

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie)

**Selektive Reduktion immaturer leukämischer Vorläuferzellen
-am Modell der AML Zell-Linie KG-1a-**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Mack, Sophie Rosa
2017

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. R. Handgretinger

2. Berichterstatter:

Professor Dr. R. Möhle

Tag der Disputation

22.07.2016

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Häufigkeit und aktuelle Therapiekonzepte der Akuten Myeloischen Leukämie	1
1.1.1	Epidemiologie der Akuten Myeloischen Leukämie.....	1
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese der Akuten Myeloischen Leukämie.....	4
1.1.3	Klinik der Akuten Myeloischen Leukämie	5
1.1.4	Aktuelle Therapie der Akuten Myeloischen Leukämie	6
1.2	Die Bedeutung leukämischer Stammzellen für die Akute Myeloische Leukämie und ihre Entstehung aus hämatopoetischen Stammzellen.....	9
1.2.1	Definition der hämatopoetischen Stammzelle.....	9
1.2.2	Hämatopoetische Stammzellen als Ursprung der Leukämieentstehung	11
1.2.3	Definition der LSC und ihre Rolle für die akute myeloische Leukämie	12
1.2.4	Phänotyp der LSC - Entwicklung der Forschung	14
1.3	Wirkung und Wahl genexpressionregulierender Medikamente zur Behandlung der Akuten Myeloischen Leukämie	15
1.3.1	Histondeacetylaseinhibitor Valproat	15
1.3.2	Glykogensynthase-Kinase 3 β Inhibitor TDZD-8.....	16
1.3.3	mTor Inhibitor Temsirolimus.....	17
1.3.4	Fragestellung	18
2	Material und Methoden.....	19
2.1.1	Geräte und Verbrauchsliste.....	19
2.1.2	Allgemeine Chemikalien.....	20
2.1.3	Stammlösungen	20
2.1.4	Verwendete Reagenzien	21
2.1.5	EDV	21
2.1.6	Wahl der Zelllinie und Vorbereitung der Proben	21
2.1.7	Analyse der Stammzellpopulation und der Zellzyklusentwicklung mit Hilfe der Durchflusszytometrie.....	23
2.1.8	Vorbereitung der Medikamente und Behandlung der AML Zelllinie	34
2.1.9	Statistische Auswertung	37

3	Ergebnisse	38
3.1	Die Wirkung von Valproat auf die AML generell und im Besonderen auf die LSC ..	38
3.1.1	Die Wirkung von Valproat auf die Proliferation von Zellen der Akuten Myeloischen Leukämie	38
3.1.2	Die Wirkung von Valproat auf die Hoechst Sidepopulation 2n	41
3.1.3	Die Wirkung von Valproat auf die Hoechst Sidepopulation 4n	42
3.2	Die Wirkung von TDZD-8 auf die AML generell und im Besonderen auf die LSC ..	44
3.2.1	Die Wirkung von TDZD-8 auf die Proliferation von Zellen der Akuten Myeloischen Leukämie	44
3.2.2	Die Wirkung von TDZD-8 auf die Hoechst Sidepopulation 2n	47
3.2.3	Die Wirkung von TDZD-8 auf die Hoechst Sidepopulation 4n	48
3.3	Die Wirkung von Temsirolimus auf die AML generell und im Besonderen auf die LSC	49
3.3.1	Die Wirkung von Temsirolimus auf die Proliferation von Zellen der Akuten Myeloischen Leukämie bei einmaliger Medikamentengabe	49
3.3.2	Die Wirkung von Temsirolimus auf die Hoechst Sidepopulation 2n	53
3.3.3	Die Wirkung von Temsirolimus auf die Hoechst Sidepopulation 4n	54
3.1	Die spezifischen Wirkungen von VPA, TDZD-8 und Temsirolimus im Vergleich	57
3.1.1	Die Wirkung auf die Proliferation von Zellen der Akuten Myeloischen Leukämie im Vergleich	57
3.1.2	Die Wirkung auf die Hoechst Sidepopulation 2n im Vergleich	58
3.1.3	Die Wirkung auf die Hoechst Sidepopulation 4n im Vergleich	58
4	Diskussion	60
4.1	Effekte von Valproat auf putative leukämische Stammzellen	60
4.2	Effekte von TDZD-8 auf putative leukämische Stammzellen	64
4.3	Effekte von Temsirolimus auf putative leukämische Stammzellen	70
4.4	Kritische Betrachtung der Hoechst Färbung im Hinblick auf die Identifikation von Stammzellen und Verhalten unter Behandlungsversuchen	74
4.4.1	Hoechst als funktionelles Assay vs. Antikörperfärbung von CD34	74
4.4.2	Verhalten der Hoechstfärbung unter Behandlungsversuchen	76
4.5	Ausblick	78

5	Literaturverzeichnis	80
	Tabellenverzeichnis.....	86
	Abbildungsverzeichnis.....	87
	Publikationsverzeichnis	89
	Erklärung.....	90

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP Binding Casette
AML	Akute Myeloische Leukämie
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Cyclin-dependent Kinase
CFU	Colony Forming Unit
CR	Clinical Remission
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FLT3	Fms-like Tyrosine Kinase 3
FSC	Forward Scatter
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 β
HDAC	Histondeacetylasen
HDACI	Histondeacetylaseinhibitor
HSC	Hämatopoietic Stem Cell
IGF	Insulin-like Growth Factor
LSC	Leukemic Stem Cell
MDR	Multi Drug Resistant
MRD	Minimal Residual Disease
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NF κ B	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NOD/SCID	Non-obese diabetic/ Severe combined immunodeficiency
PBS	Phosphat Buffered Saline
PKC	Proteinkinase C
SAHA	Suberoylanilide Hydroxamic Acid
SSC	Side Scatter
SD	Standard Deviation
SHH	Sonic Hedgehog

SP	Sidepopulation
TDZD-8	4-benzyl, 2-methyl, 1,2,4-thiadiazolidine, 3,5 dione
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VPA	Valproat
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Leukämie ist eine maligne Erkrankung des blutbildenden und lymphatischen Systems. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine Anreicherung von Leukozyten in ihren funktionsunfähigen Vorstufen. Durch die Ausbreitung der leukämischen Zellen im Knochenmark wird die gesunde Blutbildung verdrängt, wodurch sich die normalen Blutbestandteile vermindern.

Je nach Krankheitsverlauf werden akute von chronischen Leukämien unterschieden. Des Weiteren werden Leukämien auf Grund der vorkommenden Zelltypen in myeloisch und lymphatisch eingeteilt. Diese Unterteilung ist Ausdruck einer heterogenen Gruppe von hämatologischen Neoplasien, die sich in ihrer Pathogenese und Ätiologie teilweise deutlich unterscheiden.

Leukämien zählten im Jahr 2012 bei Frauen zu den 10 häufigsten Krebstodesursachen, bei Männern lagen sie an elfter Stelle (ZFKD, 2013, URL: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Krebs_gesamt/krebs_gesamt_node.html?jsessionid=F149419B14A80D676368D9DBC39ED7BF.2_cid290 (Stand 20.12.2014)). Innerhalb der Leukämien macht die chronische Leukämie ungefähr 50% aus, 35% gehen auf akute Leukämien und 15% auf weitere leukämische Erkrankungen (Zentrum für Krebsregisterdaten) zurück. Betrachtet man die Gruppe der akuten Leukämien, so sind 80% der akuten Leukämien beim Erwachsenen myeloische Leukämien und 20% lymphatische Leukämien. Im Kindesalter ist dieses Verhältnis umgekehrt. Die vorliegende Arbeit wird sich auf die Betrachtung der AML beschränken.

1.1 Häufigkeit und aktuelle Therapiekonzepte der Akuten Myeloischen Leukämie

1.1.1 Epidemiologie der Akuten Myeloischen Leukämie

Misst man die Häufigkeit unterschiedlicher Krebsarten liegen Leukämien beim Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts an elfter Stelle. Zu 30% handelt es sich um die Form der akuten myeloischen Leukämie (AML).

Das Krankheitsbild der akuten myeloischen Leukämie betrifft vor allem Patienten höheren Lebensalters. Die Inzidenz der AML beläuft sich generell auf 3-4/100000 Einwohner pro Jahr. Jedoch steigt die Inzidenz mit zunehmendem Lebensalter an, so

dass sie im Alter von 65 Jahren bei 15/100000 Einwohner pro Jahr liegt. Männer sind im Allgemeinen etwas häufiger betroffen als Frauen.

Auch Kinder können an einer akuten myeloischen Leukämie erkranken, allerdings tritt diese dort deutlich seltener auf. Die AML ist nur für 15% der akuten Leukämien im Kindesalter verantwortlich, während der höhere Anteil bei den akuten lymphatischen Leukämien (ALL) liegt. Diese beträchtliche Häufigkeit des Auftretens von Leukämien in der Bevölkerung macht das Thema des Fortschritts in der Therapie dringlich.

Die akute myeloische Leukämie wird anhand der FAB Klassifikation eingeteilt (vgl. Tabelle 1.1). Diese wurde 1976 von französischen (F), amerikanischen (A) und britischen (B) Hämatologen festgelegt. Morphologische, sowie zytochemische Charakteristika liegen ihr zu Grunde. Seit einiger Zeit werden akute myeloische Leukämien allerdings nach der World Health Organisation (WHO) Klassifikation eingeteilt (

Tabelle 1.2), welche sich als Erweiterung der FAB Klassifikation sieht. Hierbei werden zusätzlich molekularbiologische und immunphänotypische Merkmale beachtet. In der Klinik sollte die Klassifikation nach beiden Schemata erfolgen.

Tabelle 1.1: FAB-Klassifikation der AML

FAB Subtyp	Bezeichnung
M0	Akute Leukämie mit minimaler Differenzierung
M1	Akute Leukämie ohne Ausreifung
M2	Akute Leukämie mit Ausreifung
M3	Akute Promyelozyten-Leukämie (APL)
M3v	Akute Promyelozyten-Leukämie, mikrogranuläre Form
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie
M4Eo	Akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie
M5a	Akute Monoblasten-Leukämie
M5b	Akute Monozyten- Leukämie
M6	Akute Erythroleukämie
M7	Akute Megakaryoblasten-Leukämie

Tabelle 1.2: WHO Klassifikation akuter myeloischer Leukämien 2008

WHO 2008 Klassifikation akuter myeloischer Leukämien 2008 und verwandter Vorläufer-Neoplasien und akute Leukämie mit unklarer Linienzugehörigkeit (nach Creutzig et al. (2012))

Leukämieform	morphologische und zytochemische Charakteristika
Akute myeloische Leukämie mit wiederkehrenden zytogenetischen Anomalien	<p>AML mit t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1</p> <p>AML mit inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11</p> <p>APL (Akute Promyelozytenleukämie) mit t(15;17)(q22;q12); PML-RARA1</p> <p>AML mit t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL²</p> <p>AML mit t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214</p> <p>AML mit inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1</p> <p>AML (megakaryoblastär) mit t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1</p> <p>Vorläufige Entität: AML mit mutiertem NPM1</p> <p>Vorläufige Entität: AML mit mutiertem CEBPA</p>
Akute myeloische Leukämie mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen	
Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien	
Akute myeloische Leukämie ohne weitere Kategorie (not otherwise specified, NOS)	<p>AML mit minimaler Differenzierung (FAB M0)</p> <p>AML ohne Ausreifung (FAB M1)</p> <p>AML mit Ausreifung (FAB M2)</p> <p>Akute myelomonozytäre Leukämie (FAB M4)</p> <p>Akute monoblastäre/monozytäre Leukämie (FAB M5a, b)</p> <p>Akute Erythroleukämie (FAB M6)</p> <p>- reine Erythroleukämie</p> <p>- Erythroleukämie, erythroid/myeloid</p> <p>Akute Megakaryoblastenleukämie (FAB M7)</p> <p>Akute Basophilenleukämie</p> <p>Akute Panmyelosis mit Myelofibrose (Syn.: akute Myelofibrose; akute Myelosklerose)</p>
Myeloisches Sarkom (Syn.: extramedullärer myeloischer Tumor; granulozytäres Sarkom; Chlorom)	
Myeloische Proliferationen bei Down-Syndrom	<p>Transient abnormale Myelopoese (Syn.: Transientes myeloproliferatives Syndrom)</p> <p>Down Syndrom assoziierte myeloische Leukämie</p>

Blastische plasmazytoide dendritische Zell-Neoplasien	
Akute Leukämien mit unklarer Linienzugehörigkeit	<p>Akute undifferenzierte Leukämie</p> <p>Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp und t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1</p> <p>Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp und (v;11q23); MLL-Rearrangement</p> <p>Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, B/myeloisch</p> <p>Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, T/myeloisch</p> <p>Vorläufige Entität: Natural Killer (NK) Zell lymphoblastische Leukämie/Lymphom</p>

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese der Akuten Myeloischen Leukämie

Risikofaktoren für die Entstehung einer AML sind in erster Linie Schädigungen der hämatopoetischen Stammzellen. Noxen, wie zum Beispiel Kohlenwasserstoffe, ionisierende Strahlungen aber auch alkylierende Substanzen und Topoisomerasehemmer können die DNA schädigen und zu Mutationen führen. Außerdem sind einige hämatologische Erkrankungen prädisponierend für die Entstehung der AML, darunter myelodysplastische Syndrome, myeloproliferative Syndrome, aplastische Anämie, multiple Myelome und paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie. Mit einem erhöhten Risiko gehen auch angeborene genetische Veränderungen einher, wie zum Beispiel die Trisomie 21, die Fanconi-Anämie, das Bloom-Syndrom und das Li-Fraumeni-Syndrom. Trotz all dieser Risikofaktoren muss bemerkt werden, dass die Ätiologie bei dem größten Teil der neudiagnostizierten Patienten ungeklärt bleibt (Berger et al., 2014).

Auf molekularer Ebene finden sich drei Arten von Pathomechanismen: zytogenetisch, molekulargenetisch und epigenetisch.

Zytogenetisch lassen sich numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen der AML zuordnen. In den meisten Fällen handelt es sich um balancierte Translokationen, die vor allem bei jüngeren Patienten beschrieben werden. Die wichtigsten sind AML1/ETO (t(8;21)(q22;q22)), CBFbeta/MYH11 (inv(16)(p13;q22)) und die RAR α Alteration (t(15;17)(q21;q11)). Sie führen zu Fusionsproteinen, welche die Transkription beeinflussen.

Molekulargenetisch steht die Aktivierung von Onkogenen, wie die Punktmutation im N-Ras/K-Ras-Protoonkogen oder Genrearrangements im Vordergrund. Reikvam et al. stellten 2013 fest, dass in der AML eine konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR Signalwegs vorliegt. Sie schlugen dessen Inhibition als möglichen therapeutischen Ansatzpunkt vor (Reikvam et al., 2013). Einen genaueren Einblick in diesen Signalweg wird in Kapitel 1.3.3 gegeben.

Hypermethylierung und Histondeacetylierung von Genen spielt als epigenetischer Pathomechanismus eine Rolle (Conway O'Brien et al., 2014). Bradbury et al. verglichen im Jahr 2005 die Expression der Histondeacetylasen in AML Zellen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Aktivität dieser Enzyme im Gegensatz zu normalen hämatopoetischen Vorläuferzellen durchgehend missreguliert sind (Bradbury et al., 2005). Nähere Betrachtung dieses Mechanismus erfolgt in Kapitel 1.3.1.

Durch die oben genannten Pathomechanismen kommt es im Knochenmark zu einer Vermehrung myeloischer Vorläuferzellen, je nach Subtyp der AML in verschiedenen Reifungsstadien. Normalerweise findet man daher eine monomorphe Population von sogenannten Blasten. Blasten sind unreife Zellen mit einem großen Kern, deutlich sichtbaren Nukleolus und schmalem basophilem Zytoplasma, die nicht in der Lage sind sich in funktionelle Granulozyten und Monozyten zu differenzieren (Bonnet and Dick, 1997). In einer Art Überlaufaktion können diese Blasten als Leukozytose im peripheren Blut erscheinen. Diesen Vorgang nennt man Blastenkrise. Durch die Anhäufung dieser Blasten im Knochenmark wiederum wird die normale Hämatopoese im Knochenmark verdrängt. Diese Verdrängung hat eine dramatische Folge für die gesamte Blutbildung, denn es kommt dadurch zu einer Anämie, einer Neutropenie und einer Thrombopenie.

1.1.3 Klinik der Akuten Myeloischen Leukämie

Im Vordergrund der Erkrankung stehen für Patienten die Symptome der hämatopoetischen Insuffizienz, die durch die blastäre Infiltration des Knochenmarks verursacht wird. So kommt es durch die Anämie zu Abgeschlagenheit, Müdigkeit und Blässe der Haut und Schleimhäute. Durch die mangelnde Bildung von Thrombozyten steigt die Blutungsneigung an, was zu Hämatomen und Epistaxis führen kann. Aber auch durch disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) und Hyperfibrinolyse sind solche Symptome möglich. Die Neutropenie stellt auf Grund der erhöhten Infektneigung eines

der größten Risiken für den Patienten dar und trägt maßgeblich zur Letalität der Erkrankung bei.

Im Blut von 60% der Patienten zeigt sich eine Leukozytose. Übersteigt diese Leukozytose den Wert von 100000/ μ l, besteht die Gefahr der Leukostase mit Hypoxie, pulmonalen Verschattungen, retinalen Einblutungen und neurologischen Symptomen (Büchner, T, Leitlinie AML (2014), URL: <https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/aml> (Stand: 20.12.2014)).

Zusätzliche unspezifische Allgemeinsymptome, die mit kurzer Anamnese auftreten, sind Nachtschweiß, Fieber, Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust und grippeähnliche Symptome.

Weitere eher seltene Symptome der AML sind extramedulläre Manifestationen, beispielsweise leukämische Infiltration der Gingiva oder der Haut. Eine Hepatosplenomegalie und eine Lymphadenopathie treten zwar auch auf, sind aber bei der ALL deutlich häufiger. ZNS Manifestationen sind bekannt, allerdings als Erstmanifestation äußerst selten.

Die genannten Symptome lassen viel Raum nicht nur für hämatologische Differentialdiagnosen, daher ist eine ausführliche Diagnostik wichtig.

Eine Anamnese mit Abklärung der Risikofaktoren sowie eine körperliche Untersuchung sind unerlässlich. Ein großes Blutbild und ein Knochenmarksausstrich nach Beckenkammbiopsie gehören zum Standard, ebenso ein Röntgen-Thorax und eine Sonografie des Abdomens um extramedulläre Manifestationen aufzudecken. Gegebenenfalls können eine Liquorpunktion und eine mikrobiologische Diagnostik erfolgen um Infekte und Viruserkrankungen auszuschließen. Eine HLA Typisierung wird vor allem bei jüngeren Patienten durchgeführt, bei denen die Stammzelltransplantation eine therapeutische Rolle spielen könnte (Berger, 2006).

1.1.4 Aktuelle Therapie der Akuten Myeloischen Leukämie

Die Therapie hängt von dem Typ der AML ab. Daher ist eine genaue Diagnostik erforderlich. Es lassen sich generell drei verschiedene Therapiephasen unterscheiden:

- Induktionsphase
- Konsolidierungsphase
- Erhaltungsphase

Die Induktionsphase bzw. der Therapiebeginn bei der AML sollte so schnell wie möglich erfolgen, denn bereits eine Verzögerung um fünf Tage führt bei jüngeren Patienten zu einer Verschlechterung der Prognose (Leitlinie AML, DGHO). Ziel in der Induktionsphase ist das Erreichen einer kompletten Remission, das heißt Reduktion der leukämischen Zellen um mindesten 2-3 Zehnerpotenzen, Normalisierung der Blastenzahl im Knochenmark (<5%, was der mikroskopischen Nachweisgrenze entspricht) wie im Blut (<1%) und Wiederherstellung der normalen Hämatopoese.

Goldstandard in der Induktionstherapie ist eine kombinierte Chemotherapie aus Cytosin-Arabinosid und einem Anthrazyklin, zum Beispiel Daunorubicin (Dempke, 2006, S. 528).

Die Konsolidierungstherapie richtet sich nach dem Karyotyp der AML und nach dem Ansprechen auf die Induktionstherapie. Entweder erfolgt eine intensive Chemotherapiekombination mit Cytosin-Arabinosid oder eine Hochdosis-Chemotherapie zusammen mit Stammzelltransplantation (Dempke, 2006, S. 529). Ziel ist die weitere Reduktion und Elimination des malignen Klon, sprich, wie bereits im vorherigen Schritt, die komplette Remission. Man spricht dabei auch von einer Vollremission.

Wenn die erste komplette Remission erreicht wird, haben Patienten drei Möglichkeiten der Therapie:

- Allogene Knochenmarktransplantation
- Autologe Blutstammzelltransplantation
- Hochdosierte Chemotherapie mit Ara-C

Die allogene Knochenmarktransplantation von einem passenden Spender wird vor allem bei der Behandlung von Hochrisikopatienten eingesetzt. Für Patienten mit geringerem Risiko kommt eine autologe Knochenmarktransplantation aus eigenem, aufgereinigtem Knochenmark in Frage. Unabhängig von der Einteilung in Risikogruppen, besteht für den Patienten die Möglichkeit einer hochdosierten Chemotherapie. In großen randomisierten Studien wurde gezeigt, dass sich diese drei Therapiemöglichkeiten hinsichtlich des Gesamtüberlebens nicht signifikant unterscheiden (Dempke, 2006).

Wie bereits beschrieben, ist das Ziel aller Therapien eine sogenannte Vollremission. Dabei soll der Anteil der Blasten im Knochenmark unter 5% und im Blut auf unter 1% fallen. Dennoch verbleiben trotz Vollremission entartete Zellen als minimale Resterkrankung (minimal residual disease, MRD) zurück. Diese MRD kann im Falle der

AML, mit der Durchflusszytometrie gemessen werden, gilt aber nicht als Standarduntersuchung für Patienten. Die Methode hat eine Sensitivität von bis zu 10^{-5} , was bedeutet, dass unter 100 000 Zellen noch ein einzelner leukämischer Blast nachweisbar ist. So kann die laufende Therapie kontrolliert und ein Rückfall früh erkannt werden. Der MRD-Level ist prädiktiv für das klinisch sichtbare Resultat des Patienten. Das bedeutet, dass auf einen hohen MRD-Level wahrscheinlicher ein Rezidiv folgt als auf einen niedrigen.

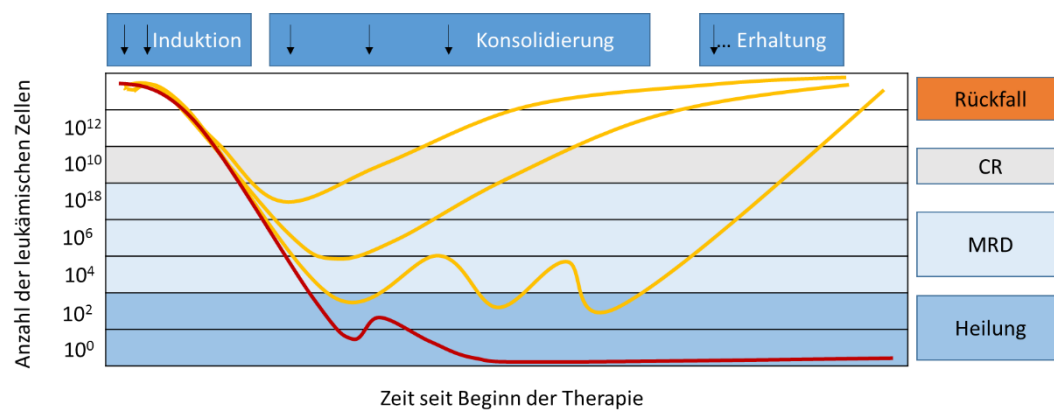


Abbildung 1: Resultat der Leukämiebehandlung unter Betrachtung der MRD

Die rote Linie zeigt die Reduktion der Anzahl leukämischer Zellen mit einem kleinen Anstieg vor der 2. Konsolidierungstherapie. Heilung wird erreicht. Die gelben Linien zeigen Verläufe mit Rückfällen der AML, bei denen vorher erhöhte MRD Level auftreten. Der hellgraue Bereich bezieht sich auf 1-5% leukämische Zellen im Knochenmark, was der Vollremission entspricht. Der hellblaue Bereich ist der, in dem 0% leukämische Zellen im Knochenmark nachweisbar sind, jedoch MRD Level in der Durchflusszytometrie auffallen. Im dunkelblauen Bereich sind 0% leukämische Zellen im Knochenmark nachweisbar und die MRD Level liegen unterhalb der Sensitivität der Durchflusszytometrie. (Adaptiert nach Kern et al. (2005))

Mit Hilfe dieser Messung konnten bereits Patienten in molekularem Rezidiv erkannt und behandelt werden, noch bevor im Routinelabor eine Veränderung aufgefallen ist (Kern et al., 2005, Hourigan and Karp, 2013).

