

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

III. Medizinische Klinik und Poliklinik des
Klinikums rechts der Isar

**Induktion von Apoptose, Zellzyklusarrest und
Differenzierung in AML-Zellen
durch Histondeacetylaseinhibitoren**

Sabine Dreyer-Schmitt

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Th. Licht

2. Univ.-Prof. Dr. J. G. Duyster

Die Dissertation wurde am 04.09.2008 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 22.07.2009 angenommen.

Für Florian
und meine Familie

*Wissenschaft lehrt nicht zu antworten;
sie lehrt zu fragen.*

Erwin Chargaff

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Akute myeloische Leukämien	1
1.2	Chromatinstruktur und transkriptionelle Regulation	4
1.3	Histondeacetylase-Inhibitoren	7
1.4	Zytostatika	11
1.5	Zellzyklus	13
1.5.1	Allgemeines	13
1.5.2	Regulationsmechanismen	13
1.5.2.1	p53	16
1.5.2.2	c-myc	17
1.6	Apoptose	17
1.6.1	Biologie des programmierten Zelltods	17
1.6.2	Regulationsmechanismen	19
1.6.2.1	Extrinsischer Weg	19
1.6.2.2	Caspase-Kaskade	19
1.6.2.3	Intrinsischer Weg	20
1.7	AML1/ETO- und PML/RAR α -Fusionsgen	22
1.8	Differenzierung	24
1.9	Resistenzgene	27
1.10	Zielsetzung	28
2	Material	30
2.1	Chemikalien	30
2.2	HDAC-Inhibitoren	31
2.3	Zytostatika	31
2.4	Zelllinien	31
2.5	Antikörper	33
2.5.1	Antikörper für Western Blots	33
2.5.2	gelabelte Antikörper für FACS	34
2.6	Molekularbiologische Kits	34
2.7	Standardgeräte	34
2.8	Häufig verwendete Lösungen, Puffer, Kulturmedien	35

3 Methoden.....	37
3.1 Arbeiten mit eukaryoten Zelllinien	37
3.1.1 Kultivierung der Zelllinien.....	37
3.1.2 Bestimmung der Zellzahl	37
3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	37
3.1.4 Reinigung der Zellen mit Ficoll	38
3.2 Proliferationsassay	38
3.2.1 Bestimmung der Stoffwechselaktivität am ELISA-Reader	38
3.2.2 Auswertung der Daten und Erstellung von Approximationskurven...	40
3.3 Durchflusszytometrische Methoden	40
3.3.1 AnnexinV-/Propidiumjodid-Messung.....	40
3.3.2 Zellzyklusanalyse	41
3.3.3 Bestimmung von Oberflächenantigenen.....	41
3.4 Proteinbiochemische Methoden	42
3.4.1 Herstellung von Zelllysaten und Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	42
3.4.2 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
3.4.3 Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran.....	43
3.4.4 Immunchemische Darstellung von transferierten Proteinen	44
3.5 Separation von CD34 ⁺ -Zellen.....	44
4 Ergebnisse	46
4.1 Bestimmung der Stoffwechselaktivität von AML-Zellen im MTT-Assay	46
4.1.1 Zytotoxizität der HDAC-Inhibitoren auf AML-Zellen.....	46
4.1.2 Korrelation der IC ₅₀ -Werte von TSA und SAHA.....	49
4.1.3 Behandlung der Leukämiezellen mit Zytostatika	50
4.1.4 Unterschiedliche Sensibilität der AML-Zellen gegenüber Zytostatika und fehlende Korrelation zwischen Zytostatika und HDAC-Inhibitoren	51
4.2 Behandlung der Zelllinien mit SAHA	53
4.2.1 Induktion eines Zellzyklusarrests.....	53
4.2.2 Induktion von Apoptose	57
4.3 Charakterisierung von Zellzyklus-regulierenden und Apoptose- induzierenden Proteinen mittels Western Blot.....	58

4.3.1	Zellzyklusassoziierte Proteine	58
4.3.2	An den Übergängen der Zellzyklusphasen beteiligte Proteine	60
4.3.3	Apoptose-assoziierte Proteine.....	62
4.4	Korrelationen zwischen nativen Proteinexpressionen und Induktion von Apoptose oder Zellzyklusarrest durch SAHA	64
4.4.1	Apoptoseinduktion und Expression von FAS, DR4 und Bad	64
4.4.2	p53 und Rb bzw. p53 und Bcl-2.....	65
4.4.3	p53 und Zellzyklus- bzw. Apoptoseinduktion.....	65
4.5	Bestimmung von Oberflächenstrukturen auf AML-Zelllinien.....	66
4.5.1	Die Zelllinie CMK.....	66
4.5.1.1	Induktion von Differenzierung in CMK.....	66
4.5.1.2	Bestimmung der Resistenzgene auf CMK	68
4.5.2	Expression von Oberflächenmarkern auf den Erythroleukämien TF-1 und HEL	69
4.5.3	Expression von Resistenzgenen in AML-Zellen	70
5	Diskussion	72
5.1	Sensibilität von AML-Zellen gegenüber HDAC-Inhibitoren und Zytostatika.....	73
5.2	Sensibilität von CD34 ⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen gegenüber HDAC-Inhibitoren und Zytostatika.....	74
5.3	Induktion von Zellzyklusarrest	75
5.4	Induktion von Apoptose.....	78
5.5	Chromosomale Translokationen	80
5.6	Differenzierung	81
5.7	Resistenzgene	81
5.8	Klinischer Einsatz von HDAC-Inhibitoren	82
5.9	Schlussfolgerung und Ausblick	84
6	Zusammenfassung.....	85
7	Literaturverzeichnis	87
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	96
9	Danksagung.....	98

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABCC	„ATP-binding cassette, sub-family C“
A.d.	Aqua destillata
AIF	„apoptosis-inducing factor“
AK	Antikörper
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
Apaf-1	„apoptotic protease-activating factor 1“
APL	akute Promyelozytenleukämie
APS	Ammoniumpersulfat
Ara C	Cytosinarabinosid
Ara-CTP	Ara C-Triphosphat
ATRA	all-trans-Retinolsäure
β	beta
Bad	„Bcl-x _L /Bcl-2-associated death promotor“
BAX	„Bcl-2 associated x protein“
Bcl6	„B cell lymphoma 6“
BcoR	Bcl-6-interagierender Co-Repressor
BFU	„burst forming unit“
Bid	„Bcl-2 interacting domaine“
BSA	Rinderserum Albumin (bovine serum albumine)
°C	Grad Celsius
CBFβ	„core binding factor beta“
CD	„cluster of differentiation“
Cdk	„cyclin-dependent kinase“
CKI	Cdk-Inhibitor
CGH	komparative genomische Hybridisierung
CR3	„complement receptor 3“
CFU-E	„colony forming unit, erythroid“
CFU-GM	„colony forming unit, granulocyte/macrophage“
CFU-MEG	„colony forming unit, megakaryocyte“

CtBP	carboxy-terminales Bindungsprotein
DD	„death domain“
DED	„death effector domain“
DISC	„death-inducing signaling complex“
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-PBS	Dulbecco´s PBS
DR	„death receptor“
DTT	1,4-Dithiolthreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Endkonzentration
ELISA	„enzyme-linked immunsorbent assay“
ETO	„eight-twenty-one“
FAB	„French-American-British“
FACS	„fluorescent activated cell sorting“
FADD	Fas assoziiertes Protein mit Todesdomäne (death domain)
Fas-L	Fas Ligand
Fc	fragment crystalline
FCS	fötales Kälberserum (foetal calf serum)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gravitationsbeschleunigung an der Erdoberfläche (9,81 m/s ²)
GM-SCF	Granzlozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
G-SCF	Granulozyten konloniestimulierender Faktor
h	Stunde
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HPC	„hematopoietic progenitor cell“
Hsp	Hitzeschockprotein
IAP	„inhibitor of apoptosis proteins“
IEV	Ifosfamid/Epirubicin/Vepesid
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INK4	„inhibitor of Cdk4“
kDa	Kilodalton

KG	Körpergewicht
L	Ligand
µg	10 ⁻⁶ Gramm
µl	10 ⁻⁶ Liter
µM	10 ⁻⁶ Mol
mA	Milliampere
Mcl-1	„myeloid cell leukemia-1“
MDR	„multidrug resistance“
MDS	myelodysplastisches Syndrom
min	Minute
mg	10 ⁻³ Gramm
ml	10 ⁻³ Liter
MLL	„mixed lineage leukemia“
mM	10 ⁻³ Mol
MPS	myeloproliferatives Syndrom
MYH	„myosin heavy chain“
N-CoR	„nuclear receptor corepressor“
NuRD	„nucleosome remodeling and deacetylation“
n.d.	„not done“
n.e.	„not evaluable“
ng	10 ⁻⁹ Gramm
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-ribose)Polymerase
PAS	„periodic acid-Schiff stain“
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
P-gp	permeability-glycoprotein
pH	pondus Hydrogenii
PI	Propidiumjodid (propidium iodide)
PLZF	„promyelotic leukemia zink finger“
PML	Promyelozytenleukämie
POX	Peroxidase

pRb	phosphoryliertes Retinoblastoma-Protein
PS	Phosphatidylserine
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Rezeptor
RAR α	„retinoic acid receptor alpha“
Rb	Retinoblastoma-Protein
REST	„RE-1-silencing transcription factor“
R-IEV	Rituximab-Ifosamid/Etoposid/Vepesid
rpm	„rotation per minute“
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAHA	„suberoylanilide hydroxamic acid“
SCF	Stammzellefaktor
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sin3	„switch independent 3“
SIRT	Sirtuine
SMRT	„silencing mediator for retinoid and thyroid receptors“
TCF	„T cell factor“
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF	„tumor necrosis factor“
TNFR1	„tumor necrosis factor receptor 1“
TRADD	TNF-Rezeptor assoziiertes Protein
TRAIL	„tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand“
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSA	Trichostatin A
UBF	„upstreaming binding factor“
VPA	Valproinsäure
V/V	Volumen pro Volumen
WB	Western Blot
WHO	„world health organisation“
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
YY1	Yin Yang

1 Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämien

Leukämien wurden erstmals 1875 von Rudolf Virchow beschrieben und bezeichnen eine bösartige Erkrankung des blutbildenden Systems. Der sehr rasche Verlauf akuter Leukämien kann innerhalb weniger Wochen und Monate zum Tode führen. Bei regelrechter Differenzierung entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten. Durch Veränderung im genetischen Material entstehen funktionsuntüchtige Zellen, die ins periphere Blut ausgeschwemmt werden; gesundes umliegendes Knochenmark wird durch ungehemmtes Wachstum der entarteten Zellen verdrängt. Aufgrund des Mangels an funktionsfähigen Granulozyten und Monozyten treten gehäuft Infektionen auf; weitere Symptome sind Leistungsschwäche, Anämie, petechiale Blutungen, Epistaxis, Lymphknotenschwellung, Splenomegalie oder Gingivahyperplasie. Manchmal besteht eine B-Symptomatik mit Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust.

Richtungweisend für die Diagnose ist der übermäßige Anteil unreifer Blasten im Blut- oder Knochenmarksausstrich. Meist kann nach Anfärben schon eine Einteilung in myeloische oder lymphatische Leukämien getroffen werden. Laut WHO-Klassifikation muss für die Diagnose einer AML und als Abgrenzung zum MDS der Blastenanteil mindestens 20% aller kernhaltigen Zellen betragen. Differentialdiagnostisch kommen für die Veränderung des peripheren Blutbilds unter anderem eine Agranulozytose, eine Myelodysplasie, eine perniziöse Anämie, eine infektiöse Mononukleose oder im Falle einer Leukozytose auch eine leukämoide Reaktion in Betracht.

Die Diagnose Leukämie bezeichnet keine einheitliche Erkrankung. Die Einteilung in die verschiedenen Subtypen erfolgte lange Zeit nach der 1976 publizierten FAB-Klassifikation. Ersetzt wurde diese durch neue Richtlinien der WHO, wonach sich die Kriterien vor allem auf zyto- und molekulargenetische Befunde stützen und dysplastische Veränderungen als deskriptive Parameter verwendet werden (Haferlach, Schoch et al. 2002). Diese Einteilung ist bis heute weltweit Standard für die Diagnostik und Klassifikation der AML:

Einteilung der AML nach WHO-Kriterien

1. AML mit spezifischen zytogenetischen Translokationen
 - mit t(8;21)(q22;q22), AML1/ETO
 - akute Promyelozytenleukämie (AML M3 mit t(15;17)(q22;q11-12) und Varianten, PML/RAR α)
 - mit abnormen KM-Eosinophilen und (inv16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22);CBF β /MYH11
 - mit 11q23 (MLL)-Anomalien

 2. AML mit multilineärer Dysplasie (2-3 Linien betroffen)
 - mit vorausgegangenem MDS/MPS
 - ohne vorausgegangenem MDS

 3. Therapie-induzierte AML und MDS
 - nach Alkylantien
 - nach Epipodophyllotoxin
 - andere Auslöser

 4. AML ohne andere Einordnungsmöglichkeit
 - AML ohne Ausreifung (entspr. FAB M0)
 - AML minimal differenziert (entspr. FAB M1)
 - AML mit Ausreifung (entspr. FAB M2)
 - Akute Promyelozytenleukämie (entspr. FAB M3)
 - Akute myelomonozytäre Leukämie (entspr. FAB M4)
 - Akute monozytäre Leukämie (entspr. FAB M5)
 - Akute Erythro-Leukämie (entspr. FAB M6)
 - Akute Megakaryoblasten-Leukämie (entspr. FAB M7)
 - Akute Basophilen-Leukämie
 - Akute Panmyelose mit Myelofibrose
 - Myelosarkom/Chlorom
 - Akute biphänotypische Leukämie
-

Tabelle 1. WHO-Klassifikation der AML. Die Einteilung beruht vor allem auf Berücksichtigung zytogenetischer Translokationen, dem Vorhandensein von Dysplasien in mehreren Zellreihen sowie auf Induktion durch vorausgegangene Therapien. Als vierte Subpopulation wird eine Gruppe nicht anders einteilbarer AML zusammengefasst. (Tabelle modifiziert nach Haferlach und Schoch 2002)

Als wichtigstes Kriterium gilt das Merkmal spezifischer Translokationen. Für diese vier genetisch definierten Gruppen (s. Tabelle 1) gilt die Bezeichnung AML auch dann, wenn der Blastenanteil im Knochenmark unter 20% liegt (Haferlach, Schoch et

al. 2002). Als zweites Kriterium gilt das Vorhandensein von Dysplasien in zwei oder drei Zelllinien. Allerdings erbrachte der Nachweis von Dysplasien keine zusätzliche Information zur Diagnose und Prognose bei der AML (Haferlach, Schoch et al. 2003). Als dritte AML-Subpopulation werden Therapie-induzierte MDS und AML klassifiziert. Wichtig ist dabei eine weitere Einteilung entsprechend dem verwendeten Therapeutikum. Erst als letzte Stufe der WHO-Einteilungskriterien bezieht man sich auf die früheren morphologischen bzw. immunphänotypischen Subgruppen der FAB-Kriterien, die jedoch durch neue Subentitäten wie der akuten Panmyelose mit Fibrose oder dem Myelosarkom bzw. Chlorom erweitert wurden.

Zur Diagnostik wird neben der konventionellen Zytogenetik unter anderem die Immunphänotypisierung verwendet. Diese erlaubt beispielsweise die sichere Klassifizierung der beiden Subtypen AML M0 und M7, da hier morphologische Kriterien alleine nicht ausreichend sind (Haferlach, Schoch et al. 2002). Weitere diagnostische Methoden sind die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) an Metaphase- und Interphase-Zellkernen sowie die komparative genomische Hybridisierung (CGH) (Haferlach, Schoch et al. 2002). Über die Real time PCR kann in ca. 35% der AML-Patienten eine quantitative Aussage zum Therapieansprechen getroffen werden.

Akute Leukämien können in allen Altersstufen auftreten. Die ALL kommt zu 90% im Kindesalter vor; einen zweiten Altersgipfel gibt es zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr. Akute myeloische Leukämien dagegen treten hauptsächlich im Erwachsenenalter auf. Die Inzidenz beträgt dabei etwa 2,3 Neuerkrankungen pro Jahr, wobei das mittlere Erkrankungsalter zwischen 62 und 64 Jahren liegt und Männer 1,5mal häufiger betroffen sind als Frauen. Da in den letzten 20 Jahren eine Zunahme der Inzidenz beobachtet werden konnte, vermutet man, dass Umweltgifte einen Risikofaktor für das Auftreten einer AML darstellen. Meist kann kein auslösender Faktor eruiert werden, bekannte Stimuli sind jedoch radioaktive Strahlung, bestimmte Chemikalien wie Benzol, Pestizide, industrielle Lösungsmittel oder Zigarettenrauch. Vermehrt wird eine AML auch bei Trisomie 21 beobachtet. Sekundärleukämien, die auf dem Boden einer anderen myeloproliferativen Erkrankung oder nach einer Chemo- bzw. Strahlentherapie auftreten, haben in der Regel eine schlechte Prognose.

Da eine unbehandelte AML in kurzer Zeit zum Tode führen kann, sollte rasch nach Diagnosestellung eine Therapie eingeleitet werden. Die Grundlage stellt eine aggressive Chemotherapie dar, sofern der Patient therapiefähig ist. Oft werden mehrere Zytostatika kombiniert, um an verschiedenen Angriffspunkten in der Zellregulation anzusetzen. Abhängig von Prognosefaktoren und Gesundheitszustand kann zusätzlich eine Stammzelltransplantation induziert sein. Das primäre Ziel ist das Erreichen einer Vollremission mit einem Blastenanteil von unter 5%. Durch neuere diagnostische Verfahren mit höherer Sensitivität werden darüber hinaus zytogenetische und molekulare Remissionen definiert. Durch Fortschritte in der Therapie ist heute oftmals eine Heilung möglich geworden. Dennoch stirbt mehr als die Hälfte der Patienten an ihrer Erkrankung; neue Therapieverfahren werden daher dringend benötigt. Als neue Substanzgruppe wurden für die Behandlung von Leukämien, aber auch von soliden Tumoren, Histondeacetylase-Inhibitoren eingeführt. Einige dieser Substanzen, u.a. Vorinostat (SAHA) stehen bereits unmittelbar vor der klinischen Zulassung.

1.2 Chromatinstruktur und transkriptionelle Regulation

Die DNA einer eukaryoten Zelle liegt im Zellkern in geordneter, verdichteter Form vor. Zusammen mit Histonen und Nichthistonproteinen bildet sie das Chromatin. Die funktionelle und sich wiederholende Basiseinheit des Chromatins ist das Nukleosom (Kornberg 1977). Ein Nukleosom besteht aus einer DNA-Doppelhelix aus 146 Basenpaaren, die sich in 1,65 Windungen einer linksgängigen Helix um einen Nukleosomenkern (Core) windet. Dieser besteht aus einem Oktamer aus Histonproteinen, die sich in je zwei H2A, H2B, H3 und H4 aufteilen.

Histone sind aufgrund ihres hohen Gehalts an den Aminosäuren Lysin und Arginin basische Proteine, deren C-terminale Domäne nach innen auf den Nukleosomenkern gerichtet ist, während die N-terminale Domäne mit ihren Lysinresten aus dem Nukleosom herausragt (Finnin, Donigian et al. 1999; Monneret 2005). Diese N-terminalen Domänen können durch zahlreiche posttranslationale Mechanismen wie Phosphorylierung, Methylierung und Acetylierung modifiziert werden (Grunstein 1997; Monneret 2005).

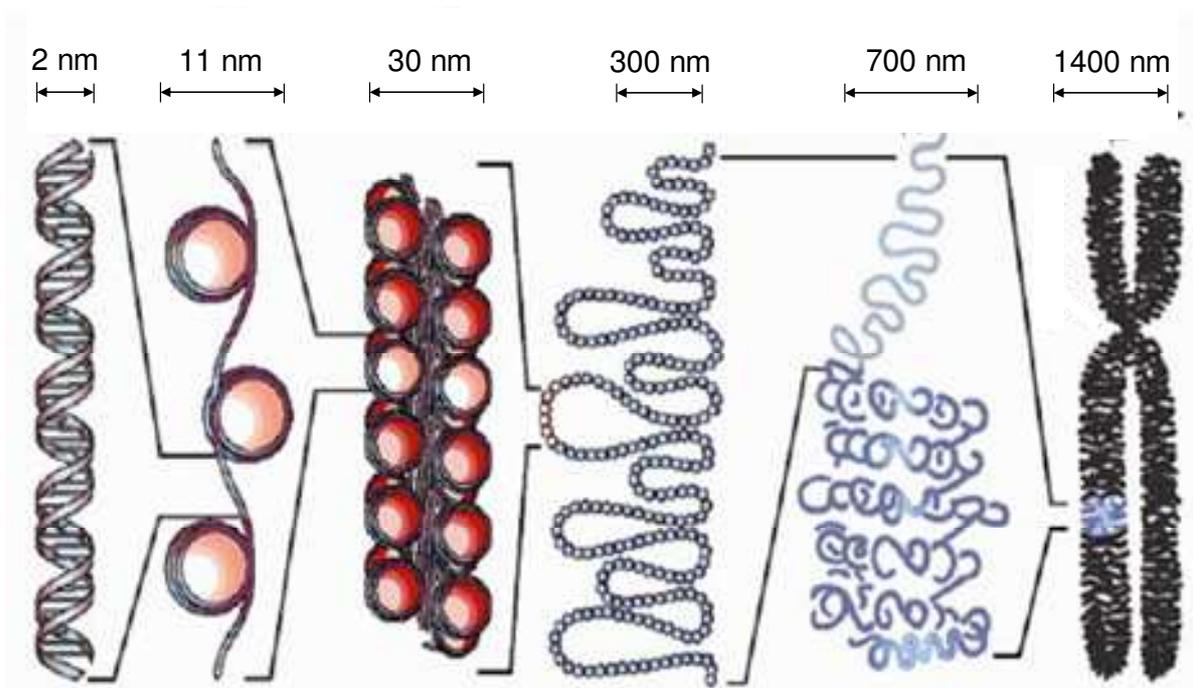


Abbildung 1. Aufbau eines Chromosoms. Die DNA-Doppelhelix ist um die Histone gewunden und bildet ein Nukleosom. Die einzelnen Nukleosomen sind über Linker-DNA (10-80 bp) zu einer Art Perlenkette mit einem Durchmesser von ca. 11 nm verbunden. Die nächst höhere Stufe bildet eine Faser mit einem Durchmesser von 30 nm, welche Schleifen mit einer Länge von 50-300 kb bildet. Über einen weiteren „Verpackungsschritt“ wird so letztendlich ein Chromosom gebildet. (Abbildung aus Felsenfeld and Groudine 2003)

Die am besten charakterisierte posttranslationale Modifikation stellt die Acetylierung bzw. Deacetylierung dar, bei der die Enzyme Histonacetyltransferasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC) am ϵ -Aminoende der Lysinketten reversibel eine Acetylgruppe übertragen bzw. abspalten. Dies erfolgt über einen besonderen Ladungsaustauschmechanismus; ein wesentliches Element stellt dabei ein Zn^{2+} -Ion tief in der Enzytasche der HDAC dar (Finnin, Donigian et al. 1999).

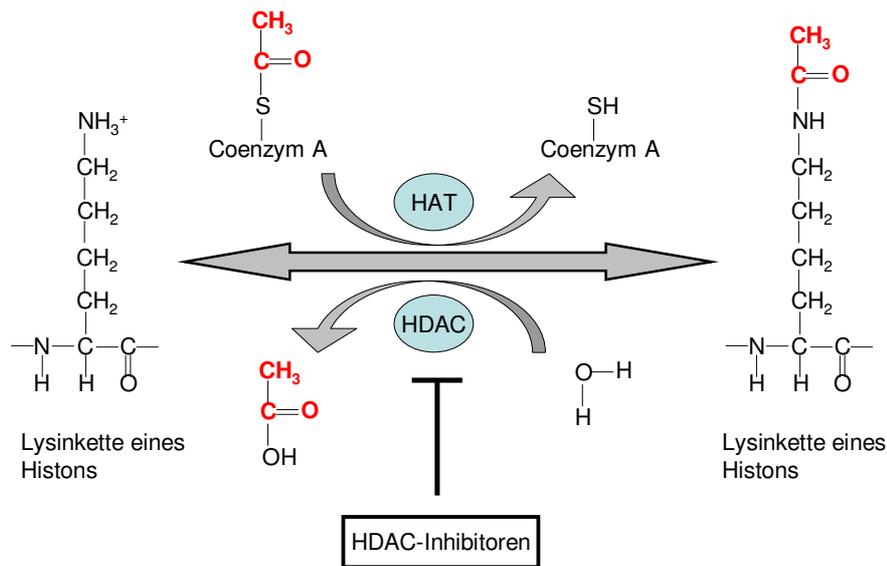


Abbildung 2. Acetylierung und Deacetylierung der ϵ -Aminogruppe einer Lysinkette eines Histons. Die Steuerung des dynamischen Gleichgewichts erfolgt über HAT und HDAC. Durch HDAC-Inhibitoren wird das Gleichgewicht zugunsten der hyperacetylierten Form verschoben.

Durch Acetylierung werden die positiv geladenen Lysinketten der Histone neutralisiert, dies schwächt ihre Affinität zur DNA ab. Es folgt eine Dislozierung vom Nukleosom und damit eine Entfaltung der DNA; dadurch wird das Anlagern von Transkriptionsfaktoren an die Promoterregionen erleichtert (McGhee, Felsenfeld 1980; Gross, Garrard 1988). Die Aktivierung der Promotoren bewirkt eine gesteigerte Expression bestimmter Gene. Im Gegenzug kann festgehalten werden, dass deacetylierte Histone mit unzugänglichem Chromatin assoziiert sind, was eine geringere Gentranskription bedeutet (McLaughlin, Finn et al. 2003). Somit wirken HDAC als transkriptionelle Repressoren. Werden diese jedoch inhibiert, kann eine Genexpression wieder aktiviert werden.

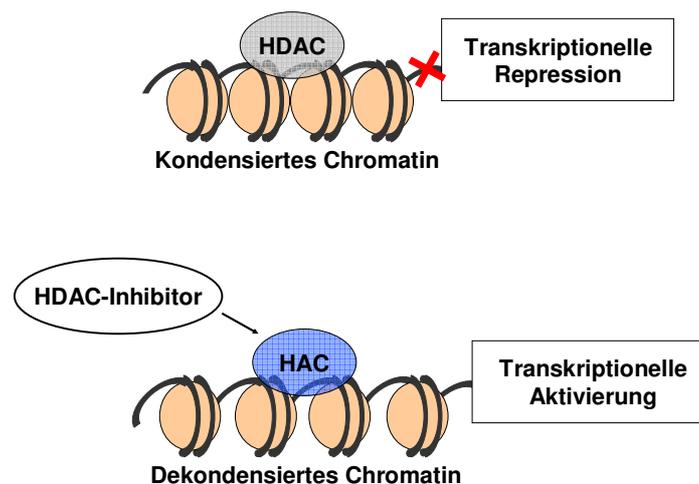


Abbildung 3. Mechanismus der Wirkung von HDAC-Inhibitoren. Eine Deacetylierung führt zur Kondensation des Chromatins, eine Acetylierung zur Dekondensation. HDAC-Inhibitoren blockieren die Aktivität der HDAC und bedingen dadurch eine Zunahme des acetylierten und dekondensierten Chromatins. (Modifizierte Abbildung nach Grunstein 1997)

Da Histone als erste als Substrate dieser Deacetylasen identifiziert wurden, waren sie namensgebend. Tatsächlich wurde inzwischen aber eine große Anzahl von Nichthistonproteinen entdeckt, die ebenfalls von HDAC deacetyliert werden (Carey, La Thangue 2006). Einige wenige Beispiele sind p53, E2F, Bcl-6 und Rb, Proteine, die maßgeblich Einfluss auf Tumorsuppression, Transkription und Zellzyklus nehmen.

1.3 Histondeacetylase-Inhibitoren

HDAC können in vier Klassen und darüber hinaus in Zink-abhängige sowie Zink-unabhängige NAD-abhängige Enzyme unterteilt werden. Aktuell sind 11 Zink-abhängige HDAC bekannt (McLaughlin, La Thangue 2004; Pan, Lu et al. 2007). Zur Klasse I gehören die Enzyme HDAC 1, 2, 3 sowie 8; diese sind im Zellkern lokalisiert. Die Enzyme der Klassen IIa und IIb liegen vor allem im Zytoplasma vor, können aber in den Nukleus transferiert werden. Im Einzelnen sind dies HDAC 4, 5, 7 und 9 der Klasse IIa und HDAC 6 und 10 der Klasse IIb. HDAC 11 besitzt in seiner katalytischen Region eine Domäne, die von der Evolution unberührt blieb, sie wird der Klasse IV zugeordnet.

Klasse		Lokalisation		Funktion
Zn ²⁺ -abhängig	Klasse I	HDAC 1	Nukleus	Teil des Sin3, NuRD und Co-REST-Komplexes
		HDAC 2	Nukleus	
		HDAC 3	Nukleus, kaum im Zytoplasma	Teil des SMRT und N-CoR-Komplexes
		HDAC 8	Nukleus	
	Klasse IIa	HDAC 4	Nukleus Zytoplasma	Interaktion mit SMRT/N-CoR, BcoR und CtBP
		HDAC 5	Nukleus Zytoplasma	
		HDAC 7	Nukleus Zytoplasma	Differenzierung in Muskelgewebe
		HDAC 9	Nukleus Zytoplasma	
	Klasse IIb	HDAC 6	Zytoplasma	Tubulindeacetylase
		HDAC 10	Nukleus Zytoplasma	Rekrutierung anderer HDACs
	Klasse IV	HDAC 11	Nukleus Zytoplasma	-
Zn ²⁺ -unabhängig	Klasse III	SIRT1-7		

Tabelle 2. Einteilung der HDAC in Klassen, Funktion und Lokalisation. Die derzeit 11 bekannten HDACs werden in Zn²⁺-abhängige Enzyme der Klassen I, IIa, IIb und IV unterteilt, die Zn²⁺-unabhängigen Enzyme gehören der Klasse III an. (Abbildung nach Pan, Lu et al. 2007)

Genexpressionsanalysen ergaben, dass die Aktivität von HAT und HDAC in vielen Tumoren verändert ist (Timmermann, Lehrmann et al. 2001). Durch das Ungleichgewicht dieser Enzyme werden die Regulierungsmechanismen von Proliferation und Autolyse außer Kraft gesetzt. Die Folge ist ein vermehrtes Wachstum maligne veränderter Zellen. Durch Inhibition der HDAC kann das alte Gleichgewicht wieder hergestellt werden. Die aktuell in der Tumorthherapie eingesetzten Substanzen richten sich dabei gegen Enzyme der Zink-abhängigen Klassen I und II (Pan, Lu et al. 2007). Die Klasse-I-Inhibitoren können anhand ihrer chemischen Substanzklassen weiter unterteilt werden in Hydroxaminsäuren, cyclische Peptide, kurzkettige Fettsäuren und Benzamide (Miller, Witter et al. 2003). Diese Arbeit fokussiert auf die Hydroxaminsäuren TSA und SAHA. Beide inhibieren sowohl Klasse I als auch Klasse II-Enzyme (Kapustin, Fejér et al. 2003; Wegener, Hildmann et al. 2003).

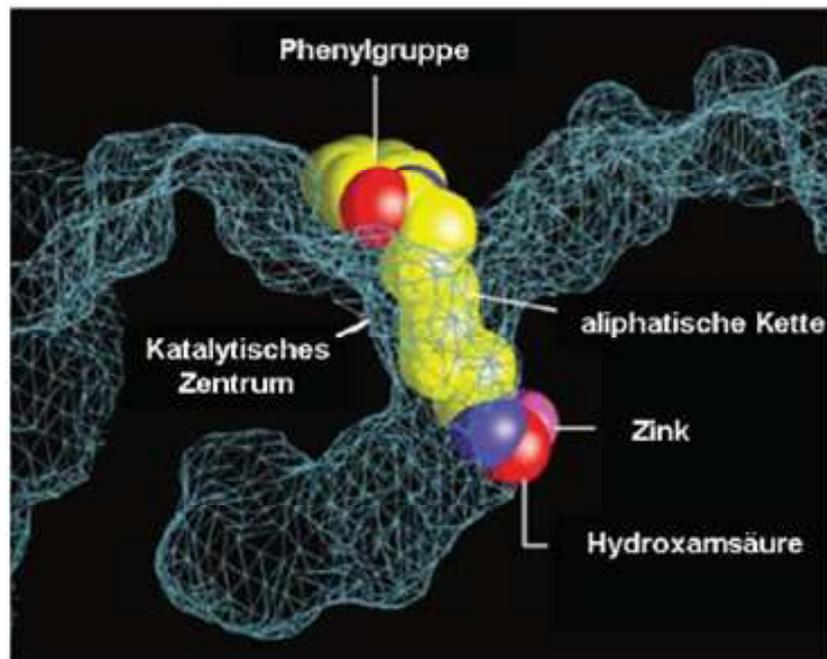


Abbildung 4. Bindung von SAHA an das Zink-Atom im katalytischen Zentrum der Enzymtasche eines HDAC-Proteins. Die Struktur des dargestellten katalytischen Zentrums beruht auf Röntgenstrukturanalysen des HDAC-Homologs in *Aquifex aeolicus*. (Abbildung aus Finnin, Donigian et al 1999)

Das katalytische Zentrum der HDAC wird von einer lipophilen Enzymtasche, in dessen Grund ein Zinkatom lokalisiert ist, gebildet. HDAC-Inhibitoren wie SAHA und TSA passen genau in diese Struktur. Ihre Hydroxamsäure bildet mit dem Zinkatom, das für die Spaltung der Acetamidbindung essentiell ist, einen Chelatkomplex, während die Carbonringgruppe außen auf der Oberflächentasche des Proteins aufliegt (Marks, Richon et al. 2000; Kapustin, Fejér et al. 2003).

TSA wurde als Fungizid aus *Streptomyces hygroscopicus* (Tsuji, Kobayashi et al. 1976) isoliert und als einer der ersten HDAC-Inhibitoren identifiziert (McLaughlin, La Thangue 2004). Gleichzeitig ist es auch der potenteste der bisher entdeckten HDAC-Inhibitoren. Wegen seiner hohen Toxizität und fehlenden Spezifität ist TSA allerdings für die klinische Anwendung nicht geeignet (Yoshida, Kijima et al. 1990).

