätze an. Dies ist hauptsächlich auf eine verstärkte Expression von Inhibitoren der Apoptose und auf die Deregulation der pro-apoptotischen Signalwege zurückzuführen. Da die meisten CLL Zellen in G0/G1 arretiert sind und sich nicht vermehren können, kann die Eliminierung der malignen Zellen über die Induktion des Zelltodes als therapeutischer Erfolg gewertet werden. Es ist bekannt, dass anti-Krebsmedikamente verschiedene Signalwege ansprechen, die unter anderem zur Nekrose bzw. zur Apoptose führen können. Es ist daher wichtig den genauen Ausgang der Therapie zu bestimmen.

Das BCL6 Gen ist bei Patienten mit B-Zell Lymphomen sehr oft mutiert oder überexprimiert [9-19]. BCL6, ein Transkriptionsfaktor, verursacht eine Differenzierungsblockade über die Suppression des BLIMP-1 (B-Lymphocyte Induced Maturation Protein-1) Gens. Das BLIMP-1 Protein ist ein Masterregulator für die Plasmazelldifferenzierung. Zusätzlich zur Blockade der terminalen Differenzierung der B-Zellen scheint BCL6 auch die Proliferation von B-Zellen steigern zu können. Darüber hinaus hat BCL6 eine starke anti-apoptotische Funktion. BCL6 führt zur Suppression des p53 Tumorsuppressorproteins [20-21]. Da das wt p53 Protein über mehrere Mechanismen Apoptose induziert, führt die BCL6-medierte Suppression von p53 zusätzlich zur Blockade der apoptotischen Kaskade.

Ziele / Methoden

Ziel dieses Forschungsvorhabens war es zu untersuchen, ob Therapie-resistente CLL Patienten im Vergleich zu gut therapierbaren Patienten einen veränderten Status des BCL6 Transkriptionsfaktors aufweisen. Die medikamentöse Induzierbarkeit der Apoptose in den leukämischen Zellen wurde als Indikator des therapeutischen Erfolgs gewählt. Zur Erfassung der Veränderungen der Apoptosenrate sollte eine neue Methode etabliert werden. Anhand der Veränderungen der Apoptosenrate im Zuge der Behandlung von CLL Patienten sollten die Therapie-resistenten und gut therapierbaren CLL Patienten identifiziert werden. Im Anschluss daran sollte der Status des BCL6 Transkriptionsfaktors in beiden Patientengruppen bestimmt werden.

Als experimentelles Modell wurden Lymphozytenzellkulturen gewählt. Die isolierten Zellen wurden mit oder ohne Medikamente kultiviert. Danach wurde die Vitalität der Zellen mittels CellTiterGLO™ (Promega) bestimmt und die Aktivität der Caspasen in den Zellen sowie im Medium gemessen [22]. Darüber hinaus wurde die Expression und Status bestimmter zellulärer Faktoren mittels Immunoblotting bestimmt. Lymphozyten wurden aus Blutproben von Patienten mit CLL (B-CLL) und gesunden Probanden isoliert [22-23]. Die Aktivität der Caspasen wurde mittels Caspase-GLO und APO-ONE Homogenous Caspase-3/7 Assay (Promega, Madison, WI) zusätzlich in Plasma von Patienten mit CLL (B-CLL) und gesunden Probanden gemessen

Ergebnisse

1. CLL Zellen sezernieren aktivierte Effektor Caspasen ins Kulturmedium:

Um die Relation zwischen behandlungsbedingter Induktion der Apoptose in den CLL Zellen und Sezernierung der aktivierten Caspasen zu erfassen, wurden Modellversuche mit kultivierten CLL Zellen durchgeführt. Die Aktivierung der Caspasen-3/7 infolge der Behandlung wurde sowohl in den Zellen als auch im Kulturüberstand bestimmt.

2. Die stärkste Caspasenaktivierung korreliert mit der Zahl der apoptotischen CLL Zellen:

Die stärkste Aktivierung der Induktor- und Effektorcaspasen wurde nach der Behandlung mit ROSC festgestellt. Die Analyse der Zellmorphologie zeigte, dass nach der Behandlung mit ROSC die Zahl der Zellen mit dem, für die Apoptose charakteristischen segregierten Chromatin, am höchsten war.

3. Die Aktivierung der Caspasen korreliert mit den Veränderungen in den zellulären Regulatoren der Apoptose:

Die Aktivierung der Caspase-3 in den CLL Zellen wurde auch funktionell bestätigt. Die höchste Aktivierung der Caspase-3 (Abb. 1) nach der Behandlung mit ROSC führte zur völligen Spaltung des Kernenzym Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 (PARP-1) und infolge dessen zur Akkumulation des 89 kD Carboxy-terminalen Spaltprodukts. In der Kontrolle konnte lediglich die intakte Form (full length) bei 116 kD detektiert werden.