Zusammengefasst kann man sagen, dass durch die Kontrolle der MRD eine Risikostratifizierung der Patienten erfolgen kann. Dies führt dazu, dass das Schema der Chemotherapie angeglichen wird und unnötig hohe Dosen an Chemotherapeutika vermieden werden (Campana, 2008).

1.2 Die Bedeutung leukämischer Stammzellen für die Akute Myeloische Leukämie und ihre Entstehung aus hämatopoetischen Stammzellen

In folgendem Kapitel soll der Fokus auf den Ursprung der akuten myeloischen Leukämie gelegt werden. Seit einigen Jahren hält sich die These, dass der Erkrankung eine maligne Transformation der hämatopoetischen Stammzellen (HSC) zugrunde liegt. Diese transformierten Zellen stellen den Ursprung der bisher im Behandlungsfokus stehenden leukämischen Blasten dar.

1.2.1 Definition der hämatopoetischen Stammzelle

Alle Zellen des Blutes haben eine begrenzte Lebenszeit. Erythrozyten überleben 120 Tage im Blut, neutrophile Granulozyten nur eine Woche. Dieser hohe Umsatz an Zellen benötigt eine potente Hämatopoese, sprich eine starke Entwicklung neuer Zellen.

Am Anfang der Hämatopoese steht eine multipotente hämatopoetische Stammzelle (HSC). Im Jahre 1961 wurde von Till und McCulloch zum ersten Mal die Existenz der HSC nachgewiesen (Till et al., 1964). Stammzellen sind definiert als diejenigen Körperzellen, die in der Lage sind, sich durch Selbsterneuerung zu erhalten und außerdem die Fähigkeit besitzen, ausgereifte Zellen eines Gewebes hervorbringen zu können (Reya et al., 2001).

Beim Erwachsenen im Knochenmark liegend, sind sie der Ursprung aller im Blut vorkommenden Zellen (Reya et al., 2001, Abbas et al., 2012). Um die Anzahl der Stammzellen konstant zu halten, besitzen sie die Eigenschaft sich selbst zu erneuern und asymmetrisch zu teilen, wobei eine Zelle als HSC verbleibt, während die andere sich im Verlauf differenziert (Weissman et al., 2001).

Die multipotenten HSCs können in drei fortlaufende Untergruppen eingeteilt werden: die Stammzellpopulation gliedert sich in Langzeit selbst-erneuernde HSCs (long term self-renewing HSC), kurzzeitig selbst-erneuernde HSCs (short term self-renewing HSC) und sich nicht erneuernde multipotente Vorläuferzellen mit hoher mitotischer Aktivität. Daraufhin entwickeln sich die multipotenten Vorläuferzellen zu einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle (common lymphoid progenitor cells, CLP) oder zu einer gemeinsamen myeloischen Vorläuferzelle (common myeloid progenitor cells, CMP) (Akashi et al., 2000). Aus diesen spezifischen Vorläuferzellen entwickeln sich im Folgenden Lymphozyten, dendritische Zellen, Monozyten und Erythrozyten (vgl. Abbildung 5). Long term self-renewing HSCs befinden sich zum größten Teil in einem

Ruhezustand, der Quieszenz genannt wird. Sie besitzt den höchsten Grad an Stammzeleigenschaften (Selbsterneuerung, Teilungskapazität, Multipotenz). Im Verlauf der Entwicklung, bzw. mit jedem Teilungsschritt, verlieren die Zellen nach und nach ihre Stammzeleigenschaften und erlangen für bestimmte Zellarten spezifische Charakteristika, wie beispielsweise Oberflächenmarker.

HSCs sind immer noch Gegenstand der Forschung, da man ein möglichst genaues System etablieren möchte um diese Zellen zu charakterisieren. Die Charakterisierung läuft vor allem über Oberflächenmoleküle, welche als sogenannte „Clusters of Differentiation“ (CD) bezeichnet werden. Zellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien besitzen ein unterschiedliches Muster an CDs (Ogawa, 2002). HSCs werden grundsätzlich als CD34⁺ und CD38⁻ beschrieben. Des Weiteren gelten sie als CD117⁺, Sca⁺, Lin⁻ und Thy10^{low/-} (Challen and Goodell, 2011). Diese Oberflächenmarker sind nicht die einzige Methode HSCs nachzuweisen: von Goodell et al. in den 90er Jahren entwickelt, ist die Hoechst 33342 Färbung eine Möglichkeit HSCs zu filtern. Nach Färbung mit Hoechst 33342 fluoresziert eine kleine Population an Zellen aus dem Knochenmark geringer als die restlichen Zellen. Dies liegt an für HSCs und Vorläuferzellen spezifischen Membrantransportern, die den Farbstoff aus der Zelle schleusen. Genauer wird dieser Mechanismus in Kapitel 2.1.7-„ Analyse der Stammzellpopulation und der Zellzyklusentwicklung mit Hilfe der Durchflusszytometrie“ beschrieben. Durch diese Transporterproteine lassen sich die Vorläuferzellen in einer sogenannten Sidepopulation (SP) darstellen. Überraschenderweise wurde festgestellt, dass diese Zellen zum großen Teil CD34^{low/-} sind (Goodell et al., 1997). Dennoch sind SP Zellen in der Lage, in vitro Kolonien zu formen und in immunodefizienten Mäusen eine Blutbildung zu initiieren (Goodell et al., 1996).

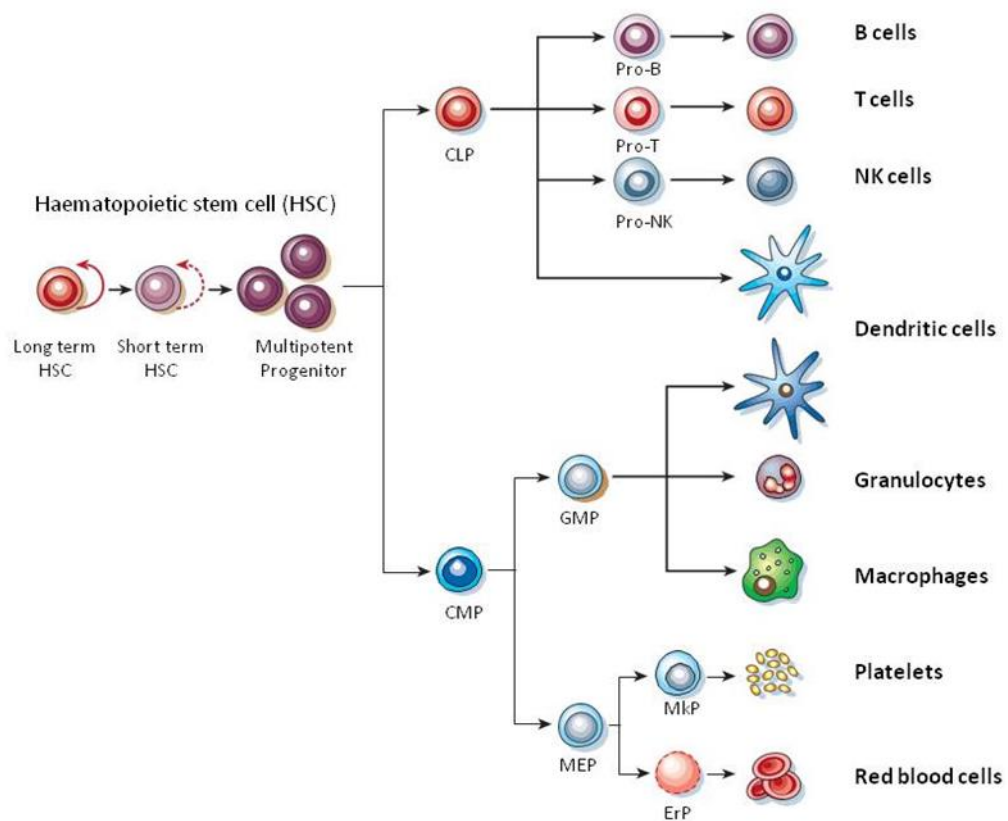


Abbildung 2: Hämatopoese

Entwicklung der hämatopoetischen Stammzelle. Die long term HSC bringt die short term HSC hervor, während Selbsterneuerung möglich ist (rote Pfeile). Aus den short term HSC gehen die multipotenten Vorläuferzellen hervor und aus ihnen wiederum die common lymphatic progenitors (CLP) und die common myeloid progenitors (CMP). Diese beiden bilden den Ausgangspunkt für alle weiteren Zellen. GMP: Granuloxytes/macrophages Precursor, MEP: Megakaryocytes/Erythrocytes Precursor, MkP: Megakaryocytes Precursor, ErP: Erythrocytes Precursor, NK cells: Natural Killer Cells, adaptiert von Reya et al. (2001)

1.2.2 Hämatopoetische Stammzellen als Ursprung der Leukämieentstehung

Die Existenz sogenannter Krebsstammzellen beschäftigt die Forschung der letzten zehn Jahre. Durch die besondere Eigenschaft der HSCs, sich selbst zu erneuern und sich immer und immer wieder im Laufe des Lebens zu teilen, geht man davon aus, dass Mutationen, welche über die Zeit entstehen, sich leichter akkumulieren können und nicht von den zelleigenen Reparatursystemen behoben werden. Die Fähigkeit sich selbst erneuern zu können stellt für viele Krebsarten einen entscheidenden Überlebensfaktor dar. Daher ist die Entwicklung einer hämatologischen Neoplasie besonders wirkungsvoll an der Stelle, an der der Selbsterneuerungsmechanismus seinen physiologischen Höhepunkt erreicht, an den long term self-renewing HSCs und den short term self-renewing HSCs. Ein Beleg für diese Theorie ist, dass in Leukämiepatienten die

physiologischen long term self-renewing HSCs leukämieassoziierte Translokationen zeigen (Reya et al., 2001).

Miyamoto et al. (2000) stellten fest, dass Leukämie aus Mutationen auf Höhe der HSCs entstehen könnte. Sie untersuchten das Knochenmark von Patienten in CR einer AML mit t(8;21) und fanden AML1/ETO⁺ unter den normalen HSCs. Diese Zellen waren nicht leukämieinduzierend, sondern differenzierten in vitro zu normalen myeloerythoiden Zellen aus. Dieser Versuch zeigt, dass die ursprüngliche Mutation auf der Ebene der HSCs erfolgt sein muss und weitere Mutationen, entweder an derselben Stelle oder in den nachfolgenden Vorläuferzellen, erfolgt sein müssen.

Es wurde außerdem gezeigt, dass viele Signalwege, welche mit einer AML assoziiert sind, auch normale Stammzellentwicklung steuern könnten. Der Wnt Pathway, der Shh Pathway und auch der Notch Pathway liegen daher im Fokus neuerer Arbeiten (Reya et al., 2001).

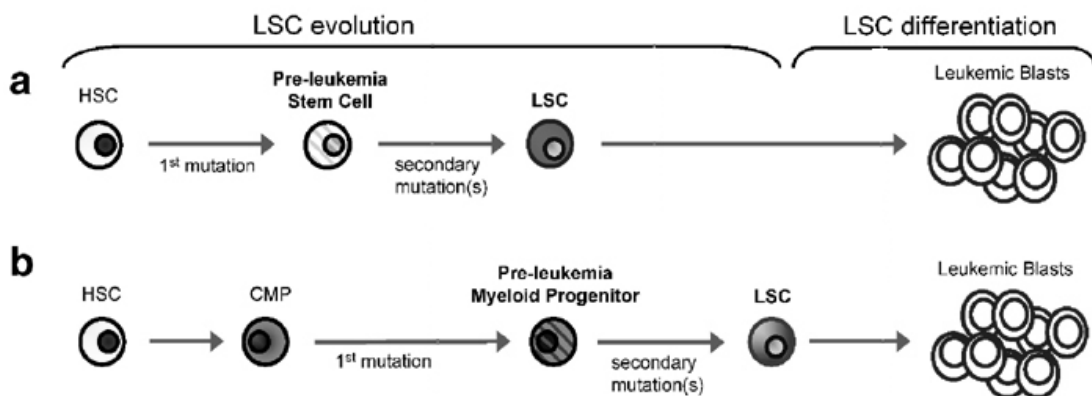


Abbildung 3: Hypothesen zur Entwicklung der LSC

a) Bildung der LSC durch zwei Mutationen über die Zwischenstufe der Pre-leucemia Stem Cell, b) Bildung der LSC durch mehrere Mutationen aus einer myeloiden Vorläuferzelle, nach Jordan (2007)

Finden nun die Mutationen auf Höhe der HSCs statt, so ergibt sich, dass eine leukämische Zelle mit Stammzeleigenschaften entsteht.

1.2.3 Definition der LSC und ihre Rolle für die akute myeloische Leukämie

Eine wachsende Anzahl an Belegen weist darauf hin, dass die Krebsentstehung hierarchischen Strukturen folgt und von einem Pool an selbsterneuernden Krebsstammzellen genährt wird (Reya et al., 2001). Diese These gilt auch für die akute myeloische Leukämie (Bonnet and Dick, 1997). Man geht davon aus, dass die LSC den

Ursprung der AML darstellen (vgl. Abbildung 4). Durch ihre stammzellspezifischen Eigenschaften unterhalten sie die Entwicklung von Blasten und sichern das Fortbestehen der Erkrankung. Da leukämische Blasten, das klassische Aushängeschild der AML, nur eine geringe Teilungskapazität besitzen, wird eine Zellart vorausgesetzt, die über eine immense Proliferationskapazität verfügt. Diese Proliferationskapazität findet sich bei leukämischen Stammzellen (Bonnet and Dick, 1997). An diese leukämischen Zellen werden drei Anforderungen gestellt, damit sie als Stammzellen gelten können (Valent, 2011):

- Die Kapazität sich selbst zu erneuern
- Die Kapazität sich zu differenzieren
- Die Kapazität den Pool an Stammzellen aufrecht zu erhalten

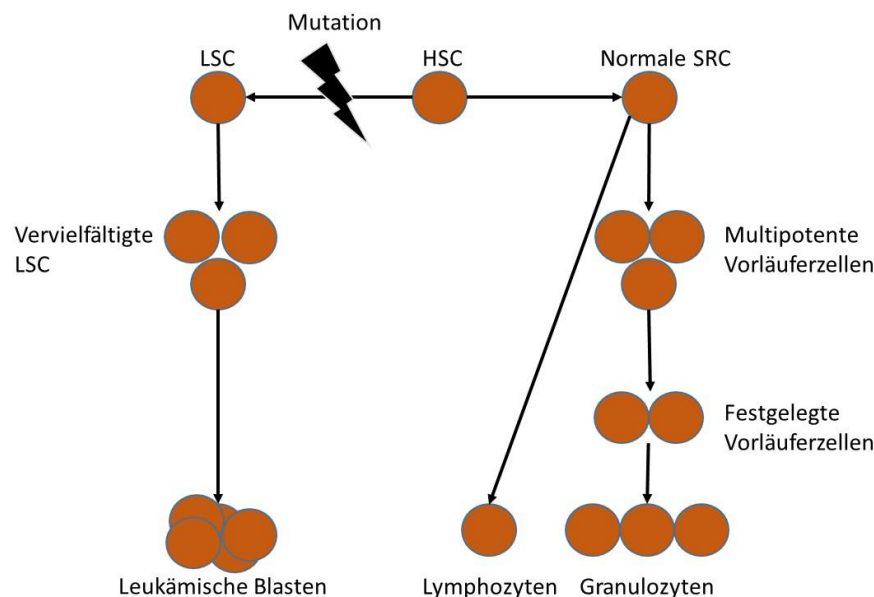


Abbildung 4: Leukämie folgt einer hierarchischen Ordnung.

Durch Mutationen auf Höhe der HSC entstehen leukämische Stammzellen (LSC). Diese führen bei gesteigerter Teilungsrate zu leukämischen Blasten. SRC: scid repopulating cells (in immunodefizienten Mäusen anwachsende Zellen) (adaptiert von Bonnet and Dick (1997))

Der einzige sicher geltende Nachweis von leukämischen Stammzellen ist die Transplantation in immunodefiziente Mäuse. Sind die Zellen in der Lage in der Maus anzuwachsen und eine Leukämie hervorzurufen, die der ursprünglichen Krankheit des Patienten gleicht, so gilt der Beweis als erbracht.

Schon in Kapitel 1.1.4 (S.6) wurde über die hohe Rezidivrate bei CR berichtet. Trotz Remission erfahren 60-80% der AML Patienten ein Rezidiv, da Therapieresistenz ein weiteres Charakteristikum der leukämischen Stammzellen ist: dadurch, dass die Zellen

sich überwiegend im Ruhezustand befinden, lassen sie sich durch normale Chemotherapie, welche vorwiegend in den Teilungsprozess einer Zelle eingreift, nicht reduzieren. Außerdem besitzen sie einen ausgeprägten Selbstschutzmechanismus (ten Cate et al., 2010). Durch sogenannte ABC Transporter, darunter multi drug resistance 1 (MDR1), sind diese Zellen vermutlich in der Lage, Chemotherapeutika und andere potentiell zytotoxische Substanzen aktiv aus den Zellen zu pumpen. Man geht davon aus, dass die LSC innerhalb der MRD (vgl. Kapitel 1.1.4) verweilen und für Rezidive der Erkrankung verantwortlich sind (Kern et al., 2005).

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die leukämischen Stammzellen eine wichtige Rolle für die Entstehung und Erhaltung der Erkrankung sowie für Rezidive nach blastenreduzierender Chemotherapie spielen.

1.2.4 Phänotyp der LSC - Entwicklung der Forschung

Im Jahr 1997 stellten Bonnet und Dick zum ersten Mal die hierarchische Ordnung der Entstehung der AML dar. Die Arbeitsgruppe postulierte, dass CD34⁺ und CD38⁻ Zellen in der Lage sind, in vivo AML-CFU und leukämische Blasten zu generieren (Bonnet and Dick, 1997).

Die Frage der Charakterisierung der LCs treibt Forscher seither um.

Blair et al. (1998) beschrieben, dass die meisten leukämischen Vorläuferzellen mit der Fähigkeit über einen langen Zeitraum zu proliferieren, den Phänotyp CD34⁺/CD71⁻/HLA-DR⁻ besitzen (Blair et al., 1998).

Die weit verbreitete Meinung, dass LSCs sich ausschließlich mit CD34⁺/CD38⁻ darstellen, wurde 2012 von Martelli widerlegt. In einer Metaanalyse wurde festgestellt, dass LSC Aktivität auch in anderen Subpopulationen gemessen wurde. Diese zeigen entweder einen CD34⁻, CD34⁺/CD34⁻ Phänotyp oder sogar CD34⁺/CD38⁺ (Martelli et al., 2012). Diese These widerspricht der Arbeit von Lapidot, dass CD34⁺/CD38⁻ AML-Zellen in SCID-Mäusen eine Leukämie induzieren können, CD34⁺/CD38⁺ sowie CD34⁻ Zellen jedoch nicht (Lapidot et al., 1994). Eindrücklich zeigt sich bei der Studie der Arbeiten zu diesem Thema, dass ein Konsens noch nicht gefunden wurde.

Viele Forschungsarbeiten der letzten 10 Jahre drehten sich um die Suche nach möglichen Ursprungszellen der akuten myeloischen Leukämie. Viele Forscher sind sich einig, dass es leukämische Stammzellen gibt, die einem Ausbruch der Krankheit vorangehen. Diese Zellen als Angriffspunkt zu nehmen und als therapeutisches Target zu verwenden ist nicht neu.

Die Forschungsgruppe AG Ebinger der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen hat in den vergangenen zwei Jahren mehrere Medikamente auf die Möglichkeit der Reduktion der LSCs überprüft. Arsentrioxid und Curcumin wurden in ähnlichen Studien, wie der vorliegenden geprüft. Die Ergebnisse hierzu stehen noch aus.

Allerdings ist die Charakterisierung der LSC immer noch Ausgangspunkt vieler Diskussionen. Aus diesem Grund müssen die genannten Forschungsarbeiten unterschieden werden in diejenigen, die LSCs über Oberflächemarker, sogenannte CDs, charakterisieren und diejenigen, die andere Verfahren, wie zum Beispiel die Färbung mit Hoechst 33324 verwenden.

1.3 Wirkung und Wahl genexpressionregulierender Medikamente zur Behandlung der Akuten Myeloischen Leukämie

Das Ziel der vorliegenden Studie ist es, die Wirksamkeit von Valproat (VPA), 4-benzyl, 2-methyl, 1,2,4-thiadiazolidine, 3,5 dione (TDZD-8) und Temsirolimus auf die Entwicklung einer AML zu testen. Im Fokus liegt dabei die Blockade der leukämischen Entwicklung an ihrem Ursprung, den putativen leukämischen Stammzellen.

Des Weiteren muss beachtet werden, dass diese Medikamente keinen erheblichen negativen Effekt auf die Entwicklung von physiologischen Zellen haben.

Die Medikamente, die sich als vielversprechend herausstellen, werden im Weiteren in NOD/SCID Mäusen getestet.

1.3.1 Histondeacetylaseinhibitor Valproat

Valproat ist eine kurzkettige Fettsäure, die als Histondeacetylaseinhibitor (HDACI) wirkt. Die Regulation der Histonacetylierung und Deacetylierung ist in vielen Neoplasien aufgehoben. Vor allem in humanen Leukämien steht die Veränderung der Histonacetylierung im Verdacht, Teil der Krankheitsentstehung zu sein. Die Möglichkeit mit Hilfe der HDACIs diesen aufgehobenen Mechanismus wieder herzustellen, zeigt einen neuen Weg zur Behandlung der AML auf (Barbetti et al., 2013).

Histonacetylierung (HDAC) ist ein reversibler Mechanismus der Transkriptionsregulation. Histonacetyltransferasen und Histondeacetylase sind die beiden Gegenspieler des Chromatinremodellings. Chromatinremodelling ist die dynamische Veränderung der Chromatinstruktur um Zugang zur kondensierten DNA und somit zu regulatorischen Proteinen zu bekommen und dadurch die Genexpression zu modifizieren. Ersteres fügt

eine Acetylgruppe an die Lysinenden der Histone an, zweiteres löst die Acetylgruppen wieder ab. Generell lässt sich sagen, dass die Acetylierung der Histone eine relaxierte Form des Chromatins begünstigt, wodurch die Transkription erleichtert wird. Histondeacetylasen können somit also Transkription unterbinden, während HDACIs diese eher fördern.

Valproat wird in der Klinik heute als erste Wahl bei generalisierten epileptischen Anfällen verschrieben. Dort wirkt es durch Blockade von Na⁺ Kanälen und durch Verstärkung GABAerger Wirkung antiepileptisch und antikonvulsiv. Unter dem Namen Ergenyl werden 150mg bis 500mg verabreicht, um einen therapeutischen Serumspiegel von 50-100 µg/ml zu erreichen.

Interessant als Wirkstoff wird Valproat auch, weil es durch die Förderung bestimmter Transkriptionsmechanismen (beispielsweise p21) zu Zellwachstumsstop, Zelltod und Hemmung der Angiogenese führen kann, wobei normale Zellen relativ resistent gegenüber dem HDACI induziertem Zelltod sind (Burgess et al, 2004). Die Signalwege, die durch HDACIs induziert werden und zum Zelltod führen, laufen über intrinsisch wie extrinsisch verursachte Apoptose, mitotische Katastrophe, autophagischen Zelltod und ROS induzierter Zelluntergang (Xu et al., 2007).

1.3.2 Glykogensynthase-Kinase 3 β Inhibitor TDZD-8

TDZD-8 ist ein Inhibitor der Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK3 β). Galectin3, ein β -galactosid bindendes Lectin, wird in vielen Neoplasien überexprimiert und ist Teil der Tumorgenese durch Regulation der Differenzierung, des Zellzyklus und der Apoptose. Zytoplasmatisches Galectin3 ist antiapoptotisch, während nukleäres Galectin3 proapoptotisch ist. Leukämische Zellen nutzen den GSK3 β /galectin3 Mechanismus um dem apoptotischen Stimuli zu entkommen (Cheng et al., 2011). Diese Tatsache macht TDZD-8 interessant als Substanz für die Behandlung einer AML.

Nachgewiesene Effekte erzielt TDZD-8 bereits bei der Anwendung gegen Zerebrale Ischämien, wobei eine deutliche Verringerung der Marker für oxidativen Stress, Apoptose und Entzündungsantwort festgestellt wurde (Collino et al., 2008).

TDZD-8 wirkt sowohl auf den Proteinkinase C (PKC), als auch auf den Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) Signalweg und führt zu einem zügigen Verlust der Membranintegrität der Zellen und einem Abbau der freien Thiolgruppen. Zusammengenommen führen diese Effekte, bei ausreichender Dosierung, zu einem schnellen Zelltod vor allem für

primitive Zellen, in-vitro koloniebildende Zellen und LSCs (nachgewiesen durch Xenotransplantation) (Guzman et al., 2007). Vor allem die beschriebene Wirkung auf die LSCs macht TDZD-8 zu einem vielversprechenden Medikament bei der Untersuchung der Hoechst Side Population.