SAHA (Vorinostat) ist ein künstlich hergestellter HDAC-Inhibitor und in der Tumorthherapie eine äußerst vielversprechende Substanz (Pan, Lu et al. 2007). Er wird sowohl intravenös als auch oral gut vertragen (McLaughlin, La Thangue 2004). Derzeit wird er in klinischen Phase III-Studien getestet; seine Zulassung für den klinischen Einsatz wurde bereits bei der Europäischen Arzneimittelagentur beantragt (Journal Onkologie 2008).

Am Rande sei auch Scriptaid erwähnt, ebenfalls eine Hydroxaminsäure, die sich jedoch im experimentellen Teil als unzureichend wirksam erwies und klinisch keine Bedeutung hat.

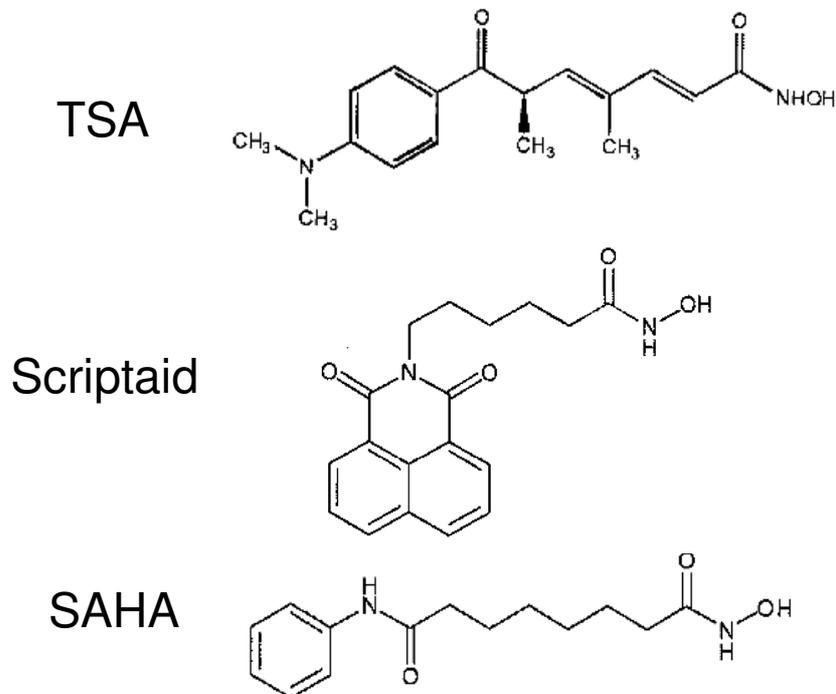


Abbildung 5. Molekülstrukturen von HDAC-Inhibitoren. Abgebildete Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten HDAC-Inhibitoren TSA, Scriptaid und SAHA.

Eine weitere Substanz, die als HDAC-Inhibitor identifiziert wurde, ist das seit 30 Jahren verwendete Antiepileptikum Valproat. In einer Pilotstudie wurde der therapeutische Benefit von Valproinsäure für MDS-Patienten gezeigt. Mittlerweile befindet es sich in klinischen Phase II- und III-Studien. Vorteile von Valproat sind die Möglichkeit der oralen Applikation, das Erreichen stabiler Serumkonzentrationen sowie ein niedriges toxisches Profil (Kuendgen, Strupp et al. 2004). Die HDAC-inhibierende Wirkung von Valproat liegt dabei im millimolaren, bei SAHA im mikromolaren und bei TSA schon im nanomolaren Bereich.

Anders als bei Zytostatika greifen HDAC-Inhibitoren selektiv in die Regulierung von Tumorzellen ein, wohingegen normale Zellen weitgehend unbeeinflusst bleiben. Dies erklärt die niedrige Toxizität im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika (Marks, Rifkind et al. 2001).

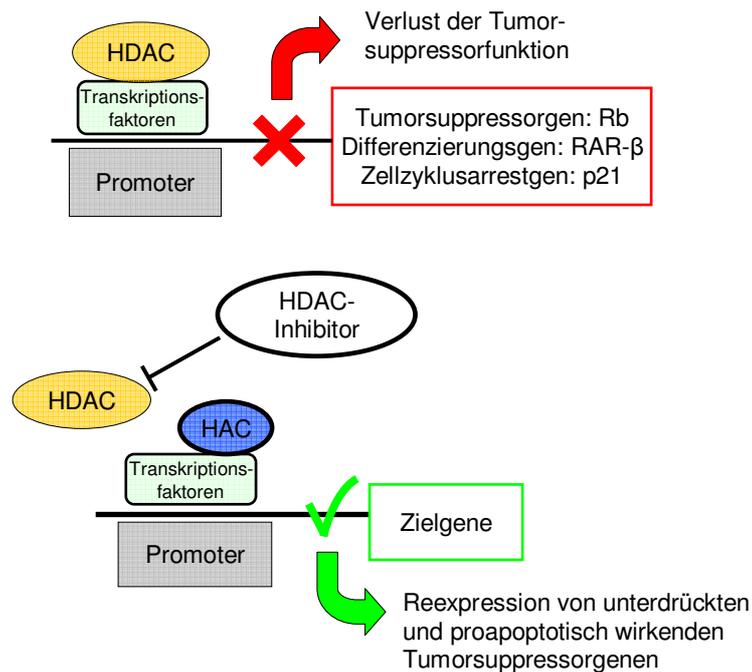


Abbildung 6. Konzept epigenetischer Therapie. Durch Anlagerung von HDAC an den Transkriptionsfaktor werden Gene für Tumorsuppression, Differenzierung und Zellzyklusarrest inaktiviert. Durch HDAC-Inhibitoren werden Proteine hyperacetyliert und die Expression von wachstumskontrollierenden Zielgenen reaktiviert.

1.4 Zytostatika

Zytostatika sind Substanzen natürlicher oder synthetischer Herkunft, die über unterschiedliche Angriffspunkte das Wachstum proliferierender Zellen hemmen. Seit etwa 1942 werden sie in der Tumorthherapie eingesetzt.

Tumorzellen weisen eine erhöhte Teilungsrate auf, verfügen aber nur über eingeschränkte Reparaturmechanismen. Während des Zellzyklus ergeben sich viele unterschiedliche Angriffspunkte, an denen man eingreifen und die Proliferation der Zelle unterbinden kann. Im Weiteren soll lediglich auf die in dieser Arbeit eingesetzten Substanzen näher eingegangen werden.

Topoisomerasen sind reversible Endonukleasen, die gezielt den DNA-Strang unterbrechen und damit zu einer Relaxation der verdrillten DNA führen. Die topologische Form der DNA beeinflusst ganz entscheidend die molekularbiologischen Eigenschaften wie Transkription, Replikation und

Rekombination, die nur in der entspiralisierten Form möglich sind. Topoisomerasen der Klasse I schneiden dabei nur einen DNA-Strang und führen zu einer Relaxation der Superhelix. Topoisomerasen II unterbrechen beide Hälften des DNA-Doppelstrangs, wodurch ein intakter DNA-Strang durch die Öffnung der geschnittenen Stelle hindurchtreten kann. Danach erfolgt die Schließung der DNA-Lücke durch die Lösung kovalenter Protein-DNA-Bindungen. Das Zytostatikum Etoposid hemmt die Topoisomerase II und führt daher zu irreversiblen DNA-Strangbrüchen. Eingesetzt wird Etoposid häufig in der Therapie von soliden Tumoren, malignen Lymphomen, Hirntumoren und der AML.

Cytosinarabinosid gehört zu den Desoxycytidinanaloga und unterscheidet sich von dem physiologischen Nukleosid Desoxycytidin nur durch eine Hydroxygruppe. Durch Phosphorylierung wird es im Körper in die aktive zytozide Form Ara-CTP umgewandelt und als Antimetabolit in die DNA eingebaut. Dadurch führt es zum einen zu Strukturdefekten in der DNA, zum anderen hemmt es kompetitiv die DNA-Polymerasen α und β , welche zu den prozessierenden Enzymen bzw. zu den Reparaturenzymen gehören. Die Zytotoxizität hängt dabei entscheidend von der intrazellulären Ara-CTP-Konzentration ab. Gleichzeitig wirkt Ara C antiviral, wird aber als Virustatikum nur selten eingesetzt.

Staurosporin ist ein Mycotoxin und wirkt als Proteinkinaseinhibitor mit breitem Spektrum. Die apoptotische Wirkung beruht auf Aktivierung des mitochondrialen intrinsischen Apoptosewegs. Klinisch wird es nicht als Chemotherapeutikum verwendet, dient jedoch *in vitro* als Modellsubstanz zur Induktion von Apoptose.

Alle Zytostatika schädigen immer auch gesunde Zellen mit schnellem Turnover, im günstigsten Fall handelt es sich um eine relative Spezifität, d.h. einer stärkeren Schädigung der Tumorzellen als gesunder Zellen. Nebenwirkungen wie Myelosuppression, Nierenversagen, Nausea, Erbrechen und Haarausfall sind daher häufig. Umso interessanter stellt sich daher die relativ hohe Selektivität der HDAC-Inhibitoren gegenüber maligne entarteten Zellen dar (Marks, Rifkind et al. 2001).

1.5 Zellzyklus

1.5.1 Allgemeines

Die Zelle als Grundbaustein komplexer biologischer Systeme unterliegt vielfältigen Kontrollmechanismen. Zellteilung, Zellwachstum, Differenzierung und nicht zuletzt Zelltod müssen zum Zwecke der Ausbildung intakter Zellverbände streng reguliert werden.

Voraussetzung für das Wachsen eines Organismus ist die Zellteilung. Der Zellzyklus bezeichnet dabei die zyklische Abfolge von einer Zellteilung zur nächsten und kann in vier Phasen eingeteilt werden. In der G1-Phase beginnt die Zelle nach einer Teilung zu wachsen, Zellorganellen zu ergänzen und sich durch Produktion entsprechender Enzyme auf die sich anschließende S(ynthese)-Phase vorzubereiten. Während der S-Phase werden die DNA dupliziert und Histone produziert. In der prämitotischen G2-Phase bereitet sich die Zelle auf die Mitose vor. Zellkontakte zu den Nachbarzellen werden aufgelöst, die Zelle vergrößert sich und rundet sich ab. Während der Mitose finden die Teilung der Chromosomen, des Zellkerns und die Aufteilung auf zwei Tochterzellen statt.

1.5.2 Regulationsmechanismen

Reguliert wird dieses komplexe Zusammenspiel durch Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen. Cycline selbst besitzen keine intrinsische enzymatische Aktivität, sie regulieren jedoch die Aktivität der Cdks. Durch Bildung eines Cdk/Cyclin-Komplexes werden wesentliche Änderungen in der Cdk-Struktur induziert, welche die Kinase in eine aktive Konformation versetzen. In jeder Phase des Zellzyklus werden nur bestimmte Cycline benötigt, daher werden sie für die einzelnen Phasen speziell exprimiert und über das Ubiquitin-System proteolytisch wieder abgebaut. Die Cdks sind Serin-/Threonin-Kinasen, die andere Proteine phosphorylieren und dadurch aktivieren oder inaktivieren. Ihre Menge bleibt während des Zellzyklus gleich.

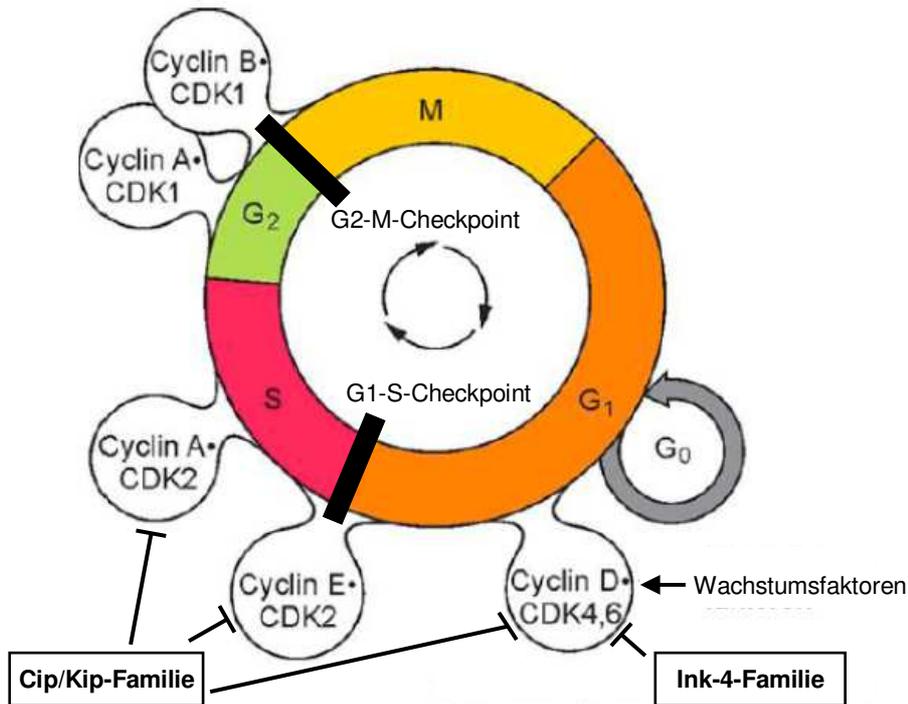


Abbildung 7. Zellzyklusphasen mit jeweiligen Cyclinen und cyclinabhängigen Kinasen. In der G₁-Phase wird der Cyclin D-Cdk4/Cdk6-Komplex gebildet. Am Übergang zur S-Phase spielt der Cyclin E-Cdk2-Komplex eine entscheidende Rolle, der Cyclin A-Cdk2-Komplex reguliert die S-Phase. In G₂ wird Cyclin A durch Cdk1 aktiviert, am Übergang zur M-Phase bildet Cdk1 mit Cyclin B einen Komplex. Die Mitglieder der Ink-4-Familie können über Inhibierung des Cyclin D-Komplexes einen G₁-Arrest induzieren, die Mitglieder der Cip/Kip-Familie inhibieren nicht nur Komplexe mit Cdk4 oder Cdk6, sondern auch Cdk2-Komplexe. (Abbildung modifiziert nach Müller Esterl, Biochemie 2004)

Während der G₁-Phase nimmt die Menge an D-Cyclinen zu. Dabei werden die Cycline D1, D2 und D3 jeweils Zellarten-typisch exprimiert werden (Sherr 1993). Aufgrund technischer Probleme in der Darstellung von Cyclin D1 und D2 beschränkt sich diese Arbeit lediglich auf die Expression von Cyclin D3.

Die D-Cycline assoziieren mit Cdk4 und Cdk6, welche dadurch aktiviert werden (Matsushime, Quelle et al. 1994). Hauptsubstrat dieser aktivierten Komplexe, die vor allem als Wachstumsfaktoren wirken, ist das Retinoblastoma-Protein (Rb). Durch Phosphorylierung entlässt Rb den Transkriptionsfaktor E2F aus seiner Bindung, woraufhin E2F die Expression von Proteinen, die für die nächste Zellphase notwendig sind, induziert.

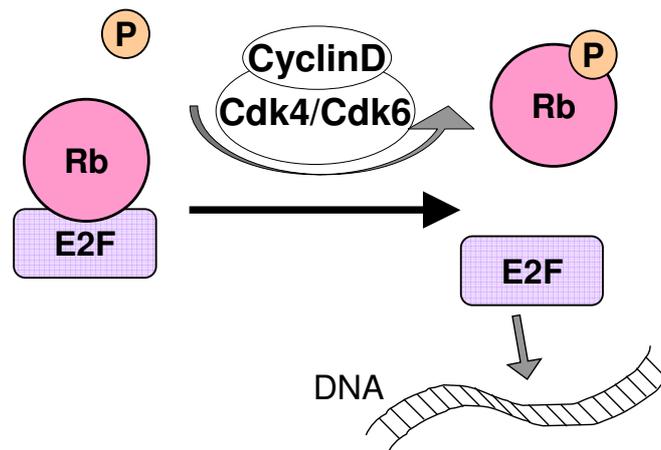


Abbildung 8. Freilassung des Transkriptionsfaktors E2F aus der Bindung mit Rb. Nach Phosphorylierung von Rb durch den Cyclin D-Cdk4/Cdk6-Komplex wird E2F frei und kann als Transkriptionsfaktor wirken.

So nimmt die Menge an Cyclin E und weiteren am G1/S-Übergang beteiligten Substanzen zu. Durch die zunehmende Bildung von Cyclin E bildet sich der Cyclin E-Cdk2-Komplex, welcher ebenfalls Rb phosphoryliert und E2F dadurch noch stärker aktiviert wird. Aufgrund dieser positiven Rückkoppelung überschreitet die Zelle den Restriktionspunkt und gelangt in die S-Phase. Zu Beginn der S-Phase wird Cyclin E rasch proteolytisch gespalten und Cyclin A durch Cdk2 aktiviert. Der Cyclin A-Cdk2-Komplex inhibiert E2F und aktiviert verschiedene an der DNA-Synthese beteiligte Proteine. In der späten S- und in der G2-Phase bildet sich durch Zunahme der Cyclin B-Expression der Cyclin B-Cdk1-Komplex. Dieser Komplex bewirkt zum einen eine globale Inhibierung der Proteinbiosynthese, DNA-Replikation und DNA-Transkription, zum anderen werden Strukturproteine aktiviert, die für die spätere Mitosephase benötigt werden.

Um zu verhindern, dass bei der Replikation mögliche entstandene DNA-Fehler auf die Tochterzellen weitergegeben werden, gibt es am Übergang von der G1- zur S-Phase sowie von der G2- zur M-Phase sogenannte Kontrollpunkte. An diesen Kontrollpunkten wird geprüft, ob die Bedingungen für die Proliferation günstig sind. Am Checkpoint zwischen G1 und S fungiert vor allem das Rb als Tumorsuppressorgen. Liegt ein für die Zelle bzw. Proliferation ungünstiges Ereignis wie Hypoxie, Zellschaden oder virale Infektion vor, wird Rb inaktiviert. Dies ist ein kritischer Schritt, der zum S-Phasen-Stopp am G1-Checkpoint führt. Bei Deletion

oder Funktionsverlust von Rb kommt es zur Deregulierung der Zellteilung, dadurch wird die Tumorbildung begünstigt (Sung, Kim et al. 2007).

Die Hemmung der Cdks und damit Regulierung des Zellzyklus kann über zwei Inhibitor-Familien, die sich in ihrer Struktur und Spezifität unterscheiden, geschehen (Martins, Berns 2002): die INK4-Familie bindet spezifisch an die monomerische Form von Cdk4 sowie Cdk6 und inhibiert die Cyclin D-Cdk-Aktivität. Zu dieser Familie gehören die Proteine p15, p16, p18 und p19.

Die andere Gruppe ist die Cip/Kip-Familie, bestehend aus p21, p27 und p57. Diese Proteine binden an eine Vielzahl von Cyclin/Cdk-Komplexen einschließlich Cyclin D/Cdk4, Cyclin D/Cdk6 und Cyclin E/Cdk2 während der G1-Phase sowie Cyclin A/Cdk2 während des G1/S-Übergangs und während der gesamten S-Phase (Pines 1995). p27 zeigt Kinase-inhibierende Effekte auch auf B-Cycline (Toyoshima, Hunter 1994). Die Folge ist ein Zellzyklusarrest in der G1- oder G2-Phase. Die Regulierung der Cdk-Inhibitoren ihrerseits geschieht durch weitere Proteine, beispielsweise durch p53.

Durch die Behandlung von Zellen mit HDAC-Inhibitoren können Proteinlevel variiert werden. So steigert SAHA die Expression der Proteine p16, p21 und p27 (McLaughlin, La Thangue 2004). p27 wird zusätzlich stabilisiert (Moradei, Maroun et al. 2005). Die Folge ist ein hypophosphoryliertes Rb mit verhindertem Eintritt in die S-Phase und ein G1-Arrest (Sandor, Senderowicz et al. 2000). Eine verminderte Expression durch SAHA erfahren die Cycline A und B1 (Fournel 2002) sowie Cyclin D1 (Kumagai, Wakimoto et al. 2007).

1.5.2.1 p53

p53 ist ein wichtiges Tumorsuppressorgen. In normalen Zellen wird p53 nur in geringer Konzentration gebildet und hat eine kurze Halbwertszeit (el-Deiry 1998). DNA-Schäden oder andere Stressoren triggern jedoch die Bildung und Stabilisierung von p53 (el-Deiry 1998), welches wiederum zahlreiche Zielgene aktiviert. Die Anzahl wird auf 200 bis 400 geschätzt (el-Deiry, Kern et al. 1992).

p53 und pRb regulieren sich gegenseitig in einem kompliziertem Netzwerk: bei funktionsfähigem pRb induziert p53 Zellzyklusarrest, bei defektem pRb aktiviert p53 Apoptose (Godefroy, Lemaire et al. 2006). Beispielsweise inaktiviert p53 im Falle

eines DNA-Schadens die Cyclin-Cdk-Komplexe und induziert dadurch indirekt einen Zellzyklusarrest. Dadurch wird Zeit gewonnen, die DNA zu reparieren. Gelingt dies, wird am Checkpoint der Zellzyklusprogress in die nächste Phase freigegeben; gelingen dies nicht, werden weitere Targetgene wie Bax (Miyashita, Krajewski et al. 1994) und Fas/Apo1 (Nagata 1997), die beide über unterschiedliche Wege Apoptose auslösen, induziert. Über Aktivierung seiner Zielgene reguliert p53 dadurch neben Zellzyklusarrest und Apoptose auch Differenzierung oder Antiangiogenese (el-Deiry 1998). Welches Ereignis eintritt, hängt sowohl vom Zelltyp als auch von der Art des auslösenden Ereignisses ab.

Eine Mutation des p53-Gens führt zum Ausfall der Tumorsuppressorfunktion; ein mutiertes p53 kann umgekehrt die Funktion eines Onkogens annehmen. In etwa 60% aller humanen Tumore wurden Mutationen im p53-Gen nachgewiesen (Hollstein, Sidransky et al. 1991), damit ist es das am häufigsten mutierte Gen humaner Krebszellen (el-Deiry 1998).

1.5.2.2 c-myc

c-myc gehört zur Familie der Transkriptionsfaktoren und spielt eine Schlüsselrolle in zellulären Prozessen wie der Apoptose (Martins, Berns 2002). Seine Expression wird durch p53 herunterreguliert (Prochownik 2004; Ho, Ma et al. 2005), während es selbst die Expression von p27 reguliert (Martins, Berns 2002). Häufig ist c-myc als Ergebnis von Genamplifizierung, Translokation, Überexpression oder Mutation in vielen Tumoren dereguliert (He, Sparks et al. 1998; Martins, Berns 2002).

1.6 Apoptose

1.6.1 Biologie des programmierten Zelltods

Die Apoptose als physiologische Form des Zelltods ist essentiell für die Homöostase und Differenzierung von Geweben (Desagher, Martinou 2000). Apoptose findet in unterschiedlichem Ausmaß während des gesamten Lebens statt. So ist sie während der Ontogenese an der Rückbildung der Schwimmhäute zwischen den Fingern und

Zellen beteiligt, später an der Eliminierung funktionsuntüchtiger oder maligner Zellen. Apoptose auslösende Ereignisse wie Stimulierung bestimmter Oberflächenrezeptoren auf der Zelle, Entzug von Wachstumsfaktoren, DNA-Schäden oder Störungen im Zellmetabolismus setzen eine fest vorgegebene Maschinerie in Gang, die in dem gemeinsamen Endweg der Apoptose mündet. Die Zelle schrumpft, zerstört sich selbst und stirbt ab.

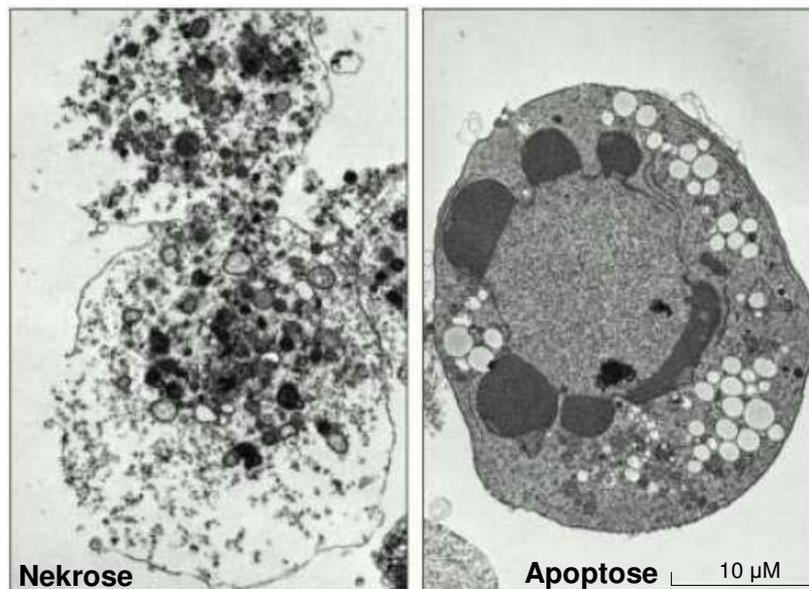


Abbildung 9. Elektronenmikroskopisch dargestellte Abbildungen einer nekrotischen und einer apoptotischen Zelle. Bei der nekrotischen Zelle rupturiert die Zellmembran, der Zellinhalt gelangt dabei in das umliegende Gewebe und löst dort eine Entzündungsreaktion aus. Im Gegensatz dazu finden bei der Apoptose Chromatinkondensation, Kernfragmentierung und Abschnürung des Zellinhalts in Form von Vesikeln statt. Phagozyten nehmen diese „apoptotic bodies“ auf und die Zelle löst sich so Stück für Stück auf. (Abbildung modifiziert nach www.pathologie.uk-erlangen.de/e1848/e603/e638/inhalt678/5.Sem_05a-Apoptose.pdf)

Entscheidend ist, dass der Zellinhalt dabei nicht unkontrolliert an die Umgebung abgegeben wird, sondern sich die zytoplasmatischen Bestandteile über Vesikel vom Zellrest abschnüren, die dann von Phagozyten aufgenommen werden.

Nicht so bei der pathologischen Form des Zelltods. Durch physikalische oder chemische Noxen bricht das Aktionspotential der Zelle zusammen, es kommt zu unkontrollierten Ionenströmen und damit zum osmotisch bedingten Platzen der Zelle. Dabei gelangen die Zellorganellen ins umliegende Gewebe und verursachen dort eine Entzündungsreaktion.

Wie wichtig der kontrollierte Ablauf der Apoptose ist, zeigt sich, wenn sich Fehler in diese fest vorgegebene Maschinerie einschleichen. Übermäßige Apoptose wird in Zusammenhang gebracht mit Morbus Alzheimer, Chorea Huntington oder spinaler Muskelatrophie, verminderte Apoptose führt zu Autoimmun- oder neurodegenerativen Erkrankungen und vor allem zu Tumorentstehung.

1.6.2 Regulationsmechanismen

1.6.2.1 Extrinsischer Weg

Apoptose kann auf zwei unterschiedliche Wege induziert werden: Äußere Stimuli aktivieren den extrinsischen, intrazelluläre Ereignisse den intrinsischen Weg.

Der extrinsische Weg wird über die Interaktion von Rezeptoren auf der Zelloberfläche mit seinen entsprechenden Liganden vermittelt. Intensiv untersucht wurden vor allem die Cytokine TNF- α und Fas-L (Synonyme: CD95, APO1) und ihre jeweiligen Rezeptoren TNF-R1 und Fas-Rezeptor.

Der Fas-Rezeptor gehört zur TNF-Rezeptor-Familie und besitzt an der transmembranären Innenseite eine Todesdomäne (DD), die bei Anlagerung des Liganden das Apoptosesignal nach innen weiterleitet. Ähnlich funktioniert die Apoptoseauslösung über den Liganden TRAIL, der an die Rezeptoren DR4 und DR5 bindet. Dies bewirkt eine Trimerisierung und Aktivierung der intrazellulären Domäne (Huang, Eberstadt et al. 1996) mit Anlagerung von FADD. FADD selbst enthält ebenfalls eine Effektor-Todesdomäne (DED) (Chinnaiyan, O'Rourke et al. 1995), die die Bindung und autokatalytische Aktivierung von Procaspase 8 und Procaspase 10 erleichtert (Fandy, Shankar et al. 2005). Nach Aktivierung von TNFR1 lagert sich das intrazelluläre TRADD an, welches über seine eigene DED ebenfalls Caspase 8 aktivieren kann.

1.6.2.2 Caspase-Kaskade

Die Aktivierung von Caspasen ist der entscheidende Schritt auf dem gemeinsamen Endweg der Apoptose. Extrinsisch induzierte Apoptose wird über Caspase 8

vermittelt, intrinsische Apoptose über Caspase 9. Caspasen sind **C**ystein-**A**spartat-Proteasen, die als Proenzyme existieren und durch Autoaktivierung, spezifische Proteolyse oder durch Assoziation mit Cofaktoren aktiviert werden. Die Initiator-Caspasen 8, 9 und 10 aktivieren bei ihrer Aktivierung die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7. Diese aktivieren ihrerseits wiederum sekundäre Zielproteine wie die DNase, sind aber auch selbst am Abbau des Zytoskeletts (Lamin und Actin) beteiligt. Ein Substrat der Proteasen ist unter anderem auch PARP. PARP spielt eine Rolle bei der DNA-Reparatur. Das Enzym wird durch DNA-Strangbrüche aktiviert und aktiviert seinerseits DNA-Reparaturenzyme. Während der Apoptose wird PARP schnell gespalten, damit es die DNA-Reparatur nicht weiter unterstützen kann.

Ein charakteristisches Apoptosemerkmal ist die Kondensation des sich im Zellkern befindenden Chromatins. Es folgt ein kontrollierter schrittweiser Abbau der DNA zuerst in 50-300 kbp- und später in 180 bp-Fragmente (Oberhammer, Wilson et al. 1993). Dieser Mechanismus wird auch als „DNA-laddering“ bezeichnet. So wird die Zelle Stück für Stück abgebaut und in Vesikeln abgeschnürt. Diese apoptotischen Zellreste werden schließlich von Makrophagen phagozytiert.

1.6.2.3 Intrinsischer Weg

Der intrinsische Weg ist zum einen die Fortsetzung des extrinsischen Wegs, zum anderen kann er auch durch Schäden im Zellinneren ausgelöst werden. Im Zuge der Apoptose kommt es zu einem irreversiblen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (Kroemer, Zamzami et al. 1997). Bei Schädigung der mitochondrialen Membran wird Cytochrom c freigesetzt, welches zusammen mit Apaf1 und Caspase 9 das Apoptosom bildet, wodurch Caspase 9 aktiviert wird (Scorrano, Korsmeyer 2003).

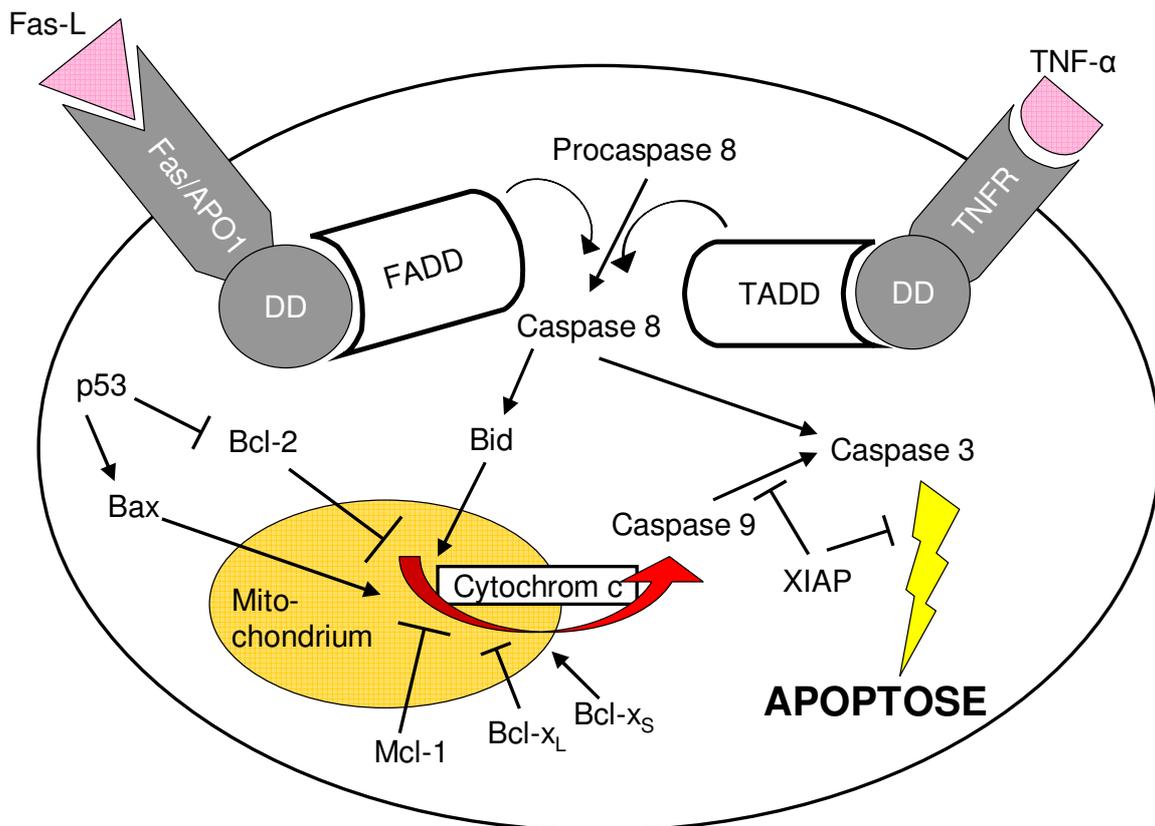


Abbildung 10. In- und extrinsisch induzierte Apoptosewege einer Zelle. Über Aktivierung der Oberflächenrezeptoren Fas/APO1 oder TNFR durch ihre entsprechenden Liganden Fas-L bzw. TNF- α kommt es zu einer intrazellulären Konformationsänderung der Rezeptoren mit Anlagerung von FADD bzw. TRADD, welche Caspase 8 durch Proteolyse aktivieren. Caspase 8 aktiviert sowohl Bid als auch die Effektorcaspase 3, die weitere Apoptosesignale initiiert. Durch intrazelluläre Schädigung oder Vermittlung durch Bid und Bax wird Cytochrom c aus dem Mitochondrium freigesetzt. Dies führt über Aktivierung der Initiatorcaspase 9 zur Aktivierung von Caspase 3. Bcl-2 kontrolliert die Cytochrom c-Freisetzung negativ und kann durch p53 gehemmt werden. XIAP kann die Caspasen 9 und 3 inhibieren und Apoptose damit verhindern.