4. Keine Induktion der Apoptose und keine Caspasenaktivierung in normalen Lymphozyten:

ROSC, der wirksamste Apoptoseinduktor in CLL Zellen zeigte lediglich eine sehr schwache Wirkung bei der Behandlung normaler Lymphozyten.

Die oben gezeigten Resultate haben folgendes bestätigt:

- Die Messung der Caspasenaktivität reflektiert die Induktion der Apoptose
- Aktivierte Caspasen werden aus den apoptotischen CLL Zellen sezerniert

Sie bildeten eine fundierte Grundlage für die Bestimmung der Caspaseaktivität in Serum vom CLL Patienten. Diese Resultate lassen den Schluss zu, dass im Zuge der Apoptose aufgrund der Therapie, die in den CLL Zellen aktivierten Caspasen auch sezerniert und im Plasma nachgewiesen werden können.

5. Höhe basale Caspaseaktivität in Sera von CLL Patienten:

Die Resultate zeigen eine geringe basale Aktivität der Caspase-3 in Proben von gesunden Probanden. Im Gegensatz dazu zeigen CLL Patienten eine deutlich höhere basale Aktivität der Caspase-3 (bis zu 10-fach). Aufgrund beträchtlicher Unterschiede in der basalen Aktivität der Caspase-3 wurden die Patienten in 2 Gruppen unterteilt: in eine mit niedrigem und eine mit hohem basalen Level. Diese Unterschiede scheinen Differenzen in der spontanen Apoptosenrate widerzuspiegeln.

6. Veränderungen der Aktivität der Caspase-3 in CLL nach der Behandlung:

Anschließend wurde die Aktivität der Caspase-3 in den Proben vor und nach der Therapie verglichen. Bei einigen CLL Patienten (No. 2, 10 und 17) konnte ein Anstieg der enzymatischen Aktivität verzeichnet werden.

7. Aussagekraft der gemessenen Caspaseaktivitäten –Suche nach einer Korrelation mit Ansprechen der Patienten auf Therapie:

Die bis dahin erzielten Resultate wurden anschließend mit dem klinischen Therapieerfolg bei den jeweiligen Patienten verglichen. Es hat sich gezeigt, dass es, bei 2 Patienten, die einen Abfall der Caspase-3 Aktivität aufwiesen, zur Progression der Erkrankung kam.

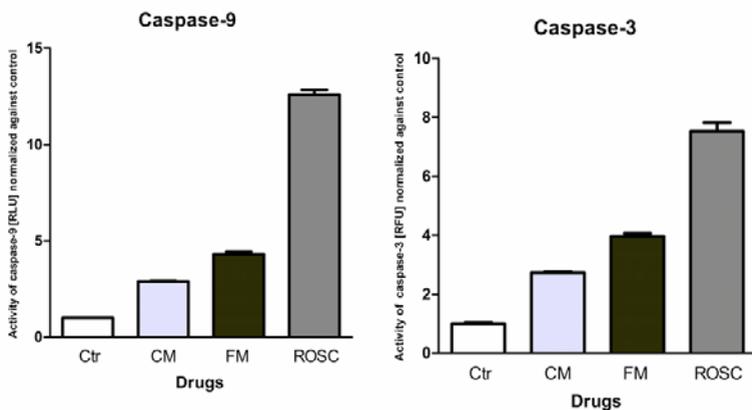


Abb. 1: CLL Zellen sezernieren aktivierte Effektor Caspasen ins Kulturmedium. CLL Zellen wurden mit Cladribine/Mafosfamid, Fludarabine/Mafosfamid oder Roscovitine (ROSC) inkubiert. Die Aktivität der Caspasen wurde im Kulturmedium bestimmt und auf die Zahl der vitalen Zellen normalisiert

Ausblick

Derzeit laufen Untersuchungen, um einen direkten kausalen Zusammenhang zwischen dem funktionellen Status des BCL6 Transkriptionsfaktors, insbesondere zwischen dem zellulären Spiegel und seinen post-translationalen Modifikationen, und der Apoptosenrate nach der Therapie zu erfassen. Die bisherigen Resultate waren sehr interessant und stellten somit die Basis für einen Antrag auf finanzielle Unterstützung an den Jubiläumsfonds der ÖNB.

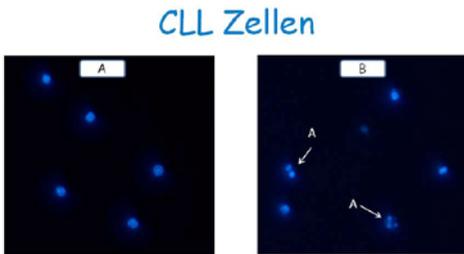


Abb. 2: ROSC induziert Kondensierung und Fragmentierung v. Chromatin in CLL Zellen. CLL Zellen wurden im Medium (A) oder mit 20 µM ROSC (B) 48 h inkubiert. Die Zellen wurden mit Hoechst angefärbt. Pfeile zeigen Zellen mit segregiertem Chromatin.