1.3.3 mTor Inhibitor Temsirolimus

Temsirolimus ist ein Derivat des mammalian target of rapamycin (mTOR) Inhibitors Rapamycin, welcher aus *Streptococcus hygroscopicus* gewonnen wurde. CCI-779, wie Temsirolimus auch genannt wird, wurde 2007 in den USA zur Behandlung von fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom zugelassen.

Die mTOR Serin/threoninekinase ist an der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und der Angiogenese beteiligt. Der PI3k/AKT Signalweg führt zu einer Aktivierung der beiden Subspezies mTORC1 und mTORC2. Während mTORC2 für den Aufbau des Zytoskeletts eine Rolle spielt, setzt mTORC1 bei Aktivierung Translationsfaktoren und ribosomale Untereinheiten frei (Martelli et al., 2010). Dieser Signalweg ist in einigen hämatologischen Neoplasien abnormal aktiviert, so auch in der Mehrzahl der Zellen der AML (Ryningen et al., 2012). Aktiviert wird dieser Signalweg durch Mutationen, beispielsweise von c-Kit, FLT3 und Ras, Überexpression von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K) Untereinheiten (P110beta) und auto-/parakriner Sekretion von Vascular endothelial growth factor (VEGF) und Insulin-like growth factor 1 (IGF-1), wie sie sich in der AML häufig finden. Des Weiteren spielt die Interaktion mit dem Knochenmark eine große Rolle. Durch die Sekretion von Fibronectin und CXCL durch die Knochenmarksstromazelle wird mTOR in den AML Zellen hochreguliert. All diese genannten Mechanismen haben dieselbe Auswirkung auf das Verhalten der AML Zellen: verminderte Apoptose- und Autophagozytoseeigung, erhöhter Metabolismus und Proliferation.

Es wurde gezeigt, dass Rapamycin, ein mTOR Inhibitor der ersten Generation, zwar nur einen geringen Effekt auf das Überleben der AML Zellen in einer Kurzzeitkultur hat, jedoch deutlich die koloniebildenden Anteile der AML hemmt. Es konnte sichtbar gemacht werden, dass Rapamycin zu einer deutlichen Wachstumshemmung bei KG-1a Zellen führt, indem die Zellen in der G0/G1 Phase des Zellzyklus arretierten (Recher et al., 2005b). Diese Beobachtung macht Temsirolimus wiederum interessant für die Betrachtung der Hoechst Side Population.

1.3.4 Fragestellung

Die Fragestellung dieser Arbeit ist die mögliche Reduktion von leukämischen Stammzellen durch die genannten Medikamente. Mit Hilfe der Hoechst 33342 Färbung sollen die leukämischen Stammzellen identifiziert und ihre Entwicklung während des Experiments dokumentiert werden.

2 Material und Methoden

2.1.1 Geräte und Verbrauchsliste

Folgende Geräte und Verbrauchsgegenstände wurden verwendet:

Tabelle 2.1: Geräte und Verbrauchsmaterial

Gerät	Hersteller
Sterile Werkbank <i>Hera safe</i>	Heraeus
Beheizbares Wasserbad	Memmert
Zentrifuge <i>Rotixa 50 RS</i>	Hettich
Blutanalysegerät <i>Cellcounter Advia 120</i>	Bayer
Durchflusszytometer <i>FACS Aria</i>	BD Bioscience
Kühlschrank (+4°C)	Liebherr
Gefrierschrank (-80°C) <i>Freezer</i>	Forma Scientific
Feinwaage	Sartorius
Vortexer <i>Reox Top</i>	Heidolph
Pipettiergerät <i>Pipettboy Plus</i>	Integra Bioscience
Pipettiergerät <i>Pipettboy</i>	Tec No Vara
Verstellbare Pipetten <i>Pipetman</i> 10,20,200,1000µl	Gilson
Pipettenspitzen	Greiner
FACS-Röhrchen 5ml, Rundboden	Becton Dickinson
Safe-Lock-Tubes 0,5ml	Eppendorf
Kryoröhrchen 1,5ml	Corning incorporated
Falcon 15, 50ml	Greiner
Sterile Facsröhrchen	Astromedtec
Sterile Pinzette	Hartmann
Kulturflaschen	Cell Star
6-Well Platten	FALCON

2.1.2 Allgemeine Chemikalien

Tabelle 2.2: Allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka
Dulbecco's Phosphat buffered saline (PBS)	PAA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), high glucose (4,5g/l)	PAA
RPMI 1640	Biochrom
HEPES	Gibco-life technologies
Fetal Bovine(Calve) Serum (FCS)	Biochrom
L-Glutamin	Biochrom
Pen/Strep	Biochrom
FACS Flow Puffer	Becton Dickinson

2.1.3 Stammlösungen

Tabelle 2.3: Stammlösungen

Lösung	Hersteller
Kulturmedium	RPMI 1640 10%FCS (Böhm 2009) Pen/Strep L-Glutamin 2mM
Einfrierlösung	90% FCS 10%DMSO
DMEM-Medium	+10%FCS +2% HEPES +Pen/Strep +L-Glutamin 2mM

2.1.4 Verwendete Reagenzien

Tabelle 2.4: Verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Hoechst 33342	Sigma
Verapamil	Sigma
Propidium Iodid (PI)	Fluka
Valproat sodium acid	Sigma
TDZ-D8	Sigma
Temsirolimus	Sigma

2.1.5 EDV

Tabelle 2.5: EDV

Software	Hersteller
FACS DIVA Software Version 6.1.2	Becton Dickinson
Microsoft Excel	Microsoft
SPSS	IBM

2.1.6 Wahl der Zelllinie und Vorbereitung der Proben

Zelllinie KG-1a

Diese AML Zelllinie ist ein Derivat der schon seit Langem verwendeten KG-1 Zelllinie. Ausgewählt wurde sie, da sie im Gegensatz zur KG-1 Zelllinie eine deutlichere Sidepopulation in der Hoechst Färbung aufweist (Mattes, 2013). KG-1 wurde aus Knochenmark eines 59 Jahre alten Kaukasiers gewonnen, immortalisiert und passagiert. Des Weiteren hat die Zelllinie den Phänotyp CD3⁻, CD13⁺, CD14⁻, CD15⁺, CD19⁻, CD33⁺, CD34⁺, mit einer optimalen Wachstumsdichte bei $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ und einer maximalen Dichte bei $2,5 \times 10^6/\text{ml}$. Optimale Wachstumsbedingungen herrschen bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5%, was zu einer Verdopplungszeit von 50 Stunden führt. Die Zelllinie wurde für die Versuche in RPMI 1640 mit 10% FCS, 5ml Glutamin (2mM) und Pen/Strep kultiviert, wobei alle nach 24 und 48 Stunden ein Mediumaustausch vorgenommen wurde. Dabei wurden die Zellen im Sinne der Kultivierung auf die Wachstumsdichte von $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ verdünnt.

Kryokonservierung

Kryokonservierung beschreibt den Prozess des Einfrierens von Zellen zum einen für weitere Versuche, zum anderen als Backup von Zelllinien und Leukämien (Schmitz, 2011).

Es ist ratsam, regelmäßig Aliquots der Zelllinien einzufrieren, um bei etwaigen Kontaminationen oder zur Versuchswiederholung auf die Ausgangszelllinie zurückgreifen zu können, denn auch immortalisierte Zelllinien durchlaufen durch Bildung von Subpopulationen Passagen. Diese Passagen können über längere Zeit zu einer Veränderung der Eigenschaften der Zelllinie führen. Um diesen Effekt möglichst klein zu halten wird nach folgendem Protokoll Kryokonservierung durchgeführt:

1. Bestimmung der Zellzahl im Häemocytometer oder am ABX-Counter
2. Überführen von $60-90 \times 10^6$ Zellen in 50ml Falcons
3. Zentrifugieren der Zellen für 15 Minuten und Abpipettieren des Überstandes
4. Zugeben von 6ml Einfriermedium : 90% FCS und 10% DMSO
5. Bei mehreren Falcons: Zusammenführen der beiden Suspensionen und gutes Durchmischen.
6. Überführen von 1ml in je ein Kryoröhrchen, es werden 6 Aliquots à 1ml angestrebt Verschließen und beschriftet in Mr.Frosty stellen
7. Kryoröhrchen nach Einfrieren in -80°C zügig in Stickstofftank umlagern

Auftauen von Zellen

Um die oben beschriebenen eingefrorenen Zellen aufzutauen, folgt man untenstehendem Protokoll. Auftauen früherer Chargen ermöglicht annähernd gleiche Versuchsbedingungen bei allen Versuchen und lässt einen bei Kontamination der Zelllinien wieder an den „Ursprungspunkt“ zurückkehren (Schmitz, 2011).

Es ist zu beachten, dass das im Einfriermedium vorhandene DMSO bei Raumtemperatur zytotoxisch wirkt. Daher ist ein rasches Auftau- bzw. Verdünungsverfahren wichtig. Dennoch darf nicht zu schnell aufgetaut werden, denn durch die Konzentrationsänderung des Mediums werden die aufzutauenden Zellen einem osmotische Druck ausgesetzt, der, wenn er zu schnell zu hoch ansteige, die Zellen zum Zerplatzen brächte.

1. Kryoröhrchen in 37°C warmes Wasserbad halten, bis der Inhalt beinahe komplett geschmolzen ist

2. Überführen der Suspension in 10ml Falcon und mit, auf 37°C vorgewärmten Medium (RPMI) tröpfchenweise auf 10ml auffüllen. Gut mischen
3. Zentrifugieren der Probe für 5 Minuten bei 400g
4. Abgießen des Überstandes und Resuspendieren der Zellen mit ca.5ml Medium
5. Zellzahlbestimmung im Hämocytometer- hier Neubauer Zählkammer- mit Trypanblau (s.1.2.233.3.3.)
6. Anlegen einer Suspensionskultur mit einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml

Zellzahlbestimmung im Hämocytometer – hier Neubauer Zählkammer- mit Trypanblau

Um Versuche zuverlässig zu starten ist es von Nöten die Zahl der lebenden und toten Zellen einer Lösung zu kennen. Zellzahlbestimmung über die Neubauer Zählkammer ist ein etabliertes Verfahren zur Differenzierung von lebend/tot. Der Farbstoff Trypanblau gelangt nur bei perforierter Membran in die Zellen, folglich nur in tote Zellen ohne intakte Membran. Durch die Anreicherung erscheinen diese Zellen leuchtend blau im Mikroskop. Zu beachten ist allerdings, dass Trypanblau bei längerer Inkubation zytotoxisch wirkt. Daher ist die Zählung zügig durchzuführen.

Folgendes Protokoll wurde verwendet:

1. Mischen eines Aliquots der zu bestimmenden Lösung mit 10 µl mit 10 µl Trypanblau (0,2%). Lösung 2 Minuten inkubieren lassen
2. Desinfizieren der Zählkammer. Deckglas mit etwas Druck über die Zählkammer schieben, bis Newtonsche Ringe erscheinen
3. Zellsuspension unter das Deckglas pipettieren und kurz sedimentieren lassen
4. Auszählung der 4 Eckquadrate unter dem Mikroskop mit 10x Objektiv.
5. Berechnung der Zellzahl: $Dichte \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Zellen in 4 Quadraten} \times \text{Verdünnung} \times 10^4}{4}$

2.1.7 Analyse der Stammzellpopulation und der Zellzyklusentwicklung mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es Zellen oder kleine Partikel auf ihre spezifischen Eigenschaften zu überprüfen. Zellgröße, Granularität und der Charakter der gebundenen Antikörper lassen sich mit diesem Verfahren darstellen. Das Prinzip beruht auf der Möglichkeit Partikel zum Fluoreszieren zu bringen und die emittierte Energie in ihrer Menge und Wellenlänge zu detektieren (Tung et al., 2007).

Hoechst-Färbung

2.1.7.1.1 Prinzip der Hoechstfärbung

Hoechst 33342 ist ein Farbstoff, der an die kleinen Furchen der DNA, genauer an AT reiche Regionen in dieser, bindet. Durch diese Bindung verlagert sich das Emissionsspektrum des Farbstoffs von violett nach rot, je nach Affinität, Bindungsenergie und Bindungsstellen (Bertoncello and Williams, 2004). So wird Hoechst 33342 mit einer Wellenlänge von 450nm (Hoechst Blue) und 675nm (Hoechst Red) im Durchflusszytometer detektiert. Im zweidimensionalen Diagramm Hoechst Blue gegen Hoechst Red zeigt sich ein charakteristisches Bild (vgl. Abbildung 5). Zellen, die sich in der G₀/G₁ Phase des Zellzyklus befinden, besitzen einen geringeren DNA Gehalt (2n 1C) als diejenigen die sich kurz vor (G₂) oder in der Mitose (M) befinden und einen doppelten Chromosomensatz (2n 2C) besitzen. Die Intensität der Fluoreszenz des Farbstoffs verhält sich proportional zur Menge des gebundenen Farbstoffs. So stellt sich die G₀/G₁ Population schwächer positiv, in beiden Achsen, im Vergleich zur G₂/M Population dar.

Des Weiteren fällt die sogenannte Sidepopulation (SP) auf. Ein Schweif an Zellen, der sich sowohl aus der G₀/G₁ Population, wie auch aus der G₂/M ergibt. Diese Sidepopulation entsteht durch den gerichteten, aktiven Efflux von Hoechst 33342 aus bestimmten Zellen. Die Transporter, die diesen Efflux bewirken gehören zu der Klasse der ATP-binding cassette transporter (ABC) Subfamilie, die auch die MDR1 und BCRP beinhaltet (Challen and Little, 2006). Diejenigen Zellen, die diesen Transporter überexprimieren, zeigen somit einen verminderten Gehalt an intranukleärem Farbstoff.

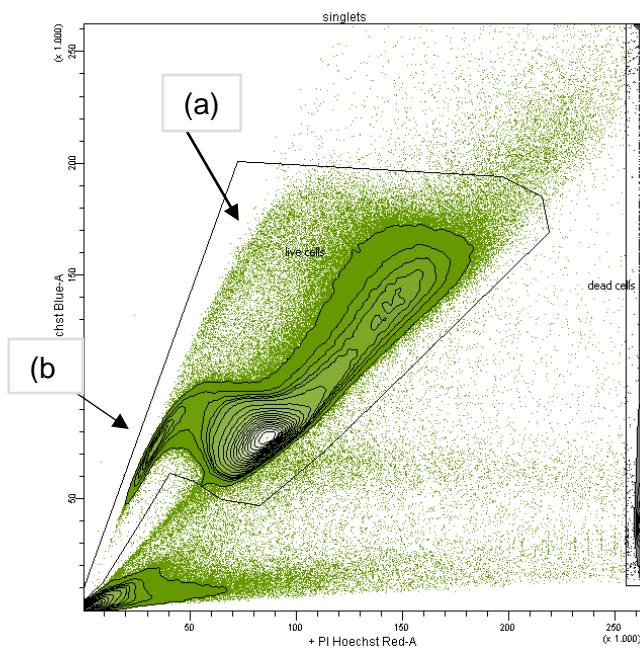


Abbildung 5: Charakteristisches Bild der SP

Nach Färbung der Zellen mit Hoechst und FACS Analyse. Darstellung in Hoechst Blue gegen Hoechst Red; (a) SP 4n; (b) SP 2n. Es zeigen sich die charakteristischen Schweife, die aus der Hauptpopulation herausragen

Man geht davon aus, dass hämatopoietische Stammzellen genau diese Expressionsmuster an Transportern zeigen und somit durch die SP charakterisiert werden. Das Ausmaß der Effluxkapazität scheint dabei mit dem Reifungsstadium der Zellen zusammenzuhängen. Das heißt, Zellen mit der höchsten Effluxkapazität sind am primitivsten (Challen and Little, 2006).

2.1.7.1.2 Kontrollfärbung mit Verapamil

Die Aktivität der beschriebenen ABC Transporter lässt sich mit Verapamil inhibieren. Verapamil wird in der klinischen Anwendung als Antiarrhythmikum der Klasse IV (Calciumantagonisten) in der Kardiologie verwendet. Wenn es der Inkubation zugesetzt wird, verschwindet die SP (vgl. Abbildung 6). Dieses Verfahren bildet die Negativkontrolle der Färbung und die Grundlage der Bewertung der SP (Challen and Little, 2006).

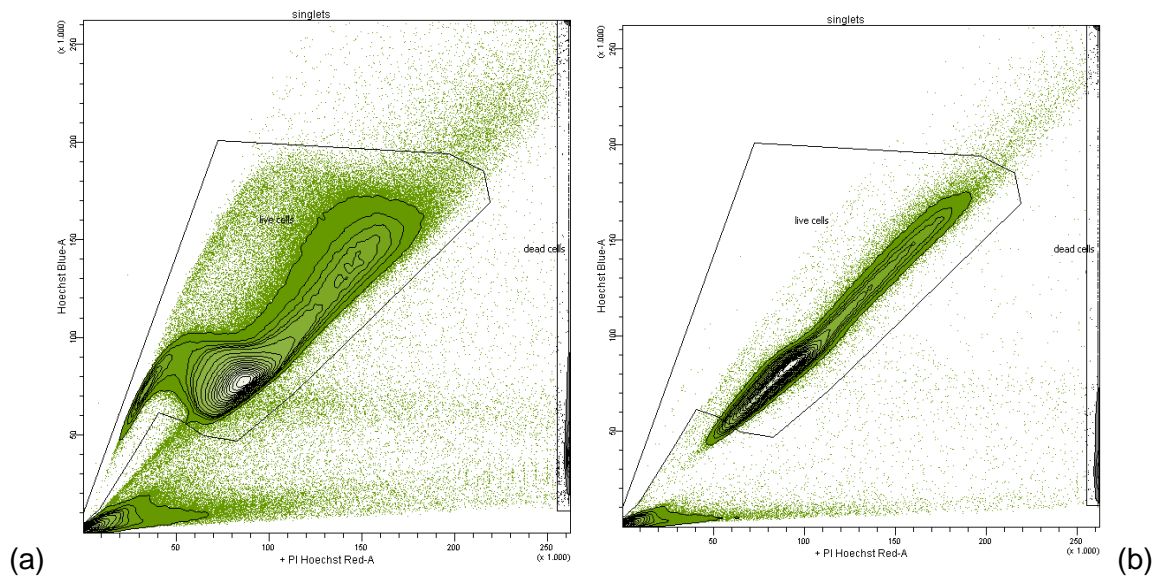


Abbildung 6: Beispiel der Inhibierung mit Verapamil

(a) normale Hoechstfärbung mit distinkten SPs; (b) Inhibierung der ABC-Transporter mit Verapamil, dadurch verschwindet das Bild der SP. Übrig bleiben die beiden Hauptpopulationen

2.1.7.1.3 Hoechst- und Verapamilherstellung

Hoechst 33342 wird in Form von Pulver von der Firma Sigma bezogen. Um den Farbstoff verabreichen zu können, wird er in steril filtriertem Wasser gelöst bei einer Menge von 42,5mg zu 42,5ml Wasser, um eine Konzentration von 1mg/ml zu erreichen. Diese Lösung wurde à 500µl aliquotiert und bei -20°C gelagert. Um bei der Färbung, wie bei Godell et al. beschrieben, eine Konzentration von 5µg/ml zu erreichen, wird der Farbstoff dabei um 1:200 verdünnt.

Für die Verapamilstocklösung wurden 4,9mg Verapamil in 1ml absolutem Alkohol gelöst, à 100µl aliquotiert und bei -20°C gelagert. Um wiederum, wie von Godell et al. festgelegt, eine Konzentration von 50µM während der Färbung zu erreichen, wird Verapamil 1:200 verdünnt angewendet.

Um die Veränderungen in der Stammzellfraktion der Zelllinie beobachten zu können, bedienen wir uns der Hoechst-Färbung mit der dadurch charakterisierten SP. Um den Efflux des Farbstoffes aus den Stammzellen differenziert darstellen zu können, wird eine Negativprobe mit Verapamil gefärbt.

2.1.7.1.4 Protokoll der Hoechstfärbung

In Anlehnung an Goodell et al. wurde die Färbung mit Hoechst 33342 wie folgt durchgeführt:

1. Bestimmung der Zellzahl der Zelllinie
2. Ernten von ca. 5-6 Millionen Zellen und Zentrifugation dieser für 5-10 Minuten mit 400g, daraufhin Überstand abgießen
3. Resuspendieren der Zellen in auf 37°C vorgewärmtem DMEM (+ 2 mM Glutamin, + 20 mM HEPES, + Pen/Strep, +10 %FCS)
4. Erneute Bestimmung der Zellzahl und Überführung von $1,5 \times 10^6$ Zellen in einer Konzentration von $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml in FACS Röhren. Um die gewünschte Konzentration zu erlangen auffüllen der Probe mit DMEM
5. Zugabe von Hoechst-Farbstoff (200x konzentrierte Stammlösung). In einer Konzentration von (Volumen der Suspension/ 200) μ l. Zellen gut mischen
6. Entnahme von $0,5 \times 10^6$ Zellen der Suspension, Überführung in ein neues FACS-Röhren und Zugabe von Verapamil in einer Konzentration von (Volumen der Suspension/ 200) μ l. Zellen gut mischen
7. Inkubieren der FACS-Röhren in einem 37°C Wasserbad für genau 120 Minuten, dabei alle 20 Minuten mischen
8. Beenden der Hoechst-Inkubation durch zweiminütige Lagerung der FACS-Röhren auf Eis
9. Zentrifugieren der Zellen für 5 Minuten mit 400g bei 2°C, daraufhin Überstand abgießen
10. Resuspendieren der Zellen in 2ml DMEM und Zentrifugation für 4 Minuten mit 400g, daraufhin Überstand abgießen. Diesen Schritt zwei Mal wiederholen
11. Zugabe von 1 μ l PI zur lebend/tot-Färbung auf des Zellpellet
12. Messung am Durchfluss-Cytometer

Lebend/tot-Differenzierung

Sowohl die Kryokonservierung, das Auftauen, als auch der Hoechst Farbstoff selber unterziehen die Zellen einem gewissen Stress, so dass die Vitalität einiger Zellen eingeschränkt wird. Gehen diese Zellen zu Grunde, so verlieren sie die Integrität ihrer Zellmembran. Dadurch kann Hoechst ungehindert sowohl in die Zellen eindringen, als auch wieder herausfließen, was zu einem SP ähnlichen Ergebnis in der Durchflusszytometrie führen kann. Des Weiteren werden auch DNA Bruchstücke von Hoechst angefärbt und werden in einer Diagonale auf Höhe der early SP detektiert, was zu erheblichen Störungen in der Auswertung führt.

Aus diesem Grund werden die Zellen eine bis fünf Minuten vor Messung am Durchflusszytometer mit 1µl Propidium Jodid (PI) gefärbt. PI ist 200fach verdünnt in PBS gelöst und wird bei 4°C aufbewahrt.

Propidium Jodid ist ein weitverbreiteter lebend/tot-Marker. Das fluoreszierende Molekül ist ein DNA-Interkalator, der ausschließlich durch defekte Membranen in das Zellinnere gelangen kann und so zwischen lebenden und toten Zellen unterscheidet. Durch die Bindung an DNA erhöht sich die Fluoreszenz um das 20fache und Absorptionsmaximum sowie Emissionsmaximum werden angehoben: das Absorptionsmaximum von 488nm auf 535nm und das Emissionsmaximum von 590nm auf 617nm. Durch das breite Emissionsspektrum ergibt sich das Problem, dass PI in Kanäle anderer Farbstoffe einstrahlen kann, was durch exakte Kompensierung ausgeglichen werden kann.

Beurteilung der Apoptoseleistung

Der programmierte Zelltod (Apoptose) lässt sich in mehrere Stadien unterteilen, nach denen er verläuft. Eines der ersten Kennzeichen ist die Umlagerung von Phosphatidylserin von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite. (Robles-Escajeda et al., 2013). Diese anionische Phospholipid kommt in der intakten Zelle nur auf der Innenseite der Membran vor. Daraus ergibt sich, dass wenn Phosphatidylserin an der Oberfläche einer Zelle detektiert werden kann, sich diese Zelle in einem Apoptosevorgang befindet. Dieses Detektieren gelingt mit dem humanen Protein Annexin, welches eine hohe Affinität zu membrangebundenem Phosphatidylserin besitzt. (Blankenberg et al., 1999).

Verwendet wurde an APC gekoppeltes Annexin, welches sich mit 650nm im Durchflusszytometer anregen lässt.

Die Färbung der KG-1a Zellen wurde nach durchlaufener Hoechst-Färbung mit zwei Waschgängen mit 1µl Annexin-APC durchgeführt. Daraufhin wurden die Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert, danach wurde PI, wie im Standardprotokoll, dazugegeben und die Zellen ohne einen weiteren Waschgang am LSR gemessen.