Die Freisetzung von mitochondrialen Proteinen wird v.a. durch die Bcl-2-Familie reguliert, deren Mitglieder teils pro- als auch antiapoptotische Funktion haben (Martin, Reutelingsperger et al. 1995). Bcl-2, das bekannteste Antiapoptose-Mitglied der Bcl-2-Familie, bildet über seine BH1-BH2-BH3-Domäne eine Tasche, die proapoptotische Proteine wie Bax bindet und dadurch inhibiert. Weitere antiapoptotisch wirkende Proteine sind Bcl-x_L und Mcl-1, proapoptotische Funktion haben Bax, Bad, Bid und Bcl-x_S. Allen gemeinsam ist, dass sie mindestens eine der vier Bcl-2-homologen Sequenzen BH1, BH2, BH3 oder BH4 besitzen (Adams, Cory 1998). Die meisten antiapoptotisch wirksamen Mitglieder wie Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl-1 besitzen mindestens die Domänen BH1 und BH2, während die proapoptotischen Proteine Bax und Bad mindestens über die BH3 Domäne verfügen. Dies lässt darauf

schließen, dass BH3 die essentielle Domäne für die proapoptotische Funktion darstellt (Adams, Cory 1998).

Zusätzlich besitzen fast alle Bcl-2-Mitglieder im Bereich des C-terminalen Endes eine Sequenz mit hydrophoben Aminosäuren, die eine Bindung an die intrazelluläre Mitochondrienmembran ermöglicht. Vermutlich können bestimmte Proteine der Bcl-2-Familie Porenkomplexe bilden, über die während der Apoptose das Cytochrom c ins Zytosol strömt. Insgesamt hemmen die antiapoptotischen Mitglieder die Freilassung von mitochondrialen Apoptosefaktoren, während die proapoptotischen Mitglieder wie Bax das Freilassen solcher Faktoren triggern (Yang, Liu et al. 1997; Rossé, Olivier et al. 1998; Desagher, Martinou 2000).

Ein weiteres in dieser Arbeit untersuchtes Protein ist XIAP. Seine Expression ist von prognostischer Bedeutung (Tamm, Kornblau et al. 2000). Es gehört der IAP-Familie an und ist der potenteste Caspase-Inhibitor. XIAP spielt eine tragende Rolle in vielen zellulären Funktionen (Holcik, Gibson et al. 2001). Es kann die aktivierten Caspasen 9 und 3 inhibieren, wodurch Apoptose noch „auf den letzten Metern“ verhindert wird (Facchetti, Previdi et al. 2004).

1.7 AML1/ETO- und PML/RAR α -Fusionsgen

Reziproke Translokationen mit der Folge pathologischer Genfusionen sind ein häufiger Mechanismus in der Entstehung einer AML. Das am häufigsten von chromosomalen Translokationen betroffene Gen in der AML ist der Transkriptionsfaktor AML1 (Nucifora, Rowley 1995; Hiebert, Downing et al. 1996). Das normale AML1-Protein vermittelt drei wesentliche Funktionen: Bindung an die DNA durch die α -Untereinheit, Heterodimerisierung mit CBF β und Interaktion mit Transkriptionsfaktoren. Der Transkriptionskomplex AML1-CBF β wirkt als Aktivator für hämatopoesespezifische Gene und ist daher für die normale Hämatopoese essentiell (Löwenberg, Downing et al 1999). Hierfür ist allerdings noch das Zusammenwirken mit anderen Transkriptionsfaktoren notwendig: Die beiden Co-Aktivatoren p300 und CBP lagern sich an die Transaktivierungsdomäne von AML1 an. Da diese Co-Aktivatoren intrinsische HAT-Aktivität besitzen (Ogryzko, Schiltz et al. 1996), werden die Lysinketten der Histone acetyliert, durch das nachfolgende Chromatinremodelling wird eine Transkription aktiviert.

In ca. 6-8% aller AML wird das AML1/ETO-Fusionsgen exprimiert, in 96% der Fälle liegt dabei die Translokation t(8;21) zugrunde (Urioste, Martínez-Ramírez et al. 2001). Dabei wird die carboxyterminale Transaktivierungsdomäne durch ETO ersetzt, mit der Folge, dass sich ein Multiproteinkomplex an die DNA anlagert: die Zinkfingerregion des AML1-ETO-Fusionsgens interagiert dabei mit den Domänen der Co-Repressoren N-CoR, SMRT und Sin3. An diese Co-Repressoren lagern sich wiederum HDAC-Komplexe an. Durch die aberrante Rekrutierung der HDAC an die Co-Aktivatoren, die eine intrinsische HAT-Aktivität besitzen, kommt es zu einer transkriptionellen Repression von Targetgenen. Wahrscheinlich sind Zielgene wie die Myeloperoxidase, neutrophile Elastase, IL-3, GM-CSF und der T-Zell-Rezeptor betroffen (Nucifora, Rowley, 1995). Dadurch wird die Differenzierung in hämatopoetischen Vorläuferzellen verhindert (Gelmetti, Zhang et al. 1998). Durch den Einsatz von HDAC-Inhibitoren kann in diesen Leukämien das onkogene Potential der Fusionsproteine vermindert und die Differenzierung vorangetrieben werden.

Ein weiterer gut charakterisierter Untertyp der AML ist die APL. Sie entsteht durch Translokationen, die das Chromosom 17 betreffen. In 95% liegt die Translokation t(15;17) zugrunde, in 2-3% liegt t(11q23;17) vor. Andere das Chromosom 17 betreffende Translokationen sind selten. Bei beiden genannten Translokationen fusioniert das RAR α -Gen mit den jeweiligen Translokationspartnern, im Falle von t(15;17) ist es das Gen für das PML-Protein, bei t(11q23;17) ist es das Gen für das PLZF-Protein. Unter physiologischen Bedingungen ist RAR α ein ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor, der durch ATRA stimuliert wird. Das Fusionsgen inhibiert jedoch die normale Funktion von RAR α . Über Interaktion mit nukleären Co-Repressor-Komplexen kommt es auch hier zu einer aberranten Anlagerung von HDAC-Komplexen, welche als Repressoren fungieren (Grignani, De Matteis et al. 1998; Lin, Nagy et al. 1998). Die Folge ist ein Differenzierungsstopp und Ausbildung des APL-Phänotyps (Grignani, Ferrucci et al. 1993). Therapeutische ATRA-Dosen hingegen bewirken eine Überwindung des Differenzierungsstopps mit Ausdifferenzierung der promyelozytären Blasten sowie eine verstärkte Apoptose (Grignani, Ferrucci et al. 1993). Daher wird ATRA heute standardmäßig in der Primärtherapie der APL eingesetzt. Im Gegensatz dazu weist jedoch das PLZF-RAR α -Fusionsgen eine Resistenz gegenüber ATRA auf. Die Behandlung dieser Leukämien kann jedoch durch den kombinierten Einsatz von ATRA und HDAC-Inhibitoren wie TSA oder

SAHA eine Differenzierung und signifikante Apoptose induzieren (He, Grayson et al. 2001).

1.8 Differenzierung

Während der Hämatopoese durchlaufen die Zellen mehrere Reifungsstadien. Durch Bestimmung von Oberflächenmarkern, die als cluster of differentiation bezeichnet werden, können die Zellen den jeweiligen Reifungsstadien zugeordnet werden. Die CD-Moleküle sind meist membrangebundene Glykoproteine, die teilweise zellspezifisch exprimiert werden und verschiedene Funktionen haben können. Einige CDs haben Rezeptor- oder Signalfunktion, während bei anderen eine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden konnte. Nach der letzten Human Leukocyte Differentiation Antigens-Konferenz im Jahr 2004 umfasst die CD-Nomenklatur über 300 Cluster.

Ein Merkmal hämatopoetischer Stammzellen und früher Progenitorzellen ist die Expression von CD34. Es ist ein transmembranes Glykoprotein, das auf Gefäßendothelzellen exprimiert wird und als Ligand für L-Selektin fungiert. L-Selektin ist ein leukozytäres Adhäsionsmolekül und vermittelt den ersten Schritt der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen bei der Extravasation in ein entzündetes Gewebe und in Lymphknoten. Mit zunehmender Reifung bildet sich die Expression von CD34 zurück. Ein weiteres Antigen auf hämatopoetische Vorläuferzellen ist CD117, ein Tyrosinkinase-Rezeptor für SCF. Auch dieser bildet sich mit zunehmender Ausreifung zurück, während andere spezifische Oberflächenantigene ausgebildet werden.

Die Differenzierung einer Stammzelle in die myeloische Reihe ist an der Expression des Markers CD33 zu erkennen. Für die weitere Differenzierung in die granulozytäre Reihe ist die Expression der Marker CD11b und CD16 charakteristisch. Bei dem Antigen CD11b handelt es sich um die α -Untereinheit des Integrins CR3. Sie spielt eine Rolle in der Vermittlung von Phagozytose. CD16 ist ein niedrig-affiner Fc- γ -III-Rezeptor, der sowohl Phagozytose als auch antikörperabhängige Zytotoxizität vermittelt. Die immunphänotypische Unterscheidung der Monozyten von den Granulozyten ist anhand der Expression von CD14 möglich. Das CD14-Antigen ist das entscheidende Ziel- und Effektormolekül in der Erkennung von Bakterien. Es

bindet Lipopolysaccharide, dadurch wird die Freisetzung proinflammatorischer Enzyme wie TNF- α und IL-1 β aus der CD14 tragenden Zelle provoziert. Zusätzlich exprimieren Monozyten und Makrophagen das CD64-Molekül, einen hoch-affinen Rezeptor für IgG, über den es Phagozytose vermittelt.

Für die Entwicklung von Erythrozyten aus der myeloischen Stammzelle ist die vorübergehende Expression von CD71 charakteristisch. Es handelt sich um den Transferrinrezeptor, der auch als Marker für Zellproliferation fungiert, da sich teilende Zellen Eisen benötigen und währenddessen diesen Rezeptor exprimieren. Thrombozyten bilden während ihrer Reifung unter anderem den Rezeptor CD41 aus. CD41 bindet Fibrinogen, Fibronectin, den von-Willebrand-Faktor sowie Thrombospondin und ist ein Mediator für Thrombozytenadhäsion und -aggregation. CD36 wird von unterschiedlichen Zellreihen exprimiert. Bisher wurde eine Vielzahl von Funktionen beschrieben: es vermittelt die Bindung zwischen Thrombozyten und Kollagen, auf Erythroblasten verhindert es vermutlich das Nicht-Ausschwemmen aus dem Knochenmark. Zusätzlich ist es im Rahmen der Phagozytose von apoptotischen Neutrophilen und T-Lymphozyten durch Makrophagen beteiligt.

Als CD123 wird die α -Untereinheit des IL3-Rezeptors bezeichnet. Dieses Antigen wird schon auf hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert, dort ist es an Proliferation und Differenzierung beteiligt. Seine Expression nimmt mit dem Reifungsgrad zu und ist auf Granulozyten, Monozyten und Megakaryozyten zu finden.

CD45, früher auch als leukozytenspezifisches Antigen bezeichnet, wird speziell auf hämatopoetischen Zellen exprimiert. Dieses Antigen ist beteiligt an Prozessen, die für Differenzierung und Zellwachstum sowie für die T- und B-Zell-Signalwege wichtig sind. Es kommen mehrere Isoformen vor.

Myeloische Differenzierung

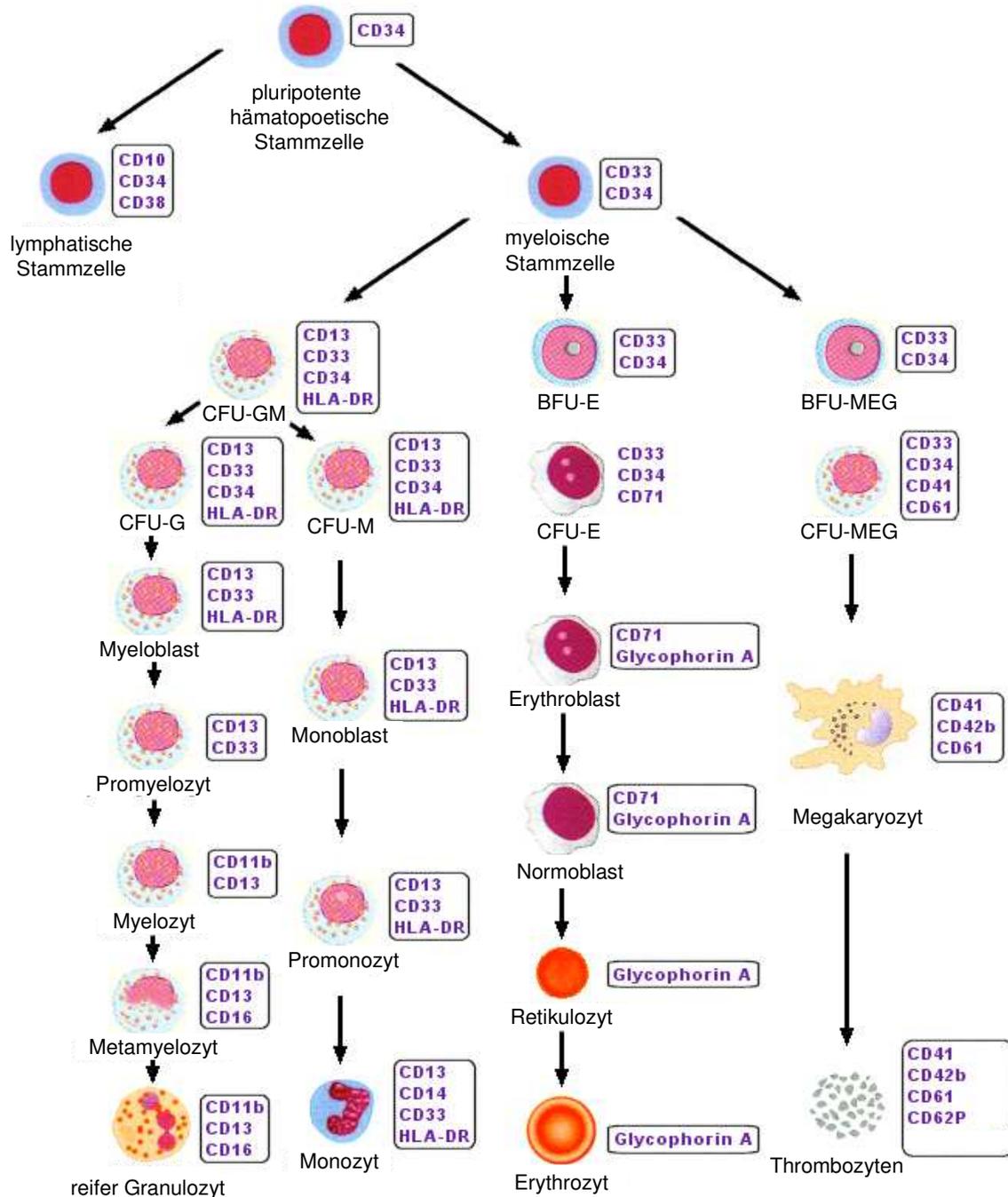


Abbildung 11. Myeloische Differenzierung aus CD34⁺ Stammzellen. Durch immunphänotypische Bestimmung der Oberflächenmarker können die unterschiedlichen Reifungsstadien bestimmt werden. Die stammzelltypische Expression von CD34 bildet sich im Verlauf zurück, während als Charakteristika der granulozytären Reihe CD11b, CD13 und CD16 exprimiert werden. Monozyten tragen die Antigene CD13, CD14 und CD33. Erythrozyten zeichnen sich durch die passagere Ausbildung von CD71 aus. Thrombozyten tragen die Oberflächenantigene CD41, CD42b, CD61 und CD62P. (Abbildung modifiziert nach einer Folie aus http://www.medizin.uni-koeln.de/institute/kchemie/Lehre/Vorlesung/C_Leukopoese/Leukopoese.pdf)

1.9 Resistenzgene

Ein großes Problem in der Behandlung von Tumorerkrankungen ist die Entwicklung von Resistenzen. Als Multiresistenz bezeichnet man dabei das Fehlen einer Apoptoseinduktion durch eine Vielzahl von Substanzen, die sich sowohl in ihrer Struktur als auch bezüglich ihres Wirkmechanismus unterscheiden. Die Entwicklung von Multiresistenzen erklärt, warum Therapieregime mit mehreren Substanzen an Effektivität einbüßen (Gottesmann, Fojo et al. 2002).

Insgesamt können dabei mehrere Mechanismen zugrunde liegen: Eine Möglichkeit ist die verminderte Aufnahme der zytotoxischen Stoffe in die Zelle – sei es über Endozytose oder über Transportsysteme. Dies ist der Fall bei Methotrexat, Cisplatin oder Nukleotid-Analoga. Ein anderer Mechanismus, der durch jede Substanz hervorgerufen werden kann, ist die Aktivierung von DNA-Reparatur-Systemen oder Induktion entgiftender Systeme wie das Cytochrom-P450-System. Ein weiterer Grund für eine Resistenzentwicklung können Defekte oder Mutationen in Genen sein, die Apoptose oder Zellzyklus regulieren. Ein vierter Mechanismus ist die Expression ATP-abhängiger Proteine, die in die Zelle gelangte zytotoxische Substanzen wieder nach außen schleusen und dadurch die intrazelluläre Ansammlung Apoptose-induzierender Substanzen verhindern.

Das am besten charakterisierte Protein dieser Art ist P-gp. Es ist in der Lage, lipophile Substanzen wie Antracycline, Vincaalkaloide und Taxane, die alltäglichen Einsatz in der Tumorthherapie finden, durch die Zellmembran nach außen zu schleusen (Ferrao, Sincock et al. 2001). P-gp wird durch das MDR1/ABCB1-Gen codiert und besitzt neben 12 transmembranären Regionen zwei ATP-Bindungsstellen. Die transmembranäre Region bindet hydrophobe Substanzen, die entweder neutral oder positiv geladen sind. Diese Bindung verursacht eine Konformationsänderung, woraufhin die Substanz nach außen geschleust und dort abgegeben werden kann. Pro Substrat werden dafür zwei ATP-Moleküle verbraucht. In etwa einem Drittel der Patienten mit Leukämien sowie bei mehr als 50% der Patienten mit Rezidiven unterschiedlicher Tumorkrankheiten wurde die Expression von P-gp entdeckt (Gottesmann, Fojo et al, 2002). Die Überexpression von P-gp in AML-Zellen ist mit einem verminderten Ansprechen gegenüber einer Therapie assoziiert (van der Kolk, de Vries et al. 2002).

Da jedoch nicht alle resistenten Zellen P-gp exprimieren, hatte man nach weiteren Proteinen dieser Art gesucht. Man stieß dabei auf das Multiresistenz-assoziierte Protein 1 MRP1 oder ABCC1. MRP1 funktioniert ähnlich wie P-gp, es besitzt jedoch zusätzlich am Aminoende weitere fünf transmembranäre Regionen (Gottesmann, Fojo et al. 2002). MRP1 bindet neutrale und anionische hydrophobe Substanzen und schleust Gluthation und seine Konjugate nach extrazellulär. So sind MRP1-exprimierende Zellen resistent gegenüber Daunorubicin, Mitoxantron, Etoposid und 6-Mercaptopurin - ebenfalls häufig eingesetzte Substanzen in der Tumorthherapie (van der Kolk, de Vries et al. 2002). Acht weitere Mitglieder der ABCC-Familie wurden inzwischen identifiziert. MRP1 wird stark exprimiert in Leukämien, Ösophaguscarzinomen und Nicht-kleinzelligen Bronchialcarzinomen (Nooter, Westermann et al. 1995).

Ein weiterer Transporter in Mitoxantron-resistenten Zellen ist MXR oder BCRP. Dieser besteht aus einem Homodimer aus zwei Transporterhälften, die je eine ATP-Domäne am Aminoende sowie sechs transmembranäre Segmente besitzen. In Leukämien wurden jedoch nur geringe Expressionsraten von BCRP beobachtet (Ross, Karp et al. 2000), während Sekundärleukämien eine Assoziation mit hohen BCRP-mRNA-Spiegeln aufweisen (van den Heuvel-Eibrink, van der Holt et al. 2007).

1.10 Zielsetzung

HDAC-Inhibitoren erweisen sich als vielversprechende neue Substanzgruppe in der Behandlung von Tumorerkrankungen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Wirkung von HDAC-Inhibitoren auf myeloischen Leukämiezellen untersucht. Um die Heterogenität der verschiedenen Subtypen der AML widerzuspiegeln, wurde ein Panel aus 12 Zelllinien ausgewählt. Dabei waren alle Differenzierungsgrade der AML von FAB M1 bis M7 vertreten, darunter auch Modelle mit molekularen Translokationen und den daraus resultierenden Fusionsgenen AML1/ETO und PML/RAR α , wie sie beispielsweise in KASUMI-1 bzw. NB-4 vorliegen.

Zum Einsatz kamen die drei HDAC-Inhibitoren SAHA, TSA und Scriptaid, wovon SAHA in klinischen Phase III-Studien getestet wird und in den USA unter dem Handelsnamen ZOLINZA® bereits eingesetzt wird (Journal Onkologie 2008).

Zunächst sollte das Verhalten der Zelllinien gegenüber diesen drei Substanzen getestet und im Vergleich zu den in der Tumorthherapie eingesetzten zytotoxischen Substanzen wie Etoposid und Cytosinarabinosid analysiert werden.

Um die Zytotoxizität der HDAC-Inhibitoren gegenüber gesunden Zellen zu testen, wurden auch CD34⁺ hämatopoetische Vorläuferzellen mit HDAC-Inhibitoren behandelt und in ihrem Sensibilitätsverhalten mit dem von malignen myeloischen Zellen verglichen.

Der Kernteil dieser Arbeit befasst sich mit den Effekten von SAHA auf den Zellzyklus und die Induktion von Apoptose. Die Expression von Zellzyklus- und Apoptose-assoziierten Proteinen als prädiktive Voraussetzung wurde mittels Western Blot untersucht.

Ergänzend wurden am Rande weitere durch SAHA beschriebene Effekte wie Differenzierung und Expression von Resistenzgenen betrachtet.

2 Material

2.1 Chemikalien

Acrylamid/bis-Acrylamid Gel 30	Roth, Karlsruhe
Aqua destillata	Delta Select GbmH, Pfullingen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Annexin-V-binding Buffer, 10-fach	Pharmingen, Heidelberg
Annexin-FITC	Pharmingen, Heidelberg
Biocoll (Ficoll) Separating Solution	Biochrom AG, Berlin
BSA	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
3,3'-Dihexyloxacarboxyaninjodid	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
D-PBS, 10-fach, steril	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiaminitetraessigsäure (EDTA)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
FCS Gold	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Glycin	Roth, Karlsruhe
Iscove´s mod. Dulbecco´s Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Methanol	J.T.Baker, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Natrium-Orthovanadate	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
L-Glutamin, 200 mM, 100-fach, steril	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Propidium-Jodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Protease-Inhibitor-Tabletten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNAse	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RPMI 1640 Zellmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Slim Milk Powder	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Super Signal® West Luminol/Enhancer Lösung	Pierce, Rockford, USA
Super Signal® West Peroxid Puffer	Pierce, Rockford, USA
TEMED	Promega, Madison, USA
Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

2.2 HDAC-Inhibitoren

SAHA	Biomol, Plymouth Meeting, USA
Scriptaid	Biomol, Plymouth Meeting, USA
TSA	Biomol, Plymouth Meeting, USA

2.3 Zytostatika

Arabinofuranosid Cytosin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Etoposid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Staurosporin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

2.4 Zelllinien

Verwendet wurden 12 unterschiedliche Leukämiezelllinien, alle weisen komplexe zytogenetische Aberrationen auf:

KG-1a	humane AML, M1, diploider Karyotyp mit 5% polyploiden Zellen, 46(44-47)<2n>X/XY, +8, +11, -12, -17, -20, der(5;17)(q10;q10)del(5)(q?11q?13), del(7)(q22q35), i(8q), der(8)t(8;12)(p11;q13) add(8)(q24), i(11q), add(16)(q13/21), der(19)t(14;19)(q11;q13), add(20)(p13)
HL-60	humane AML, M2, hypotetraploider Karyotyp mit einer hypodiploiden Seitenlinie und 1.5% Polyploidie, 82-88<4n>XX, -X, -X, -8, -8, -16, -17, -17, +18, +22, +2mar, ins(1;8)(p?31;q24hsr)x2, der(5)t(5;17)(q11;q11)x2, add(6)(q27)x2, der(9)del(9)(p13)t(9;14)(q?22;q?22)x2, der(14)t(9;14)(q?22;q?22)x2, der(16)t(16;17)(q22;q22)x1-2, add(18)(q21), Seitenlinie mit: -2, -5, -15, del(11)(q23.1q23.2), c-myc Amplicons vorhanden in der(1) und in beiden Markern
KASUMI-1	humane AML, M2, hypodiploider Karyotyp - 45<2n>X, -Y, -9, -13, -16, +3mar, t(8;21)(q22;q22), der(9)t(9;?) (p22;?), der(15)t(?9;15)((?q11;?p11) – besitzt beide Partner der 8;21 Translokation (ETO/AML1 Fusionsgen)
NB-4	humane AML, M3, PML/RAR α Fusionsgen, hypertriploider Karyotyp mit 3% Polyploidie, 78(71-81)<3n>XX, -X, +2, +6, +7, +7, +11, +12, +13, +14, +17, -19, +20, +4mar, der(8)t(8;?) (q24;?), der(11)t(11;?) (?->::11p15->11q22.1::11q13->22.1:), der(12)t(12;?) (p11;?), 14p+, t(15;17)(q22;q11-12.1), der(19)t(10;19)(q21.1;p13.3)x2

- ML-2 humane AML, M4, tetraploider Karyotyp - 92(84-94)<4n>XX, -Y, -Y, -7, -9, -10, -10, +11, +12, +12, +13, +13, -15, -16, -17, -17, +18, +18, -20, -20, +4mar, der(1)t(1;?)(p21;?)x2, del(6)(q23)x2, der(6)t(6;11)(q27;?q23)x2, ?der(11)t(6;11)(q27;?q23)/ del(11)(q23)x2, der(11)t(11;?)(?->11p11->11q23)x2, der(11)t(11;?)(q11-13;?), dup(13)(q32->qter)x2, der(18)t(5;?;18)(q21;?;q11)x2, komplexe Chromosom 11-Veränderung (inkl. 11q23, typisch für M4 und M5 AML) verschleiert das zytogenetische Bild, möglicherweise ist die seltene Translokation t(6;11) vorhanden
- MONO-MAC-6 humane AML, M5, hypotetraploider Karyotyp mit Diploidie (8%) und polyploiden (17%) Seitenlinien, 84-90<4n>XX/XXX, -Y, +6, +7, -12, -13, -13, -16, -16, +2mar, t(9;11)(p22;q23)x2, add(10)(p11)x2, add(12)(q21), del(13)(q13q14)der(13) t(13;14)(p11;q12)x2, der(17)t(13;17)(q21;p11)x2, die erste Zelllinie, an der die für AML M5 charakteristische Translokation t(9;11) gefunden wurde
- U-937 humane AML, M5, hypotriploider Karyotyp, 63(58-69)<3n>XXY, -2, -4, -6, +7, -9, -20, -21, +3mar, t(1;12)(q21;p13), der(5)t(1;5) p22;q35), add(9)(p22), t(10;11)(p14;q23), i(11q), i(12p), add(16)(q22), add(19)(q13) – besitzt t(10;11) - t(1;5) ähnelt der Variante von t(2;5) (Histiozytenlymphom)
- HEL humane AML, M6, hypotriploider Karyotyp mit 2.3% Polyploidie, 63(60-64)<3n>XYY, -2, -9, -10, -10, -11, -14, -16, -16, -17, -19, +20, +21, +2mar, del(2)(q32), t(3;6)(p13;q16), der(5)t(5;17) (q10;q10), der(6)t(1;6)(p13;p21), der(7)add(7)(p14;q32), add(8)(p21), der(9)t(9;?)(?;11)(p24;?)(?;q13), del(11)(q13), add(15)(p11), del(20)(q13), r(20)(p11q11), dup(21)(q11q22.3-qter), psu dic(22;9)t(9;?)(?;22)(p24;?)(?;p11-13)
- K-562 humane Erythroleukämie/CML, Philadelphiachromosom mit b3-a2 Fusionsgen, hypotriploider Karyotyp, 61-68<3n>XX, -X, -3, +7, -13, -18, +3mar, del(9)(p11/13), der(14)t(14;?)(p11;?), der(17)t(17;?) (p11/13;?), der(?18)t(15;?18)(q21;?q12), del(X)(p22)
- TF-1 humane AML, M6, stark translozierter hyperdiploider Karyotyp mit 12% Polyploidie - 52-57<2n>XY/XXY, +3, +5, +6, -8, +12, +15, +19, +19, +20, +20, +3mar, der(1)?dup(1)(p21p31) t(1;8)(p36;q11), t(2;12)(q32;q14), t(3;12)(p13-14;p12-13), add(3)(q21), add(5)(q11-13), der(8)t(1;8)(p36;q11), der(12)t(3;12)(p13-14;p12-13)t(1;12)q31-32;q24), add(14)(p12), iso(17)(q10)add(17)(q21), add(19)(q13), trp(19)(q12;q13.3), der(21)t(19;21)(q13.1;q22)dup(19)(q13.1q13.3)t(11;19)(q13;q13), der(22)t(19;22)(q11;p11)
- M-07e humane AML, M7, diploider Karyotyp - 46(45-46)<2n>XX, t(11;21)(p11;p13), add(13)(p13), add(22)(p13)
- CMK humane AML, M7, t(5;11), hypotetraploider Karyotyp mit 8% Polyploidie, 85-90<4n>XY, -X, -Y, -2, -3, +5, -6, -6, -8, +11, -15, -15, +16, -17, -19, +21, +22, +7-11mar, add(1)(q31), add(1)(p36), add(3)(q11), del(3)(p14)x2-3, add(5)(q11),

add(5)(q13), dup(8)(q11q21), add(8)(q13-21), del(8)(q11), del(9)(p21)x2,
 add(9)(q11)x2, del(10)(q22q24), der(11;17)(q10;q10),
 der(11)dup(11)(p13p15)t(5;11)(q11;p15)x1-2, del(11)(q23), add(12)(p13)x2,
 add(17)(p1?), add(18)(q23)x2-3, add(19)(p13), der(20)t(1;20)(q2?5;q1?2)x2,
 add(22)(q13)

2.5 Antikörper

2.5.1 Antikörper für Western Blots

Anti-Bad, polyklonal, Hase	Cell Signaling, USA
Anti-Bcl-X, monoklonal, Maus IgG2a	BD Biosciences, USA
Anti-BID, polyclonal, Ziege	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Anti-Cdk4, polyklonal, Hase	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Anti-Cdk6, polyklonal, Hase	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Anti-c-Myc, polyklonal, Hase	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Anti-Cyclin A, polyklonal, Hase	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Anti-Cyclin B1, polyklonal, Hase	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Anti-Cyclin E, monoklonal, Maus IgG2b	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Anti-FAS, monoklonal, Maus, IgG1	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Anti-FAS-L, polyklonal, Hase	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Anti-Human Bax, polyklonal, Hase	BD Biosciences, USA
Anti-Human Bcl-2, monoklonal, Maus IgG1	PharMingen International, San Diego, USA
Anti-Human Cyclin D1, monoklonal, Maus IgG2a	BD Biosciences, USA
Anti-Human Cyclin D1, monoklonal, Maus IgG2a	PharMingen International, San Diego, USA
Anti-Human Cyclin D2, monoklonal, Maus IgG	PharMingen International, San Diego, USA
Anti-Human Cyclin D3, monoklonal, Maus IgG1	PharMingen International, San Diego, USA
Anti-Human p16 ^{INK4} , monoklonal, Maus IgG1	PharMingen International, San Diego, USA
Anti-Human p53, monoklonal, Maus IgG2b	PharMingen International, San Diego, USA
Anti-Human Rb, monoklonal, Maus IgG1	BD Biosciences, USA
Anti-Kip1/p27, Maus IgG1	BD Biosciences, USA
Anti-Mcl-1, polyclonal, Hase	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Anti-mouse IgG	Amersham Biosciences, Buchinghamshire, UK
Anti-p27, polyklonal, Hase	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Anit-rabbit IgG	Amersham Biosciences, Buchinghamshire, UK
Anti-TNF-R1, monoklonal, Maus IgG2b	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Anti-XIAP, polyklonal, Hase	Cell Signaling, USA

2.5.2 gelabelte Antikörper für FACS

Anti BRCP-1, FITC	Cymbus Biotechnologie
Anti Caspase-3-FITC (aktiv)	Pharmingen, Heidelberg
Anti CD11b-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti CD123-PE	Becton Dickinson, San Jose, USA
Anti CD14-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti CD15-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti CD25-PE	Becton Dickinson, San Jose, USA
Anti CD33-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti CD34-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti CD41-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti CD45-FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti CD64-FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti CD71-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti Human P-Glycoprotein (MDR)	Pharmingen, Heidelberg
Anti IgG1-FITC	Pharmingen, Heidelberg
Anti IgG1-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti IgG2a-PE	Pharmingen, Heidelberg

2.6 Molekularbiologische Kits

Apo-Direct-Kit	Pharmingen, Heidelberg
CD 34 Progenitor Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Cell Proliferation Assay	Promega, Mannheim
CellTiter® Aqueous Non-Radioactive	Promega, Mannheim
DC Protein Assay	Bio-Rad, München
FIX & PERM	Caltag, Burlingame, USA

2.7 Standardgeräte

Blood Tube Rotator SB1	Stuart Scientific
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
CO ₂ -Inkubator NUNC	Nalge Nunc International, Wiesbaden-Biebrich
Digitalwaage BP 221 S	Sartorius, Göttingen
Digitalwaage LC 1200 S	Sartorius, Göttingen
Elisa Reader ELX 800	Biotek, Vermont, USA
Facs EPICS® XL	Beckman-Coulter, Krefeld

Kühlzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Magnetic Cell Separator Vario MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Megafuge 1.OR	Heraeus Instruments, Langenselbold
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
Multi Gel Long Elektrophorese Kammer	Biometra, Göttingen
pH-Meter inoLab	WTW, Weilheim
Schüttler WT 12	Biometra, Göttingen
Sterile Werkbank, HERA safe	Heraeus, Langenselbold
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Vortex REAX top	Heidolph, Nürnberg
Wasserbad GFL	C-Lab, Ebersberg

2.8 Häufig verwendete Lösungen, Puffer, Kulturmedien

Amidoschwarz-Entfärbelösung:	25% Isopropanol 10% Essigsäure
Annexin-Puffer:	10% Annexin-V-binding-Buffer (10fach) 90 % PBS
Blocking-Puffer:	PBS mit 10% Trockenmilchpulver 0,1% Tween
CD34-Isolationspuffer:	PBS, pH 7,2 0,5% BSA 2 mM EDTA
FACS-Puffer:	10% PBS 1% BSA
Iscove´s Kulturmedium:	5% Penicillin/Streptomycin 5% Glutamin 20% FCS Iscove´s mod. Dulbecco´s Medium ad 11 A.d.
Lysis-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 130 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8,0

	0,5 % Triton X-100 20 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ 10 mM Natriumpyrophosphat, pH 7 1 mM Natriumorthovanadate 20 mM Natriumfluorid 1 mM Glycerol-2-Phosphat 1 mM PMSF 1 x Protease-Inhibitor Cocktail Tablette/10 ml A.d.
Paraformaldehyd-Lösung (1%):	1% PFA in A.d. 10% PBS (10fach) pH 7,4
PBS-Tween-Puffer:	PBS 0,1% Tween
PI-Staining-Solution: 10% RNAse	PBS 0,1% PI
SDS-Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS in A.d.
SDS-Probenpuffer (2-fach)	M Tris/HCl, pH 6,8 200 mM DTT 4% SDS 0,2% Bromphenol-Blau 20% Glycin
Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS in A.d. 20% Methanol in A.d.
Trenngelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	1,5 M Tris, pH 8,8 0,4% SDS
Sammelgelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	0,5 M Tris, pH 6,8 0,4% SDS

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit eukaryoten Zelllinien

3.1.1 Kultivierung der Zelllinien

RPMI-Kultur-Medium: RPMI 1640, 10% bzw. 20% FCS, 2mM Glutamin, 1% antibiotische/antimykotische Lösung

Alle AML-Zelllinien bis auf KG-1a wurden im oben angegebenen RPMI-Kulturmedium mit 10% FCS gehalten. Die Zelllinie KG-1a benötigte 20% FCS. Die optimale Zelldichte betrug zwischen $0,4-0,8 \times 10^6$ Zellen/ml Medium. Je nach individueller Verdoppelungszeit, die zwischen zwei und drei Tagen lag, wurde altes Medium abgenommen und durch entsprechend viel frisches Medium ersetzt. Den Zelllinien TF 1 und M-07e wurde zusätzlich der Wachstumsfaktor IL3 in der Konzentration 5 bzw. 10 ng/ml Medium zugegeben. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Hierzu wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit einer 0,5%igen Trypanblaulösung im Verhältnis 1:1 verdünnt. Da Trypanblau nur durch die Zellmembran toter Zellen diffundiert und diese im Zytoplasma blau anfärbt, können diese unter dem Mikroskop von viablen Zellen unterschieden werden. Der Zahl viabler Zellen pro ml Medium berechnete sich aus der durchschnittlichen Zellzahl der vier Quadranten einer Neubauer-Zählkammer multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor sowie dem Faktor 10^4 .

