

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	10
1 EINLEITUNG	15
1.1 Die chronische lymphatische Leukämie	15
1.1.1 Grundsätzliche Fakten.....	15
1.1.2 Stadieneinteilung der CLL nach Binet [8].....	16
1.1.3 Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie.....	16
1.2 Prognostische Marker in der CLL.....	17
1.2.1 IgV _H -Hypermutation	17
1.2.2 Expression von CD38.....	18
1.2.3 Expression von ZAP-70.....	18
1.2.4 Zytogenetik.....	19
1.3 Der B-Zell-Rezeptor (BCR).....	19
1.3.1 Aufbau und Struktur des B-Zell-Rezeptors	19
1.3.2 Intrazellulärer Signalweg nach Antigenbindung durch den BCR	21
1.3.3 Somatische Hypermutation.....	22
1.4 Bedeutung der Microarrays in der chronischen lymphatischen Leukämie.....	23
1.4.1 Genomweite Transkriptionsanalyse.....	23
1.4.2 Bedeutende Resultate von Microarray-Analysen in der CLL	23
1.4.3 Ziel der Microarray-Analyse in dieser Arbeit	24
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 Material.....	25
2.1.1 Geräte.....	25
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	27

2.1.3 Chemikalien, Bioreagenzien und fertig zum Gebrauch erhältliche Baukästen.....	28
2.1.4 Enzyme.....	30
2.1.5 Immunreagenzien, Proteine, Inhibitoren.....	30
2.1.6 Antibiotika.....	31
2.1.7 Antikörper.....	31
2.1.8 Primer, Nukleotide [71].....	32
2.1.9 Angesetzte Lösungen.....	33
2.1.10 Benutzte Software.....	36
2.2 Methoden.....	36
2.2.1 Patientenproben.....	36
2.2.2 Lymphozytenaufbereitung.....	37
2.2.2.1 Isolierung der Lymphozyten aus peripherem Blut.....	37
2.2.2.2 Immunomagnetische Isolierung von gesunden B-Lymphozyten (MACS).....	38
2.2.2.3 Zellzählung.....	41
2.2.3 Durchflusszytometrische Messung (FACS).....	41
2.2.3.1 Messung der Expression von IgM, IgG, CD79a, CD79b.....	42
2.2.3.2 Messung der Expression von CD38.....	43
2.2.3.3 Intrazelluläre Messung von ZAP-70.....	43
2.2.3.4 Messung und Analyse apoptotischer Zellen.....	44
2.2.4 Stimulationen.....	45
2.2.4.1 Stimulation mit anti-IgM Immunobeads.....	45
2.2.4.2 Stimulation mit anti-IgA Immunobeads.....	46
2.2.5 Extraktion und Aufbereitung von Nukleinsäuren.....	46
2.2.5.1 RNA-Isolation.....	46
2.2.5.2 Extraktion genomischer DNA.....	48
2.2.5.3 cDNA-Synthese.....	49
2.2.6 Microarray-Genexpressionsanalyse.....	49
2.2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	50
2.2.7.1 Bestimmung des IgV _H -Mutationsstatus.....	50
2.2.7.2 Agarose-Gel-Elektrophorese.....	51

2.2.7.3	Aufreinigung der PCR-Produkte	52
2.2.7.4	Sequenzierungs-PCR.....	52
2.2.7.5	Auswertung der Sequenzen	53
2.2.7.6	Real-Time-PCR (RT-PCR)	54
2.2.8	Zellkultur	55
2.2.9	Inhibition der Lipoproteinlipase (LPL)	56
2.2.9.1	Behandlung der Zellen mit Orlistat	56
2.2.9.2	Behandlung der Zellen mit Orlistat und Fludarabin.....	56
2.2.9.3	Messung apoptotischer Zellen.....	57
2.2.9.4	Viabilitätsprüfung mittels XTT-Assay	57
2.2.10	Nachweis von Proteinen	58
2.2.10.1	Herstellung von Proteinlysaten	58
2.2.10.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	58
2.2.10.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen	59
2.2.10.4	Western Blot.....	60
2.2.11	Statistik	61
3	ERGEBNISSE	64
3.1	Patientendaten	64
3.1.1	Daten der Patienten der Microarray-Genexpressionsanalyse	64
3.1.2	Daten der Patienten der Orlistat-Behandlung	65
3.2	Microarray-Genexpressionsanalyse.....	67
3.3	Lipoproteinlipase (LPL)	72
3.4	Einfluss von Orlistat auf CLL-Zellen.....	78
4	DISKUSSION	86
4.1	Microarray-Genexpressionsanalyse.....	86
4.2	Lipoproteinlipase (LPL)	90

4.3 Einfluss von Orlistat auf CLL-Zellen.....92

4.4 Ausblick94

5 ZUSAMMENFASSUNG.....96

6 SUMMARY97

7 LITERATURVERZEICHNIS98

8 ERKLÄRUNG ZU VORABVERÖFFENTLICHUNGEN 114

9 LEBENSLAUF..... 116