Konfiguration des verwendeten Gerätes

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es Zellen, oder kleine Partikel auf ihre spezifischen Eigenschaften zu überprüfen. Zellgröße, Granularität und der Charakter der gebundenen Antikörper lassen sich mit diesem Verfahren darstellen. Das Prinzip beruht auf der Möglichkeit, Partikel zum Fluoreszieren zu bringen und die emittierte Energie in ihrer Menge und ihrer Wellenlänge zu detektieren (Tung et al., 2007). Das verwendete FACS

Gerät der Firma BD Bioscience verfügt über drei serielle Laser, sowie einem UV-Laser. Im Folgenden wird das Schema der Laser mit ihren Filtern, Spiegeln und Detektoren wiedergegeben.

Tabelle 2.6: Laserkonfiguration

Laser	Wellenlänge
Violett	405nm
Blau	488nm
Rot	633nm
UV	355nm

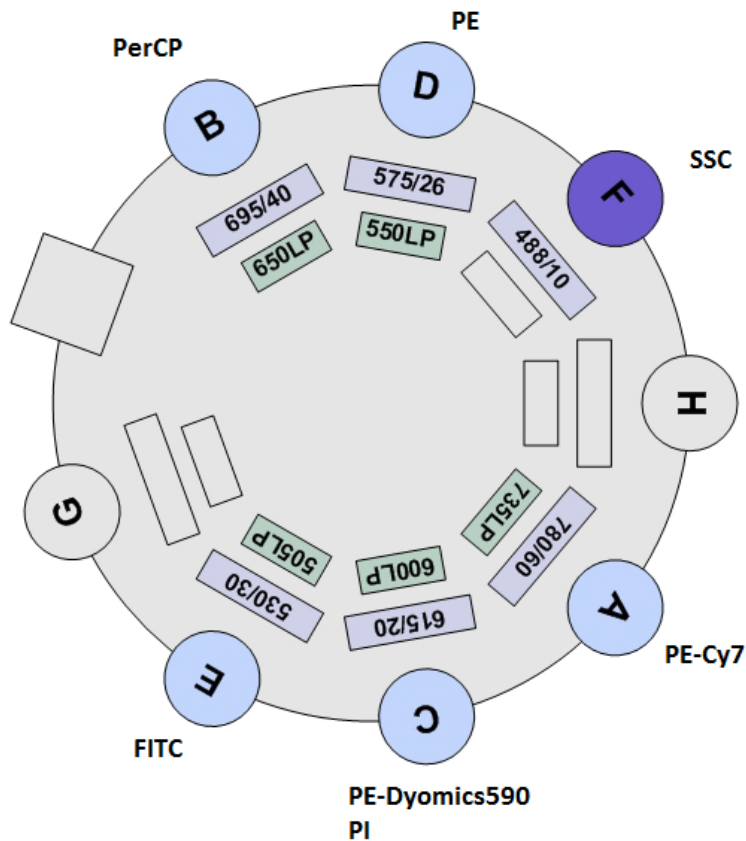


Abbildung 7: Konfiguration des blauen Lasers (488nm),

Nach Passage des gestreuten Lichts durch das Filtersystem (innere Rechtecke) erfassen Detektoren (in der Reihenfolge A-H) die Intensitäten für verschiedene Emissionswellenlängen (äußere Rechtecke). LP: Langpassfilter. Quelle: FACSDiva Software

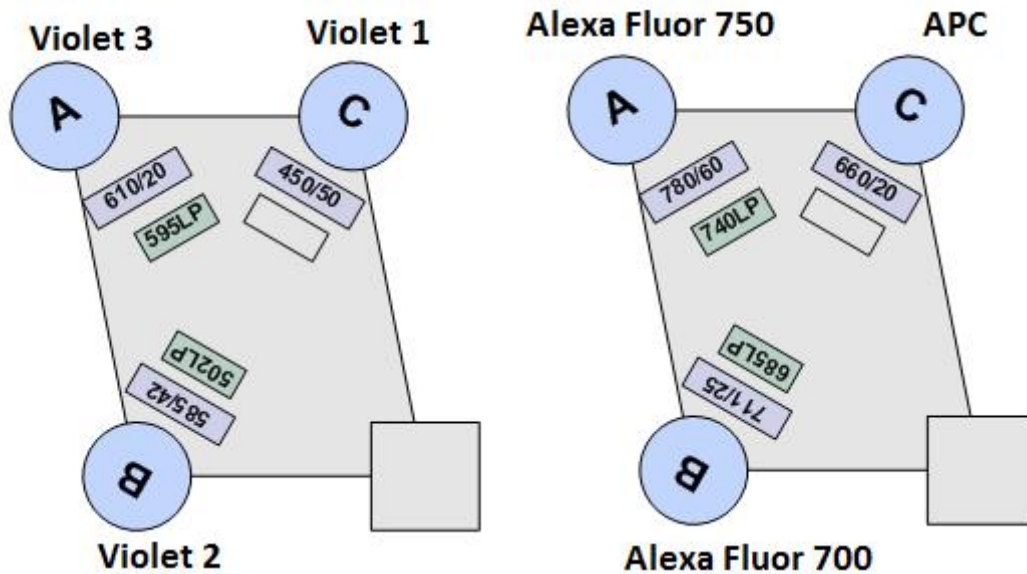


Abbildung 8: Konfiguration des violetten Lasers (405nm) und des roten Lasers (633nm)

Nach Passage des gestreuten Lichts durch das Filtersystem (innere Rechtecke) erfassen Detektoren (in der Reihenfolge A-C) die Intensitäten für verschiedene Emissionswellenlängen (äußere Rechtecke). LP:Langpassfilter. Quelle: FACS Diva Software

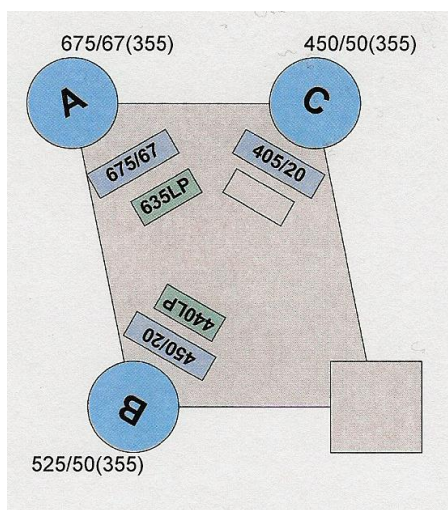


Abbildung 9: Konfiguration UV-Laser (355nm).

Nach Passage des gestreuten Lichts durch das Filtersystem (innere Rechtecke) erfassen Detektoren (in der Reihenfolge A-C) die Intensitäten für verschiedene Emissionswellenlängen (äußere Rechtecke).LP:Langpassfilter. Quelle: FACSDiva Software

Kalibrierung des LSR II-Durchflusszytometer

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, sowie zur Kontrolle der Laserjustierung sollte eine regelmäßige Kalibrierung des Gerätes erfolgen. Dies wird mit Hilfe sogenannter Cytometer Setup Tracking Beats (CST-Beats) durchgeführt. Diese

werden genauso wie Zellproben durch das Gerät geleitet, detektiert und zusammen mit einer Kalibrierungssoftware innerhalb der FACSDiva Software ausgewertet und die Cytometereinstellungen dementsprechend angepasst.

Gating

Das verwendete FACS Gerät hat die Möglichkeit, neben forward scatter (FSC) und side scatter (SSC), bis zu 14 Parameter gleichzeitig zu messen. Im Rahmen der vorliegenden Versuche wurden höchstens 4 Parameter gleichzeitig aufgezeichnet. Verschiedene Gatingstrategien werden in Current Protocols in Cytometrie dargestellt.

Gatingstrategie im Rahmen der Hoechst-Färbung

Um die Auswertung aller Versuche möglichst gleich zu halten, wurde zu Beginn ein Arbeitsblatt erstellt, anhand dessen die Auswertung standardisiert abläuft, angelehnt an Bertoncillo and Williams (2004). Die Auswertungen erfolgten nach Ende der Messung mit dem Programm FACSDiva.

Population	#Events	%Parent	%Total
all events	1.205.538	####	100,0
unstable acquisition 1	0	0,0	0,0
NOT(unstable acquisition 1)	1.205.538	100,0	100,0
unstable acquisition 2	0	0,0	0,0
NOT(unstable acquisition 2)	1.205.538	100,0	100,0
time window	1.205.538	100,0	100,0
singlets	999.284	82,9	82,9
live cells	873.803	87,4	72,5
vital cells	871.424	99,7	72,3
G0 / G1	581.848	66,8	48,3
side population 2n	23.827	4,1	2,0
early SP 2n	10	0,0	0,0
intermediate SP 2n	90	0,4	0,0
late SP 2n	23.727	99,6	2,0
NOT(G0 / G1-1)	289.576	33,2	24,0
G2/M	90.273	31,2	7,5
side population 4n	4.039	4,5	0,3
early SP 4n	0	0,0	0,0
intermediate SP 4n	96	2,4	0,0
late SP 4n	3.943	97,6	0,3
dead cells	23.344	2,3	1,9

Abbildung 10: Gate-Hierarchie

Darstellung der endgültigen Rangfolge zur Auswertung; angezeigt werden sowohl die absoluten Zahlen der einzelnen Gates, wie auch die Prozentangaben bezogen auf das vorherige Gate bzw. auf „all events“

Um die SP möglichst genau differenzieren zu können, wurde ein komplexes Gatingschema erstellt (vgl. Abbildung 10). Zu Beginn steht die Eingrenzung derjenigen Zellen, welche in konstantem Fluss auf der „time“-Achse gemessen wurden, das heißt,

alle etwaigen Unterbrechungen der Messung werden durch ein „unstable“ Gate aus der Auswertung genommen. Die Zellen, die dadurch ausgewählt wurden, werden nun in einem Diagramm SSC-A (Fläche) gegen SSC-H (Höhe) aufgetragen um, ähnlich wie oben beschrieben, die Singlets von den Doubletten zu trennen. Lebende, intakte Zellen stellen sich entlang des unteren Drittels der Ursprungsgeraden dar, denn die Höhe einer intakten Zelle korreliert mit deren Fläche. Diese Singlets werden daraufhin in einem Diagramm PI gegen Hoechst Red aufgetragen, um möglichst nur vitale Zellen für die Auswertung herauszufiltern.

Die selektierten Zellen werden dann in ein Diagramm Hoechst Blue-A gegen Hoechst Red-A aufgetragen. Es ergibt sich ein charakteristisches Bild der Populationen in G₀/G₁ Phase bzw. in G₂/M Phase der Zellteilung mit ihrer jeweiligen SP. Zellen, die sich in der G₀/G₁ Phase des Zellzyklus befinden, besitzen einen geringeren DNA Gehalt ($2n \ 1C$) als diejenigen, die sich kurz vor (G₂) oder in der Mitose (M) befinden und einen doppelten Chromosomensatz ($2n \ 2C$) besitzen. Da Hoechst 33342 sich, wie in 5. (S.23) beschrieben, an DNA anlagert und sich die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Menge des gebundenen Farbstoffs verhält, stellt sich die G₀/G₁ Population schwächer positiv, in beiden Achsen, im Vergleich zur G₂/M Population dar. Die daraus hervorgehenden Zellen werden zum wiederholten Male in einem Diagramm mit Hoechst Blue gegen Hoechst Red aufgetragen um nun sowohl G₀/G₁, als auch G₂/M noch sauberer zu trennen. Daraufhin wird ein genauere Fokus auf die einzelnen Populationen gelegt und mit einem Gate diejenigen Zellen umrahmt, welche zur SP gehören (vgl. Abbildung 11). Die gemessenen $4n$ und $2n$ SP Zellen werden nun anhand der relativen Intensität ihrer Strahlung in Hoechst Red in drei Abschnitte unterteilt. Zellen, deren Charakterisierung nicht eindeutig der SP zuzuordnen ist, da sie sich an der Übergangszone zwischen Hauptpopulation und SP befinden, können so in der Auswertung separat berücksichtigt werden. Die Unterteilung erfolgt zwischen dem Median und der minimalen Intensität einer Messung in drei gleichgroße Teile, je für $2n$ und $4n$ getrennt.

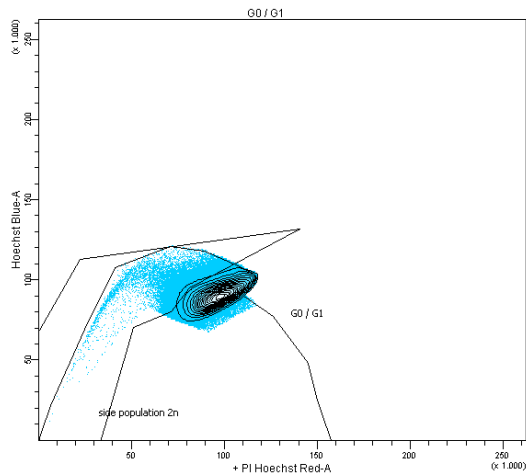


Abbildung 11: SP 2n

Lage des Gates der SP 2n der G0/G1-Population angelegt an die Hauptpopulation G0/G1. Es findet zu diesem Zeitpunkt noch keine Differenzierung in early/intermediate/late statt

Um sicherzugehen, dass die ausgewählten Zellen eine gute Vitalität besitzen und nicht tote Zellen, deren Fluoreszenz ähnlich der der SP sein kann, ausgewählt wurden, wird ein sogenanntes Backgating durchgeführt. Man lässt sich die gatedeten SP Zellen, 2n wie 4n, noch einmal separat im Scatterplot (SSC gegen FSC) darstellen. Liegen die Zellen als distinkte Population im vital Gate, so kann man von deren Vitalität ausgehen. Liegen sie allerdings am Rand, oder schmieren darüber hinaus, deutet das auf eine verminderte Vitalität hin.

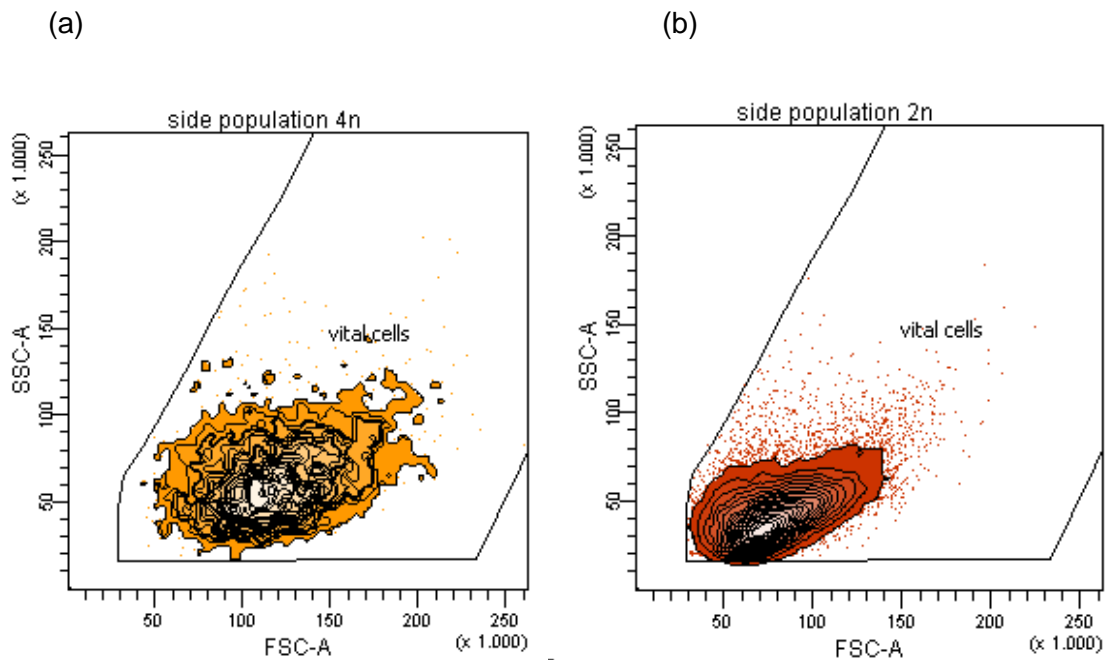


Abbildung 12: Backgating
Darstellung der SP 4n(a) und 2n (b) im Scatterplot innerhalb des vital Gates.

2.1.8 Vorbereitung der Medikamente und Behandlung der AML Zelllinie

Vorbereitung der Medikamente

Um die Behandlungsversuche durchführen zu können mussten die Medikamente, die hauptsächlich in Pulverform vorlagen, gelöst werden.

Nach den Empfehlungen von SIGMA wurde eine 1M Lösung Valproat mit PBS hergestellt. Diese wurde daraufhin bei -20°C gelagert.

TDZD-8 wurde in DMSO gelöst. Einmal mit einer Masse von 20mM und einmal mit 40mM um das Pipettierschema zu erleichtern. Lichtgeschützt wurde TDZD-8 bei 8°C aufbewahrt.

Temsirolimus wurde nach der Empfehlung von Sigma-Aldrich in DMSO gelöst und eine 10mM Lösung hergestellt. Das Medikament wurde lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert.

Behandlung

Ein Behandlungsversuch wurde in 4 Tage unterteilt: An Tag 0 gilt es, den Versuch anzusetzen und eine Hoechst-Färbung mit der Ausgangszelllinie zu machen, woraufhin nach 24-48-72 Stunden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und gefärbt werden, um den Verlauf der Behandlung in den drei Tagen verfolgen zu können. Für einen Behandlungsversuch werden zwischen $60\text{-}70 \times 10^6$ Zellen benötigt. Diese Zellen sollten am Vortag noch einmal auf $0,7 \times 10^6/\text{ml}$ verdünnt werden um eine optimale Viabilität zu gewährleisten.

- Tag 1 (d0):
 1. Zellzahlbestimmung am ABX-Counter
 2. Ernten von $7\text{-}8 \times 10^6$ Zellen und Ansetzen einer Hoechst-Färbung wie in 5, S.23, beschrieben
 3. Messung am LSR
 4. Ansetzen des Behandlungsversuches:

KG-1a: 8×10^6 Zellen werden für jeden Ansatz verwendet und mit RPMI 1640 auf 16 ml aufgefüllt. Daraus ergibt sich die für diese Zelllinie optimale Wachstumsdichte von $0,5 \times 10^6/\text{ml}$.

Die jeweiligen Ansätze, sechs an der Zahl, werden in 50ml Falcons durchgeführt. Diesen Falcons werden dann die entsprechenden Mengen an Medikament bzw. Kontrolle hinzugefügt. Nach ausführlichem Mischen werden drei 6-Well Platten mit je 5ml eines Ansatzes bestückt und bei

37°C und 5% CO₂-Gehalt bis zur Analyse in den Inkubator gestellt. An den folgenden drei Tagen wird je eine 6-Well Platte ausgewertet

- 24/48/72 Stunden (d1-3):
 1. Zellen der 6-Well Platte ernten
 2. Bestimmen der Zellzahl mit Hilfe des Hämocytometers (s.0). Genaue Zahl der lebenden/toten Zellen wird ausgewertet
 3. Abzentrifugieren der Zellen für 7 Minuten bei 400g und in 37°C warmem DMEM resuspendieren
 4. Zellzahlbestimmung am ABX-Counter
 5. Ansetzen einer Hoechst-Färbung wie in 5, S.23, beschrieben
 6. Messung am LSR

Variante für Temsirolimus

Da sich im Verlauf der Versuch herausstellte, dass die Halbwertszeit von Temsirolimus recht niedrig ist, wurde das Protokoll dahingehend erweitert, dass das Medium jeden Tag ausgetauscht wurde und somit jeden Tag frisches Medikament hinzugegeben wurde.

D1-D2:

1. Ernten von 5 ml Zellsuspension pro Ansatz und weiteres Verfahren wie in Behandlung beschrieben
2. Ernten der restlichen Zellen
3. Bestimmung der Zellzahl am ABX-Counter
4. Abzentrifugieren der Zellen für 15 Minuten bei 400g
5. Resuspendieren der Zellen mit Medium in geschätzter Menge (Schritt 3) auf eine Konzentration von $0,7 \times 10^6$ Zellen/ml
6. Erneute Bestimmung der Zellzahl am ABX-Counter und Anpassen der Konzentration
7. Zugabe der spezifischen Menge an Medikament

Valproat

Die Behandlungsversuche mit Valproat wurden bei einer Lösung von 1M mit folgenden Konzentrationen durchgeführt:

Tabelle 2.7: Behandlungsansatz Valproat

Konzentration	Menge Medikament	Menge PBS
Leerkontrolle	-	50µl
0,06mM	1µl	49µl
0,31mM	5µl	1µl
0,62mM	10µl	5µl
1,56mM	25µl	10µl
3,12mM	50µl	-
6,25mM	100µl	-

TDZD-8

Die Behandlungsversuche mit TDZD-8 wurden bei einer Lösung von 40mM mit folgenden Konzentrationen durchgeführt:

Tabelle 2.8: Behandlungsansatz TDZD-8

Konzentration	Menge Medikament	Menge DMSO
Leerkontrolle	-	3,75µl
0,5µM	0,1875µl	3,56µl
1µM	0,375µl	3,375µl
2µM	0,75µl	3µl
5µM	1,875µl	1,875µl
10µM	3,75µl	-

Temsirolimus

Die Behandlungsversuche mit Temsirolimus wurden bei einer Lösung von 10mM mit folgenden Konzentrationen durchgeführt:

Tabelle 2.9: Behandlungsansatz Temsirolimus

Konzentration	Menge Medikament	Menge DMSO
Leerkontrolle	-	10µl
0,3µM	0,5µl	9,5µl
0,6µM	1µl	9µl
1,5µM	2,5µl	7,5µl
3,12µM	5µl	5µl
6,25µM	10µl	-

2.1.9 Statistische Auswertung

Da es sich bei den folgenden Experimenten um erste Herangehensmöglichkeiten in der Behandlung von KG-1a Zellen mit Medikamenten handelt, wird nach Absprache mit dem statistischen Institut Tübingen rein deskriptive Statistik verwendet.

Wenn von einer Normalverteilung auszugehen war, wurde der Mittelwert, sowie die Standardabweichung (SD), in Anlehnung an Goodell et al., verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Die Wirkung von Valproat auf die AML generell und im Besonderen auf die LSC

3.1.1 Die Wirkung von Valproat auf die Proliferation von Zellen der Akuten Myeloischen Leukämie

Bei der Kultivierung der KG1-a Zellen mit Valproat über 72 Stunden wurde durch tägliche Zellzahlbestimmung die Wirkung des Medikaments auf die Zellteilung gemessen. Die Zellzahlen der beiden erfolgreich durchgeführten Versuche wurden gemittelt.

Die Zellzahl unter der höchsten Konzentration Valproat nimmt im Gegensatz zum Wachstum der PBS Leerprobe nach 24 Stunden ab. Ab einer Konzentration von 3,12mM können sich die Zellen im Verlauf der 72 Stunden zwar erholen, bleiben aber nach 24 Stunden in ihrer Gesamtzahl unterhalb der Leerprobe (vgl. Abbildung 13).

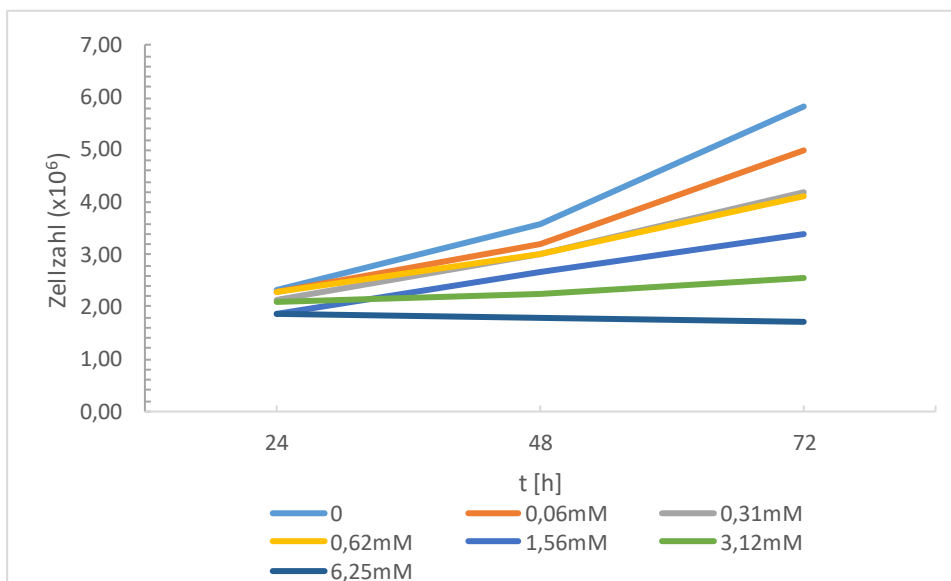


Abbildung 13: Wirkung von Valproat auf die Zellzahl der AML im Verlauf von 72h

Bei täglicher Messung mittels ABX CellCount zeigt sich eine verminderte Zellzahlentwicklung für die behandelten Zellen im Gegensatz zur Leerprobe. Die Entwicklung verläuft entlang der Konzentration an Valproat: höchste Hemmung bei 6,25mM (dunkelblau), es folgt 3,12mM (grün), 1,56mM (mittelblau), 0,62mM (gelb), 0,31mM (grau), 0,06mM (orange). ($n=3$, SD)

Des Weiteren wird die Entwicklung der Anzahl toter Zellen beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass in der Leerkontrolle PBS der Prozentsatz der toten Zellen im Verlauf von 72 Stunden konstant abfällt. Im Gegensatz dazu bleibt der Anteil toter Zellen bei 0,06mM, 0,31mM, 0,62mM bei 4% \pm 1% konstant. Bei 1,56mM lässt sich nach 72 Stunden ein leichter Anstieg auf 6,5% erkennen. Die beiden höchsten verwendeten Konzentrationen

an Valproat (3,12mM und 6,25mM) zeigen ab 24 Stunden einen deutlich erhöhten Anteil an toten Zellen mit bis zu 96% Anteil tote Zellen unter 6,25mM. Vergleiche dazu Abbildung 14.