3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

RPMI-Kulturmedium, 20% FCS, 10% DMSO

Durch langsames Tieffrieren in DMSO-haltigem Einfriermedium können Zellen längere Zeit im Flüssigstickstoff gelagert werden. DMSO verhindert die intrazelluläre Kristallbildung und schützt die Zellen während des Einfrierens.

Nach Waschen der Zellen mit PBS wurden sie mit einer Konzentration von 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen pro ml in frischem Medium aufgenommen. 700 μ l dieser Suspension wurden mit 200 μ l FCS und 100 μ l DMSO in ein Kryoröhrchen pipettiert, in eine vorgekühlte Einfrierbox überführt und bei -80 °C zwischengelagert. Um das Platzen der Zellen zu verhindern, wurde das Einfriermaterial erst zwei bis drei Tage später in die Flüssigstickstofftanks überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und rasch in Medium aufgenommen. Das toxische DMSO wurde durch Zentrifugieren entfernt. In frischem Medium konnten die Zellen wieder hochgezogen werden.

3.1.4 Reinigung der Zellen mit Ficoll

Ficoll

Die Reinigung einer Suspensionslösung von Zell- und Mediumresten erfolgte über einen Ficoll-Gradienten. Die Dichte von FICOLL als ungeladenem Sucrose-Polymer ist so eingestellt, dass Zellreste oder kleinere Partikel die Ficollschicht passieren, während viables Zellmaterial über dieser Schicht verbleibt und abgenommen werden kann.

Nach Waschen der Zellen mit PBS wurden diese im Verhältnis 2:1 ohne Vermischen der beiden Phasen auf Ficoll pipettiert. Nach Zentrifugieren bei 2100 rpm für 17 min konnte die sich gebildete Interphase aus viablen Zellen abgenommen und nach einem erneuten Waschschrift in frischem Medium aufgenommen werden.

3.2 Proliferationsassay

3.2.1 Bestimmung der Stoffwechselaktivität am ELISA-Reader

CellTiter® Aq_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, RPMI-Kulturmedium und darin angesetzte verschiedene Konzentrationen mit HDAC-Inhibitoren und Zytostatika

Mit diesem Assay kann der Anteil von viablen, stoffwechselaktiven Zellen in einer Population bestimmt werden. Die mitochondriale Succinatdehydrogenase intakter Zellen wandelt den Stoff MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-

carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium] in braunes Formazan um, wobei die Absorption im Elisa Reader bei 490 nm gemessen werden kann.

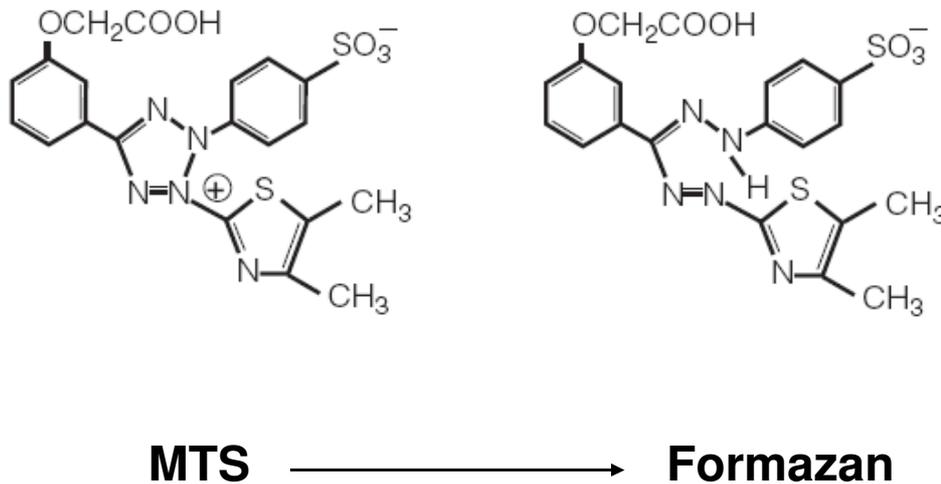


Abbildung 12. Molekülstruktur von MTS und Formazan. (Abbildung aus Technical Bulletin CellTiter 96[®]AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega)

Für die Versuchsreihen wurden die Zellen auf eine Konzentration von 400.000 Zellen pro ml Medium eingestellt. Um systemische Fehler durch Verdunstung im Inkubator möglichst gering zu halten, wurden die äußeren Reihen der 96-Well-Platten jeweils mit 100 µl PBS gefüllt. In die zweite Reihe wurden zur Bestimmung des Leerwerts jeweils 50 µl Medium gegeben. Die restlichen Wells wurden mit je 50 µl Zellsuspension (20.000 Zellen) befüllt. Am Folgetag wurden weitere 50µl Medium zur „Leerwertreihe“ pipettiert, in die übrigen Wells wurde das gleiche Volumen der unterschiedlich konzentrierten HDAC-Inhibitoren bzw. Zytostatika gegeben. Nach 72h Inkubation wurde zu den Wells 20 µl MTS gegeben und nach Sichtbarwerden eines deutlich braunen Farbumschlags, spätestens aber nach vier Stunden, wurde die Absorption bei 490 nm im ELISA-Reader gemessen.

3.2.2 Auswertung der Daten und Erstellung von Approximationskurven

Microsoft Excel

Zur Auswertung der Daten im ELISA-Reader gemessenen Daten wurde das Computerprogramm Microsoft Excel verwendet. Die Werte wurden tabellarisch übertragen und aus den Dreifachbestimmungen pro Konzentration ein Mittelwert sowie die Standardabweichung ermittelt. Von diesen Werten wurde der Wert der optischen Dichte des Mediums subtrahiert. Der Betrag der unbehandelten kultivierten Zellen wurde mit 100% gleichgesetzt und die Werte der behandelten Zellen in Relation dazu gesetzt. Diese Zahlenwerte wurden in ein Diagramm übernommen, wobei die eingesetzten Konzentrationen der jeweiligen Substanz gegen die Stoffwechselaktivität in 100% aufgetragen wurden. Das Einfügen einer Verbindungslinie zwischen den Diagrammpunkten ergab die Approximationskurve. Die Konzentration, bei der die Stoffwechselaktivität 50% betrug, wurde als IC₅₀ festgelegt.

3.3 Durchflusszytometrische Methoden

3.3.1 AnnexinV-/Propidiumjodid-Messung

Annexin-Puffer, AnnexinV-FITC, 50 µg/ml Propidium-Iodid

Ein frühes Apoptoseereignis stellt das Flipping der Phosphatidylserine auf der Zelloberfläche dar. In viablen Zellen befinden sich diese auf der Innenseite der Zellmembran, werden aber nach Apoptoseinduktion auf die Außenseite transloziert. Dort kann sich zugegebenes AnnexinV-FITC spezifisch an die PS anlagern. Durch ihre Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff können apoptotische Zellen in einem Durchflusszytometer dargestellt werden.

Beim Fortschreiten der Apoptose werden Zell- und Kernmembran porös. Dadurch kann der zweite zugegebene Fluoreszenzfarbstoff PI in die Zelle eindringen und an die DNA anlagern. Die Gegenfärbung mit PI ermöglicht somit die Unterscheidung

von apoptotischen (Annexin-V-positiv, PI-negativ) von nekrotischen (Annexin-V-positiv, PI-positiv) Zellen.

Für den Assay wurden 200.000 Zellen pro Messung und Ansatz in ein Durchflusszytometer-Röhrchen überführt, zentrifugiert (1300 rpm, 5min) und mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 500 µl Annexin-Puffer, 10 µl AnnexinV-FITC, 5 µl PI und Inkubieren (+4 °C, 20 min) erfolgte die Messung am Durchflusszytometer.

3.3.2 Zellzyklusanalyse

PI-Staining-Solution, 70% Ethanol

Abhängig von der Zellzyklusphase besitzen Zellen einen unterschiedlichen DNA-Gehalt. Durch Anfärbung der DNA mit PI kann durch die unterschiedlich starke PI-Anreicherung auf die Zellzyklusphase rückgeschlossen werden.

Pro Messung und Ansatz wurden 200.000 Zellen verwendet. Nach Alkoholfixierung mit -20 °C gekühltem Ethanol und Resuspension in 500 µl PI-Staining-Solution erfolgte die Zellzyklusanalyse am Durchflusszytometer nach 30 minütiger Inkubationszeit im Dunkeln bei RT.

3.3.3 Bestimmung von Oberflächenantigenen

Fluoreszenzmarkierte Antikörper

Die Anwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper ermöglicht durch ihre spezifische Bindung an entsprechende Oberflächenstrukturen eine genaue Zellcharakterisierung. Pro Ansatz wurden zu 250 000 Zellen 10 µl der FITC- bzw. PE-gelabelten Antikörper zugegeben, gut gemischt und für 20 min bei +4 °C inkubiert. Gleichzeitig erfolgte ein zweiter Ansatz für die Isotypenkontrolle. Nach einer Inkubationszeit und Resuspension in frisches PBS erfolgte die Messung am Durchflusszytometer.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Zelllysaten und Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Lysis-Puffer, DC Protein Assay (BioRad, München), SDS-Probenpuffer

Ein Zellpellet wurde in Lysepuffer resuspendiert und auf Eis gelegt. Nach 20 min konnten die Zellbestandteile abzentrifugiert und das Lysat im Überstand abgenommen werden. Nach Zugabe von zweifach-konzentriertem SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 wurde das Lysat bei -20°C tiefgefroren.

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde eine geringe Lysatmenge in 96-Well-Platten überführt und mit unterschiedlichen Standardproteinkonzentrationen sowie den entsprechenden Reagentien (s. DC Protein Assay) versetzt. Der zu beobachtende Farbumschlag wurde im ELISA-Reader bei 750 nm gemessen. Die Proteinkonzentration der Lysate berechnete sich aus dem im ELISA-Reader gemessenen Wert, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor sowie dem Faktor 0,5.

3.4.2 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-Probenpuffer, SDS-Gelelektrophoresepuffer, Sammelgel-Puffer, Trenngel-Puffer, Marker: Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BioRad, München)

Der Western Blot dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen. Nach Übertragen der Proteine auf einen Filter bleibt ihre Immunreaktivität erhalten und kann mittels Antikörper qualitativ und quantitativ dargestellt werden.

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden hitzedenaturierte Proteine nach ihrer Masse aufgetrennt. Das SDS, ein amphiphatisches Detergenz, lagert sich mit seiner hydrophoben Seite an die Proteinketten an, wobei sich die Anzahl der SDS-Moleküle nach der Proteingröße richtet. Auf der nicht angelagerten Seite sind die Proteine negativ geladen und können daher durch Anlegen einer Spannung getrennt werden.

Je nach Größe der Proteine bot es sich an, verschieden konzentrierte Polyacrylamidgele herzustellen. Die Acrylpolymeren bilden lange Kettenmoleküle, die durch Bisacrylamid quervernetzt werden. Je kleiner das Protein, desto größer wurde der Anteil des Bisacrylamids gewählt.

Das hergestellte Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen, nach ausreichender Polymerisierung wurde das Sammelgel, welches der Konzentrierung der zu trennenden Proteine in einer schmalen Bande dient, dazugegeben. Das Einbringen von Kämmen diente der Ausbildung von Geltaschen, in die später die gleichen Mengen an hitzedenaturierten Proteinlysate pipettiert wurden. Das entsprechende Volumen war abhängig von der jeweiligen Proteinkonzentration. Ein zusätzlich verwendeter Marker diente durch Ausbildung von Banden der späteren Größenbestimmung der Proteine.

Die Glasplatten wurden in eine Kammer gespannt und mit SDS-Elektrodenpuffer gefüllt. Die Proteinauftrennung erfolgte zwischen 30-180 mA und 200 V.

3.4.3 Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran

Transferpuffer, 20 % (V/V) Methanol, 3mm Whatman-Papier, PVDF Membran (Millipore)

Beim Transfer werden die Proteine aus dem SDS-Gel mittels eines elektrischen Feldes auf eine Membran transferiert. Die durch SDS negativ geladenen Proteine wandern innerhalb des elektrischen Feldes zur Anode. Vor der Anode befindet sich die Nitrozellulosemembran, so dass die Proteine aus dem Gel auf der Kathodenseite auf die Membran wandern.

Das Gel zwischen den Glasplatten wurde abgelöst und auf eine vorher in Methanol getränkte PVDF-Membran gelegt. Membran und Gel wurden zwischen je zwei Whatman-Papiere gelegt und in eine mit Schwämmchen gepolsterte Plastikkassette eingespannt, diese wurde zwischen die Elektroden-Platten der mit Transferpuffer gefüllten Blotkammer gehängt. Je nach Proteingröße wurde eine Stromstärke von 0,8-1 mA angelegt und für ständige Kühlung gesorgt. Nach dem Transfer wurden die auf der Membran gefärbten Banden mit einem Kugelschreiber markiert, das Gel wurde verworfen.

3.4.4 Immunchemische Darstellung von transferierten Proteinen

Blocking-Puffer, PBS-Tween-Puffer, Lumineszenz-Reagenzien, Hyperfilm™ ECL

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran zunächst bei 37°C auf dem Schüttler mit 10%igem Blocking-Puffer geblockt, was der Sättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen diente und dadurch spätere Hintergrundfärbung vermieden wurde. Nach anschließendem Waschen mit PBS-Tween wurde ein spezifischer Antikörper hinzugegeben. Nach entsprechend langer Bindungsdauer wurde der Antikörper durch Waschen wieder entfernt und ein Sekundär-Antikörper hinzugegeben. Dieser war mit Peroxidase gekoppelt und band an den Fc-Teil des Primärantikörpers. Die Membran wurde mit der Entwicklungslösung benetzt und nach Auflegen eines Films entwickelt.

Die Peroxidase des Antikörpers oxidiert den Farbstoff Luminol. Dieser emittiert durch den „Rückfall“ auf sein energieärmeres Ursprungsenergieniveau ein Lichtsignal, welches zur Schwärzung auf dem Entwicklungsfilm führt.

Durch Anfertigen einer Ladungskontrolle - in dieser Arbeit wurde β -Aktin verwendet, da es von allen Zellen in etwa gleichem Maße exprimiert wird – konnte sichergestellt werden, dass in die Geltaschen immer gleiche Proteinmengen pipettiert wurden.

Für die mehrmalige Verwendung einer Membran wurde diese mit Amidoschwarz-Entfärbelösung gestrippt. Nach mehrmaligem Waschen und anschließendem Blocken konnte nach dem oben beschriebenen Prinzip mit einem neuen Primär-Antikörper verfahren werden. Auf diese Weise wurden Membranen je nach Güte des Antikörpers bis zu viermal wiederverwendet.

3.5 Separation von CD34⁺-Zellen

CD 34 Progenitor Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach), CD34-Isolationspuffer, Iscove's Medium, IL3, IL6, SCF

Patienten mit nicht myeloischen Neoplasien erklärten sich bereit, einen Teil der gesammelten Stammzellen für Forschungszwecke zur Verfügung zu stellen. Zur Mobilisierung von CD34⁺ Zellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut wurden diese 24 bis 48 Stunden nach Verabreichung einer Chemotherapie mit IEV oder R-IEV durch Faktorgabe (G-CSF) stimuliert. Diese Applikation wurde bis zum Ende der

geplanten Leukapheresen fortgeführt. Ab einem Wert von mehr als 20 CD34⁺-Zellen/ μ l Blut wurde die Sammlung der Blutstammzellen veranlasst. Die Leukapherese wurde mit dem Blutzellseparator Cobe Spectra in der jeweilig aktuellen Softwareversion durchgeführt. Die Leukapherese wurde als erfolgreich betrachtet, wenn die Mindestzahl der benötigten Stammzellen von 4×10^6 CD34⁺-Zellen gesammelt worden ist. Zur Prävention einer Gerinnung des Blutes im Schlauchsystem des Leukaphereseegerätes wurde als Antikoagulanzen eine Mischung aus Citrat und Dextrose zugegeben. Die maximale Leukapheresedauer betrug 5 Stunden. Es folgte eine Kryokonservierung der Blutstammzellen in tiefkaltem Stickstoff.

Zur Verwendung für Forschungszwecke wurden die Leukapheresepräparate aufgetaut und gewaschen. Die durch freigesetzte DNase entstandenen Zellklumpen wurden mittels Filtration durch einen 40 μ m großen Nylonfilters entfernt.

Je 1×10^8 Zellen wurden in Puffer aufgenommen, die Zugabe eines PcR-Blocking Reagents diente dem unspezifischen Blocken. Anschließend wurde der Hapten-Antikörper zugegeben. Während einer 15 minütigen Inkubationszeit auf einem Rotator bei +4 °C konnte dieser an die CD34-Oberflächenstruktur binden. Zur Entfernung der verbleibenden ungebundenen Antikörper erfolgte ein Waschschriff. Im Anschluss wurden die Anti-Hapten-MicroBeads zugegeben, nochmals inkubiert und erneut von überschüssigem Material befreit.

Vor Verwendung der MACS-Säule wurde diese mit Puffer befeuchtet. Die Zellsuspension mit den magnetisch markierten CD34⁺-Zellen wurde eingefüllt und die unter der Säule aufgefangene Negativfraktion verworfen.

Zur Gewinnung der Stammzellen wurde die Säule nach Zugeben von Puffer aus dem Magnetfeld entfernt und die Zellen mittels eines Kolbens aus der Säule herausgepresst. Um eine möglichst hohe Aufreinigung zu erzielen, wurde der Separationsschritt über die Säule wiederholt. Der Reinheitsgrad und der Anteil viabler Zellen konnten mittels einer durchflusszytometrischen Messung bestimmt werden. Die separierten CD34⁺-Zellen wurden in Iscove's Medium aufgenommen und für Versuche weiterverwendet. Dem Iscove's Medium wurden verschiedene Wachstumsfaktoren in folgenden Konzentrationen zugegeben: IL 3: 100 ng/ml; IL 6: 100 ng/ml; SCF: 20 ng/ml.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung der Stoffwechselaktivität von AML-Zellen im MTT-Assay

4.1.1 Zytotoxizität der HDAC-Inhibitoren auf AML-Zellen

Zur Darstellung von Sensibilitätsreihen wurden die Zellen der 12 AML-Modelllinien mit HDAC-Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. TSA wurde dabei im nanomolaren, SAHA im mikromolaren Bereich eingesetzt. Die Konzentrationsbereiche waren in Vorversuchen ermittelt worden. Scriptaid konnte nur bis zu einer Konzentration von 40 μM eingesetzt werden, da sonst die kritische Grenze von 5% des Lösungsmittelanteils von DMSO überschritten worden wäre, oberhalb derer zytotoxische Wirkungen auftreten.

Nach Zugabe der HDAC-Inhibitoren zu den Zellen und einer Inkubationszeit von 72h wurde die verbleibende Stoffwechselaktivität über den Farbumschlag im MTT-Assay mittels eines ELISA-Readers ermittelt. Die so gewonnenen Daten wurden mit der Programm-Routine ausgewertet. Die Dosis-Wirkungskurven der einzelnen AML-Zelllinien sind in Abb. 13 dargestellt, Tabelle 3 gibt einen Überblick über die ermittelten IC_{50} -Werte.

Als auffällig resistent gegenüber allen drei eingesetzten Substanzen zeigten sich K-562-Zellen. Bei Scriptaid konnte kein IC_{50} -Wert ermittelt werden, da aus oben genannten Gründen keine ausreichend hohe toxische Konzentration eingesetzt werden konnte. Als ebenfalls resistent gegenüber TSA und SAHA konnten Zellen der Linie HEL eingestuft werden. Auch ML-2-Zellen lagen bei TSA über dem Medianwert, bezüglich SAHA war ihr IC_{50} -Wert noch höher als der der resistenten K-562-Zellen. Sensibel waren die Zellen der Modelle M-07e, HL-60, CMK. Gegenüber SAHA waren auch Zellen der Linien KASUMI-1 und MONO-MAC-6 sehr empfindlich.

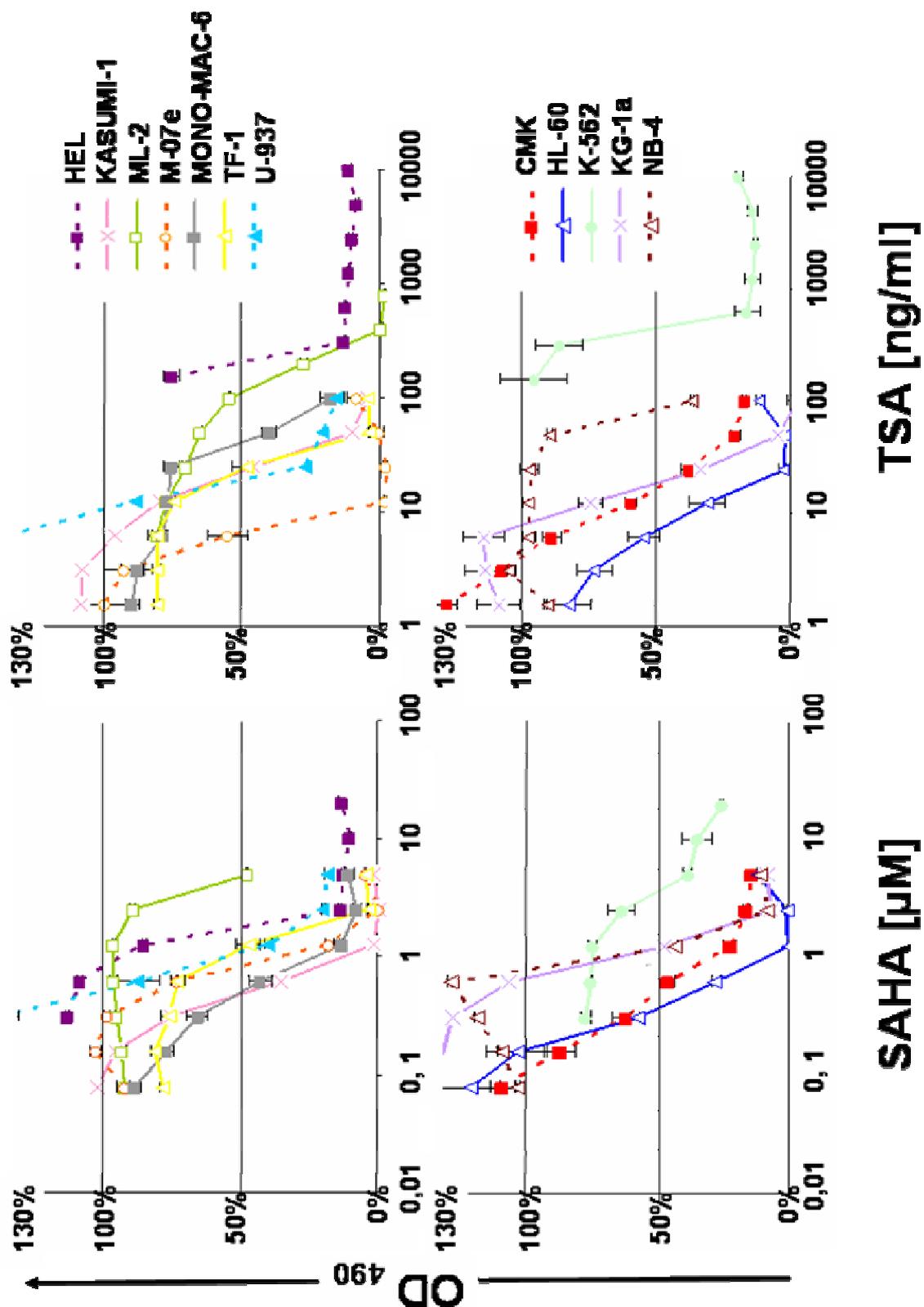


Abbildung 13. Dosis-Wirkungs-Kurven der 12 AML-Zelllinien bezüglich SAHA und TSA. Nach Inkubationszeit von 72h und Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von SAHA (im mikromolaren Bereich) und TSA (im nanomolaren Bereich) wurde der Farbumschlag im MTT-Assay als Optische Dichte bei 490 nm im ELISA-Reader ermittelt und in Korrelation zu unbehandelten Zellen gesetzt. Es handelt sich jeweils um Dreifachbestimmungen. Die Erstellung der Sensibilitätsreihen und Ermittlung der IC₅₀-Werte erfolgte mit der Programmroutine.

Zelllinie	TSA [nM]	SAHA [μ M]	Scriptaid [μ M]
M0-7e	23,2	0,9	30,8
HL-60	24,8	0,4	14
CMK	59,5	0,55	30,8
KG-1a	66,1	1,23	32,3
U-937	67,8	1,1	31,2
KASUMI-1	77,7	0,5	13
TF-1	114	1,7	31,7
MONO-MAC-6	144	0,53	23,5
NB-4	289	1,2	27
ML-2	427	4,23	26,8
HEL	728	3,2	30,7
K-562	1571	3,85	> 40
Medianwerte	299	1,62	27,7
# 1 CD 34⁺ HPC	129	n.d.	n.d.
# 2 CD 34⁺ HPC	59,5	> 5	19,5
# 3 CD 34⁺ HPC	135	> 5	12,5
# 4 CD 34⁺ HPC	61,2	5,5	7,5

Tabelle 3. Mittels MTT-Assay ermittelte IC₅₀-Werte der AML-Zelllinien und CD34⁺ HPC nach Inkubation mit TSA, SAHA und Scriptaid für 72h. Zur Gewinnung von CD34⁺-Stammzellen wurden Leukapherese-Präparate von vier verschiedenen Patienten aufgereinigt und ebenfalls mit den HDAC-Inhibitoren behandelt (# 1 bis # 4).

Um die Toxizität der HDAC-Inhibitoren auf normale CD34⁺ Progenitorzellen zu ermitteln, wurden diese Zellen aus Leukapherese-Präparaten von insgesamt vier verschiedenen Patienten aufgereinigt und mit den ausgewählten HDAC-Inhibitoren behandelt. Auffällig war, dass die IC₅₀-Werte der Vorläuferzellen bei TSA und Scriptaid deutlich unter den jeweiligen Medianwerten lagen, während von der Substanz SAHA mehr als das Dreifache der medianen Konzentration eingesetzt werden musste, um einen IC₅₀-Wert zu ermitteln. Damit zeigten sich die CD34⁺ Progenitorzellen deutlich weniger empfindlich als Zellen der Linien ML-2 und K-562.

4.1.2 Korrelation der IC₅₀-Werte von TSA und SAHA

Während bei Scriptaid viele IC₅₀-Werte um den Konzentrationsbereich von 30 µM kumulierten, streuten die Werte bei TSA und SAHA in einem wesentlich größeren Ausmaß. In der Auflistung der Werte fiel eine Ähnlichkeit der relativen Sensibilitäten zwischen TSA und SAHA auf. So zeigten sich Zellen der Linien M-07e, HL-60 und CMK bei beiden Substanzen eher sensibel, während bei K-562-Zellen zum Teil eine 20-fach höhere Konzentration eingesetzt werden musste, um eine Halbierung der Stoffwechselaktivität zu erzielen.

Zur Prüfung eines signifikanten Zusammenhangs wurde der Spearman-Test verwendet, in dem sich eine Korrelation zwischen SAHA und TSA bestätigte. Der Korrelationskoeffizient betrug $r=0,69$ bei einer Wahrscheinlichkeit von $p=0,014$. Damit ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen diesen beiden HDAC-Inhibitoren. Eine Korrelation mit Scriptaid wurde nicht nachgewiesen; allerdings sind diese Ergebnisse technisch limitiert: Scriptaid erwies sich als wenig zytotoxisch; bei den in Tabelle 3 angegebenen IC₅₀-Werten ist zu berücksichtigen, dass diese häufig in Bereichen liegen, bei denen der DMSO-Gehalt des Kulturmediums schon toxische Effekte ausübte. Aus diesem Grunde konnten auch die Dosis-Wirkungskurven nur unvollständig dargestellt werden.

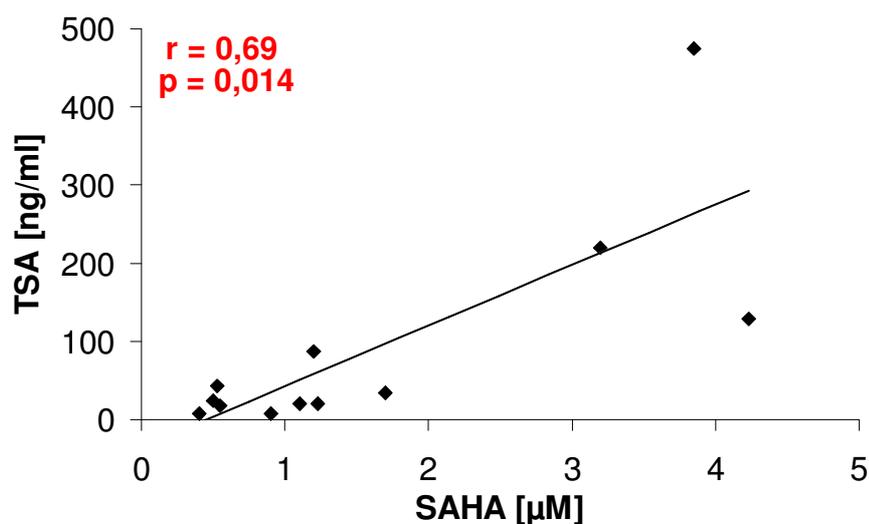


Abbildung 14. Gegeneinander aufgetragene IC₅₀-Werte der 12-AML-Zelllinien bei TSA und SAHA mit eingetragener Korrelationsgeraden. Der mit dem Spearman-Test ermittelte Korrelationskoeffizient beträgt $r=0,69$ bei einer Wahrscheinlichkeit von $p=0,014$.

4.1.3 Behandlung der Leukämiezellen mit Zytostatika

Um die Effekte von in der klinischen Behandlung eingesetzten Zytostatika auf die Modelllinien zu testen, wurden diese Zellen für einen MTT-Assay vorbereitet und für 72h mit Ara C, Etoposid und Staurosporin behandelt. Wie schon in den Versuchen mit HDAC-Inhibitoren wurden auch hier CD34⁺ Progenitorzellen eingesetzt. Die IC₅₀-Werte wurden ebenfalls mittels Dosis-Wirkungskurven ermittelt. Tabelle 4 gibt einen Überblick über diese Werte.

Zelllinie	Ara C [ng/ml]	Etoposid [ng/ml]	Staurosporin [ng/ml]
M0-7e	8490	1070	5,5
HL-60	146	1017	124
CMK	363	5500	16,5
KG-1a	285	4160	11,5
U-937	18	382	19
KASUMI-1	116	1530	3
TF-1	937	8915	44
MONO-MAC-6	405	2470	1,5
NB-4	1200	757	23
ML-2	107,5	6560	22,5
HEL	66	1914	9,2
K-562	> 10000	> 10000	218
Medianwert	1844	3690	41
# 1 CD 34⁺ HPC	n.d	n.d	n.d
# 2 CD 34⁺ HPC	16,5	467	7,5
# 3 CD 34⁺ HPC	132	232	12,5
# 4 CD 34⁺ HPC	30	171	6,5

Tabelle 4. Mittels MTT-Assay ermittelte IC₅₀-Werte der AML-Zelllinien und CD34⁺ HPC nach Inkubation mit Ara C, Etoposid und Staurosporin für 72h. Die IC₅₀-Werte wurden mittels Dosis-Wirkungskurven, wie in der Legende zu Abb. 14 beschrieben, ermittelt. Zur Berechnung der Medianwerte wurde für K-562 der Wert 10 mg/ml festgesetzt.