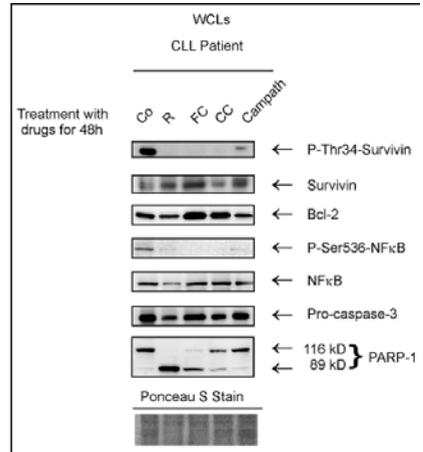


Abb. 3: Veränderungen in den zellulären Regulatoren der Apoptose. Proteine wurden in SDS Gelen aufgetrennt, geblotet und die spezifischen Antigene wurden mittels Immunoblotting detektiert.

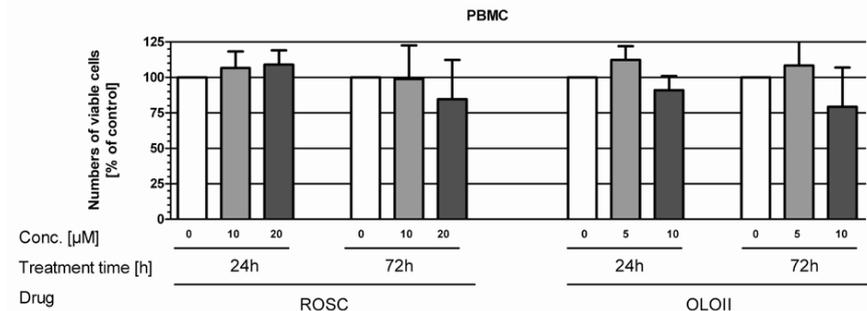


Abb. 4: Keine Induktion der Apoptose in ROSC-behandelten normalen Lymphozyten.

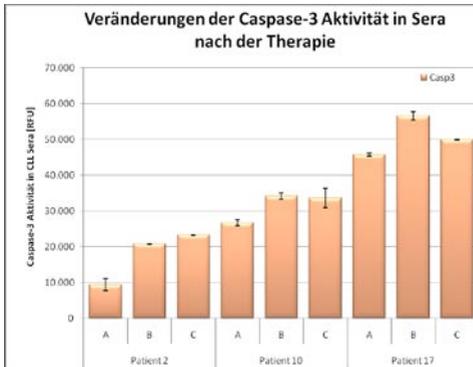


Abb. 5: Basale Aktivität der Caspase-3 in Sera von CLL Patienten. Aktivität der Caspase-3 wurde in Sera von gesunden Probanden (n=10) und von CLL Patienten (n=20) bestimmt.

Abb. 6: Aktivierung der Caspase-3 in Sera von CLL Patienten nach der Therapie. Bestimmung der enzymatischen Aktivität in Proben von Patienten vor der Therapie (A) und nach der Therapie (B und C).

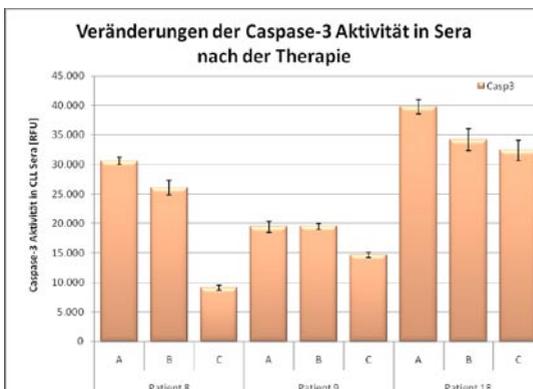
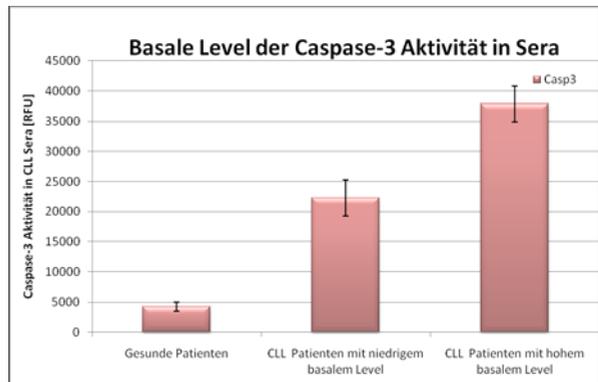


Abb. 7: Abnahme der aktiven Caspase-3 in Sera von CLL Patienten nach der Therapie. Bestimmung der enzymatischen Aktivität in Proben von Patienten vor der Therapie (A) und nach der Therapie (B und C).