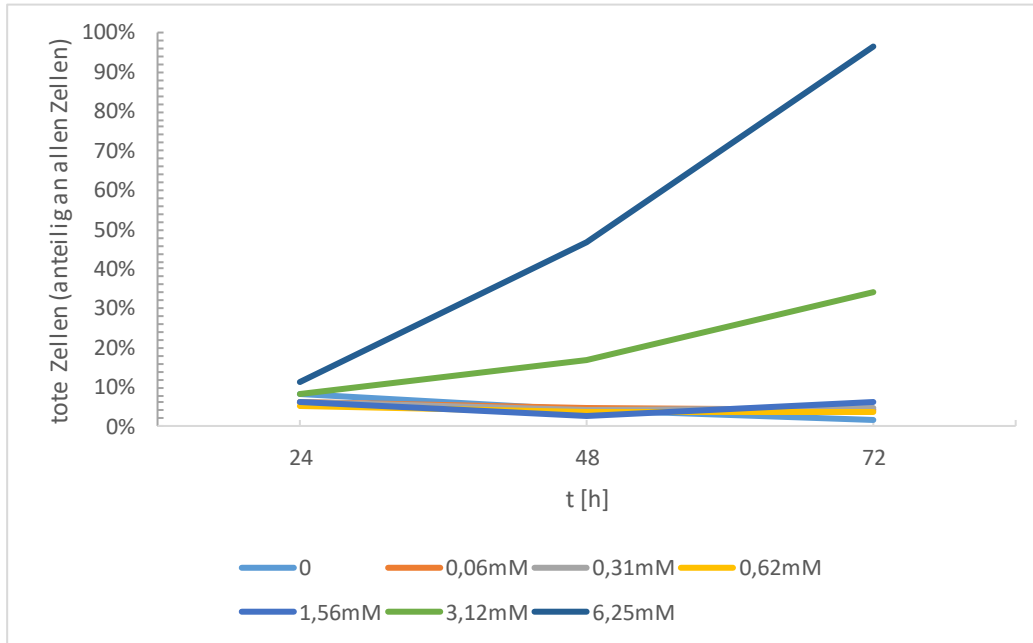


Abbildung 14: Entwicklung des Anteils toter Zellen an der Gesamtmenge der Zellen unter Behandlung mit Valproat über 72h

Es zeigt sich eine deutliche medikamentenabhängige Zunahme der toten Zellen für 6,25mM (dunkelblau) und 3,12mM (grün) über 72h. Alle niedrigeren Konzentrationen liegen dicht oberhalb der Leerprobe (mittelblau- 1,56mM/gelb-0,62mM/grau-0,31mM/orange-0,06mM/hellblau-0). (n=3)

Es lässt sich daher festhalten, dass Valproat innerhalb der gemessenen Konzentrationen zu einer Hemmung der Proliferation führt und der Anteil toter Zellen ansteigt.

Zellzyklusentwicklung

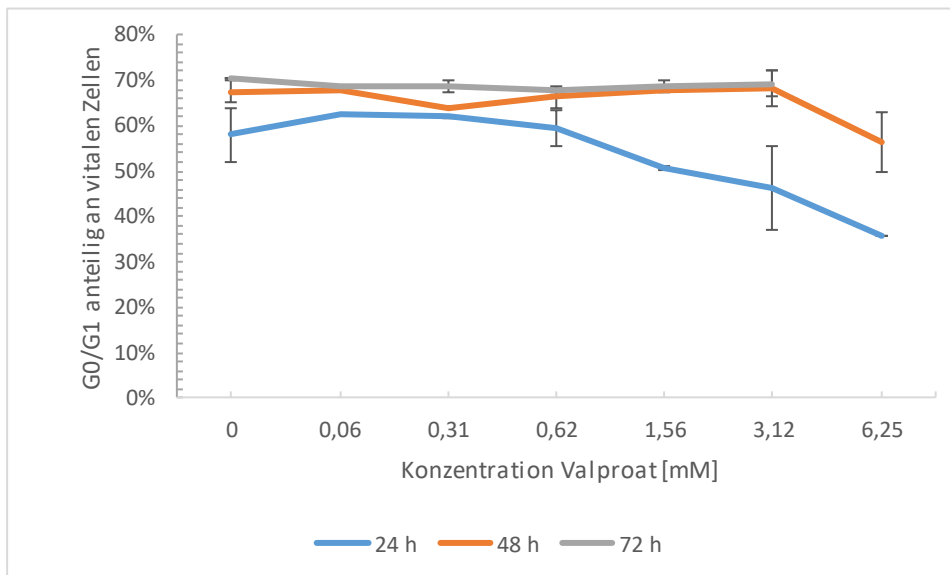
Die Entwicklung des Zellzyklus unter Einfluss von Valproat ermöglicht kein eindeutiges Bild. Für die Leerprobe PBS ergibt sich, dass im Verlauf von 72 Stunden der Anteil der Zellen in G0/G1 Stadium um 10% zunimmt, während der Anteil in G2/M um 4% abnimmt.

Generell lässt sich dieser Trend in G0/G1 bei allen verwendeten Konzentrationen an Valproat feststellen. Allerdings sind die Ausmaße unterschiedlich. Den deutlichsten Einfluss hat Valproat nach 24 Stunden. Während die beiden höchsten Konzentrationen oberhalb der Leerprobe liegen, befinden sich die drei niedrigen parallel angeordnet unterhalb dieser. Nach 48 Stunden steigt der Anteil Zellen in G0/G1 an, allerdings besteht keine Korrelation zwischen der Konzentration des Medikaments und der Höhe

des Anstiegs. Nach 72 Stunden liegen alle Werte, im Sinne einer Erholung, annähernd auf gleicher Höhe ($\pm 2\%$).

Betrachtet man nun die Entwicklung in G2/M ist auffällig, dass auch hier Valproat die größte Wirkung nach 24 Stunden entfaltet. Alle Medikamentenproben liegen oberhalb der Leerprobe, aber nicht nach Konzentrationen geordnet. Deutlich ist jedoch, dass die beiden höchsten Konzentrationen (3,12mM und 1,56mM) nach 24 Stunden 6% und 4% oberhalb der anderen gemessenen Werte liegen. Legt man die Entwicklung in G0/G1 und G2/M übereinander, ist die genannte Entwicklung in sich schlüssig. Erhöhte Werte in G2/M gleichen sich durch verminderte Werte in G0/G1 aus.

(a)



(b)

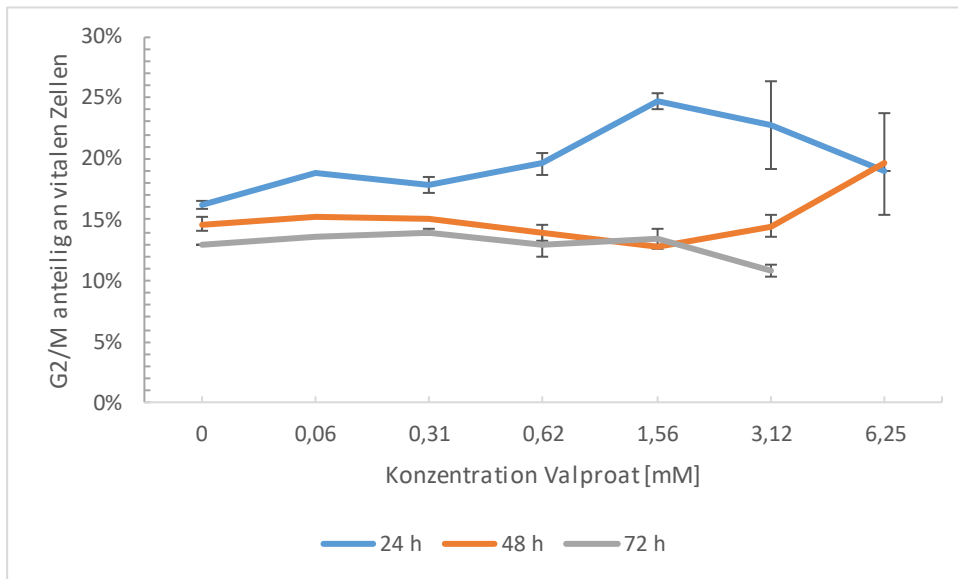


Abbildung 15: Wirkung von Valproat auf die Entwicklung des Zellzyklus nach FACS Analyse der behandelten KG-1a Zellen

(a) Wirkung auf Anteil der Zellen in G0/G1: Zunahme der Zellen in G0/G1 über 72h (orange und grau), bei initial deutlich niedrigerem Anteil Zellen in G0/G1 bei Konzentrationen >0,62mM (blau). (b) Wirkung auf Anteil der Zellen in G2/M: Abnahme der Zellen in G2/M über 72h, bei initialem Anstieg unter Valproat Behandlung nach 24h für Konzentrationen >0,63mM (blau). (n=3, SD)

3.1.2 Die Wirkung von Valproat auf die Hoechst Sidepopulation 2n

Bei einmaliger Medikamentengabe an Tag 0 zeichnet sich für die Entwicklung der SP kein Trend ab. Unabhängig jeglicher Konzentrationen und über 72 Stunden schwankend, lässt sich keine Erkenntnis aus dem Versuch ziehen (vgl. Abbildung 16).

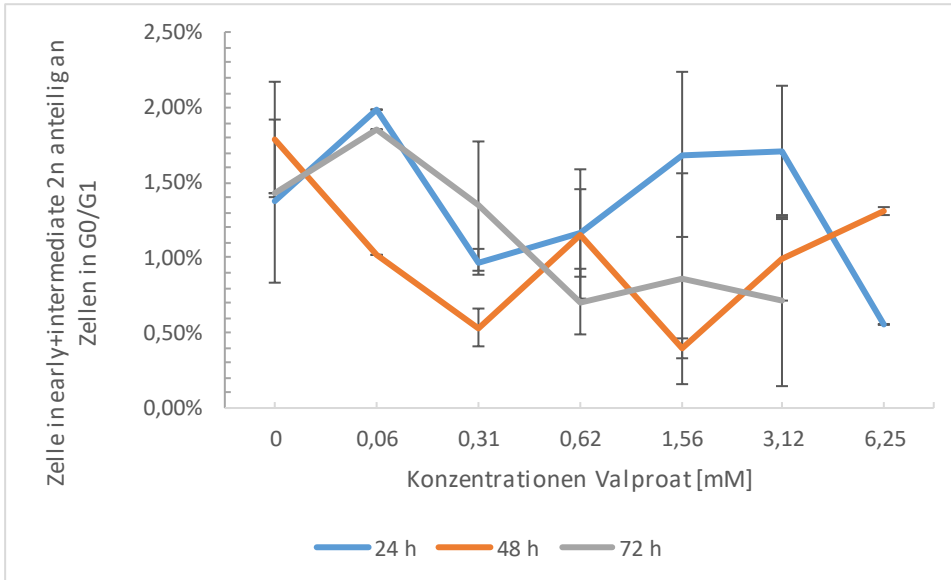


Abbildung 16: Wirkung von Valproat auf die Entwicklung der Zellen in SP early+intermediate 2n anteilig an G0/G1 bei Medikamentengabe an Tag 0

Nach Hoechstfärbung und FACS Analyse zeigt sich ein uneinheitliches Bild der SP über 72h. Nach 24h (blau), nach 48h (orange) und nach 72h (grau) sind nicht voneinander abgrenzbar, deutliches Überlappen der Fehlerbalken machen eine eindeutige Aussage schwierig. (n=3, SD)

3.1.3 Die Wirkung von Valproat auf die Hoechst Sidepopulation 4n

Wie auch schon für 2n unter einmaliger Valproatgabe beschrieben, zeichnet sich auch für die Entwicklung der SP 4n bei einmaliger Gabe des Medikaments kein Trend ab (vgl. Abbildung 17). Immense Fehlerbalken und Schwankungen machen das Ablesen einer Tendenz schwierig.

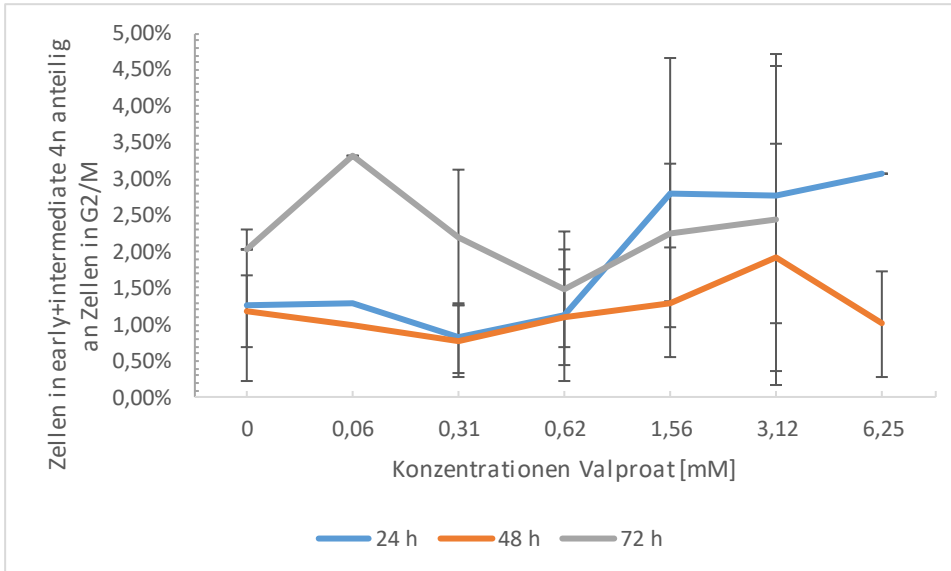


Abbildung 17: Wirkung von Valproat auf die Entwicklung der Zellen in SP early+intermediate 4n anteilig an G2/M bei Medikamentengabe an Tag 0

Nach Hoechstfärbung und FACS Analyse zeigt sich ein uneinheitliches Bild der SP über 72h. Initial SP für Konzentrationen von 0-0,62mM nach 24h (blau), nach 48h (orange) und nach 72h (grau). Für Konzentrationen > 0,62mM Ausreißer nach oben nach 24h. Dennoch deutliche Überlappung der Fehlerbalken, daher Abgrenzung nicht abschließend möglich. (n=3, SD)

3.2 Die Wirkung von TDZD-8 auf die AML generell und im Besonderen auf die LSC

3.2.1 Die Wirkung von TDZD-8 auf die Proliferation von Zellen der Akuten Myeloischen Leukämie

Zellzahlentwicklung

Bei der Kultivierung der KG1-a Zellen mit TDZD-8 über 72 Stunden wurde durch tägliche Zellzahlbestimmung die Wirkung des Medikaments auf die Zellteilung gemessen. Die Zellzahlen der vier erfolgreich durchgeführten Versuche wurden gemittelt.

Bereits nach 24 Stunden liegen die Proben mit Konzentrationen $>1\mu\text{M}$ in ihrem Wachstum unterhalb der Leerprobe. Dieser Trend setzt sich im Verlauf der 72 Stunden fort, wobei sich die Wachstumseinschränkung durch $20\mu\text{M}$ TDZD-8 am deutlichsten zeigt. Die Konzentrationen $1\mu\text{M}$ bis $10\mu\text{M}$ nähern sich im Verlauf, im Sinne einer Erholung, wieder der DMSO Kontrolle an.

Einzig $0,5\mu\text{M}$ fällt in allen drei Messwerten aus der Rolle: Schon nach 24 Stunden liegen die Werte sichtbar oberhalb der Kontrolle und es findet ein exponentieller Anstieg über 72 Stunden hinweg statt (vgl. Abbildung 18).

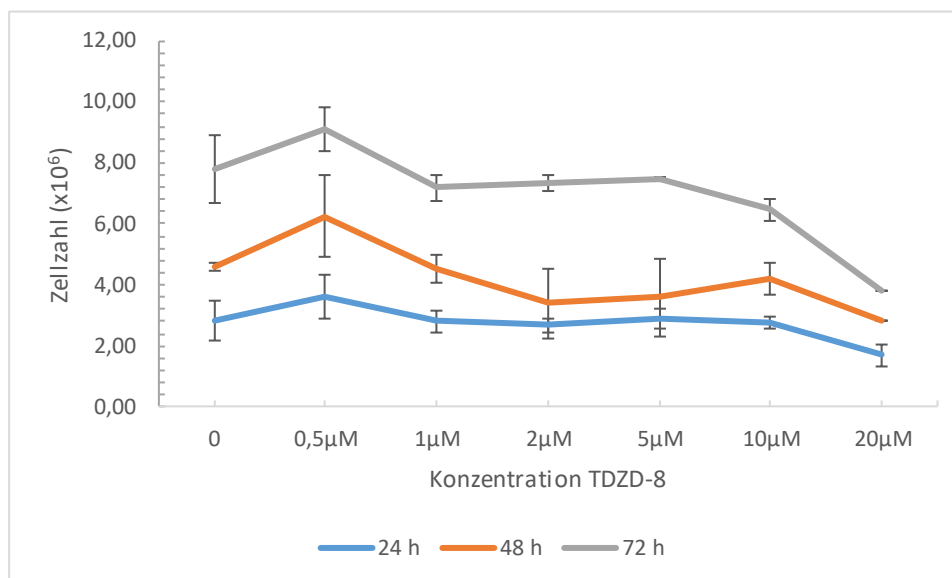


Abbildung 18: Wirkung von TDZD-8 auf die Zellzahl der AML nach Analyse mittels ABX CellCount

Deutliche Zunahme Zellen aller Konzentrationen TDZD-8 im Verlauf von 72h. Nach 24h (blau), nach 48h (orange) und nach 72h (grau). $0,5\mu\text{M}$ Entwicklung über 72h hinweg stärker als die der Leerprobe, während alle weiteren Konzentrationen an TDZD-8 auf Höhe der Leerprobe bleiben. (n=4, SD)

Die prozentuale Entwicklung der toten Zellen ergibt ein ungeordnetes Bild. Bei 20µM steigt der Anteil der toten Zellen kontinuierlich an und der zytotoxische Effekt von TDZD-8 wird mit einer Sterblichkeitsrate von 72% nach 72 Stunden deutlich. Im Verlauf von 72 Stunden nimmt für die Konzentrationen 1µM, 2µM, 5µM und 10µM der Anteil der toten Zellen im Mittel um 3,4% ab. Ausreißend sind 0,5µM wo sich ein stetiger Zuwachs an toten Zellen, um 0,9% pro Tag, zeigt und die DMSO Kontrolle, die einen Peak an toten Zellen nach 48 Stunden aufweist (vgl. Abbildung 1 Abbildung 19).

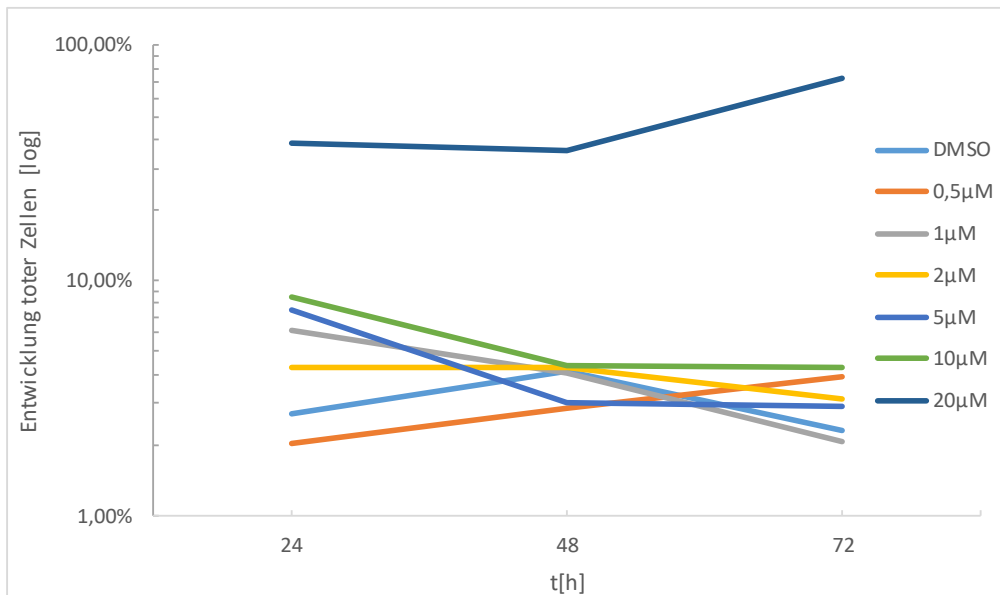


Abbildung 19: Entwicklung toter Zellen unter TDZD-8 im Verlauf von 72h

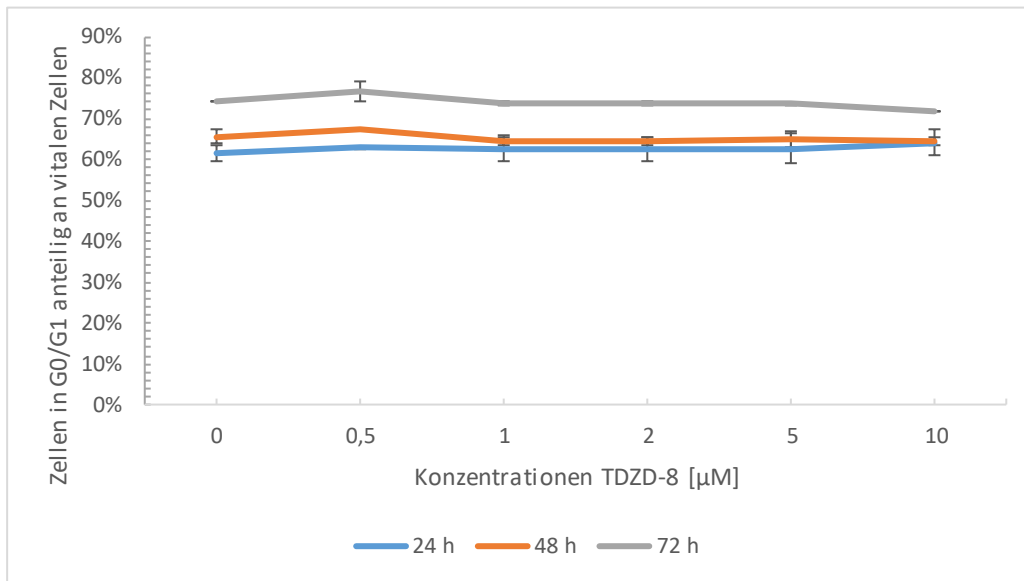
Logarithmische Darstellung der Entwicklung der anteiligen toten Zellen. Es zeigt sich eine deutlich erhöhte Rate für 20µM. Im Verlauf von 72h nimmt für die Konzentrationen 1µM, 2µM, 5µM und 10µM der Anteil der toten Zellen im Mittel um 3,4% ab. Ausreißend sind 0,5µM wo sich ein stetiger Zuwachs an toten Zellen, um 0,9% pro Tag, zeigt und die DMSO Kontrolle, die einen Peak an toten Zellen nach 48h aufweist. (n=4)

Bei Verwendung von 20µM TDZD-8 wird deutlich, dass das Zellwachstum gehemmt wird, während es bei Verwendung von niedrigen Konzentrationen (0,5µM, 1µM, 2µM und 5µM) sogar zu einer Förderung des Wachstums zu kommen scheint.

Zellzyklusentwicklung

Im Verlauf von 72 Stunden wurde festgestellt, dass der Anteil der Zellen im G0/G1 Stadium generell zunimmt, während der Anteil G2/M entsprechend abnimmt. Diese Entwicklung zeigt sich über alle Konzentrationen und die Leerprobe hinweg und lässt sich, unter Einbeziehung der Fehlerbalken, als parallel bezeichnen.