Als auffallend chemoresistent zeigten sich auch hier wieder die Zellen der Linie K-562. Sowohl gegenüber Ara C als auch gegenüber Etoposid lag der IC₅₀-Wert jeweils über der höchsten eingesetzten Konzentration von 10µg/ml. Einen ähnlich hohen IC₅₀-Wert zeigten bei Ara C nur Zellen des Modells M0-7e. Nach Berechnung des Medianwerts, wozu für die K-562-Zellen der Wert von 10µg/ml festgesetzt wurde,

zeigte sich, dass die IC_{50} -Werte von K-562 und M-07e mindestens das Vierfache der medianen Konzentration von 1844 ng/ml betragen, während die IC_{50} -Werte der übrigen Zelllinien deutlich unter dem Medianwert lagen. Als besonders sensibel fielen hier Zellen der Modelle U-937 und HEL auf.

Bei Etoposid waren neben K-562-Zellen auch die Zellen des Modells TF-1 sehr resistent. Ebenfalls über der medianen Konzentration von 3690 ng/ml lagen die IC_{50} -Werte von ML-2, CMK und KG-1a. Zu den chemosensiblen Zellen zählten hier die der Modelle U-937 und NB-4.

Auch gegenüber Staurosporin stellten sich K-562-Zellen als am resistentesten heraus. Der IC_{50} -Wert lag 145-fach höher als der der sensiblen MONO-MAC-6-Zellen. Als resistent konnten weiterhin HL-60-Zellen eingestuft werden, während neben MONO-MAC-6-Zellen auch die der Modelle HEL, KASUMI-1 und M0-7e hochempfindlich gegenüber Staurosporin reagierten.

Auffällig war, dass die IC_{50} -Werte der CD34⁺ Progenitorzellen nach Behandlung mit den Zytostatika jeweils deutlich unter den Medianwerten blieben. Bezüglich aller drei Substanzen waren die Zellen der Modelllinien überwiegend resistenter als die Vorläuferzellen, bei Etoposid waren sogar nur die Zellen einer Linie, U-937, sensibler als die Vorläuferzellen. Demnach ergab sich hier ein divergentes Verhalten im Vergleich zu den Ergebnissen, die die Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor SAHA lieferten. Dort waren die überwiegend resistenten Zellen der Linien K-562 und ML-2 deutlich sensibler als die Progenitorzellen.

4.1.4 Unterschiedliche Sensibilität der AML-Zellen gegenüber Zytostatika und fehlende Korrelation zwischen Zytostatika und HDAC-Inhibitoren

Bei der Behandlung der AML-Zellen mit Etoposid, Ara C und Staurosporin fiel auf, dass sich diese gegenüber den eingesetzten Substanzen unterschiedlich chemosensibel bzw. -resistent verhielten. Zwar waren die Zellen der Linie K-562 im Vergleich zu Zellen der anderen 11 Modelle am resistentesten, die Zellen der anderen Linien zeigten aber ein völlig uneinheitliches Verhalten; eine Kreuzresistenz war bei den meisten Leukämiezelllinien nicht festzustellen. So war der IC_{50} -Wert von M-07e-Zellen bei Ara C sehr hoch, bei Etoposid lag er aber deutlich unter dem Medianwert. Bei Staurosporin bewegten sich die IC_{50} -Werte im Mittelfeld. Umgekehrt

zeigten sich Zellen der Linien ML-2 und TF-1 resistent gegenüber Etoposid, bei Ara C lagen die IC_{50} -Werte jeweils deutlich unter dem Medianwert. HL-60-Zellen zeigten bei Staurosporin einen hohen IC_{50} -Wert, bei Etoposid und Ara C lagen die Werte im unteren Mittelfeld. Ausnahmen waren Zellen des Modells U-937, die sowohl bei Ara C als auch bei Etoposid chemosensibel waren, sowie Zellen der Linie HEL, die bei Ara C und Staurosporin ebenfalls zu den chemosensiblen Gruppen zugeordnet werden mussten. Insgesamt konnte - im Gegensatz zum Vergleich von SAHA und TSA - keine statistisch signifikante Korrelation der Zytostatika untereinander nachgewiesen werden. Der Korrelationskoeffizient betrug zwischen Staurosporin und Ara C 0,57, zwischen Staurosporin und Etoposid 0,51 und zwischen Ara C und Etoposid 0,33.

Ebenso diskrepanz im Sensibilitätsmuster war der Vergleich der Zytostatika mit den HDAC-Inhibitoren. Bis auf die allseits resistenten K-562-Zellen fiel insgesamt ein uneinheitliches Verteilungsmuster auf. Der IC_{50} -Wert von M-07e-Zellen war bei SAHA eher niedrig, während er bei Ara C sehr hoch lag; Zellen der Linie ML-2 waren sensibel bei Ara C und resistent gegenüber SAHA. Ähnlich unterschiedlich sensibel zeigten sich Zellen der Linien TF-1, CMK und KG-1a im Vergleich von Etoposid zu SAHA. Die statistisch errechneten Koeffizienten betrugen zwischen SAHA und Ara C 0,28 bzw. zwischen SAHA und Etoposid 0,58. Zwischen TSA und Ara C lag der Wert bei 0,57, zwischen TSA und Etoposid betrug der Wert 0,55. Somit besteht keine Kreuzresistenz zwischen einerseits Ara C oder Etoposid und andererseits HDAC-Inhibitoren.

	Ara C	Etoposid
Ara C	-	0,33
Etoposid	0,33	-
Staurosporin	0,57	0,51
SAHA	0,28	0,58
TSA	0,57	0,55

Tabelle 5. Korrelationskoeffizienten zwischen den Zytostatika untereinander bzw. zwischen den Zytostatika und HDAC-Inhibitoren. Kein Korrelationskoeffizient zeigte eine statistische Signifikanz.

4.2 Behandlung der Zelllinien mit SAHA

4.2.1 Induktion eines Zellzyklusarrests

Eine antiproliferative Wirkung eines Medikaments kann durch Apoptoseinduktion oder Zellzyklusarrest vermittelt sein. Um die Effekte von SAHA auf den Zellzyklus der Leukämiecellen zu untersuchen, wurden diese mit SAHA inkubiert. Dabei orientierten sich die ausgewählten Konzentrationen an den ermittelten IC_{50} -Werten.

In einer ersten Versuchsreihe wurden an drei aufeinander folgenden Tagen Zellzyklusanalysen der behandelten bzw. unbehandelten Zellen mittels eines Durchflusszytometers durchgeführt. Für die Definition eines Zellzyklusarrests wurde eine Mindestzunahme von 10% in der G1- bzw. G2-Phase gefordert.

Zellen des Modells K-562 zeigten bereits nach 24h eine deutliche Zunahme in der G1-Phase. Mit aufsteigender Konzentration bis zu 2,5 μ M SAHA nahm dabei der G1-Anteil kontinuierlich zu. Bei 1 μ M SAHA betrug die Zunahme 28% und konnte bei 2,5 μ M SAHA auf 45% gesteigert werden. Nach 48h wurde ein Zuwachs-Maximum von 49% erreicht. Die Zunahme der Zellen in G1 war auf Kosten der S-Phase zu verzeichnen, geringfügig vermehrte sich auch der Anteil in der G2-Phase. Nach 24h betrug die Zunahme hier 13%, zu späteren Zeitpunkten lag die Zuwachsrate in G2 jeweils unter 10%. Die Messung nach 72h zeigte eine deutliche Abnahme der Zellen in G1 bei gleichzeitigem Anstieg des prä-G1-Anteils, also der apoptotischen Zellen. Bei den Zellen der übrigen Linien zeigte die Induktion eines Zellzyklusarrests ebenfalls eine Zeitabhängigkeit. So konnte nach 24h ähnlich wie bei K-562 ein Zellzyklusarrest in NB-4-Zellen induziert werden. Bei der Konzentration von 2,5 μ M SAHA hatte nach 24h der G1-Anteil um 20% zugenommen. Nach 48h war jedoch kein Arrest mehr erkennbar, wohingegen der Anteil der apoptotischen Zellen zunahm. Bei Zellen der Linie CMK konnte erst nach 48h ein Zellzyklusarrest durch SAHA induziert werden. Nach 24h betrug der Zuwachs in G1 lediglich 3%, nach 48h konnte der Zuwachs auf 22% gesteigert werden. Allerdings nahm auch hier mit zunehmender Inkubationsdauer der prä-G1-Anteil deutlich zu; nach 72h waren 32% der Zellen apoptotisch. Der G1-Arrest in HL-60-Zellen fiel etwas geringer aus. Bei drei Versuchen betrug der durchschnittliche G1-Zuwachs bei 1 μ M SAHA nach 24h 8%, nach 48h 12%. Ein weiterer Zellzyklusarrest konnte auch für HEL-Zellen gezeigt werden. Bei vier Versuchsansätzen betrug der Zuwachs bei 1 μ M SAHA im Mittel

16%.

Bei den Zellen der übrigen Zelllinien fielen die Zuwachsraten in G1 deutlich geringer aus oder waren sogar negativ. Abbildung 15 zeigt dabei repräsentativ die Darstellung der durch SAHA induzierten Effekte, Abbildung 16 gibt einen Überblick über die Zellzyklusveränderungen nach Inkubation mit 1 μM SAHA für 24h.

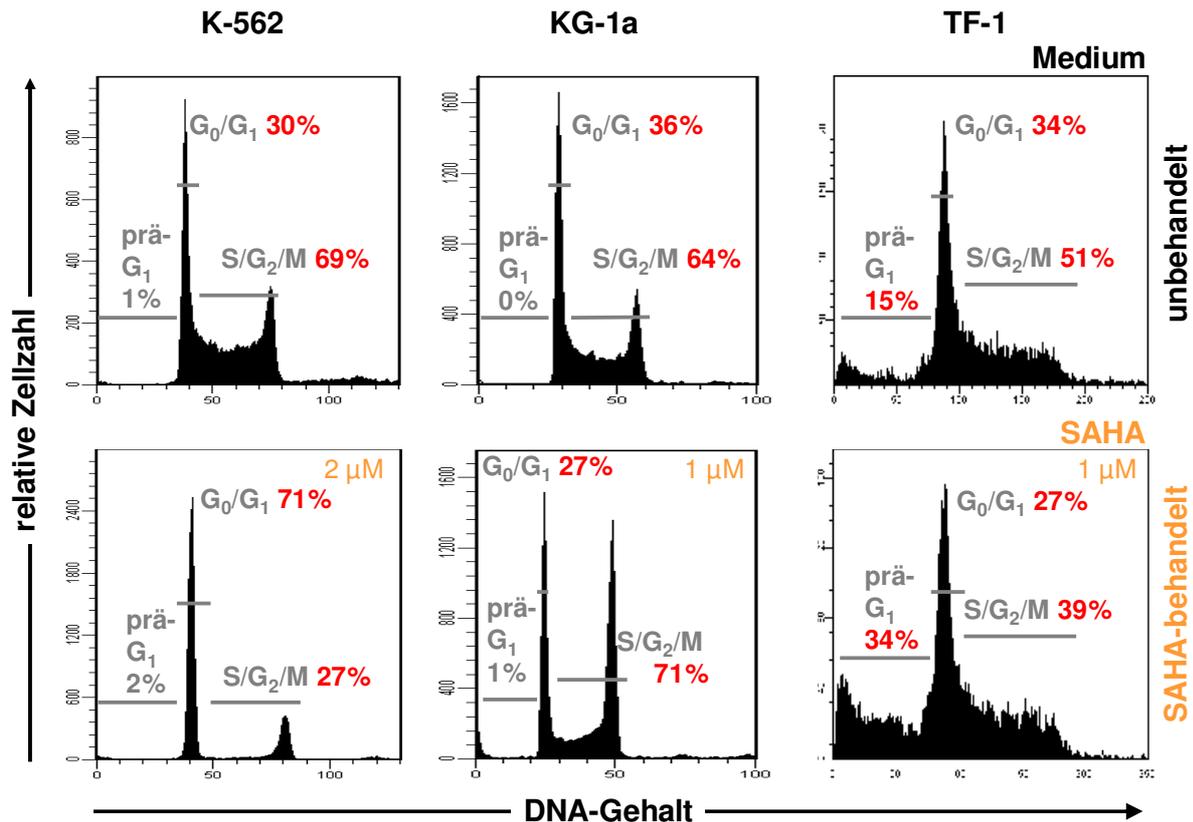


Abbildung 15. Beobachtete Effekte auf den Zellzyklus unter SAHA-Behandlung. Induktion eines G1-Zellzyklusarrest in K-562-Zellen nach Inkubation mit 2 μM SAHA, G2-Arrest in KG-1a-Zellen nach Inkubation mit 1 μM SAHA, Induktion von Apoptose in TF-1-Zellen nach Inkubation mit 1 μM SAHA jeweils nach 48h Inkubationszeit.

In Zellen zweier Linien konnte ein G2-Arrest provoziert werden. In KG-1a-Zellen wurde dabei nach 24h und 1 μM SAHA bei insgesamt zwei Versuchsansätzen eine durchschnittliche Zunahme von 20% erzielt, bei 2 μM SAHA betrug der Zuwachs 33%. In K-562-Zellen konnte bei 2,5 μM nach 24h ein Zuwachs von 13% in der G2-Phase beobachtet werden. In Zellen der übrigen Linien wurde unter den gewählten Bedingungen kein G2-Arrest nachgewiesen.

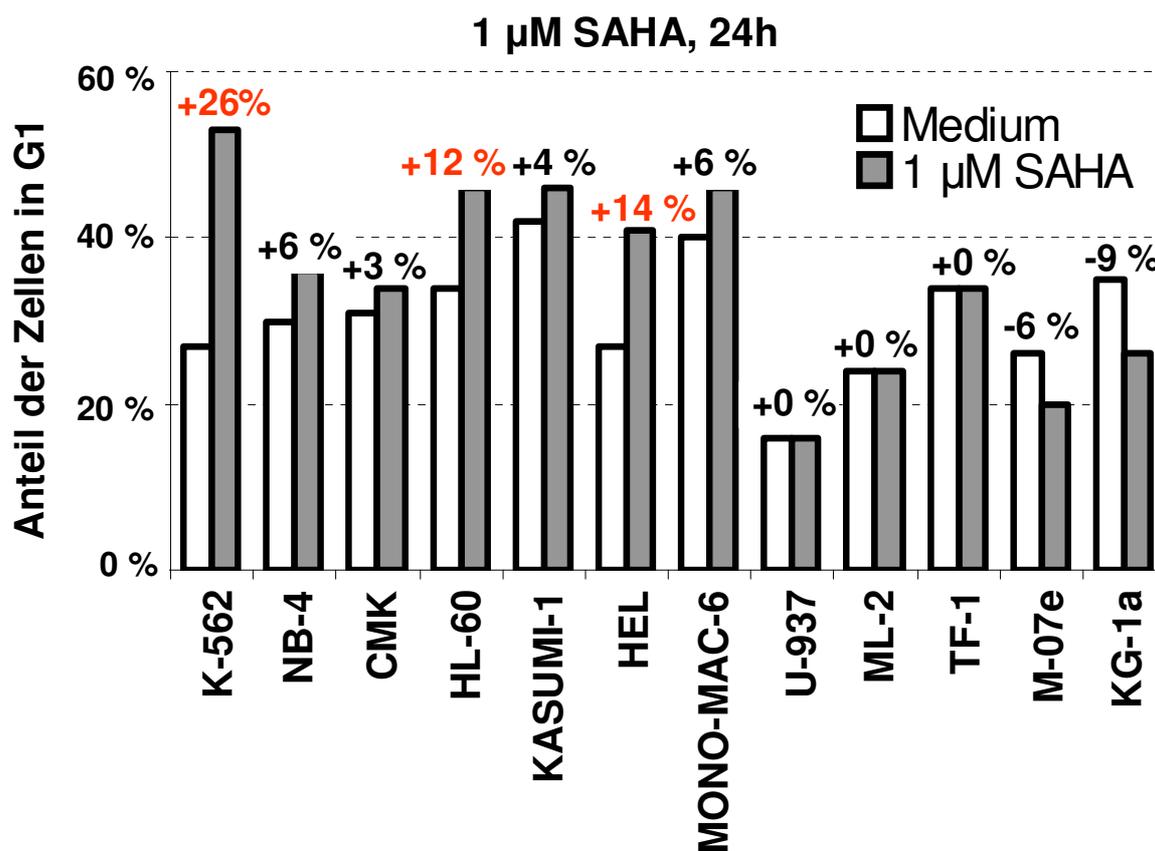


Abbildung 16. Darstellung der Zellzyklusveränderungen nach Inkubation mit 1 μ M SAHA für 24h in den Zellen der 12 Zelllinien. In dieser Versuchsreihe konnte für die Zellen der Modelle K-562, HL-60 und HEL ein Zellzyklusarrest induziert werden.

In einer zweiten Versuchsreihe sollte nicht die Zeit- sondern die Konzentrationsabhängigkeit eines Zellzyklusarrests untersucht werden. Dazu wurden SAHA-Konzentrationen bis 20 μ M eingesetzt, jedoch nur noch zu einem Zeitpunkt, nämlich nach 48h-Inkubationsdauer, gemessen. In dieser Versuchsreihe zeigte sich ein Zellzyklusarrest für Zellen weiterer Linien. Abbildung 17 zeigt die Zuwachsraten in der G1-Phase nach 48h bei 2 μ M SAHA.

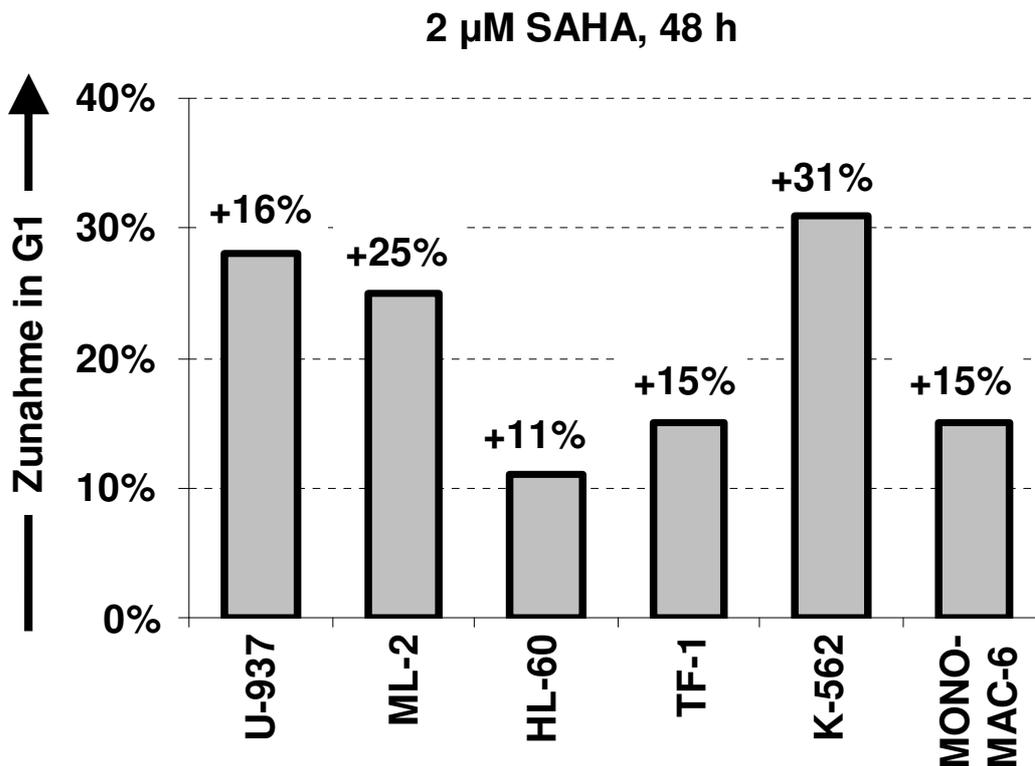


Abbildung 17. Zunahme des G1-Anteils in den Zellen der Modelllinien U-937, ML-2, HL-60, TF-1, K-562 und MONO-MAC-6. Die Inkubationsdauer betrug 48h mit 2 μ M SAHA.

Aufgrund hoher Spontanapoptoseraten insbesondere bei Zellen der Linie KASUMI-1 war die Durchführung der Versuche zum Teil sehr schwierig. In der zweiten Versuchsreihe konnte jedoch auch hier bei der Konzentration von 0,5 μ M SAHA nach 48h ein Zuwachs von 10% in der G1-Phase verzeichnet werden. In der ersten Versuchsreihe zeigten ebenfalls Zellen der Modelle U-937, MONO-MAC-6 und M-07e eher Apoptose als Arrest, in der zweiten Versuchsreihe wurde jedoch auch hier ein Zellzyklusarrest induziert, siehe hierzu Abbildung 17. Im Wesentlichen wurden jedoch die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe bestätigt.

Die Gesamtschau der Ergebnisse zeigte, dass durch die Behandlung mit SAHA zu den in dieser Arbeit ausgewählten Zeitpunkten und eingesetzten Konzentrationen in elf von zwölf Zelllinien ein Zellzyklusarrest induziert wurde. In 10 Linien handelte es sich dabei um einen G1-Arrest, während sich ein G2-Arrest nur in KG-1a- und K-562-Zellen zeigte. Die Linie K-562 war dabei die einzige, deren Zellen sowohl in G1 als auch in G2 arretierten. Einzig in Zellen der Linie M-07e war kein Arrest zu beobachten.

4.2.2 Induktion von Apoptose

Zur Darstellung der Apoptoseinduktion durch SAHA wurde ein AnnexinV-Assay verwendet. Als apoptotisch wurden bereits Zellen gewertet, die AnnexinV-positiv, aber noch PI-negativ waren. Die eingesetzte SAHA-Konzentration orientierte sich dabei wieder an den IC_{50} -Werten. Eine Übersicht über die Abnahme des viablen Zellanteils bei 1 μ M SAHA nach 48h gibt die Abbildung 18.

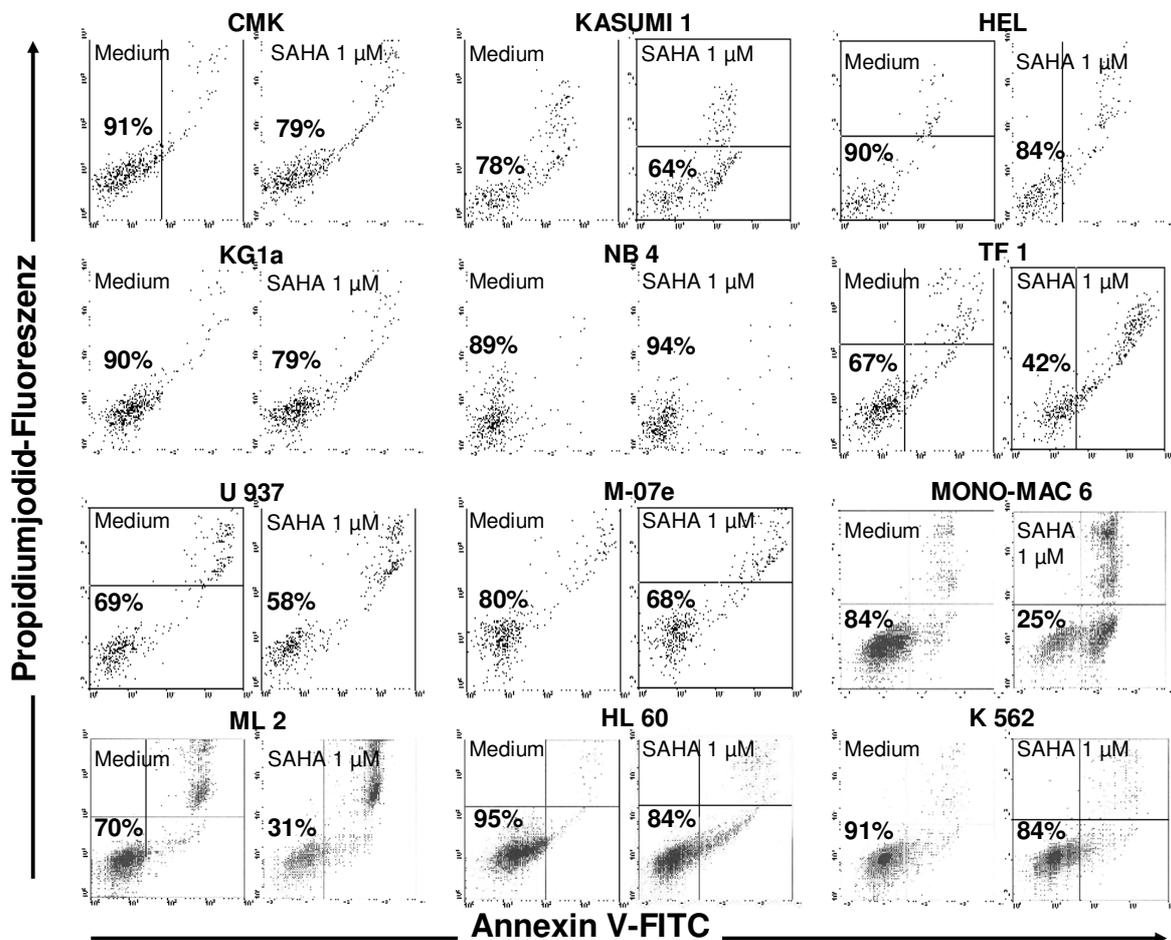


Abbildung 18. Induktion von Apoptose durch SAHA im AnnexinV-Assay. Dargestellte Veränderung des AnnexinV-negativen Anteils in den Zellen der 12 Zelllinien nach 48h Inkubation mit 1 μ M SAHA.

Schon bei den Zellzyklusanalysen war aufgefallen, dass die Zunahme von Apoptose konzentrationsabhängig ist, d.h. mit zunehmender SAHA-Konzentration nahm auch der apoptotische Zellanteil deutlich zu. Über den Zeitverlauf von 72h konnte in allen Zellen Apoptose induziert werden.

In einem Time-course-Experiment mit Zellen von drei ausgewählten Linien konnte

dabei auch eine Zeitabhängigkeit der Apoptoseinduktion beobachtet werden. Für diese Versuchsreihe wurden Zellen der Myeloblastenleukämie KASUMI-1 sowie die der beiden Erythroleukämien TF-1 und HEL ausgewählt und zu mehreren Zeitpunkten mittels AnnexinV-Assay gemessen. Eine kontinuierliche Zunahme des Apoptoseanteils wurde vor allem über die ersten 24h beobachtet.

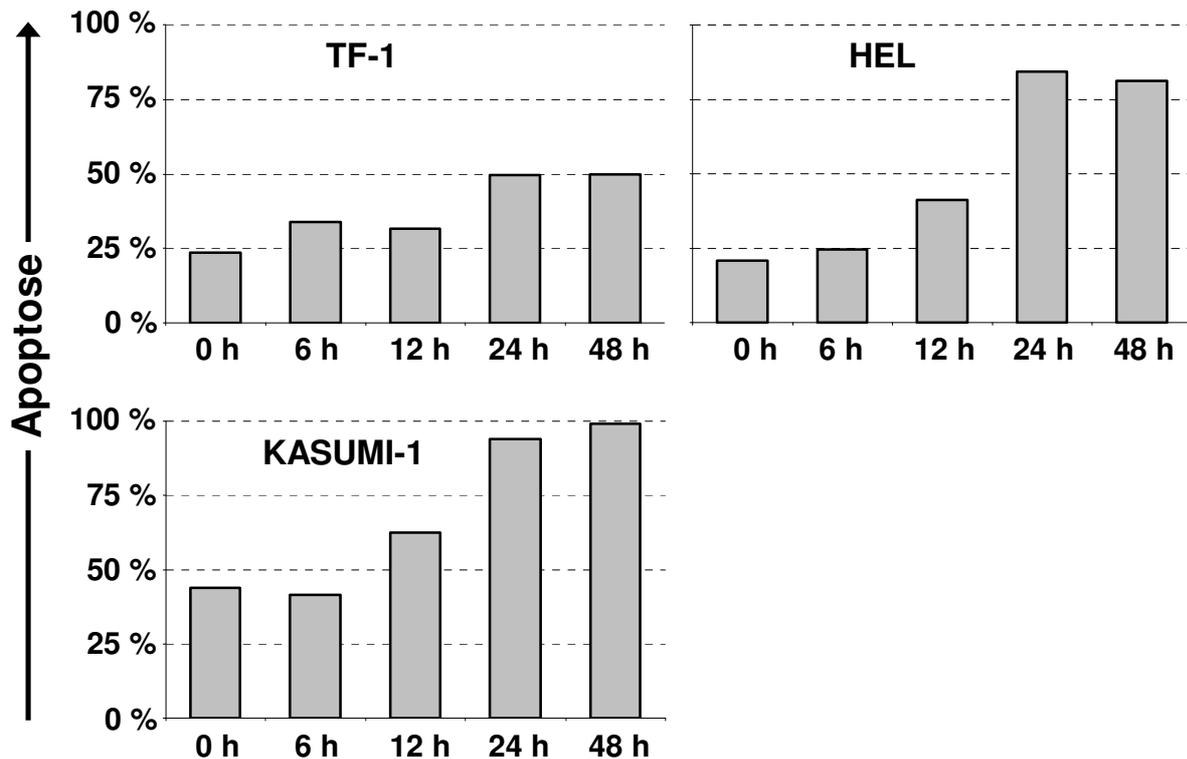


Abbildung 19. Zeitabhängige Apoptoseinduktion durch Behandlung mit SAHA. Zellen der Linien TF-1, HEL und KASUMI-1 wurden mit 2 μ M SAHA inkubiert und für einen AnnexinV-Assay vorbereitet. Es folgte eine durchflusszytometrische Messung zu den Zeitpunkten 0h, 6h, 12h, 24h und 48h.

4.3 Charakterisierung von Zellzyklus-regulierenden und Apoptose-induzierenden Proteinen mittels Western Blot

4.3.1 Zellzyklusassoziierte Proteine

Weiterhin sollte geprüft werden, ob die konstitutive Expression von Proteinen in Zellen eine Aussage über die Art bzw. den Mechanismus der Zytotoxizität zulässt. Es wurde die Expression von Zellzyklus- und Apoptose-assoziierten Proteinen als

prädiktive Voraussetzung für die oben beschriebenen Effekte durch HDAC-Inhibitoren untersucht. Dazu wurden unbehandelte Zellen lysiert und mittels Western Blot analysiert. Es wurde parallel eine Ladungskontrolle mit β -Aktin angefertigt.

Im Einzelnen wurde die Expression der Cycline A, B1, D3 und E sowie die Kinasen Cdk4 und Cdk6 analysiert.

Das während der G1-Phase exprimierte Cyclin D3 war in den Zellen von 10 Zelllinien positiv, lediglich in ML-2- und KASUMI-1-Zellen konnte es nicht nachgewiesen werden. Cdk4 war in den Zellen aller 12 Modelle vorhanden. Normalerweise werden die Kinasen nicht zellzyklusspezifisch exprimiert, ihre Menge bleibt während der Zellzyklusphasen immer gleich. Cdk6 war jedoch nur in den Zellen von 11 Linien positiv, einzig in KASUMI-1-Zellen konnte sie nicht nachgewiesen werden.

Das für den Eintritt der S-Phase wichtige Cyclin E fehlte in den Zellen der Modelle CMK und KASUMI-1 bzw. wurde nur sehr schwach ausgebildet. Stark exprimiert wurde Cyclin E dagegen in Zellen der Linien K-562, HL-60, KG-1a, U-937, TF-1 und NB-4. Cyclin A konnte in allen untersuchten Linien nachgewiesen werden. Das für die Regulation der M-Phase essentielle Cyclin B1 war außer in ML-2-Zellen ebenfalls in allen anderen 11 Linien vorhanden. Aufgrund des überwiegend positiven Expressionsmusters der Cycline ist eine Aussage zum Verhalten des Zellzyklus durch SAHA-Exposition nicht möglich.

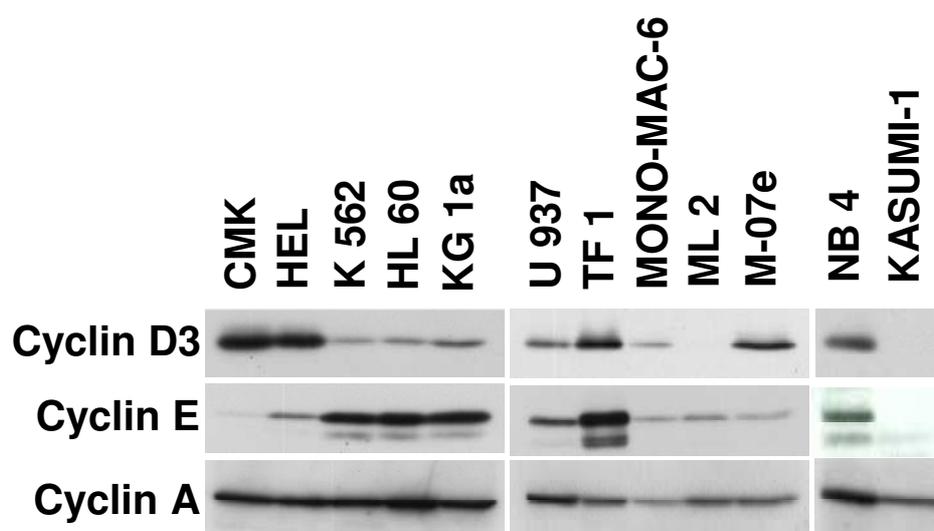


Abbildung 20. Darstellung der Cycline D3, E und A in den Zellen der 12 Modelllinien. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot.

Ausgewählte Blots sind in Abbildung 20 zu sehen. Tabelle 6 enthält eine Zusammenfassung der Expressionsmuster der untersuchten Kinasen und Cycline.

Zelllinie	Cdk 4	Cdk 6	Cyclin D3	Cyclin E	Cyclin A	Cyclin B1
CMK	++	++	++	-	++	++
HEL	++	+	++	+	++	++
K-562	++	+	+	++	++	++
HL-60	++	+	+	++	++	+
KG-1a	+	++	+	++	++	++
U-937	++	+	+	+	++	++
TF-1	++	+	++	++	+	++
MONO-MAC-6	++	++	+	+	+	+
ML-2	++	+	-	+	+	-
M0-7e	++	++	++	+	++	++
NB-4	++	++	++	+	++	++
KASUMI-1	++	-	-	-	+	+

Tabelle 6. Expressionsmuster der Zellzyklus-regulierenden Proteine Cdk4, Cdk6, Cyclin D3, Cyclin E, Cyclin A und Cyclin B1 in den Zellen der 12 AML-Linien. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot.

4.3.2 An den Übergängen der Zellzyklusphasen beteiligte Proteine

Des Weiteren wurde die Expression ausgewählter Proteine, die maßgeblich an den Kontrollpunkten des Zellzyklus beteiligt sind, mittels Western Blot untersucht. Im speziellen waren dies die Cdk-Inhibitoren p16 und p27, die Tumorsuppressorgene p53 und Rb sowie das Protoonkogen c-myc.

Als Vertreter der INK4-Familie wurde p16 analysiert. Dieses Protein inhibiert die Cyclin D-Cdk-Aktivität und kann so zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase führen. Es wurde in Zellen von drei Zelllinien nachgewiesen: in KG-1a, TF-1 und MONO-MAC-6. In TF-1- und MONO-MAC-6-Zellen konnte durch SAHA ein Arrest in der G1-Phase induziert werden, viele andere Proteine mit größeren Zuwachsraten in der G1-Phase wie CMK-, K-562- oder NB-4-Zellen waren jedoch p16-negativ, so dass die Expression dieses Proteins unter nativen Bedingungen keine Aussage über die SAHA-induzierten Effekte zulässt. In KG-1a-Zellen wurde p16 ebenfalls nachgewiesen, bei diesen Zellen konnte jedoch nur ein G2-Phase ein Arrest

provoziert werden.

Der Inhibitor der Cip/Kip-Familie p27 war in den Zellen der meisten Linien vorhanden, so dass hier eine differenzierte Aussage zu SAHA-induzierten Effekten nicht möglich ist. p27-negativ waren nur MONO-MAC-6- und ML-2-Zellen.

Von den Tumorsuppressorgenen wurden p53 und Rb untersucht. p53 war in der Hälfte der Linien vorhanden; auffällig war, dass die SAHA-resistenten Zellen der Modelle K-562 und ML-2 dieses Protein nicht exprimierten; dagegen besaßen es die SAHA-empfindlichen Zellen der Modelle MONO-MAC-6, KASUMI-1 und M-07e. Rb wurde in neun der zwölf untersuchten Modelle exprimiert, es fehlte in Zellen der Linien K-562, TF-1 und MONO-MAC-6, Zelllinien, die sich gegenüber den ausgewählten Substanzen sehr unterschiedlich verhielten. Das Protoonkogen c-myc war ebenfalls überwiegend vorhanden, es fehlte in MONO-MAC-6-, ML-2- und KASUMI-1-Zellen. Auch hier war die Empfindlichkeit gegenüber SAHA sehr unterschiedlich.

Zelllinie	p 16	p 27	p 53	Rb	c-myc
CMK	-	++	++	++	++
HEL	-	++	++	++	+
K-562	-	+	-	-	++
HL-60	-	++	-	++	++
KG-1a	+	++	-	++	+
U-937	-	++	-	++	+
TF-1	++	++	-	-	+
MONO-MAC-6	++	-	+	-	-
ML-2	-	-	-	++	-
M-07e	-	+	+	++	+
NB-4	-	+	++	+	+
KASUMI-1	-	+	++	+	-

Tabelle 7. Expressionsmuster der Cdk-Inhibitoren p16, p27, der Tumorsuppressorproteine p53 und Rb sowie des Protoonkogens c-myc in den Zellen der 12 Modelllinien. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot.

4.3.3 Apoptose-assoziierte Proteine

Es wurden Proteine des in- als auch extrinsischen Apoptosewegs analysiert. Als Vertreter des intrinsischen Systems wurden vor allem Mitglieder der Bcl-2-Familie untersucht; insbesondere waren dies die antiapoptotisch wirkenden Proteine Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl-1 sowie die proapoptotisch wirkenden Proteine Bax, Bid und Bad.

Bcl-2 wurde dabei in Zellen von 50% der untersuchten Linien exprimiert, es zeigten sich sowohl die in den Sensibilitätsversuchen gegenüber HDAC-Inhibitoren resistenten Zellen wie die der Linie ML-2 positiv für Bcl-2 als auch HDAC-Inhibitoren-sensible Zellen wie die der Modelle M-07e und HL-60. Bei der Expression von Bcl-x_L verhielt es sich ähnlich: Dieses Protein wurde sowohl in den SAHA-resistenten Zellen der Modelle K-562 und HEL ausgebildet als auch in den empfindlichen der Linie CMK.

Auch die Analyse der Proteinexpression in den Zellen, die gegenüber den klassischen Apoptoseauslösern wie Ara C und Etoposid resistent sind, zeigte keine kohärenten Zusammenhänge. Resistent gegenüber Ara C waren M-07e- und K-562-Zellen, sensibel waren U-937- und HEL-Zellen. Bcl-2 wurde sowohl in Zellen der Linie M-07e als auch denen der Linie U-937 ausgebildet, nicht jedoch in Zellen der Modelle HEL und K-562. Bcl-x_L war positiv in Zellen von K-562 und M-07e sowie in den sensibleren Zellen der Linien HEL, HL-60 und CMK. Bei Etoposid verhielt es sich ähnlich: die gegenüber dem Topoisomerase-Hemmer resistenten Zellen der Modelle K-562 und TF-1 waren Bcl-2 negativ, positiv waren jedoch die sensiblen Zellen der Linien NB-4 und U-937. Die Expression von Bcl-x_L war positiv in den Etoposid sensiblen Zellen der Linien M-07e und HEL, es wurde jedoch auch in den resistenten K-562- und TF-1-Zellen ausgebildet. Aufgrund dieser divergenten Expression scheinen Bcl-2 und Bcl-x_L daher nicht für die Apoptoseregulation verantwortlich zu sein.

Bezüglich Mcl-1 konnte keine genauere Aussage bezüglich Apoptoseregulation erfolgen, da dieses Protein in den Zellen der meisten Linien ausgebildet wurde. Nicht nachweisbar war es in MONO-MAC-6- und ML-2-Zellen. Ebenso verhielt es sich mit der Expression des antiapoptotischen Proteins XIAP; dieser Caspase-Inhibitor war in elf der zwölf untersuchten Modelle nachweisbar.

Die proapoptotischen Proteine Bax und Bid wurden in allen untersuchten Zellen ausgebildet. Die Expression von Bad war überwiegend positiv, konnte jedoch in den

Zellen der Linien MONO-MAC-6, ML-2 und KASUMI-1 nicht nachgewiesen werden. Die Zellen dieser drei Modelle verhielten sich gegenüber den eingesetzten Substanzen zum Teil ebenfalls divergent.

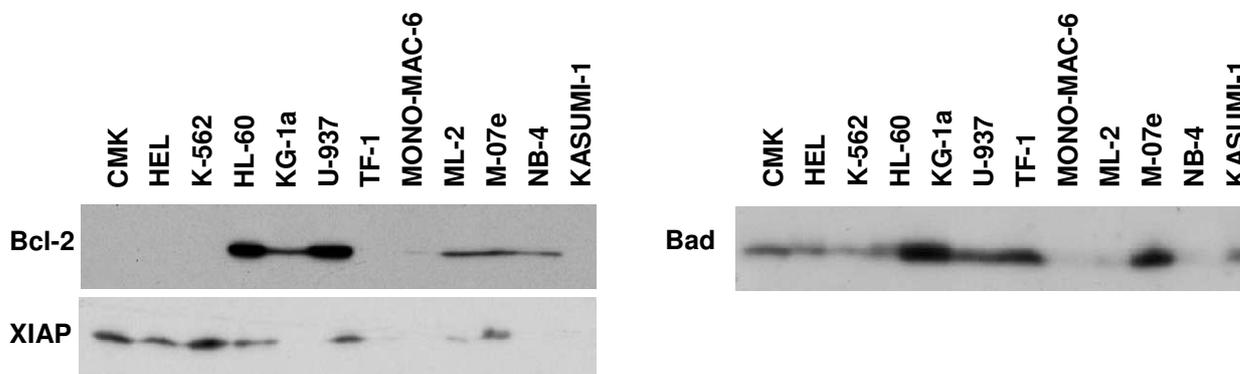


Abbildung 21. Darstellung der antiapoptischen Proteine Bcl-2 und XIAP in den Zellen der 12 AML-Zelllinien.

Abbildung 22. Darstellung des proapoptischen Proteins Bad in den Zellen der 12 AML-Zelllinien.

Als Vertreter des extrinsischen Wegs wurde die Expression der Rezeptoren der TNF-Familie TNF-R1 und FAS sowie DR3 und DR4 und die zugehörigen Liganden FAS-L und TRAIL untersucht. Als intrazelluläres Vermittlungsmolekül des extrinsischen Wegs wurde zudem FADD untersucht, welches sich nach Aktivierung der Rezeptoren durch seine Liganden an die intrazelluläre Domäne der Rezeptoren anlagert. Auch hier ergaben sich völlig unterschiedliche Expressionsmuster: TNF-R1, FAS und DR4 wurde sowohl in den allseits resistenten Zellen der Linie K-562 als auch in den sensiblen HL-60- und U-937-Zellen exprimiert. Auch FAS-L und FADD wurden in K-562- sowie in U-937- bzw. in HL-60-Zellen ausgebildet. Bei TRAIL konnte ebenfalls kein Zusammenhang zwischen Expression und Sensibilitätsverhalten festgestellt werden. DR3 wurde in den Zellen aller Linien nachgewiesen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression eines pro- oder antiapoptischen Proteins keine prädiktive Voraussetzung für das Sensibilitätsverhalten gegenüber der Behandlung mit einem HDAC-Inhibitor oder klassischen Apoptoseauslösern wie Ara C oder Etoposid ist. Tabelle 8 gibt einen Überblick über das Expressionsmuster der untersuchten Proteine in unbehandelten Zellen.

Zelllinie	Bcl-2	Bcl-x _L	Mcl-1	XIAP	Bax	Bad	Bid	TNF-R1	FAS	FAS-L	DR3	DR4	TRAIL	FADD
CMK	-	++	++	+	++	+	+	+	+	+	+	+	-	+
HEL	-	++	++	+	++	+	+	-	++	++	+	++	-	+
K-562	-	++	++	+	++	+	+	+	+	++	+	++	-	+
HL-60	++	-	+	+	++	+	+	++	++	-	++	++	-	+
KG-1a	+	+	+	-	++	++	+	-	++	-	+	+	+	+
U-937	++	-	++	+	++	++	+	++	+	+	+	+	-	-
TF-1	-	++	++	-	++	++	+	++	+	+	+	-	+	+
MONO-MAC-6	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-	+	-	-	+
ML-2	+	-	-	(+)	++	-	+	-	-	-	+	-	+	-
M-07e	+	++	+	+	++	++	+	-	+	-	++	+	++	+
KASUMI-1	-	-	+	-	++	-	+	++	-	-	+	-	-	+
NB-4	+	-	+	-	++	+	+	+	-	-	++	++	++	+

Tabelle 8. Expressionsmuster der apoptoseassoziierten Proteine des in- und extrinsischen Wegs bei den Zellen der 12 AML-Zelllinien. Abgebildet sind Vertreter der antiapoptotischen Bcl-2 Familie mit Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1 sowie XIAP und die proapoptotischen Vertreter Bax, Bad und Bid. Als Mediatoren des extrinsischen Wegs sind TNF-R, FAS, FAS-L, DR3, DR4, TRAIL und FADD abgebildet.

4.4 Korrelationen zwischen nativen Proteinexpressionen und Induktion von Apoptose oder Zellzyklusarrest durch SAHA

4.4.1 Apoptoseinduktion und Expression von FAS, DR4 und Bad

Wie bereits beschrieben, war die Expression eines pro- oder antiapoptotischen Proteins nicht prädiktiv für das Sensibilitätsverhalten einer Zelle im MTT-Versuch. Die Analyse des durch SAHA provozierten Apoptosegrads und der Vergleich mit der Expression eines dieser pro- oder antiapoptotischen Proteine zeigte jedoch für einige Proteine eine statistisch signifikante inverse Korrelation: zum einen war dies Bad; ein Apoptosevermittler des intrinsischen Systems, zum anderen waren dies FAS und DR4, Mediatoren des extrinsischen Systems. Zellen mit hohen Apoptoseraten wie die der Linien ML-2, KASUMI-1 und MONO-MAC-6 bildeten gerade diese proapoptotischen Proteine nicht aus.

Die Expression anderer proapoptotischen Proteine des extrinsischen Systems wie TNF-R1, FAS-L und TRAIL zeigte keine Korrelation mit der Höhe des induzierten Apoptosegrads.

Protein	p
FAS	0,018
DR4	0,001
Bad	0,001

Tabelle 9. Dargestellte p-Werte (2-seitig) mit signifikanter inverser Korrelation. Ein Zusammenhang besteht zwischen dem Ausmaß der Apoptoseinduktion durch SAHA und der fehlenden Expression der Proteine FAS, DR4 und Bad in unbehandelten Zellen.

Protein	p
TNF-R1	0,599
FAS-L	0,422
TRAIL	0,649

Tabelle 10. Dargestellte p-Werte (2-seitig) ohne signifikante Korrelation. Es besteht kein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Apoptoseinduktion durch SAHA und der Expression der Proteine TNF-R1, FAS-L und TRAIL in unbehandelten Zellen.

4.4.2 p53 und Rb bzw. p53 und Bcl-2

Da in der Literatur eine gegenseitige Regulation von p53 und Rb beschrieben wird (Godefroy, Lemaire et al. 2006), wurde untersucht, ob in den unbehandelten Zellen ein Zusammenhang zwischen der Expression dieser beiden Proteine besteht. Dazu wurde der Fisher-Exact-Test verwendet. Hier zeigte sich keine inverse Korrelation zwischen der Ausbildung von p53 und Rb ($r=0,696$, $p=0,214$).

Bei der Betrachtung der Proteinexpressionen bestand der Verdacht, dass für die Proteine Bcl-2 und p53 eine inverse Korrelation besteht. Eine statistische Signifikanz konnte jedoch nicht erreicht werden ($r=-0,333$, $p=0,567$).

4.4.3 p53 und Zellzyklus- bzw. Apoptoseinduktion

Die statistische Auswertung der Ergebnisse zeigte im Mann-Whitney-Test keine signifikante Korrelation zwischen p53 und dem Ausmaß des induzierten Zellzyklusarrests ($p=0,267$). Zur Berechnung wurden dabei die Zuwachsraten in G1 bzw. G2 bei individuell unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten verwendet. Ebenfalls nicht statistisch signifikant korrelierend war die p53-Expression in unbehandelten Zellen und das durch SAHA induzierte Apoptoseausmaß ($p=0,155$). Diese Berechnungen fußen auf den Apoptoseraten, die nach Inkubation mit 1 μM SAHA für 48 h erzielt wurden.

4.5 Bestimmung von Oberflächenstrukturen auf AML-Zelllinien

4.5.1 Die Zelllinie CMK

4.5.1.1 Induktion von Differenzierung in CMK

Durch Inkubation der Zellen mit SAHA konnte beobachtet werden, dass sich bei der megakaryoblastischen Linie CMK das Adhäsionsverhalten der Zellen änderte. Ein Teil der Zellen heftete sich an die Böden der Inkubationsflaschen an, während der andere Teil in Suspension verblieb. Bei den Adhäsionszellen konnten mikroskopisch deutliche spindelförmige Zellausläufer bzw. Podophyten erkannt werden. Aufgrund dieser Tatsache wurde diese Zelllinie gesondert betrachtet und ausführlicher hinsichtlich der Expression von Oberflächenmarkern, die während der Hämatopoese ausgebildet werden, analysiert. Nach Exposition gegenüber 2 μ M SAHA für 48h wurde die Expression von CD41, CD64 und CD123 auf den drei Populationsgruppen native Zellen, nach SAHA-Zugabe adhärent gewordene sowie in Suspension verbliebene Zellen bestimmt. Durch die Behandlung mit SAHA konnte eine Zunahme der Expression des Fibronectinrezeptors CD41 beobachtet werden. Auf unbehandelten Zellen exprimierte bereits ein Anteil von 22% der Zellen dieses Antigen. Bei den Suspensionszellen zeigten schon knapp doppelt so viele Zellen den Oberflächenrezeptor, bei den adhärent gewordenen Zellen nahm der Anteil der Zellen auf 60% zu. Weiterhin konnte eine Zunahme der Expression des Phagozytose-vermittelnden Rezeptors CD64 beobachtet werden. Es verdoppelte sich die CD64-Population von 5% bei unbehandelten Zellen auf 10% bei den adhärent gewordenen Zellen. Auch bei CD123 wurde eine zunehmende Expression unter SAHA-Behandlung beobachtet: es zeigte sich knapp eine Verdreifachung des CD123-tragenden Anteils. Abbildung 23 gibt die Veränderung des Expressionsmusters wieder:

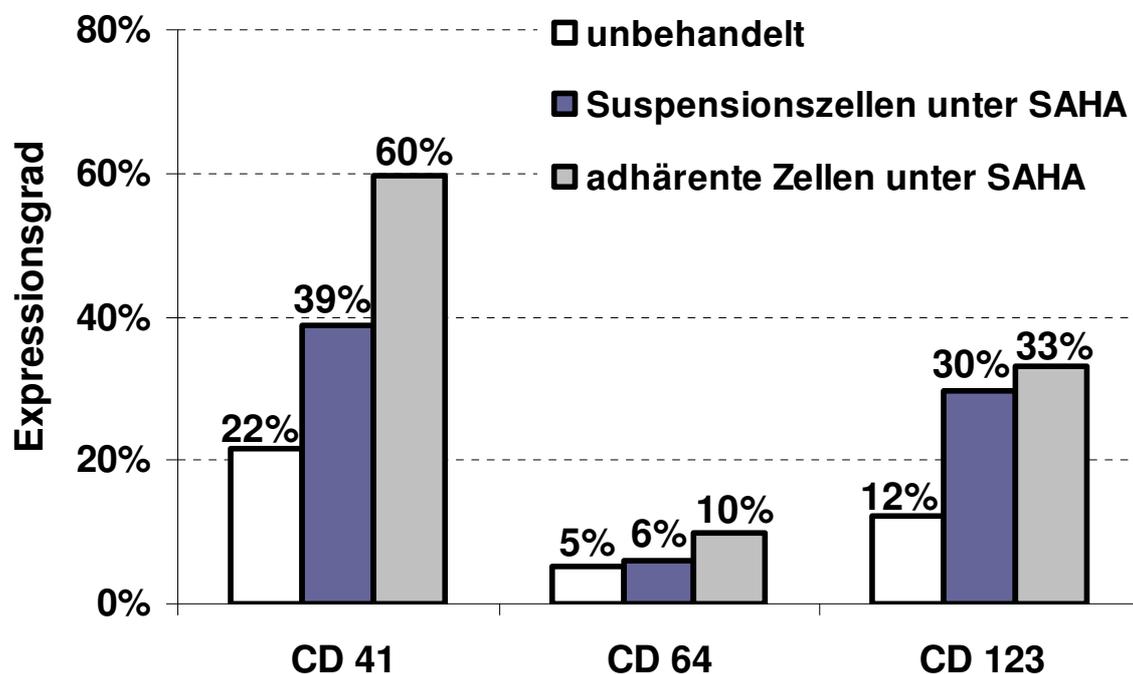


Abbildung 23. Zunahme der Expression der Oberflächenmarker CD41, CD64 und CD123 auf CMK-Zellen unter Behandlung mit SAHA. Verglichen wurden unbehandelte CMK-Zellen mit CMK-Zellen, die nach Inkubation mit 2 μ M SAHA für 48h in Suspension verblieben bzw. adhärenente wurden. Die Bestimmung der Oberflächenmarker erfolgte mittels Durchflusszytometer.

Ebenfalls eine zunehmende Expression konnte für den Marker CD16 festgestellt werden; ausgewertet wurden Suspensionszellen von CMK. Dieser Marker ist nicht nur an Phagozytose beteiligt, sondern auch an antikörperabhängiger Zytotoxizität. Hier konnte eine Zunahme von 4% bei unbehandelten Zellen auf 20% durch SAHA-Behandlung erreicht werden. Die Untersuchung anderer Oberflächenmarker blieb dagegen durch SAHA-Behandlung relativ unbeeinflusst. Nach Inkubation mit 2 μ M für 48h war die Expression von CD11b, CD33, CD34, CD71 und CD117 in etwa unverändert. Der Monozyten-Marker CD14 wurde weder auf nativen noch auf behandelten FAB M7 CMK-Zellen ausgebildet. In Tabelle 11 sind die Expressionsgrade von CD11b, CD14, CD33, CD34, CD71 und CD117 aufgeführt:

Oberflächenmarker	Medium	Suspensionszellen
CD 11b	98%	99%
CD 14	0%	0%
CD 33	99%	94%
CD 34	41%	43%
CD 71	100%	100%
CD 117	100%	100%

Tabelle 11. Expression weiterer Oberflächenmarker auf nativen und SAHA-behandelten CMK-Zellen. Verglichen wurden native Zellen im Vergleich zu SAHA-behandelten CMK-Zellen (2 μ M, 48h).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass SAHA die myeloische und megakaryozytäre Differenzierung der Hämatopoese induzierte. Dies beeinflusste auch das Adhäsionsverhalten der Zellen.

4.5.1.2 Bestimmung der Resistenzgene auf CMK

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Oberflächenmarkern wurden ausgewählte Zytostatika-Resistenzgene untersucht. Verglichen wurden unbehandelte Zellen mit den Suspensionszellen bzw. den adhärent gewordenen Zellen nach SAHA-Behandlung. Die Zellen wurden nach Inkubation mit 2 μ M SAHA für 48h am Durchflusszytometer analysiert.

Bei MRPr1 konnte durch die Behandlung mit SAHA eine Expressionszunahme erzielt werden, der Anteil der für dieses Resistenzgen positiven Zellen vervierfachte sich von 2% bei unbehandelten Zellen auf 8% in der adhärent gewordenen Population. Die Expression von P-gp änderte sich durch SAHA-Behandlung kaum und lag bei etwa 8%. BCRP wurde zu nahezu 100% in den drei Populationen exprimiert.

Resistenzgen	Medium	Suspensionszellen	adhärente Zellen
MRPr1	2%	3%	8%
P-GP	9%	8%	8%
BCRP	99%	99%	98%

Tabelle 12. Expression der Resistenzgene P-GP, MRPr1 und BCRP in CMK-Zellen. Verglichen wurden native CMK-Zellen sowie Suspensionszellen und adhärent gewordene Zellen nach Behandlung mit 2 μ M SAHA für 48h.

4.5.2 Expression von Oberflächenmarkern auf den Erythroleukämien TF-1 und HEL

Die Zelllinien TF-1 und HEL werden beide als Erythroleukämien klassifiziert, sie zeigten in den vorliegenden Versuchsreihen jedoch unterschiedliche Verhaltensweisen. Gegenüber den HDAC-Inhibitoren TSA und SAHA waren die Zellen des Modells HEL resistenter als die von TF-1, bei den Zytostatika Ara C, Etoposid sowie dem Apoptoseinduktor Staurosporin verhielten sich die TF-1-Zellen deutlich resistenter. Daher wurde die Expression ausgewählter Oberflächenmarker auf diesen beiden Modellen analysiert. Übereinstimmung zeigte sich in der Expression von CD33 und CD45, beide Marker waren zu fast 100% vorhanden. Unterschiedliche Expressionsmuster fielen jedoch für CD11b, CD123 und CD36 auf. Letzterer wurde zu fast 100% auf HEL-Zellen ausgebildet, während bei TF-1 nur etwa $\frac{2}{3}$ der Zellen diesen Rezeptor ausbildeten. Auffallend war, dass CD11b kaum und CD123 gar nicht auf HEL-Zellen zu finden war, während beide Antigene auf fast der gesamten TF-1 Population exprimiert wurden.

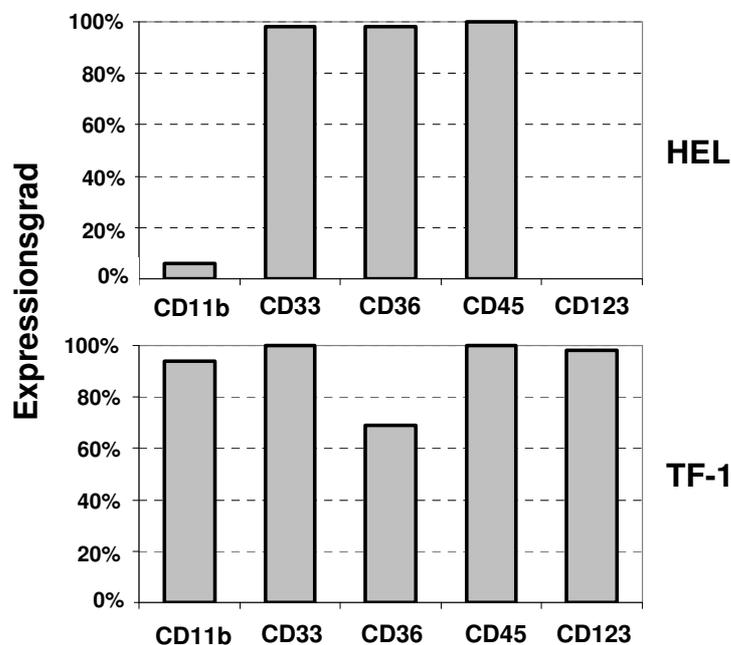


Abbildung 24. Bestimmung der Oberflächenmarker CD11b, CD33, CD36, CD45 und CD123 auf unbehandelten Zellen der Linien TF-1 und HEL.

4.5.3 Expression von Resistenzgenen in AML-Zellen

Die Expression von BCRP und P-gp wurde auch in den Zellen der übrigen AML-Linien untersucht. Aufgrund von Problemen während der Kultivierung und unzureichender Generierung konnten die Zellen der beiden Modelle M-07e und KASUMI-1 in diesem Versuch nicht analysiert werden.

Das Ausmaß der Expression von BCRP stellte sich in den Zelllinien unterschiedlich dar. Wie auch in CMK wurde dieses Resistenzgen in einem überwiegenden Teil der Zellen der Linien U-937, MONO-MAC-6, ML-2 und NB-4 ausgebildet. Weniger stark, aber dennoch in einem Großteil der Population vorhanden war BCRP in den Zellen der Modelle K-562, HEL, HL-60, KG-1a und TF-1.

P-gp wurde weit weniger stark exprimiert. Von den 10 getesteten Linien waren nur HEL- und HL-60-Zellen überwiegend positiv für dieses Resistenzgen. Tabelle 13 zeigt die Auflistung der Expressionsgrade von P-gp und BCRP:

Zelllinie	P-gp	BCRP
CMK	9%	99%
K-562	0%	45%
HEL	91%	49%
HL-60	94%	32%
KG-1a	4%	31%
U-937	0%	66%
TF-1	1%	29%
MONO-MAC-6	0%	97%
ML-2	1%	79%
NB-4	0%	59%
KASUMI-1	n.e.	n.e.
M-07e	n.e.	n.e.

Tabelle 13. Expression der Resistenzgene P-gp und BCRP in den Zellen der Leukämie Linien. Aufgrund von ungenügender Generierung von Zellmaterial war die Bestimmung in den Zellen der Linien KASUMI-1 und M-07e nicht möglich.

Beim Vergleich der Expressionsgrade der Resistenzgene in den unbehandelten Zellen mit dem Sensibilitätsverhalten gegenüber den verwendeten Zytostatika fällt auf, dass die Resistenzgen-tragenden Zellen keineswegs resistenter sind als die Zellen, die P-gp oder BCRP nicht ausbilden: HEL- und HL-60-Zellen exprimieren P-gp in starkem Maße, reagieren aber gegenüber Ara C und Etoposid eher sensibel.

Bei Staurosporin verhalten sich die beiden Modelle unterschiedlich: HL-60-Zellen reagieren eher resistent, HEL-Zellen dagegen eher sensibel. Im Gegensatz dazu ist P-gp in den allseits resistenten K-562-Zellen nicht nachweisbar. Das Vorhandensein von P-gp scheint daher in diesen Leukämiezellen nicht prädiktiv für die Resistenz gegenüber den verwendeten Zytostatika zu spielen.

Ebenso verhält es sich mit der Expression von BCRP. Auch hier schützt seine Expression nicht vor der zytotoxischen Wirkung der verwendeten Zytostatika. BCRP wird in allen untersuchten Zellen in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. Dabei kann nicht darauf geschlossen werden, dass die resistentesten Zellen auch die höchsten Expressionsgrade haben; so wird in den Populationen von K-562 und TF-1 das Resistenzgen BCRP nur zu etwa der Hälfte bzw. einem Drittel der Zellen exprimiert, die Zellen der Modelle CMK oder MONO-MAC-6 bilden es zu fast 100% aus. Weiterhin scheinen die beiden Resistenzgene P-gp und BCRP auch nicht entscheidend für das Sensibilitätsverhalten der Zellen gegenüber den verwendeten HDAC-Inhibitoren zu sein. Bei den beiden P-gp positiven Populationen reagierten HL-60-Zellen sensibel, während HEL-Zellen eher resistent gegenüber TSA oder SAHA waren. Auch für BCRP kann keine prädiktive Aussage bezüglich des Sensibilitätsverhaltens gegenüber HDAC-Inhibitoren getroffen werden.

5 Diskussion

Krebs ist eine genetisch bedingte Erkrankung, bei der es durch Deletionen, Mutationen oder epigenetische Veränderungen zu einer gestörten Signaltransduktion in der Zelle kommt. Im Unterschied zu normalen Zellen ist die Regulation in Tumorzellen bezüglich Proliferation, Zellzyklus, Apoptose und Angiogenese verändert. Maligne Tumorzellen besitzen darüber hinaus die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung. Eine häufig an der Tumorentstehung beteiligte Ursache ist ein verändertes Gleichgewicht der DNA-modifizierenden Enzyme HAT und HDAC (Timmermann, Lehrmann et al. 2001). HDAC-Inhibitoren, die dieses Gleichgewicht wiederherstellen können, waren in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten.

Expressionsanalysen zufolge werden nur etwa 2-10% aller Gene durch HDAC-Inhibitoren moduliert (Van Lint, Emiliani et al. 1996; Chambers, Banerjee et al. 2003; McLaughlin, La Thangue 2004), jedoch nehmen sie über Regulierung der Chromatinkondensation Einfluss auf die Transkriptionsaktivität (Jenuwein, Allis 2001). Sie steigern die Expression bestimmter Gene, die Zellzyklusarrest, Apoptose und Differenzierung einer Zelle induzieren (Marks, Rifkind et al. 2001). In deren Folge kann Tumorwachstum gehemmt werden. HDAC-Inhibitoren wie SAHA oder Valproat befinden sich bereits in klinischen Phase II und III-Studien (Krug, Curley et al. 2006; Imre, Gekeler et al. 2006; Oki et Issa, 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von HDAC-Inhibitoren auf AML-Zellen getestet. Zwar ist die Aussagekraft von Modelllinien den Ergebnissen von Versuchen mit Primärmaterial unterlegen, die Gewinnung einer für die Experimente ausreichenden Zahl von Patienten-Zellen wäre jedoch ohne unzumutbare Belastung nicht möglich gewesen. Um eine gewisse Repräsentativität der vielen verschiedenen Subtypen der AML zu erreichen, wurde für diese Arbeit daher ein breites Panel von AML-Zelllinien ausgewählt. Alle Subtypen der Leukämien FAB M1 bis M7 sind vertreten, darunter ebenso Leukämien mit den Translokationen t(8;21) und t(15;17). Der vergleichsweise kleinen Fallzahl von 12 Zelllinien sowie ihrer Heterogenität muss bei der Interpretation der Ergebnisse Rechnung getragen werden. Insbesondere bei

der Analyse der statistischen Werte ist zu beachten, dass die Auswahl der Modelle keiner Zufallsstichprobe gleichkommt.

5.1 Sensibilität von AML-Zellen gegenüber HDAC-Inhibitoren und Zytostatika

Um die Wirkung von HDAC-Inhibitoren auf AML-Zellen zu testen, wurden TSA und SAHA aus der Vielzahl der inzwischen als HDAC-Inhibitoren identifizierten Substanzen ausgewählt. Ebenso wurde als experimentelle, nicht aber klinisch genutzte Substanz Scriptaid verwendet; aufgrund seiner ungenügenden Zytotoxizität blieben die Versuche jedoch auf die Erstellung von Sensibilitätskurven beschränkt.

Im Vergleich der beiden Substanzen TSA und SAHA fiel eine einheitliche Sensibilität der Zelllinien gegenüber den HDAC-Inhibitoren auf; statistisch bestätigte sich eine signifikante Korrelation. Die Verwandtschaft ihrer Strukturformeln zeigt, dass beide Substanzen ähnlich gut an das Zn^{2+} -Ion in der Enzymtasche einer HDAC binden können. Scriptaid ist wie die beiden anderen Substanzen ebenfalls eine Hydroxaminsäure und gehört der Klasse I der HDAC-Inhibitoren an, aufgrund des trizyklischen Carbonrings ist Scriptaid in seiner Molekülstruktur jedoch etwas sperriger. Die Substratbindung scheint hier schwächer auszufallen; das Sensibilitätsverhalten der Zellen gegenüber Scriptaid wich deutlich von dem gegenüber TSA oder SAHA ab.

Die Inhibierung der HDAC durch TSA oder SAHA hat zur Folge, dass durch das Überwiegen von Histonen in acetylierter Form eine transkriptionelle Aktivierung erfolgt. Dieser Wirkmechanismus unterscheidet sich grundlegend von dem der eingesetzten Zytostatika. Die Hemmung der Topoisomerase II, die reversibel beide DNA-Stränge unterbrechen und wieder zusammenführen kann, hat DNA-Strangbrüche zur Folge. Im Falle von Etoposid ist dies irreversibel. Der Einsatz von Ara C führt durch Einbau in die DNA als Ara-CTP zum einen zu Strukturdefekten in der DNA, zum anderen hemmt es die Polymerasen α und β , wodurch prozessierende und reparierende Enzyme gehemmt werden. Staurosporin aktiviert als Proteinkinaseinhibitor mit breitem Spektrum den mitochondrialen intrinsischen Apoptoseweg und löst dadurch den Zelltod aus.

Aufgrund dieser verschiedenen Wirkmechanismen lassen sich die unterschiedlichen Sensibilitätsmuster der Zelllinien sowohl gegenüber den Zytostatika als auch

gegenüber den HDAC-Inhibitoren erklären. Weder zwischen den Zytostatika untereinander, noch zwischen Zytostatikum und HDAC-Inhibitor war eine korrelierende Sensibilität der Zellen der einzelnen Modelle erkennbar.