(a)



(b)

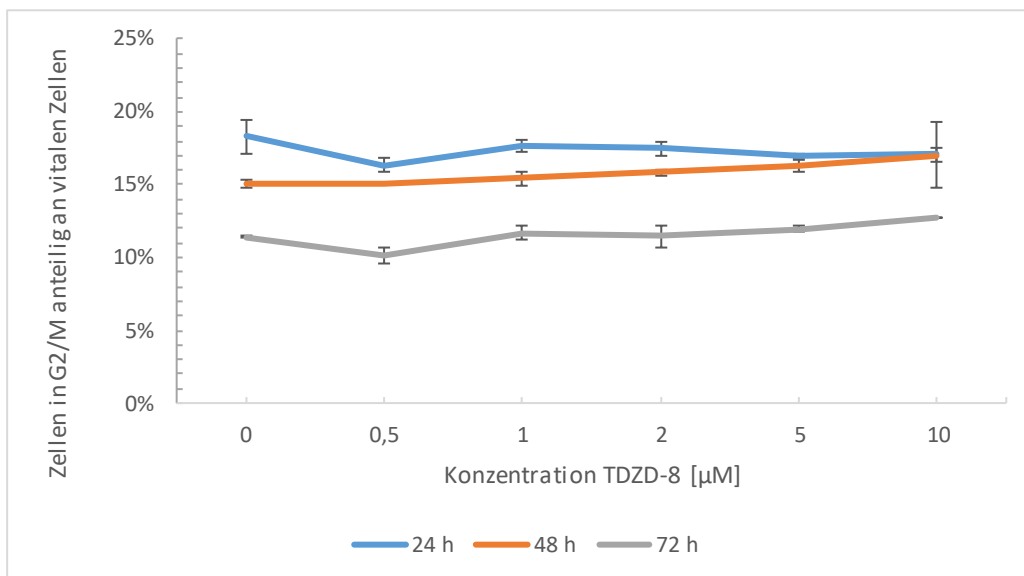


Abbildung 20: Wirkung von TDZD-8 auf die Entwicklung des Zellzyklus der AML. Nach FACS Analyse der Versuchsreihe mit KG-1a Zellen

(a) Wirkung auf Anteil G0/G1: Zunahme aller Versuchsreihen im Verlauf von 72h: nach 24h (blau) in allen Konzentrationen unterhalb der Werten nach 48h (orange) und 72h (grau), wobei die Entwicklung im Verlauf immer auf Höhe der Leerprobe verläuft. (b) Wirkung auf Anteil G2/M: Abnahme aller Versuchsreihen im Verlauf von 72h. Nach 24h (blau) in allen Konzentrationen oberhalb der Werte nach 48h (orange) und 72h (grau). Keine signifikante Abweichung der behandelten Proben von der Leerprobe. ($n=4$, SD)

3.2.2 Die Wirkung von TDZD-8 auf die Hoechst Sidepopulation 2n

Die Entwicklung der Sidepopulation 2n, sprich der Sidepopulation die aus der G0/G1 Population hervorgeht, unter TDZD-8 Gabe zeigt ein beinahe geordnetes Bild. Es wird die early und intermediate SP in Abhängigkeit der G0/G1 Population betrachtet (vgl. Abbildung 21).

Nach 24 Stunden liegt der Prozentsatz an SP für alle Konzentrationen höher im Vergleich zur Leerkontrolle. Es wird außerdem deutlich, dass der Prozentsatz nach 24 Stunden generell oberhalb dem der Folgetage liegt.

Nach 48 Stunden wird ein Abfall der SP durch alle Konzentrationen hinweg verzeichnet. Außer bei einer Konzentration von 1 μM liegen die ermittelten Werte oberhalb oder auf selbiger Höhe, wie die DMSO Leerkontrolle.

Nach 72 Stunden finden sich die Werte genau zwischen den vorangegangenen. Dies gilt für alle Konzentrationen zwischen 0,5 μM und 5 μM . Lediglich für DMSO und 10 μM liegen die Werte knapp unterhalb den gemessenen Werten nach 48 Stunden.

Betrachtet man jedoch die Ergebnisse einschließlich ihrer Standardabweichungen, so lassen sich die Werte nach 24 und 72 Stunden kaum voneinander abgrenzen. Nur nach 48 Stunden haben die Werte sehr geringe Standardabweichungen, bei denen es nicht zu einer Überschneidung mit den anderen Kurven kommt.

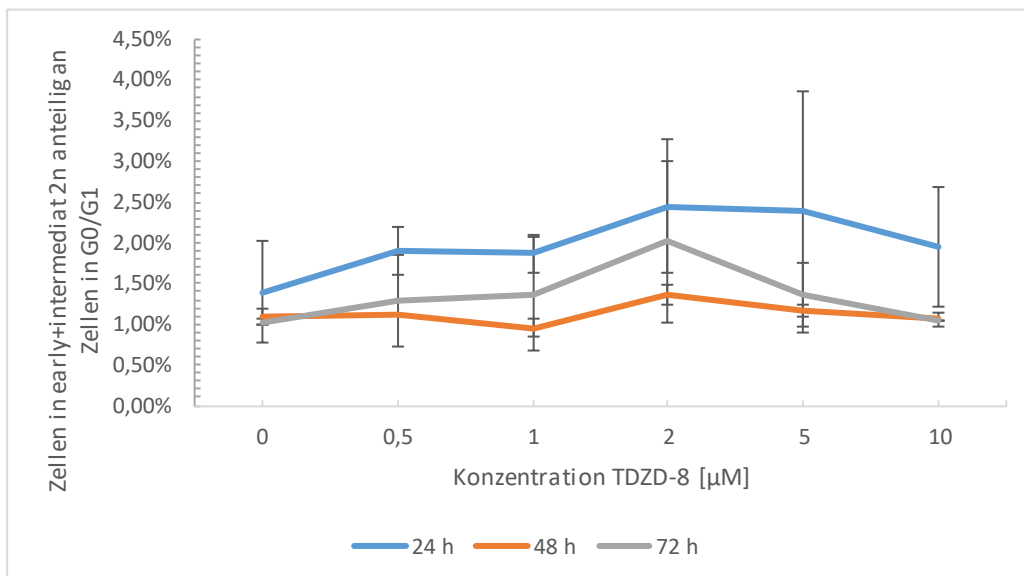


Abbildung 21: Wirkung von TDZD-8 auf die Entwicklung von Zellen in SP early+intermediate 2n anteilig an G0/G1

Nach 24h (blau) liegen die Werte in allen Konzentrationen leicht oberhalb denen nach 72h (grau) und nach 48h (orange). Auf Grund hoher Fehlerbalken kaum Differenzierung unter den Tagen möglich. (n=4, SD)

3.2.3 Die Wirkung von TDZD-8 auf die Hoechst Sidepopulation 4n

Die Entwicklung der Sidepopulation 4n, sprich der Sidepopulation die aus der G2/M Population hervorgeht, unter TDZD-8 Gabe zeigt ein ungeordnetes Bild. Es wird die early und intermediate Sidepopulation in Abhängigkeit der G2/M Population betrachtet (vgl. Abbildung 22).

Unter Einbeziehung der Fehlerbalken lässt sich für die SP 4n kaum ein Trend aussagen. Alle drei Tage liegen mit ihren Werten nahe der Leerprobe und zeigen auch keine konzentrationsabhängigen Veränderungen. Einzig die mittleren Konzentrationen 2µM und 5µM ergeben nach 24 Stunden eine Erhöhung der SP 4n.

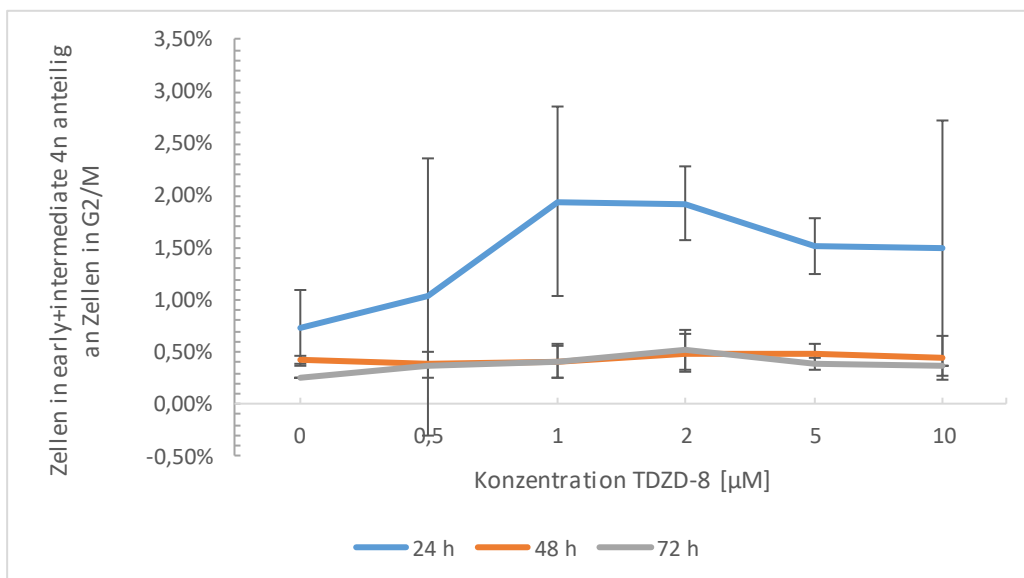


Abbildung 22: Wirkung von TDZD-8 auf die Entwicklung von Zellen in SP early+intermediate 4n

Abnahme der SP bei initial hohen Werten für behandelte Proben nach 24h (blau). Werte nach 48h (orange) und 72h (grau) liegen alle auf einer Linie mit den beiden Leerproben. (n=4, SD)

3.3 Die Wirkung von Temsirolimus auf die AML generell und im Besonderen auf die LSC

3.3.1 Die Wirkung von Temsirolimus auf die Proliferation von Zellen der Akuten Myeloischen Leukämie bei einmaliger Medikamentengabe

Bei der Kultivierung der KG1-a Zellen mit Temsirolimus über 72 Stunden, wie in Kapitel 2.1.8, beschrieben, wurde die Wirkung des Medikaments auf die Zellteilung durch tägliche Zellzahlbestimmung gemessen. Die Zellzahlen der zwei erfolgreich durchgeführten Versuche wurden gemittelt.

Es zeigt sich, dass, während die DMSO Kontrolle vor allem nach 72 Stunden deutlich ansteigt, das Wachstum der Zellkulturen unter Temsirolimus eingeschränkt ist.

Die Einschränkung des Wachstums verläuft in der Messung nicht parallel zu den verwendeten Konzentrationen an Temsirolimus. Es lässt sich zwar der Trend feststellen, dass je höher die Konzentrationen von Temsirolimus sind, desto höher sind auch die Begrenzungen im Wachstum ab 48 Stunden. Allerdings stellt 0,3 μ M eine Ausnahme dar, da hier die Zellzahl nach 48 Stunden im Vergleich deutlich niedriger liegt und sich auch nach 72 Stunden nicht wieder vollständig in die Reihe einordnet.

Eine Zunahme der Zellzahl im Verlauf von 72 Stunden ist zwar gegeben, allerdings deutlich unter den Werten der DMSO Kontrolle (vgl. Abbildung 23).

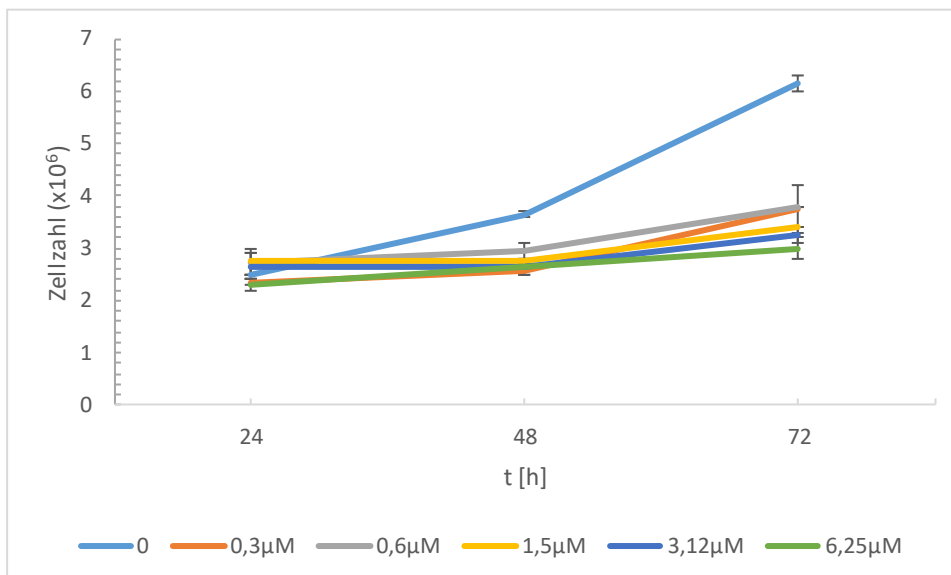


Abbildung 23: Wirkung von Temsirolimus auf die Zellzahl der AML im Verlauf von 72h

Es zeigt sich ein vermindertes Wachstum der behandelten Zellen (0,3 μ M-orange/ 0,6 μ M-grau/ 1,5 μ M-gelb/ 3,12 μ M-dunkelblau/ 6,25 μ M-grün) gegenüber der Leerprobe (hellblau). (n=2, SD)

Die Entwicklung der Anzahl toter Zellen ist bei Temsirolimus wirr und macht die Festlegung eines Trends schwierig. Außer für 3,12µM und für die DMSO Probe lässt sich sagen, dass der Anteil toter Zellen nach 72 Stunden gegenüber einem Peak nach 48 Stunden abnimmt. DMSO erlebt nach einem deutlichen Abfall nach 48 Stunden einen leichten Anstieg, während bei 3,12µM eine kontinuierliche Zunahme der toten Zellen fortgeführt wird.

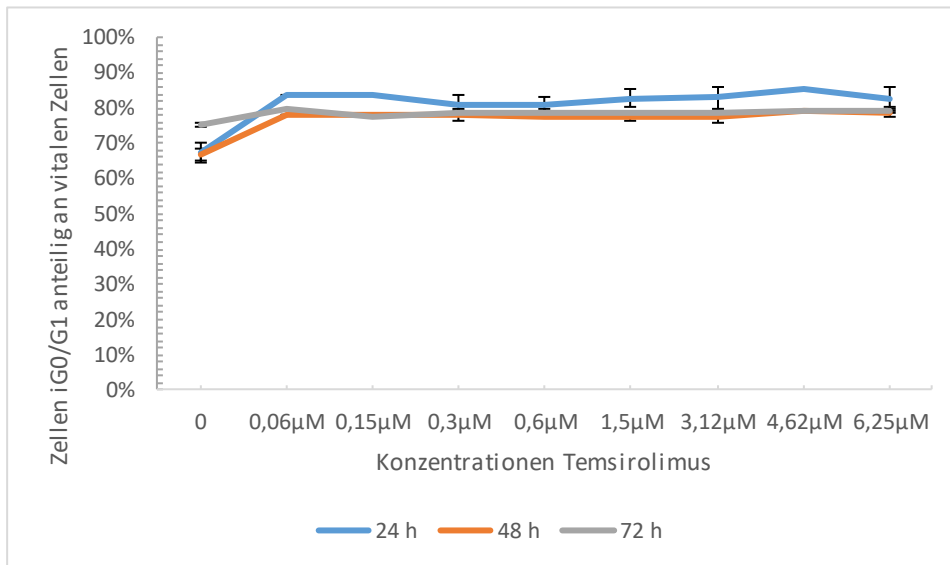
Zellzyklusentwicklung

Die Verteilung der Zellen, prozentual gemessen an allen lebenden Zellen, auf die Zellzyklusstadien G0/G1 und G2/M ergibt bei einmaliger Medikamentengabe ein geordnetes Muster (vgl. Abbildung 24). Es ist deutlich zu erkennen, dass unter dem Einfluss von Temsirolimus der Anteil derjenigen Zellen die sich im G2/M Stadium befinden im Gegensatz zur Leerprobe nach 24 Stunden deutlich verringert. Konsekutiv erhöht sich nach 24 Stunden unter allen verwendeten Konzentrationen der Anteil der in G0/G1 befindlichen Zellen.

Beachtet man die Standardabweichung, so ergibt sich, dass sich unter Behandlung mit Temsirolimus in G0/G1 die Werte nach 48 und 72 Stunden entsprechen. Diese liegen immer noch oberhalb derer der Leerprobe, aber die Differenz ist im Vergleich zum ersten Tag kleiner.

Parallel dazu zeigen sich leicht erhöhte Werte für den Anteil Zellen im G2/M Stadium. Diese liegen nach 48 Stunden nicht, wie bei G0/G1 beschrieben, auf selbiger Höhe, sondern schwanken leicht. Für niedrige Konzentrationen Temsirolimus liegt der Anteil G2/M nach 48 Stunden unterhalb des Anteils nach 72 Stunden und für hohe Konzentrationen Temsirolimus ergeben sich höhere Werte nach 48 Stunden.

(a)



(b)

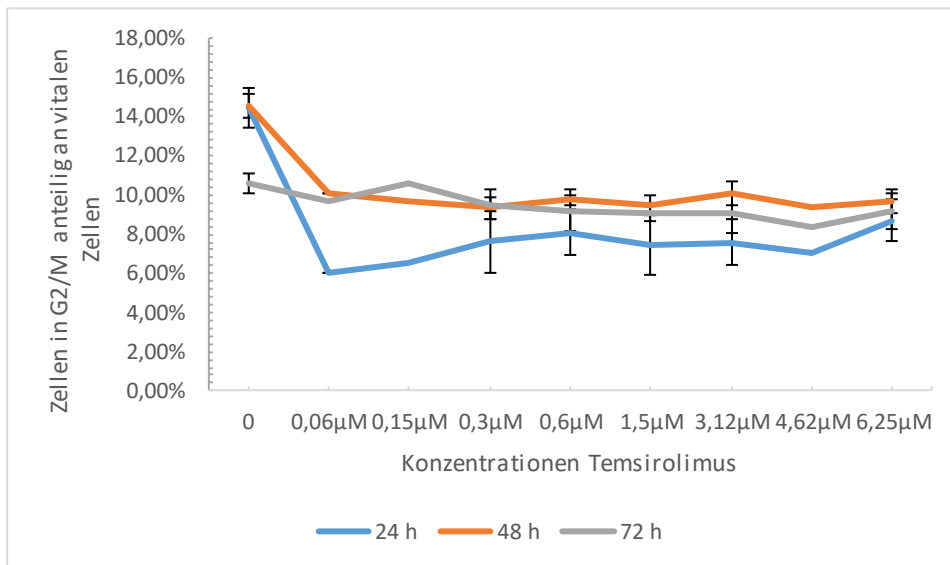


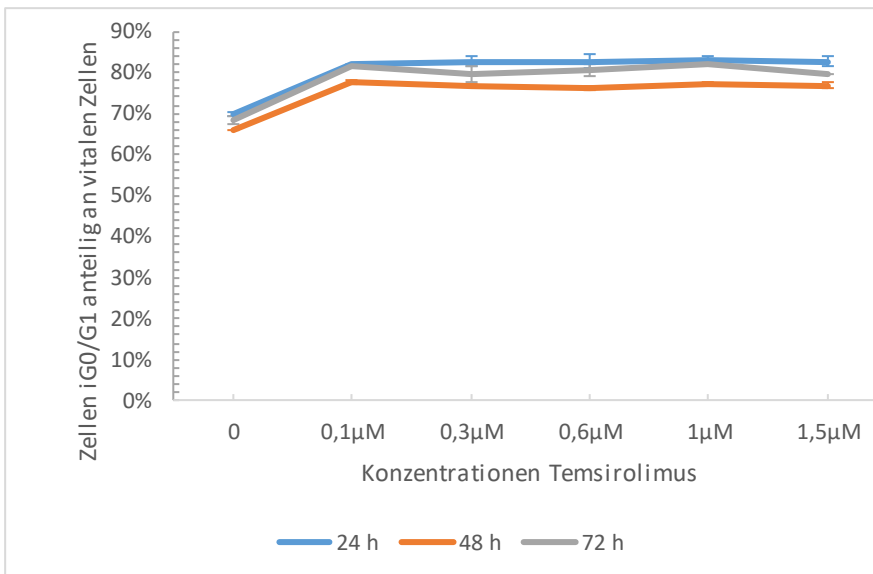
Abbildung 24: Wirkung von Temsirolimus auf die Entwicklung des Zellzyklus der AML bei einmaliger Medikamentengabe an Tag 0

Nach Behandlung der KG-1a Zelllinie und FACS Analyse am entsprechenden Tag (a) Wirkung auf Anteil G0/G1 an vitalen Zellen: Die Werte der behandelten Proben liegen für alle drei Messpunkte (24h-blau/ 48h-orange/ 72h-grau) oberhalb der Werte der Leerprobe. Es ist kaum eine Schwankung im Verlauf der 72h erkennbar. (b) Wirkung auf Anteil G2/M an vitalen Zellen: Die Werte der behandelten Proben liegen für alle drei Messpunkte unterhalb der Werte der Leerprobe (24h-blau/ 48h-orange/ 72h-grau). Es ist kaum eine Schwankung im Verlauf der 72h erkennbar. (n=3, SD)

Bei täglicher Gabe an Temsirolimus kann eine ähnliche Entwicklung gezeigt werden. Es ist auch hier zu erkennen, dass unter dem Einfluss von Temsirolimus der Anteil derjenigen Zellen die sich im G2/M Stadium befinden im Gegensatz zur Leerprobe nach

24 Stunden deutlich verringert und der Anteil Zellen in G0/G1 höhere Werte im Vergleich zur Leerprobe zeigt. Nach 48 Stunden zeigt immer noch einen gestiegenen Anteil Zellen in G2/M und einen verminderten Anteil Zellen in G0/G1 im Gegensatz zur Leerprobe. Nach 72 Stunden pendeln sich die Anteile in G0/G1 und G2/M zwischen den Werten nach 24 und 48 Stunden ein, liegen aber weiterhin unter- bzw. oberhalb der Werte der Leerprobe.

(a)



(b)

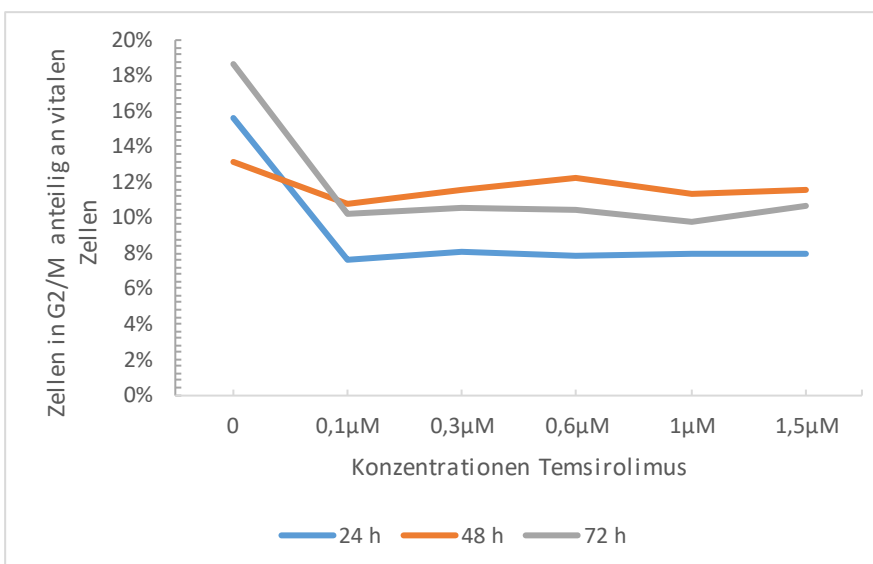


Abbildung 25: Wirkung von Temsirolimus auf die Entwicklung des Zellzyklus der AML bei täglicher Medikamentengabe

Nach Behandlung der KG-1a Zelllinie und FACS Analyse am entsprechenden Tag zeigt sich: (a) Wirkung auf Anteil G0/G1 an vitalen Zellen: Die Werte der behandelten Proben liegen für alle drei Messpunkte oberhalb der Leerprobe (24h-blau/ 48h-orange/ 72h-grau). Es ist kaum eine Schwankung im Verlauf der 72h erkennbar. (b) Wirkung auf Anteil G2/M an vitalen Zellen: Die Werte der behandelten Proben liegen für alle drei Messwerte unterhalb der Leerprobe (24h-blau/ 48h-orange/ 72h-grau). Es ist kaum eine Schwankung im Verlauf der 72h erkennbar. (n=2)

3.3.2 Die Wirkung von Temsirolimus auf die Hoechst Sidepopulation 2n

Unterschieden werden muss im Folgenden die einmalige Medikamentengabe an Tag 0 von der täglichen Gabe von Temsirolimus über 72 Stunden.

Bei einmaliger Gabe zeigt sich für die Entwicklung der SP 2n zeigt sich über 72 Stunden ein ungeordnetes Bild (vgl. Abbildung 26).

Unter Einbeziehung der Fehlerbalken wird auch hier deutlich, dass die gemessenen Werte sehr nah beieinander liegen. Sogar bei der Leerprobe lassen sich die drei Messpunkte nicht voneinander abgrenzen. Die Werte für $4,62\mu\text{M}$ stehen als Einzelwerte und können auf Grund der hohen Zahl an toten Zellen nicht als aussagekräftig gewertet werden.