Durch den andersartigen Wirkmechanismus der HDAC-Inhibitoren stellt der Einsatz dieser Substanzen eine Erfolg versprechende Option dar, wenn Tumorzellen auf die Behandlung mit herkömmlichen Zytostatika nicht genügend ansprechen. Derzeit gibt es klinische Phase III-Studien, in denen Patienten, die nach einer first-line-Therapie mit Pemetrexed progredient waren, in der zweiten Linie oral mit SAHA behandelt werden (Krug, Curley et al. 2006). Des Weiteren ist die EU-Zulassung für Vorinostat (SAHA) zur Behandlung des fortgeschrittenen refraktären kutanen T-Zelllymphoms bereits beantragt, in den USA ist dieses Medikament bereits als Kapsel unter dem Handelsnamen ZOLINZA® auf dem Markt (Journal Onkologie 2008).

5.2 Sensibilität von CD34⁺ hämatopoetischen Vorläuferzellen gegenüber HDAC-Inhibitoren und Zytostatika

Für eine klinisch gute Verträglichkeit ist eine Voraussetzung, dass die eingesetzten Substanzen relativ spezifisch auf Tumorzellen wirken. In dieser Arbeit wurde die Wirkung von HDAC-Inhibitoren und Zytostatika sowohl auf Zelllinien als auch auf normale CD34⁺ hämatogene Vorläuferzellen untersucht.

Nach der Behandlung der CD34⁺ Zellen mit den HDAC-Inhibitoren TSA und Scriptaid zeigten sich die Progenitorzellen eher sensibel oder im mittleren Bereich, ebenso waren sie gegenüber den Zytostatika Ara C, Etoposid und Staurosporin sehr empfindlich. In der Behandlung mit SAHA erwiesen sich die Vorläuferzellen jedoch als vergleichsweise resistent, es musste eine ausgesprochen hohe Konzentration eingesetzt werden, um eine wirksame Zytotoxizität zu erreichen. Auch in (prä)klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass HDAC-Inhibitoren eine starke Aktivität gegen Tumorzellen bei zugleich geringer Toxizität entwickeln (Joseph, Wajapeyee et al. 2005).

Die relative Resistenz von CD34⁺ Zellen gegenüber Apoptose durch Zytostatika wurde auch schon in anderen Arbeiten gezeigt. In der Regel sind CD34⁺ positive Leukämien chemoresistenter als CD34 negative Leukämien (van Stijn, van der Pol et al. 2003). Eine Ursache der relativen Resistenz der CD34⁺ Vorläuferzellen mag die

Ausbildung des Resistenzgens P-gp sein. Es wurde eine positive Korrelation zwischen der Expression von P-gp und CD34 beschrieben (Turkina, Baryshnikov et al. 1996). Dadurch werden die unreifen Stammzellen vor Zytotoxizität geschützt (Smeets, Raymakers et al. 1997). Der Anteil von CD34⁺ Zellen bei einer Leukämie ist somit von prognostischer Bedeutung (Campos, Guyotat et al. 1989; Porwit-MacDonald, Janossy et al. 1996).

5.3 Induktion von Zellzyklusarrest

Ein charakteristisches Merkmal von Tumorzellen ist das unkontrollierte Wachstum aufgrund fehlerhafter Regulation Zellzyklus-kontrollierender und -assoziierter Proteine. Durch die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren kann ein antiproliferatives Gleichgewicht wiederhergestellt werden. In dieser Arbeit zeigte sich die antiproliferative Wirkung von SAHA unter anderem durch Induktion eines Zellzyklusarrests. Es wurde daher untersucht, ob die Expression von Zellzyklus-regulierenden Proteinen prädiktiv für den zugrunde liegenden antiproliferativen Mechanismus sind.

In überwiegendem Maße fand der Arrest dabei in der G1-Phase statt. In elf der zwölf untersuchten Modelle konnten unterschiedlich starke Zuwachsraten in G1 beobachtet werden. Einzig die Zellen der Linie KG-1a entwickelten keinen G1-sondern einen G2-Arrest. Zellen des Modells K-562 arretierten in beiden Phasen, auch wenn der Zuwachs in G1 deutlich größer ausfiel und länger anhielt als der in der G2-Phase. Auch in anderen Arbeiten wurde der wesentlich seltenere G2-Arrest durch SAHA gezeigt (Peart, Tainton et al. 2003; Kumagai, Wakimoto et al. 2007). Die Ursache der Arrestinduktion ist die gesteigerte Expression der Zellzyklus-Inhibitoren p16 und p27 durch SAHA (McLaughlin, La Thangue 2004), p27 wird dabei zusätzlich stabilisiert (Moradei, Maroun et al. 2005). Die Folge ist ein hypophosphoryliertes Rb, welches den Eintritt in die S-Phase verhindert und so den G1-Arrest induziert (Sandor, Senderowicz et al. 2000).

Die in dieser Arbeit beobachtete Arrestinduktion war sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig. Die Zellen einiger Modelle wie K-562 oder NB-4 zeigten bereits nach 24h einen Arrest, die Zellen anderer Linien wie CMK oder HL-60 arretierten erst nach 48h. Nach 72h wurde jedoch häufig eine deutliche Zunahme der

apoptotischen Zellen beobachtet. Generell war zu beobachten, dass der Zellzyklusarrest früher als der apoptotische Zelltod einsetzte. Außerdem zeigte sich ein unterschiedlich hohes Ausmaß des induzierten Arrests. In K-562- oder CMK-Zellen konnten Zuwachsraten von über 30%, zum Teil sogar 49%, erreicht werden, während in den Zellen der übrigen Linien der Zuwachs unter 20% blieb. Im Weiteren wurde untersucht, ob die native Expression Zellzyklus-assoziiierter Proteine eine prädiktive Voraussetzung für die später induzierten Effekte darstellte. Die Cycline, die ja während der Zellzyklusphasen spezifisch gebildet werden, sowie die Cdks, deren Level während des Zellzyklus gleich bleiben, konnten in den Zellen fast aller Linien nachgewiesen werden. Dagegen fiel das Expressionsmuster der Cdk-Inhibitoren p16 und p27 sehr unterschiedlich aus: Der Cdk-Inhibitor mit breiterem Spektrum, p27, wurde in den AML-Zellen in überwiegenderem Maße exprimiert, während p16 nur in wenigen Zellen nachgewiesen werden konnte. Dabei fiel jedoch auf, dass Modelle mit außerordentlich hohen Zuwachsraten in der G1-Phase p16-negativ waren, wie z.B. K-562, CMK oder NB-4. Dies zeigt, dass p16 nicht zwangsläufig für die Induktion eines Arrests erforderlich zu sein scheint. Auch konnte kein Zusammenhang zwischen der Art des Cdk-Inhibitors und der Art des induzierten Arrests hergestellt werden. Die Zellen der Modelle KG-1a und TF-1, die sowohl p16 als auch p27 exprimierten, zeigten einen Zellzyklusarrest in unterschiedlichen Phasen: TF-1-Zellen in G1, KG-1a-Zellen in der G2-Phase. Die Zellen der Linie K-562, wo ein Arrest sowohl in G1 als auch in G2 induziert werden konnte, waren positiv für p27, nicht aber nicht für p16. Eine Zuordnung zwischen der Expression eines Cdk-Inhibitors und der Art des später induzierten Arrests war demnach nicht möglich.

In vielen Tumoren, inklusive Lymphomen und Leukämien, konnte eine Korrelation zwischen niedriger Expression von p27 und schlechter Prognose gefunden werden (Chiarle, Budel et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit wiesen die p27 exprimierenden Zellen große Sensibilitätsunterschiede auf. Auch die Zellen der zwei p27-negativen Modelle MONO-MAC-6 und ML-2 waren in ihrer Chemosensibilität äußerst diskrepanz: ML-2-Zellen waren gegenüber SAHA deutlich resistenter als MONO-MAC-6-Zellen. Die Zellen beider Linien unterschieden sich jedoch auch bezüglich ihrer Expression von p53 und Rb. MONO-MAC-6-Zellen bildeten p53, aber nicht Rb aus, ML-2-Zellen exprimierten Rb, jedoch kein p53. Es ist bekannt, dass p53 Zellzyklusarrest und Apoptose auslösen kann, die native Expression zeigte

jedoch keine statistisch signifikante Korrelation mit dem Ausmaß des durch SAHA induzierten Zellzyklusarrests bzw. dem Ausmaß der induzierten Apoptose.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte weiterhin, dass alle Zelllinien, die das Onkogen c-myc exprimierten, auch positiv für p27 waren. In der Literatur dagegen wird beschrieben, dass in vielen Lymphomen eine Kombination aus Überexpression des Protoonkogens c-myc und dem Verlust seines Zielgens p27 besteht (Martins, Berns 2002). Die inverse Korrelation konnte in dieser Arbeit demnach nicht bestätigt werden.

Die Bedeutung der HDAC-Inhibitoren auf die Zellzyklusregulation zeigt sich auch darin, dass onkogene Proteine wie c-myc herunterreguliert werden können (Kumagai, Wakimoto et al. 2007). Weitere Proteine, die durch SAHA vermindert exprimiert werden, sind die Cycline A und B1 (Fournel 2002) sowie Cyclin D1 (Kumagai, Wakimoto et al. 2007). In nativen Zellen waren die Cycline jedoch nahezu überall nachweisbar.

Zwar ist die Induktion eines Zellzyklusarrests ein antiproliferativer Effekt, jedoch sind proliferierende Zellen in der Regel empfindlicher gegenüber zytotoxischen Substanzen als arretierte Zellen. Daher könnte ein Zellzyklusarrest eine Zelle prinzipiell auch vor den zytotoxischen Effekten der HDAC-Inhibitoren schützen (Burgess, Pavey et al. 2001; Peart, Tainton et al. 2003). Da jedoch HDAC-Inhibitoren auch die Genexpression in nicht proliferierenden Zellen regulieren, ist das Transkriptionsverhalten nicht von bestimmten Zellzyklusphasen abhängig. Auf diese Weise kann auch in arretierten Zellen Apoptose ausgelöst werden.

Obwohl HDAC überall im Chromatin vorkommen, wirken Inhibitoren wie SAHA relativ spezifisch auf Tumorzellen. Normale Zellen sind dabei etwa 10-fach resistenter gegenüber SAHA als transformierte Zellen (Kelly, Marks, 2005). Die Ursache der selektiven Toxizität auf Tumorzellen bleibt unklar; möglicherweise liegt die Ursache der erhöhten Sensibilität der Tumorzellen gegenüber HDAC-Inhibitoren in der Fehlregulation am G1-Kontrollpunkt, ein häufiger Pathomechanismus in Tumorzellen (Johnstone, Licht, 2003). Weiterhin bleibt auch unklar, welche Faktoren entscheidend sind, ob eine Zelle nach Kontakt mit HDAC-Inhibitoren in Zellzyklusarrest, Apoptose oder Differenzierung geht (Johnstone, Licht, 2003). Am Ende ist es das Zusammenspiel vieler Faktoren, das über das weitere Verhalten bestimmt.

5.4 Induktion von Apoptose

Der für die klinische Anwendung bedeutendere Effekt der HDAC-Inhibitoren ist die Induktion von Apoptose. Dabei können HDAC-Inhibitoren grundsätzlich sowohl den extrinsischen als auch den intrinsischen Apoptoseweg vermitteln (Monneret 2005). In dieser Arbeit konnte in allen Modellen eine Apoptoseinduktion erreicht werden, die beobachteten Effekte waren dabei sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig. Bei genauerer Betrachtung der Proteine des intrinsischen Systems fiel auf, dass die SAHA-sensiblen Zellen der Linien MONO-MAC-6 und KASUMI-1 keines der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L exprimierten. Die Apoptoseinduktion durch SAHA war in den Zellen dieser Modelle mit am höchsten. In den Zellen der anderen Modelle wurde jeweils mindestens eines der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 oder Bcl-x_L nachgewiesen. So auch in HL-60-Zellen, deren SAHA-Sensibilität jedoch höher einzustufen war als bei Zellen der Modelle KASUMI-1 oder MONO-MAC-6. Also lässt die Sensibilität einer Zelle gegenüber SAHA nicht unbedingt einen Rückschluss auf das Ausmaß der induzierten Apoptose zu.

Das antiapoptotische Protein Bcl-2 wurde in der vorliegenden Arbeit in der Hälfte der Fälle nachgewiesen; in der Literatur wird beschrieben, dass die meisten Leukämien eine hohe Expression von Bcl-2 aufweisen (Zhou, Chen et al. 1998). Es kann die mitochondriale Depolarisation mit Freilassung von Cytochrom c blocken (Peart, Tainton et al. 2003). Ein signifikanter inverser Zusammenhang zwischen Expression von Bcl-2 oder Bcl-x_L und dem induzierten Apoptoseausmaß bestand in nativem Zellmaterial jedoch nicht.

Da p53 die Fähigkeit besitzt, Bcl-2 inhibieren zu können, wurden die Expression dieser Proteine auf eine inverse Korrelation geprüft. Auch wenn eine statistische Signifikanz nicht erreicht werden konnte, zeichnete sich zumindest ein Trend ab. So besaßen die Zellen der Modelle CMK, HEL, MONO-MAC-6 und KASUMI-1 p53, nicht aber Bcl-2.

Das dritte untersuchte antiapoptotische Protein, Mcl-1, wurde in überwiegendem Maße in den Zelllinien nachgewiesen, eine differenzierte Aussage bezüglich eines SAHA-spezifischen Effekts war daher nicht möglich. Ähnliches galt für den Caspase-Inhibitor XIAP.

Auch für die proapoptotischen Proteine Bax und Bid konnten keine Rückschlüsse gezogen werden, denn diese Proteine wurden in den Zellen aller Zelllinien nachgewiesen. Auffällig war jedoch, dass sich für die Expression von Bad eine inverse Korrelation zeigte: Die Zellen der Modelle mit hohem Apoptoseausmaß nach SAHA-Exposition, KASUMI-1, MONO-MAC-6 und ML-2, exprimierten dieses proapoptotische Protein nicht. Ob die fehlende Expression von Bad alleine für die Apoptoseinduktion verantwortlich ist, bleibt eher fraglich. Immerhin fielen die Zellen von KASUMI-1 ohnehin durch ein hohes Maß an Spontanapoptose auf und die Zellen von MONO-MAC-6 waren auch im Sensibilitätsverhalten gegenüber SAHA sehr empfindlich. ML-2-Zellen zeichneten sich in den Sensibilitätsversuchen durch eine relative Resistenz gegenüber SAHA aus. Es fiel auf, dass die Zellen von ML-2 neben denen von NB-4 die einzigen waren, die das antiapoptotische Protein Bcl-2, nicht aber den Apoptose-assoziierten Rezeptor Fas ausbildeten. Diese Konstellation aus hohem Bcl-2 Spiegel und niedriger Expression von Fas/Apo1 gilt als prognostisch ungünstiges Indiz (Zhou, Chen et al. 1998; Scorrano, Korsmeyer 2003).

Zwar wurde in dieser Arbeit nicht die Veränderung der Expressionslevel von Proteinen unter SAHA-Behandlung untersucht, es wird jedoch beschrieben, dass proapoptotische Proteine durch SAHA hochreguliert werden, während die Expression von antiapoptotischen Proteinen abnimmt (Fandy, Shankar et al. 2005; Peart, Smyth et al. 2005). So werden Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl-1 durch SAHA negativ reguliert (Cory, Adams 2002; Peart, Smyth et al. 2005). Eine Aktivierung erfolgt für proapoptotische Proteine wie Bid (Peart, Tainton et al. 2003). Die Aktivierung erfolgt dabei Caspase-unabhängig (Ruefli, Ausserlechner et al. 2001). Generell scheinen Caspasen nicht zwingend notwendig für SAHA-vermittelte Apoptose zu sein, denn der Polycaspaseninhibitor Zvad-fmk konnte SAHA-induzierte Apoptose nicht regelmäßig verhindern (Ruefli, Ausserlechner et al. 2001).

Auch der Caspasen-Inhibitor XIAP wird in einer zeitabhängigen Weise durch SAHA herunterreguliert. Dies ist ein wichtiger Angriffspunkt der HDAC-Inhibitoren, denn hohe XIAP-Expressionen korrelieren mit einer schlechten Prognose (Tamm, Richter et al. 2004). Da jedoch auch XIAP in einem Großteil der Modelle nachweisbar war, konnte eine Aussage zu SAHA-spezifischen Effekten nicht gemacht werden.

Neben den Proteinen des intrinsischen Systems wurden auch Proteine des extrinsischen Systems untersucht. Überraschenderweise zeigte sich auch hier eine inverse Korrelation der Proteine DR4 und FAS/APO/CD95. Diese Apoptose-assoziierten Proteine wurden in nativem Zustand eher auf den Zellen der Modelle ausgebildet, in denen durch SAHA geringere Apoptoseraten erzielt wurden. Die Expressionsmuster der anderen ausgewählten Proteine wie TRAIL, TNF-R1, FAS-L und FADD waren nicht prädiktiv für das Ausmaß der Apoptoseinduktion.

Die Apoptoseinduktion durch HDAC-Inhibitoren über den extrinsischen Weg erfolgt über Modulation der Gene, die die TNF-Familie und ihre Liganden codieren. SAHA steigert die Expression des Rezeptors DR4 (Fandy, Shankar et al. 2005), sowie den dazugehörigen Liganden TRAIL. Wichtig ist, dass TRAIL die Apoptose in AML-Zellen tumorselektiv triggert, wohingegen normale CD34⁺ Vorläuferzellen verschont bleiben (Nebbioso, Clarke et al. 2005).

5.5 Chromosomale Translokationen

Ein weiterer wichtiger Angriffspunkt von HDAC-Inhibitoren mit antiproliferativer Wirkung sind chromosomale Translokationen. Durch die entstehenden Fusionsprodukte AML1/ETO bzw. PML-RAR α kommt es zu einer übermäßigen Anlagerung von HDAC an die Co-Repressor-Komplexe. Die Folge ist ein Differenzierungsstopp und übermäßige Proliferation.

Leukämien mit der Translokation t(8;21) haben eine relativ günstige Prognose. Zu den ungünstigen Aberrationen gehören vor allem Veränderungen an den Chromosomen 5 und 7 sowie komplex veränderte Karyotypen.

Die Zelllinie KASUMI-1, in der das AML1/ETO-Fusionsgen vorliegt, war äußerst schwierig zu kultivieren, da häufig ein hohes Maß an Spontanapoptose auftrat. Die Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor SAHA zeigte, dass oft schon geringe Mengen ausreichten, um Apoptose auszulösen bzw. die Stoffwechselaktivität deutlich zu reduzieren. Aufgrund der schlechten Kultivierbarkeit war eine Verlaufsbeobachtung der Oberflächenexpression unter SAHA leider nicht möglich.

Die Leukämie-Subpopulation mit dem PML-RAR α -Fusionsprodukt war durch das Modell NB-4 vertreten. Die Zellen dieser Linie waren gegenüber den HDAC-Inhibitoren deutlich weniger empfindlich als die Zellen von KASUMI-1. Es konnte

durch SAHA ein deutlicher Zellzyklusarrest induziert werden, jedoch war auch hier Apoptoseinduktion mit zunehmender Konzentration und Inkubationsdauer erkennbar. Auffällig war, dass sich NB-4-Zellen bezüglich des Topoisomerase-II-Hemmers deutlich empfindlicher zeigten als die sonst so sensiblen Zellen der Linie KASUMI-1.

5.6 Differenzierung

Durch die mikroskopischen Beobachtungen der Zellen während der Experimente mit SAHA konnte eine Veränderung der Morphologie in CMK-Zellen verfolgt werden. Deutlich war die Entwicklung dendritischer Podophyten zu sehen. CMK zählt nach FAB-Einteilung zu den megakaryozytären Leukämien, und so konnte bereits in nativem Zustand eine deutliche Expression des Megakaryozytenmarkers CD41 festgestellt werden. Nach Behandlung mit SAHA war eine eindeutige Zunahme von CD41 zu erkennen. Eine weitere Expressionszunahme konnte für die Marker CD16 und CD64 beobachtet werden. Diese Antigene spielen eine entscheidende Rolle im Rahmen der Phagozytose. Auch CD123, ein Antigen, das an Proliferation und Differenzierung beteiligt ist, nahm während SAHA-Exposition zu. Diese Beobachtungen decken sich mit Beschreibungen in der Literatur, wo beschrieben wird, dass HDAC-Inhibitoren eine terminale Differenzierung provozieren können (Marks, Richon et al. 2000; Humphrey, Wang et al. 2007). CD14, ein Marker für monozytäre Zellen, wurde erwartungsgemäß nicht auf den megakaryozytären CMK-Zellen ausgebildet. Viele andere Oberflächenmarker änderten sich in ihrem Expressionsausmaß unter SAHA-Behandlung nicht. So blieben die Level von CD11b, ebenfalls an Vermittlung von Phagozytose beteiligt und Kennzeichner der granulozytären Reihe, die Stammzellmarker CD33 und CD34, sowie der Transferrinrezeptor CD71 in ihrem Expressionslevel relativ unbeeinflusst.

5.7 Resistenzgene

Ein Problem klinischer Resistenz einer AML gegenüber Chemotherapeutika ist die Expression von Multiresistenzgenen wie P-gp und BCRP. In dieser Arbeit wurde das Expressionslevel dieser beiden Resistenzgene untersucht. Dabei zeigte sich, dass

BCRP in den zehn untersuchten Linien in unterschiedlicher Expressionshöhe nachweisbar war; bei den Modellen KASUMI-1 und M-07e war eine Generierung in ausreichendem Maße aufgrund der schlechten Kultivierbarkeit leider nicht möglich. Die Expression von BCRP war weder prädiktiv für die Resistenz gegenüber Etoposid, Ara C oder Staurosporin, noch gegenüber einem HDAC-Inhibitor. Weiterhin zeigte sich BCRP wenig spezifisch für eine bestimmte Subpopulation. In der Literatur werden eher geringe Expressionsraten in Leukämien beschrieben (Ross, Karp et al. 2000). Dagegen wird P-gp bei einem Drittel der Patienten mit Leukämien sowie bei mehr als 50% der Patienten mit Rezidiv gefunden (Gottesmann, Fojo et al, 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte nur in zwei Modellen eine nennenswerte P-gp-Expression gefunden werden. Jedoch war auch hier die Expression nicht prädiktiv für das Sensibilitätsverhalten gegenüber den eingesetzten Substanzen. CMK-Zellen trugen nur zu einem geringen Prozentsatz dieses Resistenzgens, sein Expressionslevel war auch nach SAHA-Behandlung konstant. Im Gegensatz dazu konnte eine Zunahme der Expression des Resistenzgens MRPr1 in den Leukämiezellen nach SAHA-Exposition beobachtet werden, die MRPr1-tragende Population vervierfachte sich.

Die Wirkung von P-gp wird unter anderem in der Inhibition Caspase-vermittelter Apoptose beschrieben (Smyth, Krasovskis et al. 1998), seine Expression gilt als ein unabhängiger ungünstiger prognostischer Faktor für das Ansprechen einer Therapie und das Überleben (Willman 1997). Es wird jedoch beschrieben, dass HDAC-Inhibitoren das Resistenzverhalten in P-gp exprimierenden Zellen überwinden können. SAHA kann auf P-gp exprimierenden Zellen Apoptose Caspase-unabhängig auslösen; dies geschieht über Freisetzung von Cytochrom c und Spaltung von Bid (Ruefli, Bernhard et al. 2002). Die Apoptosevermittlung unabhängig von Caspasen ist daher der entscheidende Schritt zur Umgehung MDR-bedingter Resistenz - HDAC-Inhibitoren stellen daher eine Alternative in der Therapie MDR-exprimierender Tumorzellen dar.

5.8 Klinischer Einsatz von HDAC-Inhibitoren

Histondeacetylasen zählen zu den Erfolg versprechenden neuen Zielstrukturen in der molekularen Tumorthherapie. Durch posttranslationale Chromatinmodifikation nehmen

sie Einfluss auf die Genregulation und -transkription. Zunehmend wird deutlich, dass die Dysregulation epigenetischer Prozesse mit transkriptioneller Repression von Zielgenen mit molekularer Onkogenese in Zusammenhang steht. Durch Inhibition der HDAC kann die Transkriptionsaktivität gesteigert werden, die Folge sind ein vermehrter Zellzyklusarrest, Differenzierung und Apoptose.

Viele HDAC-Inhibitoren befinden sich derzeit in klinischen Studien. Dabei werden unterschiedliche Substanzklassen eingesetzt, Beispiele sind kurzkettige Fettsäuren wie VPA, cyclische Peptide wie Depsipeptid und nicht zuletzt Hydroxaminsäuren wie SAHA.

VPA wird derzeit in mehreren klinischen Studien getestet, beispielsweise in der Behandlung von Gliomen, Coloncarzinomen, MDS und AML. Die Ergebnisse deuten auf einen partiellen Behandlungserfolg durch VPA hin (Blaheta, Michaelis et al. 2005). Depsipeptid konnte erfolgreich in einer Phase II Studie an 20 Patienten mit resistenten T-Zell-Lymphomen getestet werden (Marks, Richon et al. 2004). Die Therapie wurde relativ gut vertragen und die Nebenwirkungen waren reversibel. Auch SAHA wird von Tumorpatienten gut toleriert (Kelly, Marks, 2005). Die maximal eingesetzten Dosen lagen bei 900 mg/m² täglich (Kelly, Richon et al. 2003). In Phase I wird es derzeit bei therapierefraktärem Multiplem Myelom getestet. Von 10 Patienten sprach einer an, während bei 9 Patienten ein stabiler Krankheitsverlauf zu beobachten war (Richardson, Mitsiades et al. 2008). In anderen Phase I und II Studien mit SAHA wurde eine objektive Rückbildung diverser Karzinome sowie B- und T-Zell-Lymphome beobachtet (Kelly, Richon et al. 2003; Marks, Richon et al. 2004). Alle aufgetretenen Nebenwirkungen waren reversibel. Auch in soliden Tumoren wie bei Prostata- oder Mammacarcinomen konnte SAHA einen Proliferationsarrest und eine Reversion der transformierten Morphologie erreichen (Butler, Agus et al. 2000). In der Behandlung des Retinoblastoms zeigte SAHA eine dosisabhängige Verminderung des Wachstums der Retinoblastoma-Zellen (Dalgard et al. 2008). Phase III Studien mit SAHA laufen derzeit bei fortgeschrittenen Pleuramesotheliomen (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00128102, Merck, Update vom 17. Mai 2006) und für kutane T-Zell-Lymphome (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00419367, Merck, Update vom 29. Mai 2008).

HDAC-Inhibitoren weisen zwar in der Monotherapie klinische Erfolge auf, man geht jedoch davon aus, dass der klinische Nutzen wesentlich größer ist, wenn man die Substanzen mit weiteren Chemotherapeutika kombiniert (Carey, La Thangue 2006).

Beispielsweise werden Imatinib-resistente Bcr/Abl CML-Zellen durch begleitende SAHA-Behandlung für Imatinib sensibilisiert (Yu, Rahmani et al. 2003). In vitro-Studien zeigten eine Sensibilisierung von Tumorzellen gegenüber Topoisomerase-II-Hemmern (Marchion, Bicaku et al. 2004; Marchion, Bicaku et al. 2005). Der Grund liegt in der Auflockerung der Chromatinstruktur durch HDAC-Inhibitoren. Wurden die Tumorzellen zuerst mit einem Topoisomerase-II-Hemmer und erst danach mit HDAC-Inhibitoren behandelt wurden, waren die Sensibilisierungseffekte nicht reproduzierbar (Kim, Blake et al. 2003). Auch in der Therapie von Leukämien mit dem PLZF/RAR α -Fusionsgen gibt es durch den Einsatz von HDAC-Inhibitoren im Vergleich zur Monotherapie mit Retinolsäure eine Wirkungsverstärkung (Petti, Fazi et al. 2002). Beachtenswert ist, dass die Toxizität durch die zusätzliche Gabe eines HDAC-Inhibitors dabei nicht erhöht ist (Marchion, Bicaku et al. 2005). Viele Beispiele zeigen einen Benefit durch den Einsatz von HDAC-Inhibitoren in der Behandlung von Tumorerkrankungen und rechtfertigen ihren klinischen Einsatz.

5.9 Schlussfolgerung und Ausblick

Trotz der bereits erzielten Erfolge durch den Einsatz von HDAC-Inhibitoren sind noch viele Fragen offen und weitere Forschungen notwendig. So könnten durch Kristallstrukturanalysen von HDAC-Inhibitoren neue Inhibitoren, die noch besser an das aktive Zentrum der HDAC angepasst werden, entwickelt werden. Dadurch würde die Wirksamkeit dieser Hemmstoffe weiter verbessert und die Effizienz in der Behandlung maligner Erkrankungen gesteigert werden. Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit legen nahe, dass durch HDAC-Inhibitoren auch Leukämien behandelt werden können, die auf Zytostatika wie Ara C oder Etoposid nur unzureichend ansprechen. Allerdings muss geklärt werden, ob die einseitige Hemmung einer Enzymgruppe das feine Gleichgewicht zwischen HAT und HDAC derart verschiebt, dass dies über einen längeren Zeitraum gesehen die Entstehung anderer Erkrankungen begünstigt. Weiterhin sollten die Effekte von HDAC-Inhibitoren auch auf Nicht-Histonproteine weiter untersucht werden, da auch diese als Substrate der Inhibitoren identifiziert wurden und ihre Modifikation eine Veränderung der Zellregulation zur Folge haben kann.

6 Zusammenfassung

HDAC-Inhibitoren werden seit einigen Jahren zunehmend in klinischen Studien als neue Substanzen gegen Tumorerkrankungen eingesetzt. Über die Modulation des epigenetischen Codes werden ihnen antiproliferative Effekte auf vielen Ebenen zugeschrieben. In dieser vorgelegten Arbeit wurde die Wirkung von einigen ausgewählten HDAC-Inhibitoren auf AML-Zellen getestet. Dazu wurde ein breites Panel aus 12 AML-Zelllinien ausgewählt, um die Heterogenität der verschiedenen Subtypen widerzuspiegeln.

Die AML-Zelllinien wurden mit den HDAC-Inhibitoren behandelt und bezüglich ihrer Sensibilität, Induktion von Zellzyklusarrest, Apoptose und Differenzierung untersucht. Zur Erstellung von Sensibilitätskurven kamen die HDAC-Inhibitoren TSA, SAHA und Scriptaid zum Einsatz. Dabei zeigte sich eine Korrelation der Ergebnisse bezüglich der sich in ihrer Molekülstruktur ähnelnden Substanzen TSA und SAHA. Scriptaid dagegen erwies sich bei den möglichen einsetzbaren Konzentrationen als zu wenig toxisch. Zusätzlich wurden die Leukämielinien mit herkömmlichen in der Tumorthherapie verwendeten Substanzen wie Ara C und Etoposid sowie mit dem Apoptoseinduktor Staurosporin behandelt. Dabei zeigte sich, dass das Sensibilitätsverhalten der Zellen gegenüber diesen Zytostatika sowohl untereinander, als auch im Vergleich zu den HDAC-Inhibitoren abwich. Weiterhin wurden auch CD34⁺ Progenitorzellen mit den HDAC-Inhibitoren behandelt. Dabei fiel auf, dass die Vorläuferzellen bezüglich SAHA resistenter waren als die Zellen der Modelllinien.

Durch die Behandlung der AML-Zelllinien mit HDAC-Inhibitoren konnte weiterhin beobachtet werden, dass in 11 der 12 untersuchten Modelle ein Zellzyklusarrest induziert werden konnte; in 10 Linien zeigte sich dabei ein G1-Arrest, während die Zelllinie KG-1a durch einen G2-Arrest auffiel. Die Zellen des Modells K-562 arretierten sowohl in der G1- als auch in der G2-Phase. Mit zunehmender Inkubationsdauer konnte in allen Zelllinien auch Apoptose ausgelöst werden, wobei dieser Effekt nicht nur zeit-, sondern auch konzentrationsabhängig war. Die Expression von Zellzyklus- oder Apoptose-assoziierten Proteinen in unbehandelten Zellen war dabei nicht prädiktiv für die durch SAHA induzierten Effekte. Bei den drei

Apoptose-assoziierten Proteinen Bad, DR4 und FAS zeigte sich dabei eine inverse Korrelation.

Die Zelllinie CMK fiel dadurch auf, dass sich ihre Zellen unter SAHA-Behandlung zellmorphologisch veränderten. Sie bildeten deutliche Podophyten aus. Durch die Analyse der Oberflächenmarker konnte verfolgt werden, dass die SAHA-Behandlung eine Differenzierung in diesen Zellen bewirkte. Einige Marker der myeloischen und megakaryozytären Reihe wurden durch SAHA-Gabe vermehrt exprimiert; dies führte auch zu dem veränderten Adhäsionsverhalten der Zellen. Weiterhin zeigte sich, dass sich in CMK-Zellen durch SAHA-Behandlung der MRPr1-Resistenzgen-tragende Anteil der Population vervierfachte. Andere Resistenzgene wie BCRP und P-gp blieben in ihrem Expressionslevel durch SAHA-Behandlung unbeeinflusst. Insgesamt hatte die Expression der Resistenzgene in den Leukämielinien keine prädiktive Aussagekraft für das entsprechende Sensibilitätsverhalten einer Zelle, weder gegenüber Zytostatika noch gegenüber den HDAC-Inhibitoren.

HDAC-Inhibitoren stellen durch ihren andersartigen Wirkmechanismus eine Erfolg versprechende Alternative in der Tumorthherapie dar. Viele HDAC-Inhibitoren befinden sich bereits in klinischen Phase I-III Studien. Vorinostat wird relativ gut vertragen und ist durch seine relative Spezifität wenig toxisch. Seine Zulassung für den europäischen Markt wurde bereits beantragt.

Weitere Forschungen sind jedoch notwendig, um eine immer effizientere Therapie zu ermöglichen. Da HDAC nicht die einzigen Substrate der HDAC-Inhibitoren sind, sondern inzwischen auch viele andere Nicht-Histon-Proteine als Substrate identifiziert wurden, können mögliche Langzeitfolgen, die durch die Modifikation dieser Nicht-Histon-Proteine entstehen, nicht ausgeschlossen werden.