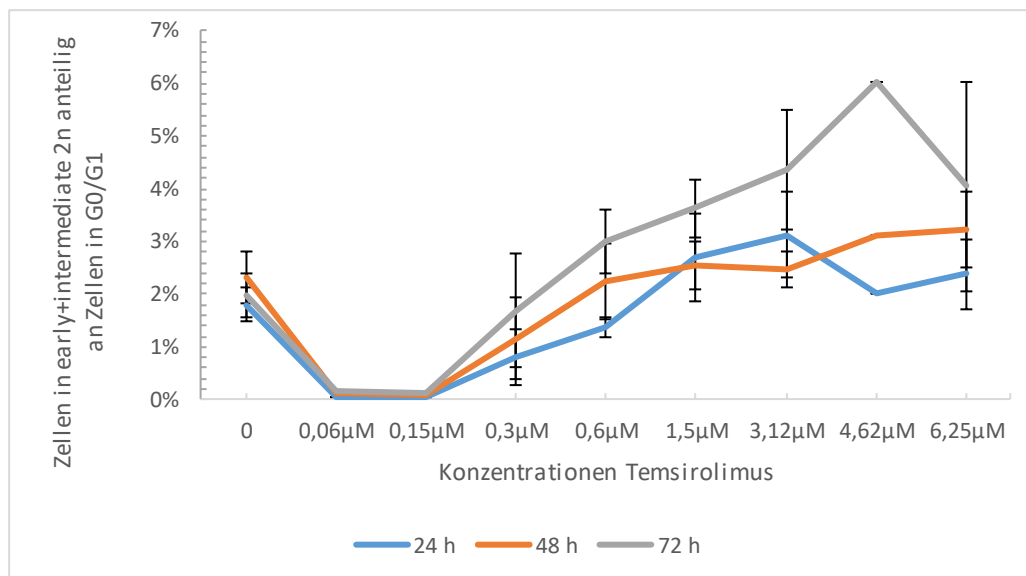


Abbildung 26: Wirkung von Temsirolimus auf die Entwicklung von Zellen in SP early+intermediate 2n anteilig an G0/G1 bei Medikamentengabe an Tag 0

Nach Hoechstfärbung und FACS Analyse zeigt sich für Konzentrationen $>0,15\mu\text{M}$ stellt sich nach 72h (grau) oberhalb der Werte von 48h (orange) und 24h (blau) dar. Ausnahme dieser Entwicklung sind $1,5\mu\text{M}$, wo die Werte nach 24h und 48h auf selbiger Höhe liegen und $3,12\mu\text{M}$, wo nach 24h die Werte oberhalb denen nach 48h liegen. Für die Konzentrationen $0,06\mu\text{M}$ und $0,15\mu\text{M}$ waren keine SP 2n messbar. (n=3, SD)

Die Entwicklung der SP 2n unter täglicher Temsirolimusgabe ergibt ein anderes Bild (vgl. Abbildung 27): während nach 24 Stunden und 48 Stunden die Werte aller Konzentrationen, Fehlerbalken eingenommen, um die Werte der Leerprobe herum liegen, zeigt sich eine deutliche Erhöhung der SP 2n nach 72 Stunden über alle Konzentrationen hinweg. Bis auf 1 μ M und 1,5 μ M liegen die gemessenen Werte mit ihren Standardabweichungen oberhalb der Leerprobe, was ein signifikantes Ergebnis darstellt. Dennoch ist keine Abhängigkeit der Zunahme der SP 2n von der Konzentration des Medikaments zu erkennen.

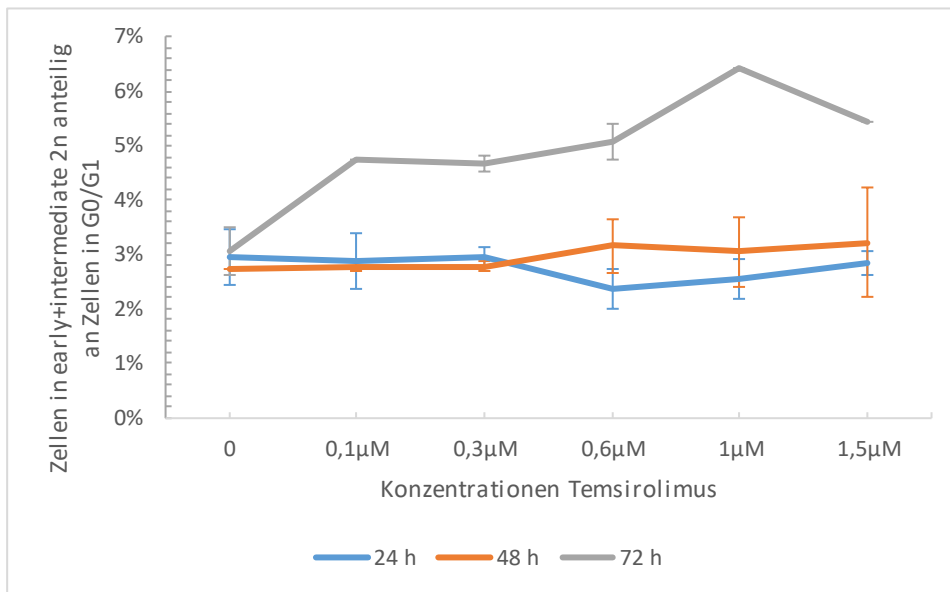


Abbildung 27: Wirkung von Temsirolimus auf die Entwicklung von Zellen in SP early+intermediate 2n anteilig an G0/G1 bei täglicher Medikamentengabe

Nach Hoechstfärbung und FACS Analyse zeigt sich ein deutlicher Anstieg nach 72h (grau) gegenüber 48h (orange) und 24h (blau) über alle Konzentrationen >0 hinweg. Für Konzentrationen 0-0,3 μ M liegen die Werte nach 24h oberhalb der Werte nach 48h und für Konzentrationen >0,3 μ M liegen die Werte nach 48h oberhalb denen nach 72h. (n=2, SD)

3.3.3 Die Wirkung von Temsirolimus auf die Hoechst Sidepopulation 4n

Wie auch im vorangegangenen Abschnitt, muss im Folgenden die einmalige Medikamentengabe (Abbildung 28) von der täglichen Medikamentengabe (Abbildung 29) unterschieden werden.

Bei Medikamentengabe ergibt sich nach 24 Stunden ein uneinheitliches Bild. Berücksichtigt man die Standardabweichung der einzelnen Werte, so ergibt sich kaum eine Tendenz.

Für 3,12 μM ergibt sich, dass die SP 4n nach 48 Stunden deutlich abnimmt um nach 72 Stunden wieder anzusteigen. Bei 4,62 μM zeigt sich wiederum ein kontinuierlicher Anstieg über 72 Stunden. Diese ganze Bewegung findet jedoch im Rahmen von unterhalb 1% statt und könnten durchaus durch Streuung in der Messung erklärt werden.

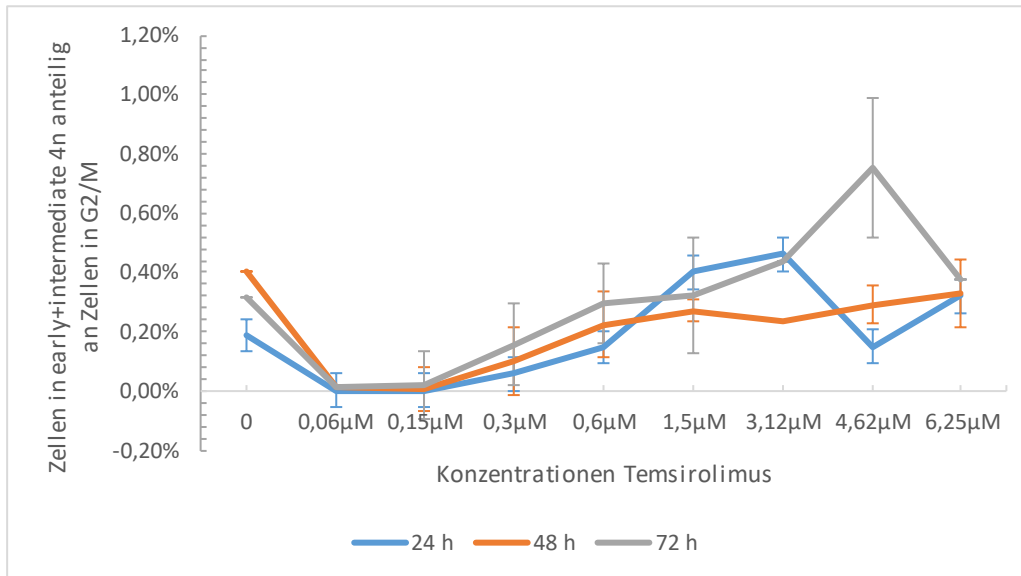


Abbildung 28: Wirkung von Temsirolimus auf die Entwicklung von Zellen in SP early+intermediate 4n anteilig an G2/M bei Medikamentengabe an Tag 0

Nach Hoechstfärbung und FACS Analyse zeigt sich dass sich bei 0,06 μM und 0,15 μM keine SP 4n messen lassen. Für Konzentrationen >0,15 μM zeigt sich eine chaotische Entwicklung mit hohen Fehlerbalken über 72 Stunden. Ein Trend ist nicht feststellbar (24h- blau/ 48h-orange/ 72h-grau). (n=2, SD)

Bei täglicher Gabe von Temsirolimus über 72 Stunden ergibt sich nach 72 Stunden eine Erhöhung der SP für alle Konzentrationen außer 0,3 μM . Alle anderen Werte liegen auf Höhe der Leerprobe. Nach 24 und 48 Stunden sind auf Grund der Fehlerbalken kaum voneinander trennbar.

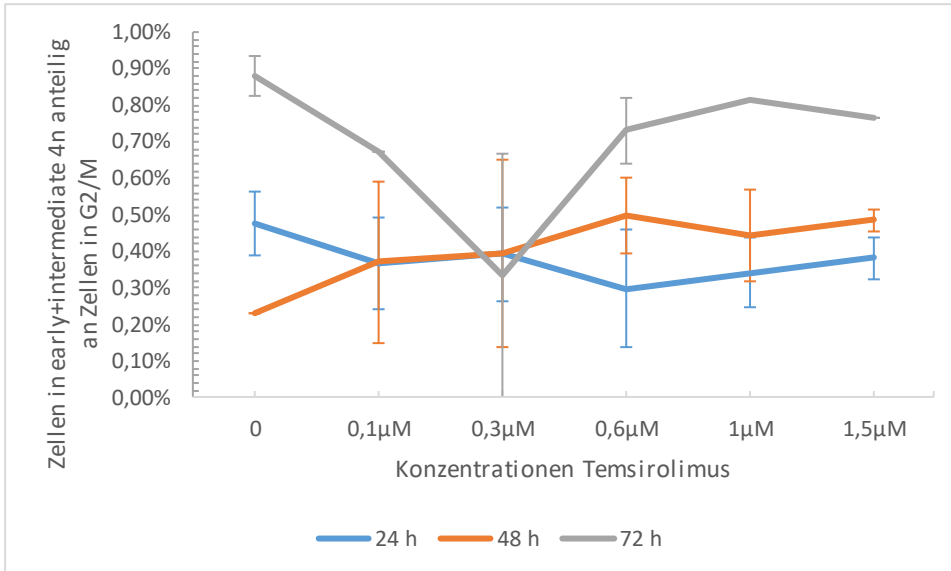


Abbildung 29: Wirkung von Temsirolimus auf die Entwicklung von Zellen in SP early+intermediate 4n anteilig an G2/M bei täglicher Medikamentengabe

Nach Hoechstfärbung und FACS Analyse zeigt sich im Bereich von 1% die Schwankungen der behandelten Proben nach 24h (blau) und nach 48h (orange). Lediglich nach 72h (grau) zeigt eine deutliche Veränderung gegenüber den vorherigen Messpunkten. Außer für 0,3 μM ist die SP 4n nach 72h deutlich erhöht. (n=2, SD)

3.1 Die spezifischen Wirkungen von VPA, TDZD-8 und Temsirolimus im Vergleich

Um die unterschiedlichen Wirkungen auf KG-1a zu verdeutlichen und um Tendenzen gegenüberzustellen werden im folgenden Kapitel die Wirkungen der Medikamente auf die Zellzahlentwicklung, die Zellzyklusentwicklung sowie auf die SP 2n und 4n verglichen.

3.1.1 Die Wirkung auf die Proliferation von Zellen der Akuten Myeloischen Leukämie im Vergleich

Zellzahlentwicklung

Im Vergleich der drei Medikamente wird deutlich, dass sowohl Valproat als auch Temsirolimus (bei einmaliger Gabe) in allen Konzentrationen, TDZD-8 nur bei einer Konzentration von 20µM eine deutliche Wachstumshemmung verursachen. Betrachtet man die prozentuale Wachstumshemmung, so zeigt Temsirolimus bei einmaliger Gabe von den drei genannten Medikamenten die größte Wachstumshemmung nach 72 Stunden: Während Valproat eine Hemmung von 15 bis 71 Prozent gegenüber der Kontrollmessung verursacht, liegen bei TDZD-8 die Werte bei 7 bis 71 Prozent der Kontrollmessung und bei Temsirolimus bei 40 bis 54 Prozent der Kontrollmessung. Es kann gezeigt werden, dass nur höher dosiertes Valproat und TDZD-8 eine vergleichsweise starke Wirkung auf das Zellwachstum im Verlauf von 72 Stunden zeigen wie Temsirolimus in allen verwendeten Konzentrationen. Somit ist insgesamt gesehen Temsirolimus das potenteste Medikament, was das generelle Zellwachstum im Vergleich zu Leerprobe angeht.

Bei TDZD-8 lässt sich jedoch auch feststellen, dass niedrige Konzentrationen, 0,5µM, das Zellwachstum nicht behindern, sondern sogar zu fördern scheinen. Es kann außerdem gezeigt werden, dass die wachstumseinschränkende Wirkungen bei allen drei Medikamenten erst nach 48 Stunden zu messen sind.

Die Betrachtung der Anteiligen toten Zellen macht deutlich, dass bei Valproat und TDZD-8 die hohen Medikamentenkonzentrationen deutlich höhere Werte an apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen vorweisen, als die niedrigeren Konzentrationen. Diese liegen zwar nach 72 Stunden alle leicht oberhalb der DMSO Leerkontrolle, weisen aber im vorherigen Verlauf erhebliche Schwankungen auf. Generell lässt sich feststellen, dass unter allen Medikamenten der Anteil toter Zellen nicht über 10% steigt. Die einzigen Ausreißer sind TDZD-8 20µM wo ein Anstieg auf 70% tote Zellen zu beobachten ist und 3,12µM Valproat mit einem Anstieg auf 35%.

Die beiden genannten Aspekte, Zellentwicklung und tote Zellen, zusammengefasst kann gezeigt werden, dass Temsirolimus das Zellwachstum am stärksten zu beeinflussen scheint, ohne eine hohe Toxizität zu haben. Unter Verwendung von 20 μ M TDZD-8 und 6,25 μ M Valproat hat man eine ähnlich beeindruckende Hemmung, allerdings auch einen deutlichen Anstieg an toten Zellen.

Zellzyklusentwicklung

Sowohl für TDZD-8, als auch für Temsirolimus zeigt sich eine geordnete Zunahme des Anteils Zellen in G0/G1 unter Medikamenteneinfluss und eine gleichzeitige Abnahme des Anteils in G2/M. Bei beiden Medikamenten erfolgt die Entwicklung durch alle Konzentrationen hinweg. Eine konzentrationspezifische Anordnung oder Veränderung lässt sich nicht feststellen, da die Standardabweichungen sich überschneiden.

Einzig bei Valproat lässt sich kein eindeutiges Bild feststellen. Generell findet hier allerdings eher eine Zunahme der Zellen in G2/M statt und eine Abnahme der Zellen in G0/G1.

3.1.2 Die Wirkung auf die Hoechst Sidepopulation 2n im Vergleich

Bei der Betrachtung von Temsirolimus zeigt sich bei einmaliger Medikamentengabe ein ungeordnetes Bild für die Entwicklung der SP 2n. Die Werte sind zwar unstet, aber man kann nach 72 Stunden eine leichte Tendenz zu einer Erhöhung der SP 2n erkennen, allerdings bei großen Standardabweichungen und teilweise fraglicher Aussage einzelner Werte auf Grund der hohen Rate an toten Zellen. Die Entwicklung der SP 2n unter täglicher Temsirolimusgabe zeigt hingegen eine deutliche Erhöhung der SP nach 72 Stunden über alle Konzentrationen hinweg.

Während sich für Valproat kein Trend abzeichnet, was die Entwicklung der SP 2n angeht, deutet sich bei TDZD-8 eine Verminderung der Zellen in SP 2n an. Die geringen Standardabweichungen nach 48 Stunden im Gegensatz zu den großen Schwankungen nach 24 und 72 Stunden lassen die gemessene Verminderung deutlich erscheinen .

Dennoch zeigt sich bei keinem Medikament eine Abhängigkeit der Zunahme bzw. Abnahme der SP 2n von der verwendeten Konzentrationen.

3.1.3 Die Wirkung auf die Hoechst Sidepopulation 4n im Vergleich

Bei Einbeziehung der Standardabweichung kann für keines der Medikamente eine eindeutige Tendenz im Verlauf von 72 Stunden festgestellt werden.

Bei TDZD-8 unterscheiden sich die Werte kaum von denen der Leerprobe. Nur zwei einzelne Konzentrationen (2 μ M und 5 μ M) zeigen eine Zunahme der SP 4n nach 24 Stunden. Für die Konzentrationen 0 bis 0,6 μ M Temsirolimus (tägliche Gabe) deutet sich eine Zunahme der SP 4n nach 72 Stunden an.

Das Ablesen eines Trends ist hier sehr vage und auch die genannten Erhöhungen der SP 4n für niedrige Temsirolimuswerte und mittlere TDZD-8 Werte lassen keine eindeutige Aussage zu.

4 Diskussion

4.1 Effekte von Valproat auf putative leukämische Stammzellen

Valproat wirkt, wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, als HDACI. Die aufgehobene Regulation der Histondeacetylierung steht im Verdacht Teil der Krankheitsentstehung der AML zu sein. Bei der Epilepsitherapie wird Valproat unter dem Handelsnamen Ergenyl mit einem therapeutischen Serumspiegel von 50-100 µg/ml verabreicht. Dies entspricht einer Konzentration von 0,31-0,63mM.

In der vorliegenden Studie wurden Valproatkonzentrationen zwischen 0,062mM und 6,25mM in Anlehnung an die klinische Dosis und bereits veröffentlichte Studien gewählt. Xie et al. (2012) verwendeten bei dem Versuch Valproat mit Clofarabine bei der Behandlung der AML zu kombinieren Konzentrationen von 0,25-1mM. Bradbury et al. (2005) kultivierten hingegen KG-1a Zellen mit Valproat in der Konzentration 1-5mM um den Effekt auf einzelne HDACs zu messen.

Die beiden genannten und einige weitere Arbeiten beschäftigten sich in den letzten Jahren mit der Frage wie HDACI, insbesondere auf Zellen der AML (Bradbury et al., 2005), aber auch auf deren Vorläuferzellen wirken (Bug et al., 2007).

In Kapitel 3.1.1 wurde die Entwicklung der Zellzahl im Verlauf von 72 Stunden beschrieben und es wurde festgestellt, dass sich die Zellen unter Valproat zwar kontinuierlich entwickeln, allerdings in der Gesamtzellzahl stets unterhalb der Leerprobe liegen. Daher ergibt sich die Frage, ob es sich hierbei um eine Reduktion der Gesamtzellzahl aufgrund eines hohen apoptoseinduzierenden Effekts von Valproat, oder um eine Hemmung des Wachstums handelt.

Wenn man die Anzahl an toten Zellen betrachtet, wird deutlich, dass der Prozentsatz abgestorbener Zellen außer für die beiden höchsten verwendeten Konzentrationen nicht stark vom Prozentsatz der Leerprobe abweicht. Sowohl Bradbury et al. (2005), als auch Xie et al. (2012) beschreiben einen hohen apoptotischen Effekt von Valproat in Abhängigkeit der spezifischen AML-Klassen. Es wurde auch eine erhöhte Sensitivität von AML Zelllinien mit t(8;2) auf Valproatkonzentrationen von 0,25mM bis 1mM beschrieben (Xie et al., 2012). Diese Veränderung liegt in der KG-1a Zelllinie nicht vor. Bradbury (2005) beobachtete valproatinduzierten Zelltod zwischen 20% und 90%, je nach Herkunft der AML Proben (Patientenkollektiv). Hierbei wurden allerdings Konzentrationen von 5mM Valproat eingesetzt, was in der vorliegenden Arbeit eine der höchsten Dosen ist. Im Hinblick auf die in dieser Arbeit gemessenen Werte, lässt sich

die KG-1a Zelllinie in die eher sensitive Gruppe der AML einordnen, denn für Valproatkonzentrationen von 3,12mM bis 6,25mM wurden auch hier sehr hohe Anteile toter bzw. apoptotischer Zellen gemessen (34% und 96%). Da sich diese Sensitivität in den Versuchsreihen allerdings nur für hohe Werte des Medikaments, die zehnfache Mengen des therapeutischen Serumspiegels, zeigt, erklärt sich dadurch nicht die hier alle Konzentrationen betreffende verminderte Zellzahl im Verlauf von 72 Stunden.

Unter Berücksichtigung der Entwicklung des Zellzyklus (vgl. Kapitel 3.1.1) wird deutlich, dass hier nach 24 Stunden die Anteile Zellen in G0/G1 und G2/M von der PBS Leerprobe abweichen. Für Konzentrationen von 1,56mM aufwärts wurde eine Zunahme der Zellen in G2/M und eine Abnahme der Zellen in G0/G1 festgestellt.

Es wurde beobachtet, dass es an nach 48 und 72 Stunden keine Schwankungen in der Verteilung der Zellen in G0/G1 bzw. G2/M gab. Die Zellen könnten bei diesem Befund einerseits zu gleichem Anteil das Zellzyklusstadium wechseln, so dass keine Schwankungen im Diagramm erkennbar sind, andererseits könnten sie sich im jeweiligen Stadium im Arrest befinden. Zwar hat Valproat im Körper bei der Hemmung von spezifischen Membrantransportern eine Halbwertszeit von 15 Stunden, doch um die Wirkung auf die Genexpression und somit Differenzierung von AML Zellen messen zu können, wurde entschieden den Versuch über einen Zeitraum von 72 Stunden laufen zu lassen.

Die Beobachtung eines Zellzyklusarrestes deckt sich mit den Ergebnissen von Xu et al. (2007), der feststellte, dass Valproat über die Induktion von Protein p21 (auch CDKInhibitor1) die zellzyklussteuernden Cyclin-dependent kinases (CDKs) hemmt. Dadurch kommt es zu einem Zellzyklusarrest. Es konnte für Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), ebenfalls ein HDACI, gezeigt werden, dass in niedriger Dosis ein Zellzyklusarrest in G0/G1 verursacht wird, während in höherer Konzentration eine Anreicherung in G2/M stattfindet. Dieser Effekt zeigte sich in T24 Blasenkarzinomzellen (Richon et al., 2000), aber auch in der AML Zelllinie K562 (Vidal and Koff, 2000). Hier wurde der Effekt über die Induktion des Proteins p27 gemessen, wodurch ebenfalls CDKs inhibiert wurden und es zu einem Stopp im Zellzyklus kam. Die genannten Beobachtungen wurden mit SAHA gemacht. Da sich die Substanzen Valproat und SAHA im Wirkprofil ähneln, kann von einem gewissen Grad an ähnlichen Auswirkungen ausgegangen werden. SAHA und VPA unterscheiden sich in der Geschwindigkeit H3 und H4 Histone zu acetylieren, wenngleich sie ähnliche Effekte, was Apoptose und myeloische Differenzierung betrifft, hervorrufen (Barbetti et al., 2013).

Bei Beobachtung der SP der KG-1a Zelllinie unter Valproat (vgl. Kapitel 3.1.2, Kapitel 3.1.3) wurde ein starkes Schwanken der Werte festgestellt. Diese bewegen sich in einem Rahmen von 2% (SP 2n) und 4,5% (SP 4n) ohne Abhängigkeiten von Medikamentenkonzentrationen oder Dreitageverlauf. Die Ursache dieses Rauschens kann nicht zuletzt an der hohen Sensitivität des Messverfahrens gegenüber Umwelteinflüssen liegen (vgl. Kapitel 4.4). Allerdings zeigt sich auch bei jeder einzelnen Messung eine starke Schwankung. Dieses Rauschen deutet sich schon bei der Betrachtung der Hauptpopulation an. Hier erkennt man ebenfalls, dass die Werte nicht nach Konzentration geordnet sind. Ein Rauschen um 1-2% fällt bei Werten, die sich nur im einstelligen Kommabereich unterscheiden, deutlich prägnanter aus, ohne wirklich stärker zu sein.