7 Literaturverzeichnis

- Adams, J. M. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." *Science* 281(5381): 1322-6.
- Archer, S. Y., S. Meng, A. Shei, R.A. Hodin. (1998). "p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(12): 6791-6.
- Blaheta, R.A., M. Michaelis, P.H. Driever, J.Jr.Cinatl. (2005). "Evolving anticancer drug valproic acid: Insights into the mechanism and clinical studies." *Med Res Rev* 25(4): 383-97.
- Burgess, A. J., S. Pavey, R. Warrener, L.J. Hunter, T.J. Piva, E.A. Musgrove, N. Saunders, P.G. Parsons, B.G. Gabrielli. (2001). "Up-regulation of p21(WAF1/CIP1) by histone deacetylase inhibitors reduces their cytotoxicity." *Mol Pharmacol* 60(4): 828-37.
- Butler, L. M., D. B. Agus, H.I. Scher, B. Higgins, A. Rose, C. Cordon-Cardo, H.T. Thaler, R.A. Rifkind, P.A. Marks, V.M. Richon. (2000). "Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo." *Cancer Res* 60(18): 5165-70.
- Campos, L., D. Guyotat, E. Archimbaud, Y. Devaux, D. Treille, A. Larese, J. Maupas, O. Gentilhomme, A. Ehram, D. Fiere. (1989). "Surface marker expression in adult acute myeloid leukaemia: correlations with initial characteristics, morphology and response to therapy." *Br J Haematol* 72(2): 161-6.
- Carey, N., N. B. La Thangue (2006). "Histone deacetylase inhibitors: gathering pace." *Curr Opin Pharmacol* 6(4): 369-75.
- Chambers, A. E., S. Banerjee, T. Chaplin, J. Dunne, S. Debernardi, S.P. Joel, B.D. Young. (2003). "Histone acetylation-mediated regulation of genes in leukaemic cells." *Eur J Cancer* 39(8): 1165-75.
- Chiarle, R., L. M. Budel, J. Skolnik, G. Frizzera, M. Chilosi, A. Corato, G. Pizzolo, J. Magidson, A. Montagnoli, M. Pagano, B. Maes, C. De Wolf-Peeters, G. Inghirami. (2000). "Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma." *Blood* 95(2): 619-26.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, M. Tewari, V.M. Dixit. (1995). "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis." *Cell* 81(4): 505-12.
- Cory, S., J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." *Nat Rev Cancer* 2(9): 647-56.
- Dalgard, C.L., K.R. van Quill, J.M. O'Brien. (2008). "Evaluation of the In vitro and In vivo Antitumor Activity of Histone Deacetylase Inhibitors for the Therapy of Retinoblastoma." *Clin Cancer Res* 14(10): 3113-23.
- Desagher, S., J. C. Martinou (2000). "Mitochondria as the central control point of apoptosis." *Trends Cell Biol* 10(9): 369-77.
- el-Deiry, W. S. (1998). "Regulation of p53 downstream genes." *Semin Cancer Biol* 8(5): 345-57.
- el-Deiry, W. S., S. E. Kern, J. A. Pietenpol, K.W. Kinzler, B. Vogelstein. (1992). "Definition of a consensus binding site for p53." *Nat Genet* 1(1): 45-9.

- Facchetti, F., S. Previdi, M. Ballarini, S. Minucci, P. Perego, C.A. La Porta. (2004). "Modulation of pro- and anti-apoptotic factors in human melanoma cells exposed to histone deacetylase inhibitors." *Apoptosis* **9**(5): 573-82.
- Fandy, T. E., S. Shankar, D.D. Ross, E. Sausville, R.K. Srivastava. (2005). "Interactive effects of HDAC inhibitors and TRAIL on apoptosis are associated with changes in mitochondrial functions and expressions of cell cycle regulatory genes in multiple myeloma." *Neoplasia* **7**(7): 646-57.
- Felsenfeld, G., M. Groudine (2003). "Controlling the double helix." *Nature* **421**(6921): 448-53.
- Ferrao, P., P. Sincock, S. Cole, L. Ashman. (2001). "Intracellular P-gp contributes to functional drug efflux and resistance in acute myeloid leukaemia." *Leuk Res* **25**(5): 395-405.
- Finnin, M. S., J. R. Donigian, A. Cohen, V.M. Richon, R.A. Rifkind, P.A. Marks, R. Breslow, N.P. Pavletich. (1999). "Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors." *Nature* **401**(6749): 188-93.
- Fournel, P. (2002). "Therapeutic strategies in advanced non-small cell bronchial cancers: platin-based combinations." *Rev Pneumol Clin* **58**(5 Pt 2): 3S42-7.
- Gelmetti, V., J. Zhang, M. Fanelli, S. Minucci, P.G. Pelicci, M.A. Lazar. (1998). "Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO." *Mol Cell Biol* **18**(12): 7185-91.
- Godefroy, N., C. Lemaire, B. Mignotte, J.L. Vayssière. (2006). "p53 and Retinoblastoma protein (pRb): A complex network of interactions." *Apoptosis* **11**(5): 659-661.
- Gottesmann, M., T. Fojo, S. Bates (2002). "Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters." *Nature* **2**(1): 48-58.
- Grignani, F., S. De Matteis, C. Nervi, L. Tomassoni, V. Gelmetti, M. Cioce, M. Fanelli, M. Ruthardt, F.F. Ferrara, I. Zamir, C. Seiser, F. Grignani, M.A. Lazar, S. Minucci, P.G. Pelicci. (1998). "Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia." *Nature* **391**(6669): 815-8.
- Grignani, F., P.F. Ferrucci, U. Testa, G. Talamo, M. Fagioli, M. Alcalay, A. Mencarelli, F. Grignani, C. Peschle, I. Nicoletti, P.G. Pelicci (1993). "The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RAR alpha fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells." *Cell* **74**: 423-31.
- Gross, D. S., W. T. Garrard (1988). "Nuclease hypersensitive sites in chromatin." *Annu Rev Biochem* **57**: 159-97.
- Grunstein, M. (1997). "Histone acetylation in chromatin structure and transcription." *Nature* **389**(6649): 349-52.
- Haferlach, T., C. Schoch (2002). "[WHO classification of acute myeloid leukaemia (AML) and the myelodysplastic syndrome (MDS)]." *Dtsch Med Wochenschr* **127**(9): 447-50.
- Haferlach, T., C. Schoch, W. Hiddemann. (2002). "The New WHO Classification for Acute Myeloid Leukemias: Comparison to the FAB Classification." *J Lab Med* **26**(1/2): 19-22.
- Haferlach, T., C. Schoch, H. Löffler, W. Gassmann, W. Kern, S. Schnittger, C. Fonatsch, W.D. Ludwig, C. Wuchter, B. Schlegelberger, P. Staib, A. Reichle, U. Kubica, H. Eimermacher, L. Balleisen, A. Grüneisen, D. Haase, C. Aul, J.

- Karow, E. Lengfelder, B. Wörmann, A. Heinecke, M.C. Sauerland, T. Büchner, W. Hiddemann. (2003). "Morphologic dysplasia in de novo acute myeloid leukemia (AML) is related to unfavorable cytogenetics but has no independent prognostic relevance under the conditions of intensive induction therapy: results of a multiparameter analysis from the German AML Cooperative Group studies." *J Clin Oncol* **21**(2): 256-65.
- He, L.Z., T. Tolentino, P. Grayson, S. Zhong, R.P.Jr. Warrell, R.A. Rifkind, P.A. Marks, V.M. Richon, P.P. Pandolfi. (2001). "Histone deacetylase inhibitors induce remission in transgenic models of therapy-resistant acute promyelocytic leukemia." *J Clin Invest* **108**(9): 1321-30.
- He, T. C., A. B. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L.T. da Costa, P.J. Morin, B. Vogelstein, K.W. Kinzler. (1998). "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway." *Science* **281**(5382): 1509-12.
- Hiebert, S. W., J. R. Downing, N. Lenny, S. Meyers. (1996). "Transcriptional regulation by the t(8;21) fusion protein, AML-1/ETO." *Curr Top Microbiol Immunol* **211**: 253-8.
- Ho, J. S., W. Ma, D.Y. Mao, S. Benchimol. (2005). "p53-Dependent transcriptional repression of c-myc is required for G1 cell cycle arrest." *Mol Cell Biol* **25**(17): 7423-31.
- Holcik, M., H. Gibson, R.G. Korneluk. (2001). "XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target." *Apoptosis* **6**(4): 253-61.
- Holick, M. F. (2006). "Resurrection of vitamin D deficiency and rickets." *J Clin Invest* **116**(8): 2062-72.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein, C.C. Harris. (1991). "p53 mutations in human cancers." *Science* **253**(5015): 49-53.
- Huang, B., M. Eberstadt, E.T. Olejniczak, R.P. Meadows, S.W. Fesik. (1996). "NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain." *Nature* **384**(6610): 638-41.
- Humphrey, G. W., Y. H. Wang, T. Hirai, R. Padmanabhan, D.M. Panchision, L.F. Newell, R.D. McKay, B.H. Howard. (2007). "Complementary roles for histone deacetylases 1, 2, and 3 in differentiation of pluripotent stem cells." *Differentiation*.
- Imre, G., V. Gekeler, A. Leja, T. Beckers, M. Boehm. (2006). "Histone deacetylase inhibitors suppress the inducibility of nuclear factor-kappaB by tumor necrosis factor-alpha receptor-1 down-regulation." *Cancer Res* **66**(10): 5409-18.
- Jenuwein, T., C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." *Science* **293**(5532): 1074-80.
- Johnstone, R.W., J.D. Licht (2003). "Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: Is transcription the primary target?" *Cancer Cell* **4**(1): 13-8.
- Joseph, J., N. Wajapeyee, K. Somasundaram. (2005). "Role of p53 status in chemosensitivity determination of cancer cells against histone deacetylase inhibitor sodium butyrate." *Int J Cancer* **115**(1): 11-8.
- Kapustin, G. V., G. Fejér, J.L. Gronlund, D.G. McCafferty, E. Seto, F.A. Etzkorn. (2003). "Phosphorus-based SAHA analogues as histone deacetylase inhibitors." *Org Lett* **5**(17): 3053-6.
- Kim, M. S., M. Blake, J.H. Baek, G. Kohlhagen, Y. Pommier, F. Carrier. (2003). "Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA." *Cancer Res* **63**(21): 7291-300.

- Kelly, W.K., P.A. Marks (2005). "Drug insight: Histone deacetylase inhibitors - development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid." *Nat Clin Pract Oncol* **2**(3): 150-7.
- Kelly, W.K., V.M. Richon, O. O'Connor, T. Curley, B. MacGregor-Curtelli, W. Tong, M. Klang, L. Schwartz, S. Richardson, E. Rosa, M. Drobnjak, C. Cordon-Cordo, J.H. Chiao, R. Rifkind, P.A. Marks, H. Scher. (2003). "Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously." *Clin Cancer Res* **9**(10 Pt 1): 3578-88.
- Kornberg, R. D. (1977). "Structure of chromatin." *Annu Rev Biochem* **46**: 931-54.
- Kroemer, G., N. Zamzami, S.A. Susin. (1997). "Mitochondrial control of apoptosis." *Immunol Today* **18**(1): 44-51.
- Krug, L.M., T. Curley, L. Schwartz, S. Richardson, P. Marks, J. Chiao, W.K. Kelly. (2006). "Potential role of histone deacetylase inhibitors in mesothelioma: clinical experience with suberoylanilide hydroxamic acid." *Clin Lung Cancer* **7**(4): 257-61.
- Kuendgen, A., C. Strupp, M. Aivado, A. Bernhardt, B. Hildebrandt, R. Haas, U. Germing, N. Gattermann. (2004). "Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid." *Blood* **104**(5): 1266-9.
- Kumagai, T., N. Wakimoto, D. Yin, S. Gery, N. Kawamata, N. Takai, N. Komatsu, A. Chumakov, Y. Imai, H.P. Koeffler. (2007). "Histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (Vorinostat, SAHA) profoundly inhibits the growth of human pancreatic cancer cells." *Int J Cancer* **121**(3): 656-65.
- Lin, R. J., L. Nagy, S. Inoue, W. Shao, W.H.Jr. Miller, R.M. Evans. (1998). "Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia." *Nature* **391**(6669): 811-4.
- Lotan, R. (1979). "Different susceptibilities of human melanoma and breast carcinoma cell lines to retinoic acid-induced growth inhibition." *Cancer Res* **39**(3): 1014-9.
- Löwenberg, B., J.R. Downing, A. Burnett. (1999). "Acute myeloid leukaemia." *N Engl J Med* **341**(14): 1051-62.
- Luo, H., Q. Li, J. O'Neal, F. Kreisel, M.M. Le Beau, M.H. Tomasson. (2005). "c-Myc rapidly induces acute myeloid leukemia in mice without evidence of lymphoma-associated antiapoptotic mutations." *Blood* **106**(7): 2452-61.
- Marchion, D. C., E. Bicaku, A.I. Daud, V. Richon, D.M. Sullivan, P.N. Munster. (2004). "Sequence-specific potentiation of topoisomerase II inhibitors by the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid." *J Cell Biochem* **92**(2): 223-37.
- Marchion, D. C., E. Bicaku, A.I. Daud, D.M. Sullivan, P.N. Munster. (2005). "In vivo synergy between topoisomerase II and histone deacetylase inhibitors: predictive correlates." *Mol Cancer Ther* **4**(12): 1993-2000.
- Marchion, D. C., E. Bicaku, A.I. Daud, D.M. Sullivan, P.N. Munster. (2005). "Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins." *Cancer Res* **65**(9): 3815-22.
- Marks, P., R. A. Rifkind, V.M. Richon, R. Breslow, T. Miller, W.K. Kelly. (2001). "Histone deacetylases and cancer: causes and therapies." *Nat Rev Cancer* **1**(3): 194-202.
- Marks, P. A., V. M. Richon, R.A. Rifkind. (2000). "Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells." *J Natl Cancer Inst* **92**(15): 1210-6.

- Marks, P.A., V.M. Richon, T. Miller, W.K. Kelly. (2004). "Histone deacetylase inhibitors." *Adv CancerRes* **91**: 137-68.
- Martin, S. J., C. P. Reutelingsperger, A.J. McGahon, J.A. Rader, R.C. van Schie, D.M. LaFace, D.R. Green. (1995). "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl." *J Exp Med* **182**(5): 1545-56.
- Martins, C. P., A. Berns (2002). "Loss of p27(Kip1) but not p21(Cip1) decreases survival and synergizes with MYC in murine lymphomagenesis." *Embo J* **21**(14): 3739-48.
- Matsushime, H., D.E. Quelle, S.A. Shurtleff, M. Shibuya, C.J. Sherr, J.Y. Kato. (1994). "D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells." *Mol Cell Biol* **14**(3): 2066-76.
- McGhee, J. D., G. Felsenfeld (1980). "Nucleosome structure." *Annu Rev Biochem* **49**: 1115-56.
- McLaughlin, F., P. Finn, N.B. La Thangue. (2003). "The cell cycle, chromatin and cancer: mechanism-based therapeutics come of age." *Drug Discov Today* **8**(17): 793-802.
- McLaughlin, F., N. B. La Thangue (2004). "Histone deacetylase inhibitors open new doors in cancer therapy." *Biochem Pharmacol* **68**(6): 1139-44.
- Miller, T. A., D. J. Witter, S. Belvedere. (2003). "Histone deacetylase inhibitors." *J Med Chem* **46**(24): 5097-116.
- Miyashita, T., S. Krajewski, M. Krajewska, H.G. Wang, H.K. Lin, D.A. Liebermann, B. Hoffman, J.C. Reed. (1994). "Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo." *Oncogene* **9**(6): 1799-805.
- Monneret, C. (2005). "Histone deacetylase inhibitors." *Eur J Med Chem* **40**(1): 1-13.
- Moradei, O., C. R. Maroun, I. Paquin, A. Vaisburg. (2005). "Histone deacetylase inhibitors: latest developments, trends and prospects." *Curr Med Chem Anticancer Agents* **5**(5): 529-60.
- Müller-Esterl, W. (2004). "Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler." Spektrum Akademischer Verlag, 1. Auflage: S. 451.
- Muller-Tidow, C., B. Steffen, T. Cauvet, L. Tickenbrock, P. Ji, S. Diederichs, B. Sargin, G. Köhler, M. Stelljes, E. Puccetti, M. Ruthardt, S. deVos, S.W. Hiebert, H.P. Koeffler, W.E. Berdel, H. Serve. (2004). "Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells." *Mol Cell Biol* **24**(7): 2890-904.
- Nagata, S. (1997). "Apoptosis by death factor." *Cell* **88**(3): 355-65.
- Nebbioso, A., N. Clarke, E. Voltz, E. Germain, C. Ambrosino, P. Bontempo, R. Alvarez, E.M. Schiavone, F. Ferrara, F. Bresciani, A. Weisz, A.R. de Lera, H. Gronemeyer, L. Altucci. (2005). "Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells." *Nat Med* **11**(1): 77-84.
- Nooter, K., A.M. Westermann, M.J. Flens, G.J. Zaman, R.J. Scheper, K.E. van Wingerden, H. Burger, R. Oostrum, T. Boersma, P. Sonneveld (1995). "Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human cancers." *Clin Cancer Res* **1**(11): 1301-1310.
- Nucifora, G., J. D. Rowley (1995). "AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia." *Blood* **86**(1): 1-14.
- Oberhammer, F., J.W. Wilson, C. Dive, I.D. Morris, J.A. Hickman, A.E. Wakeling, P.R. Walker, M. Sikorska. (1993). "Apoptotic death in epithelial cells: cleavage

- of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation." *Embo J* **12**(9): 3679-84.
- Ogryzko, V. V., R. L. Schiltz, V. Russanova, B.H. Howard, Y. Nakatani. (1996). "The coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases." *Cell* **87**(5): 953-9.
- Oki, Y., J.P. Issa (2006). "Review: recent clinical trials in epigenetic therapy." *Rev Recent Clin Trials* **1**(2): 169-82.
- Pan, L., J. Lu, L. Han, Y. Zhang, S. Han, B. Huang. (2007). "Histone deacetylase inhibitor trichostatin a potentiates doxorubicin-induced apoptosis by up-regulating PTEN expression." *Cancer* **109**(8): 1676-88.
- Peart, M. J., G. K. Smyth, R.K. van Laar, D.D. Bowtell, V.M. Richon, P.A. Marks, A.J. Holloway, R.W. Johnstone. (2005). "Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(10): 3697-702.
- Peart, M. J., K. M. Tainton, A.A. Ruefli, A.E. Dear, K.A. Sedelies, L.A. O'Reilly, N.J. Waterhouse, J.A. Trapani, R.W. Johnstone. (2003). "Novel mechanisms of apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors." *Cancer Res* **63**(15): 4460-71.
- Petti, M. C., F. Fazi, M. Gentile, D. Diverio, P. De Fabritiis, M.S. De Propriis, R. Fiorini, M.A. Spiriti, F. Padula, P.G. Pelicci, C. Nervi, F. Lo Coco. (2002). "Complete remission through blast cell differentiation in PLZF/RARalpha-positive acute promyelocytic leukemia: in vitro and in vivo studies." *Blood* **100**(3): 1065-7.
- Pines, J. (1995). "Cyclins, CDKs and cancer." *Semin Cancer Biol* **6**(2): 63-72.
- Porwit-MacDonald, A., G. Janosy, K. Ivory, D. Swirsky, R. Peters, K. Wheatley, H. Walker, A. Turker, A.H. Goldstone, A. Burnett. (1996). "Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry. IV. CD34 overexpression in acute myelogenous leukemia M2 with t(8;21)." *Blood* **87**(3): 1162-9.
- Prochownik, E. V. (2004). "c-Myc as a therapeutic target in cancer." *Expert Rev Anticancer Ther* **4**(2): 289-302.
- Promega Corporation (2007). "Structures of MTS tetrazolium and its formazan product." *Technical Bulletin CellTiter 96@AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*: 2.
- Richardson, P. C. Mitsiades, K. Colson, E. Reilly, L. McBride, J. Chiao, L. Sun, J. Ricker, S. Rizvi, C. Oerth, B. Atkins, I. Fearen, K. Anderson, D. Siegel. (2008). "Phase I trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with advanced multiple myeloma." *Leuk Lymphoma* **49**(3): 502-7.
- Ross, D.D., J.E. Karp, T.T. Chen, L.A. Doyle. (2000). "Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia." *Blood* **96**(1): 365-8.
- Rossé, T., R. Olivier, L. Monney, M. Rager, S. Conus, I. Fellay, B. Jansen, C. Borner. (1998). "Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c." *Nature* **391**(6666): 496-9.
- Ruefli, A. A., M. J. Ausserlechner, D. Bernhard, V.R. Sutton, K.M. Tainton, R. Kofler, M.J. Smyth, R.W. Johnstone. (2001). "The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(19): 10833-8.
- Ruefli, A. A., D. Bernhard, K.M. Tainton, R. Kofler, M.J. Smyth, R.W. Johnstone. (2002). "Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) overcomes multidrug

- resistance and induces cell death in P-glycoprotein-expressing cells." *Int J Cancer* **99**(2): 292-8.
- Sandor, V., A. Senderowicz, S. Mertins, D. Sackett, E. Sausville, M.V. Blagosklonny, S.E. Bates. (2000). "P21-dependent G1 arrest with downregulation of cyclin D1 and upregulation of cyclin E by the histone deacetylase inhibitor FR901228." *Br J Cancer* **83**(6): 817-25.
- Scorrano, L., S. J. Korsmeyer (2003). "Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members." *Biochem Biophys Res Commun* **304**(3): 437-44.
- Selvakumaran, M., H. K. Lin, R.T. Sjin, J.C. Reed, D.A. Liebermann, B. Hoffman. (1994). "The novel primary response gene MyD118 and the proto-oncogenes myb, myc, and bcl-2 modulate transforming growth factor beta 1-induced apoptosis of myeloid leukemia cells." *Mol Cell Biol* **14**(4): 2352-60.
- Sherr, C.J. (1993). "Mammalian G1 cyclins." *Cell* **73**(6): 1059-65.
- Smeets, M., R. Raymakers, G. Vierwinden, A. Pennings, L. van de Locht, H. Wessels, J. Boezeman, T. de Witte. (1997). "A low but functionally significant MDR1 expression protects primitive haemopoietic progenitor cells from anthracycline toxicity." *Br J Haematol* **96**(2): 346-355.
- Smyth, M. J., E. Krasovskis, V.R. Sutton, R.W. Johnstone. (1998). "The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(12): 7024-9.
- Sung, Y.H., H.J. Kim, H.W. Lee. (2007). "Identification of a novel Rb-regulated gene associated with the cell cycle." *Mol Cells* **23**(3): 409-15.
- Tamm, I., S.M. Kornblau, H. Segall, S. Krajewski, K. Welsh, S. Kitada, D.A. Scudiero, G. Tudor, Y.H. Qui, A. Monks, M. Andreeff, J.C. Reed. (2000). "Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias." *Clin Cancer Res* **6**(5): 1796-1803.
- Tamm, I., S. Richter, F. Scholz, K. Schmelz, D. Oltersdorf, L. Karawajew, C. Schoch, T. Haferlach, W.D. Ludwig, C. Wuchter. (2004). "XIAP expression correlates with monocytic differentiation in adult de novo AML: impact on prognosis." *Hematol J* **5**(6): 489-95.
- Timmermann, S., H. Lehrmann, A. Poleskaya, A. Harel-Bellan. (2001). "Histone acetylation and disease." *Cell Mol Life Sci* **58**(5-6): 728-36.
- Toyoshima, H., T. Hunter (1994). "p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21." *Cell* **78**(1): 67-74.
- Turkina, A.G.; A. Y. Baryshnikov, N.P. Sedyakhina, S.V. Folomeshkina, M.A. Sokolova, N.D. Choroshco, A.A. Stavrovskaya. (1996). "Studies of P-glycoprotein in chronic myelogenous leukaemia patients: expression, activity and correlations with CD34 antigen." *Br J Haematol* **92**(2): 88-96.
- Tsuji, N., M. Kobayashi, K. Nagashima, Y. Wakisaka, K. Koizumi. (1976). "A new antifungal antibiotic, trichostatin." *J Antibiot (Tokyo)* **29**(1): 1-6.
- Urioste, M., A. Martínez-Ramírez, J.C. Cigudosa, M.S. Mateo, P. Martínez, T. Contra, J. Benítez. (2001). "Identification of ins(8;21) with AML1/ETO fusion in acute myelogenous leukemia M2 by molecular cytogenetics." *Cancer Genet Cytogenet* **133**(1): 83-86.
- van den Heuvel-Eibrink, M. M., B. van der Holt, A.K. Burnett, W.U. Knauf, M.F. Fey, G.E. Verhoef, E. Vellenga, G.J. Ossenkoppele, B. Löwenberg, P. Sonneveld. (2007). "CD34-related coexpression of MDR1 and BCRP indicates a clinically

- resistant phenotype in patients with acute myeloid leukemia (AML) of older age." *Ann Hematol* **86**(5): 329-37.
- van der Kolk, D. M., E. G. de Vries, M. Müller, E. Vellenga. (2002). "The role of drug efflux pumps in acute myeloid leukemia." *Leuk Lymphoma* **43**(4): 685-701.
- Van Lint, C., S. Emiliani, E. Verdin. (1996). "The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation." *Gene Expr* **5**(4-5): 245-53.
- van Stijn, A., M. A. van der Pol, A. Kok, P.M. Bontje, G.M. Roemen, R.H. Beelen, G.J. Ossenkoppele, G.J. Schuurhuis. (2003). "Differences between the CD34+ and CD34- blast compartments in apoptosis resistance in acute myeloid leukemia." *Haematologica* **88**(5): 497-508.
- Wegener, D., C. Hildmann, A. Schwienhorst. (2003). "Recent progress in the development of assays suited for histone deacetylase inhibitor screening." *Mol Genet Metab* **80**(1-2): 138-47.
- Willman, C. L. (1997). "The prognostic significance of the expression and function of multidrug resistance transporter proteins in acute myeloid leukemia: studies of the Southwest Oncology Group Leukemia Research Program." *Semin Hematol* **34**(4 Suppl 5): 25-33.
- Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C.N. Kim, A.M. Ibrado, J. Cai, T.I. Peng, D.P. Jones, X. Wang. (1997). "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked." *Science* **275**(5303): 1129-32.
- Yoshida, M., M. Kijima. M. Akita, T. Beppu. (1990). "Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A." *J Biol Chem* **265**(28): 17174-9.
- Yu, C., M. Rahmani, J. Almenara, M. Subler, G. Krystal, D. Conrad, L. Varticovski, P. Dent, S. Grant. (2003). "Histone deacetylase inhibitors promote STI571-mediated apoptosis in STI571-sensitive and -resistant Bcr/Abl+ human myeloid leukemia cells." *Cancer Res* **63**(9): 2118-26.
- Zhan, Q., M. J. Antinore, X.W. Wang, F. Carrier, M.L. Smith, C.C. Harris, A.J.Jr. Fornace. (1999). "Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45." *Oncogene* **18**(18): 2892-900.
- Zhou, J., Y. Chen, C. Li, W. Liu. (1998). "The protein expression of Bcl-2, Bax, Fas/Apo-1 in acute myeloid leukemia." *J Tongji Med Univ* **18**(1): 42-5.

Internetquellen:

- ClinicalTrials.gov (2006), Online im Internet, URL: <http://mirg.org/mesothelioma-articles/suberoylanilide-hydroxamic-acid.shtml>, Stand 11.6.08
- ClinicalTrials.gov (2008), Online im Internet , URL: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00419367?intr=%22Suberoylanilide+hydroxamic+acid%22&rank=9>, Stand 11.6.2008
- Journal Onkologie (08.01.08): „EU-Zulassung für Vorinostat zur Behandlung des fortgeschrittenen refraktären kutanen T-Zelllymphoms beantragt“. Online im Internet, URL: <http://www.journalonko.de/newsview.php?id:2275>. Stand 8.8.08

Pathologisches Institut Universitätsklinikum Erlangen (WS 2007/08). Online im Internet, URL: http://pathologie.uk-erlangen.de/e1848/e603/e860/e884/inhalt898/5.Sem_05a-Apoptose.pdf, Stand 11.6.08

Wielckens, K. „Klinische Chemie, Pathobiochemie und Hämatologie.“ Online im Internet, URL: http://medizin.uni-koeln.de/institute/kchemie/Lehre/Vorlesung/C_Leukopoese/Leukopoese.pdf, Stand 11.6.08

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1. Aufbau eines Chromosoms.
- Abb. 2. Acetylierung und Deacetylierung der ϵ -Aminogruppe einer Lysinkette eines Histons.
- Abb. 3. Mechanismus der Wirkung von HDAC-Inhibitoren.
- Abb. 4. Bindung von SAHA an das Zink-Atom im katalytischen Zentrum der Enzymtasche eines HDAC-Proteins.
- Abb. 5. Molekülstrukturen von HDAC-Inhibitoren.
- Abb. 6. Konzept epigenetischer Therapie.
- Abb. 7. Zellzyklusphasen mit jeweiligen Cyclinen und cyclinabhängigen Kinasen.
- Abb. 8. Freilassung des Transkriptionsfaktors E2F aus der Bindung mit Rb.
- Abb. 9. Elektronenmikroskopisch dargestellte Abbildungen einer nekrotischen und einer apoptotischen Zelle.
- Abb. 10. In- und extrinsisch induzierte Apoptosewege einer Zelle.
- Abb. 11. Myeloische Differenzierung aus CD34⁺ Stammzellen.
- Abb. 12. Molekülstruktur von MTS und Formazan.
- Abb. 13. Dosis-Wirkungs-Kurven der 12 AML-Zelllinien bezüglich SAHA und TSA.
- Abb. 14. Gegeneinander aufgetragene IC₅₀-Werte von der 12-AML-Zelllinien bei TSA und SAHA mit eingetragener Korrelationsgeraden.
- Abb. 15. Beobachtete Effekte auf den Zellzyklus unter SAHA-Behandlung.
- Abb. 16. Darstellung der Zellzyklusveränderungen nach Inkubation mit 1 μ M SAHA für 24h in den Zellen der 12 Zelllinien.
- Abb. 17. Zunahme des G1-Anteils in den Zellen der Modelllinien U-937, ML-2, HL-60, TF-1, K-562 und MONO-MAC-6.
- Abb. 18. Induktion von Apoptose durch SAHA im AnnexinV-Assay.
- Abb. 19. Zeitabhängige Apoptoseinduktion durch Behandlung mit SAHA.
- Abb. 20. Darstellung der Cycline D3, E und A in den Zellen der 12 Modelllinien.
- Abb. 21. Darstellung der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und XIAP in den Zellen 12 AML-Zelllinien.
- Abb. 22. Darstellung des proapoptotischen Proteins Bad in den Zellen der 12 AML-Zelllinien.
- Abb. 23. Zunahme der Expression der Oberflächenmarker CD41, CD64 und CD123 auf CMK-Zellen unter Behandlung mit SAHA.

- Abb. 24. Bestimmung der Oberflächenmarker CD11b, CD33, CD36, CD45 und CD123 auf unbehandelten Zellen der Linien TF-1 und HEL.
- Tabelle 1. WHO-Klassifikation der AML.
- Tabelle 2. Einteilung der HDAC in Klassen, Funktion und Lokalisation.
- Tabelle 3. Mittels MTT-Assay ermittelte IC_{50} -Werte der AML-Zelllinien und CD34⁺ HPC nach Inkubation mit TSA, SAHA und Scriptaid für 72h.
- Tabelle 4. Mittels MTT-Assay ermittelte IC_{50} -Werte der AML-Zelllinien und CD34⁺ HPC nach Inkubation mit Ara C, Etoposid und Staurosporin für 72h.
- Tabelle 5. Korrelationskoeffizienten zwischen den Zytostatika untereinander bzw. zwischen den Zytostatika und HDAC-Inhibitoren.
- Tabelle 6. Expressionsmuster der Zellzyklus-regulierenden Proteine Cdk4, Cdk6, Cyclin D3, Cyclin E, Cyclin A und Cyclin B1 in den 12 AML-Zelllinien.
- Tabelle 7. Expressionsmuster der Cdk-Inhibitoren p16, p27, der Tumorsuppressorproteine p53 und Rb sowie des Protoonkogens c-myc in den Zellen der 12 Modelllinien.
- Tabelle 8. Expressionsmuster der apoptoseassoziierten Proteine des in- und extrinsischen Wegs bei den Zellen der 12 AML-Zelllinien.
- Tabelle 9. Dargestellte p-Werte (2-seitig) mit signifikanter inverser Korrelation.
- Tabelle 10. Dargestellte p-Werte (2-seitig) ohne signifikante Korrelation.
- Tabelle 11. Expression weiterer Oberflächenmarker auf nativen und SAHA-behandelten CMK-Zellen.
- Tabelle 12. Expression der Resistenzgene P-GP, MRPr1 und BCRP in CMK-Zellen.
- Tabelle 13. Expression der Resistenzgene P-gp und BCRP in den Leukämielinien.

9 Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Peschel für die Möglichkeit, dass ich in seiner Abteilung meine Promotionsarbeit anfertigen durfte. Dabei wurden Teile dieser Arbeit durch die Deutsche José Carreras-Stiftung unterstützt.

Mein Dank gilt Dr. Kathrin Schömig, die mich im Labor eingearbeitet hat sowie Dr. Burkhard Schmidt für seine Einführung am Durchflusszytometer. Bedanken möchte ich mich bei Dr. Thomas Decker, der stets Anregungen für dieses Projekt gegeben hat. Herzlicher Dank gilt Madlene Oelsner, die mir viele Methoden beigebracht hat, sowie Michaela Wagner, die mir bei einigen Versuchen unterstützend unter die Arme gegriffen hat. Bedanken möchte ich mich auch bei Steffi Hauswald, die Teile der Ergebnisse durch ihren Einsatz reproduziert hat.

Ganz herzlichen Dank möchte ich Prof. Dr. Thomas Licht aussprechen für das Thema der Arbeit, für die ausführlichen Besprechungen, für seinen Enthusiasmus, für seine Anregungen, für die jederzeitige Verfügbarkeit und für die erste Arbeitsstelle.

Großer Dank gebührt auch all denen, die nicht namentlich erwähnt sind, und die mich während der Entstehung dieser Arbeit begleitet haben.

Der größte Dank gilt meiner Familie, die mich stets bei meinen Vorhaben unterstützt und mir meine Ausbildung ermöglicht hat. Insbesondere sind dies meine Eltern sowie Annelie und Olaf.

Noch größerer Dank gebührt Florian, weil Du immer für mich da bist und die Zeit mit Dir einfach wunderbar ist.