Feststellen kann man allerdings, dass sich in der vorliegenden Studie kein hemmender Effekt von VPA auf die putative LSC Fraktion der KG-1a Zelllinie zeigt. Nebbioso et al. (2005) stellten fest, dass die Hemmung der Apoptose über den TNF-related apoptosis-inducing ligand Signalweg durch VPA bei CD34⁺Zellen keine Rolle spielt und CD34⁺Zellen der Apoptose entgehen. Dieser Effekt deckt sich mit den Beobachtungen von Bug et al. (2007), die erarbeiten konnten, dass unter VPA Behandlung der Anteil der CD34⁺ Zellen gleich bleibt, oder sogar ansteigt. Sie beobachteten, dass die CD34⁺Zellen nicht in ihrem Wachstum gehemmt werden, sondern sich sogar durch AKT Phosphorylierung vermehrt klonal teilen, wodurch eine Abnahme der Differenzierung der Zellen verzeichnet wurde.

Sowohl Bug et al., als auch Nebbioso et al. postulieren, dass sich LSCs in der Population der CD34⁺ Zellen finden. Die Diskussion über den Phänotyp putativer LSC wurde bereits in Kapitel 1.2.4 beschrieben. Träfen die Ergebnisse von Bug und Nebbioso auch auf die LSC Population im Rahmen der SP Bestimmung zu, so würden sie einen Anstieg der SP vermuten lassen. In der vorliegenden Studie läuft die Charakterisierung über einen funktionellen Assay bei dem der größere Anteil Zellen, die als LSCs identifiziert werden, CD34⁻ sind. Hierauf wird in Kapitel 4.4 noch näher eingegangen.

Über die Auswirkungen von VPA auf die Differenzierung von transformierten Zellen wird in der Literatur stark diskutiert. Es liegen bestätigende und entkräftende Paper zu diesem Thema vor (Gottlicher et al., 2001). Während Bug eine Abnahme der Differenzierung beobachtet und eine klonale Teilung beschreibt, ist bei Nebbioso von einer Induktion der Differenzierung in leukämischen Zellen die Rede. Weitere Versuche müssen hier Klarheit schaffen. Die Beobachtungen der ausbleibenden Abnahme der SP und die

Berichte von Bug et al. sind vereinbar mit Studien über schlechtes Ansprechen von Patienten mit AML auf Monotherapie mit VPA (Bug et al., 2005, Kuendgen et al., 2006).

Valproat nimmt durch den alleinigen entwicklungshemmenden Effekt, ohne reduktive Wirkung auf putative LSC nach den Ergebnissen dieser Studie nicht die Stellung eines geeigneten Medikamentes für die Behandlung der LSCs der AML ein.

4.2 Effekte von TDZD-8 auf putative leukämische Stammzellen

Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben ist TDZD-8 ein Inhibitor der GSK3 β . Galectin-3, ein β -galactosid bindendes Lectin, wird bei vielen Neoplasien überexprimiert. Leukämische Zellen nutzen den GSK3 β /Galectin 3 Mechanismus um dem apoptotischen Stimulus zu entkommen. Diese Tatsache macht TDZD-8 interessant als Substanz für die Behandlung einer AML.

Bei der Betrachtung der Zellentwicklung unter TDZD-8 zeigte sich eine leichte Einschränkung des Wachstums für Proben mit einer TDZD-8 Konzentration zwischen 20 μ M und 1 μ M. Dennoch stieg die Zellzahl über 72 Stunden hinweg an und näherte sich im Sinne einer Erholung wieder der Leerprobe. 20 μ M stellte sich über diesen Zeitraum als GI₅₀ für die verwendete KG-1a Zelllinie heraus. Niedrigere Konzentrationen zeigten hingegen eine Förderung des Wachstums. Bei Guzman et al. liegt der GI₅₀ Wert für die AML Zelllinie K562 bereits bei 6,5 μ M, einem deutlich niedrigeren Wert als dem hier ermittelten. Allerdings kann bei Verwendung der KG-1a Zelllinie bestätigt werden, dass bei 20 μ M nach 24 Stunden einen Großteil der AML Zellen abgestorben ist. Während in dieser Studie nach 24 Stunden 40% tote Zellen und nach 72 Stunden 70% verzeichnet werden, liegen bei Guzman et al. die Werte sogar bei ca. 80% (Patientenproben AML). Gesunde Patientenproben zeigten nur 21% tote Zellen nach 24 Stunden (Guzman et al., 2007).

Guzman et al. führen diesen Effekt nach 24 Stunden vor allem auf die Beeinflussung der Membranstabilität der Zellen zurück, wodurch Zellen in die Apoptose gedrängt werden. Aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaft ist TDZD-8 in der Lage, mit der Lipiddoppelschicht der Zellmembran zu interferieren. Die Zellmembran erfährt dadurch eine Zunahme der Permeabilität und die Apoptosekaskade wird in Gang gesetzt. Dieser Mechanismus war allerdings nur in leukämischen Proben nachweisbar (Guzman et al., 2007). Dieser Effekt wurde untersucht, um die Vergleichbarkeit zwischen der von Guzman et al. verwendeten K562 Zelllinie und der KG-1a Zelllinie hinsichtlich der Apoptoseinduktion durch TDZD-8 zu betrachten.

Ferner zeigte die Arbeitsgruppe, dass diese Veränderung mit schneller Kinetik ablief. Bereits nach 1-6 Stunden war in den meisten Fällen oben genannte Veränderung nachweisbar. In der Färbung mit Annexin V zeigte sich auch in der hier durchgeführten Versuchsreihe ein immenses Absterben der Zellen gemessen nach 15 Minuten, 30 Minuten und 1 Stunde Inkubationszeit mit 20 μ M TDZD-8 (Daten nicht aufgeführt). Dieser Effekt ist allerdings für die Fragestellung dieser Arbeit nicht von vorrangiger Bedeutung.

Durch eine über 72 Stunden andauernde Versuchsreihe wurde hier angestrebt, zelluläre Auswirkungen von TDZD-8 auf die AML zu messen, die über die Membranschädigung und einem gesteigerten Absterben hinausführen.

Interessant erscheint die Frage, ob es zu einem eingeschränkten Wachstum durch vermehrte Apoptose und somit zu relativ weniger Zellen kam, oder ob eine Hemmung der Proliferation zugrunde liegt, denn, wie zuvor erläutert, werden die Auswirkungen der Interkalierung mit der Membran nach 72 Stunden keine bedeutende Rolle mehr spielen. Betrachtet man die Entwicklung der toten Zellen (vgl. Kapitel 3.2.1), zeigt sich nur für 20µM eine relevante Zunahme der toten Zellen auf 72%. Alle anderen Konzentrationen liegen 1-2% oberhalb der Leerprobe. Diese Beobachtung stimmt nicht mit der von Cheng et al. (2007) überein, die feststellten, dass GSK3 einige Mitglieder der antiapoptotischen Bcl-2 Familie stabilisiert. GSK3β kann die antiapoptotische Signalwirkung von Bcl2L12a regulieren. Durch die Hemmung von GSK3 wurde der antiapoptotische Effekt aufgehoben und eine vermehrte Apoptoseneigung gemessen.

So legt die vorliegende Studie nahe, dass es sich um eine Hemmung der Proliferation handelt. Dies zeigt sich auch bei der Betrachtung der Zellzyklusentwicklung im Verlauf der Versuchstage: es wurde festgestellt, dass der Anteil der Zellen im G0/G1 Stadium generell zunimmt, während der Anteil G2/M entsprechend abnimmt. Diese Entwicklung lässt den Eintritt in einen Zellzyklusarrest vermuten. Die Zellen verlassen den Zellzyklus und begeben sich in das Ruhestadium. Experimentell ist eine Abnahme der Zellen in G2/M um circa 10% messbar. Dieser Zellzyklusarrest ist bekannt als Folge einer GSK3 Inhibierung. Durch die Hemmung der GSK3 kommt es zu einer Aktivierung von p27^{kip1} (Wang et al., 2008). p27^{kip1} ist ein negativer Regulator des Zellzyklus. Die Erhöhung des p27^{kip1} führt so zu einem Zellzyklusarrest in G0/G1. GSK3 kann außerdem p21^{Cip1} phosphorylieren, was zu einem proteasomalen Abbau von p21^{Cip1} führt. p21^{Cip1} ist ein potenter cyclinabhängiger Kinaseinhibitor und führt dephosphoryliert zur Seneszenz in G1. Wird nun die GSK3 durch TDZD-8 gehemmt kommt es zu einem zehnfachen Anstieg von p21^{Cip1} und somit zum Zellzyklusarrest in G0/G1 (Rossig et al., 2002).

Nicht nur die Signalwege die über p27 und p21 führen spielen eine Rolle für den Arrest des Zellzyklus in G0/G1. Guzman et al., sowie auch Martinez et al. (2002) zeigten, dass TDZD-8 kein reiner Inhibitor der GSK3β ist, sondern schon in geringer Konzentration eine hemmende Wirkung auf FLT3 entfaltet (Guzman et al., 2007). FLT3, eine Rezeptorthyrosinkinase, dimerisiert nach Bindung des Substrats, was zu einer Autophosphorylierung führt und somit zur Aktivierung nachgeordneter Signalkaskaden.

Diese beinhalten die Ras/MEK, PI3K/AKT/mTOR, und STAT-5 Signalwege, wovon jeder vielfältige Rollen in der Förderung der Entwicklung des Zellzyklus, der Hemmung der Apoptose und der Aktivierung der Differenzierung spielten (Hay and Sonenberg, 2004, Manning and Cantley, 2007, Bar-Natan et al., 2012). Es ist wahrscheinlich, dass die Hemmung, die TDZD-8 auf diese Rezeptorthyrosinkinase ausübt, ebenfalls den Arrest der Zelllinie in G0/G1 fördert (vgl. Abbildung 30).

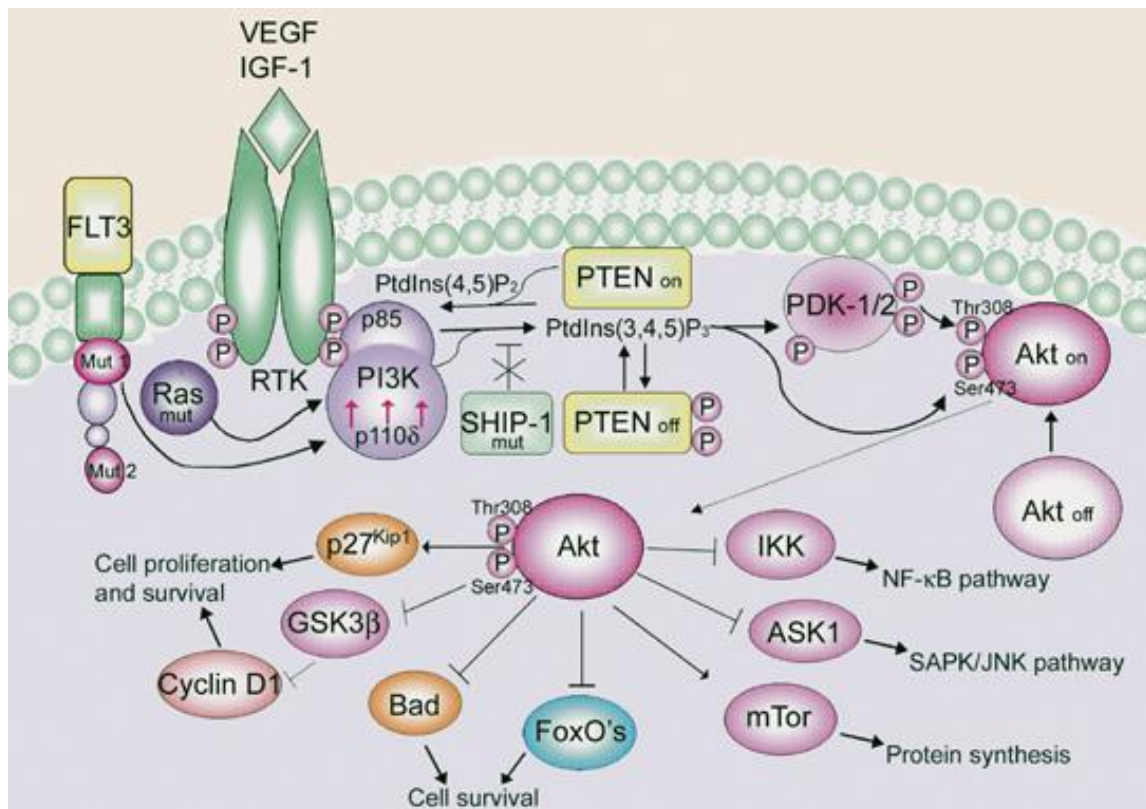


Abbildung 30: FLT3 Signalweg in AML Zelllinien und Blasten

Durch Bindung von FLT3 bzw. in AML durch Mutation dimerisiert die Rezeptorthyrosinkinase und autophosphoryliert. Dadurch ist FLT3 in der Lage den RAS und den PI3K/Akt Signalweg zu aktivieren. Aktiviertes Akt und Ras führen zur Aktivierung einer Reihe von Substraten, die grundlegend für die Zellproliferation, das Überleben und die Translation sind. Pfeile bezeichnen Aktivierung, während rechtwinkelige Linien Hemmung bedeuten. RTK, Rezeptorthyrosinkinase (nach Martelli et al. (2010))

Die Hemmung der GSK3β durch TDZD-8 wird im Folgenden noch weiter diskutiert. Zuvor sollten die LSCs, diejenigen Zellen von Interesse dieser Arbeit, genauer betrachtet werden. Die Entwicklung der putativen leukämischen Stammzellen in den SP (diploid und tetraploid) lässt durch große SD kaum eine Aussage hinsichtlich eines Trends zu. Die behandelten Proben liegen sehr nahe bzw. auf demselben Wert wie die Leerprobe.

Diese Entwicklung widerspricht den Beobachtungen von Guzman et al., die zeigten, dass nach 24 Stunden Behandlung mit 20 μM TDZD-8 die colony forming unit (CFU) bei

AML Proben deutlich abnahm. Bei Beobachtung stellt sich allerdings die Frage der Schlüssigkeit, denn bei 80% generellen toten Zellen ist fraglich, wie aussagekräftig dieser Effekt ist.

Sicher ist, dass in der vorliegenden Studie kein signifikanter Einfluss von TDZD-8 auf die SP der KG-1a Zelllinie gemessen werden konnte.

Guzman et al. postulierten 2001 allerdings, dass in LSCs nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFκB) übermäßig aktiviert ist, während dies in HSC nicht der Fall ist (Guzman et al., 2001). Die Autoren sahen dies als möglichen neuen therapeutischen Angriffspunkt auf die LSCs. Durch die Hemmung der GSK3β durch TDZD-8 kommt es nachgelagert zu einer Abnahmen der Aktivierung von NFκB (Hoeflich et al., 2000), was nach Jordan (2007) zu einer Hemmung der Entwicklung der LSCs führen sollte. Leider ist dieser Effekt in der vorliegenden Studie nicht sichtbar. Es existieren allerdings zu Jordan und Hoeflich gegenteilige Meinungen, was den Stellenwert der GSK3 gegenüber NFκB betrifft: Buss et al. (2004) beschrieben die Förderung des proteasomalen Abbaus von NFκB durch GSK3β, was bedeuten würde, dass es durch Hemmung der GSK3 zu einem Anstieg und damit zu einem gegenteiligen Effekt, wie oben beschrieben, kommen müsste. Sanchez et al. (2003) wiesen darauf hin, dass GSK3β NFκB durch Verhinderung des Abbaus von IκBα unterdrückt. Hier würde es durch Hemmung durch TDZD-8 wiederum eher zu einer Zunahme von NFκB kommen. Folglich kann GSK3β NFκB auf unterschiedlichste Weisen regulieren (McCubrey et al., 2014)

Nicht nur die Möglichkeiten, dass TDZD-8 mehrere Proteine (bspw. FLT3) hemmen kann, sondern auch die multiplen Angriffspunkte, die die GSK3β bieten, machen eine eindeutige Aussage unmöglich (vgl. Abbildung 31).

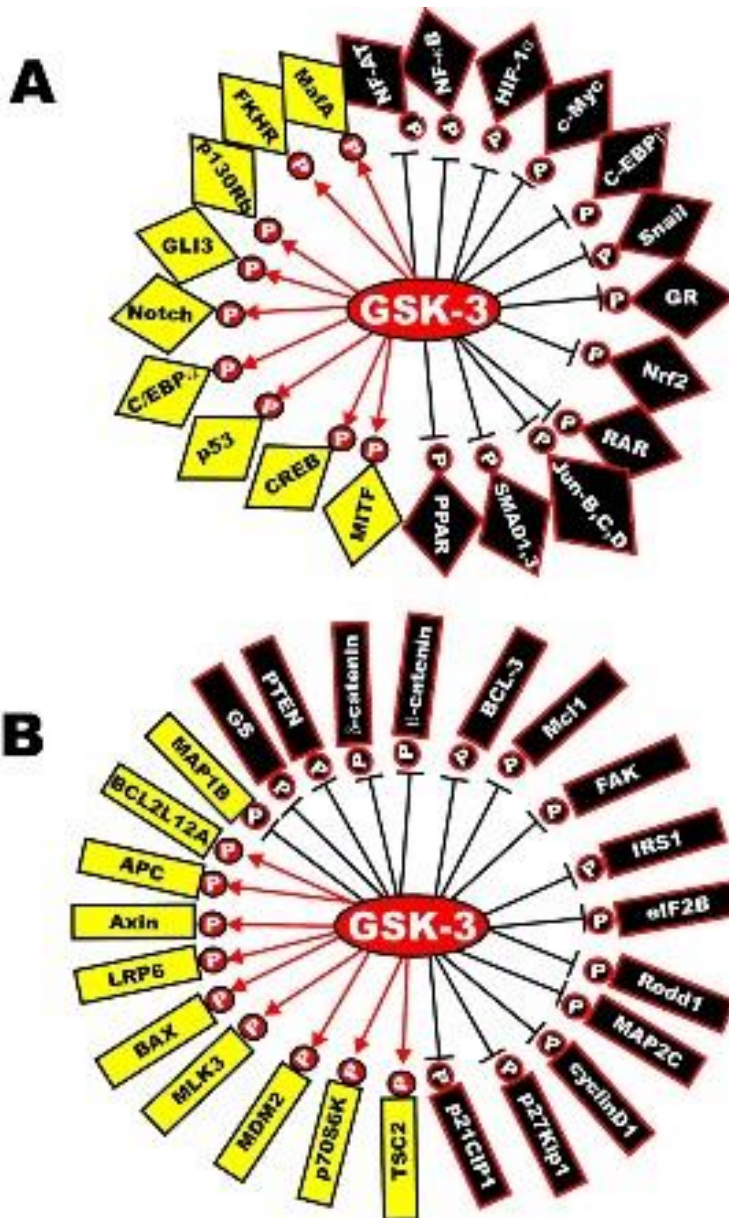


Abbildung 31: Die multiplen Auswirkungen von GSK3

(A) Transkriptionsfaktoren, die von GSK3 phosphoryliert werden. Aktivierung in gelb, Hemmung in schwarz.
 (B) Zahlreiche Proteine, die von GSK3 phosphoryliert werden. Aktivierung in gelb, Hemmung in schwarz.
 Das Diagramm soll eine Idee der Vielfältigkeit der Auswirkungen von GSK3 vermitteln (McCubrey et al., 2014)

GSK3 Inhibitoren werden kritisch beurteilt, wenn es um die Frage der Einführung in klinische Studien geht (Patel and Woodgett, 2008). Die Meinungen divergieren immer noch stark: GSK3 ist ein Haupthemmer von Wnt, Hedgehog und Notch Signalwegen. In diesen Signalwegen phosphoryliert GSK3 die protoonkogenen Moleküle β -catenin, c-Myc und c-Jun und markiert sie dadurch für Abbau und Inaktivierung. Dadurch wird Proliferation und Selbsterneuerung gehemmt. Jedoch sind diese Signalwege in unterschiedlichen Krebsarten fehlreguliert. Es wird befürchtet, dass GSK3 Inhibition

ektopische Signale nachahmen und somit Tumorgenese befördern könnte. Für diese These wurde allerdings noch kein Beweis, aber auch keine Falsifikation gefunden. Es wurden vielmehr Hinweise gefunden, dass GSK3 Inhibitoren Zellwachstum und Proliferation signifikant hemmen können (Patel and Woodgett, 2008).

Es konnten einige Auswirkungen von TDZD-8, die in vorliegendem Fall relevant erscheinen erläutert und analysiert werden. Im Vordergrund steht abschließend die schnelle Apoptoseinduktion von TDZD-8 auf Zellen der AML, sowie die deutliche Förderung des Zellzyklusarrests. Multiple Wirkorte der GSK3 β werden in nachfolgenden Experimenten noch weiter differenziert werden müssen.

4.3 Effekte von Temsirolimus auf putative leukämische Stammzellen

In Kapitel 1.3.3 wurde bereits beschrieben, dass es bei AML häufig zu einer Erhöhung von mTor und damit zu einer Überaktivierung des mTor Signalweges kommt. Dadurch entziehen sich die neoplastischen Zellen der Apoptose und steigern ihre Proliferation und ihr Wachstum. Der mTor-Inhibitor Temsirolimus zeigt in der vorliegenden Studie, dass er in der Lage ist, einige der ablaufenden Mechanismen zu hemmen. Es konnte gezeigt werden, dass unter der Behandlung die Zellen der KG-1a Linie zwar weiterhin wachsen, allerdings in ihrer absoluten Zellzahl deutlich eingeschränkt. Eine weitere Möglichkeit der Wachstumshemmung kann eine erhöhte Autophagozytoseaktivität sein. Im Jahr 2012 beschrieben Chiarini et al. (2012) einen erhöhten Level an beclin-1 und LC3B I/II bei AML Zelllinien, die für 24 Stunden mit $0,1\mu\text{M}$ Temsirolimus kultiviert wurden. Diese Marker gehen mit einer erhöhten Autophagozytoseaktivität einher. Es ergibt sich also die Frage, ob es sich bei der verminderten Zellzahl, relativ zur Leerprobe, um eine Einschränkung der Proliferation, eine erhöhte Autophagozytoseaktivität oder um eine Kombination beider Mechanismen handelt.

Betrachtet man die Zellzyklusveränderungen über 72 Stunden, konnte für alle verwendeten Konzentrationen festgestellt werden, dass eine Zunahme der Zellen in G0/G1 Stadium stattfindet und die Zellen sich in einen Zellzyklusarrest begeben. Diese Beobachtung wurde auch schon 2007 von Zeng et al. gemacht: bei einer Konzentration von $1,25\mu\text{M}$ bis $2,5\mu\text{M}$ stellte er nach 24 Stunden Kultivierung fest, dass die messenger RNA (mRNA) Level unter anderem für Cyclin d1 in AML Zelllinien um 60% herabgesetzt waren. Zeng führt diesen Effekt auf eine verminderte Aktivierung von AKT durch Inhibition von mTor2 zurück. Ein weiterer Effekt war die Dephosphorylierung von p70S6K und 4EBP1, wodurch auch die Translation der Cyclin d1 RNA inhibiert wurde (Zeng et al., 2007). Cyclin d1 bildet einen Komplex mit CDK4 oder CDK6 und ist gleichzeitig deren regulatorische Untereinheit. CDK4 und CDK6 steuern den Übergang des Zellzyklus vom G1 Stadium in das S-Stadium (Musgrove, 2006). Durch die Inhibition des Cyclin d1 kommt es zu einem Zellzyklusarrest. In der vorliegenden Studie konnten dieser Effekt sogar schon ab einer Konzentration von $0,1\mu\text{M}$ deutlich gemacht werden. Dies bestätigen auch Versuche, die 2012 von Chiarini gemacht wurden. Hierbei kam es bei der Behandlung mit $0,1\mu\text{M}$ Temsirolimus nach 24 Stunden zu einem deutlichen Anstieg des über den mTor Signalweg gesteuerten $p27^{\text{kip1}}$. $P27^{\text{kip1}}$ ist ebenfalls ein Regulator des Zellzyklus, allerdings ein Negativregulator. Die Erhöhung des $p27^{\text{kip1}}$ führt so ebenfalls zu einem Zellzyklusarrest in G0/G1

Bemerkenswert ist auch, dass sich dieser Effekt sowohl für Zellen zeigt, die an Tag 0 behandelt wurden, als auch für Zellen, die über drei Tage hinweg Temsirolimus erhalten haben. Dies könnte daraufhin deuten, dass die Hemmung durch Temsirolimus endlich ist. Die Angriffspunkte von Temsirolimus an mTor1 und mTor2 sind möglicherweise gesättigt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Temsirolimus in der vorliegenden Studie einen Zellzyklusarrest in G0/G1 verursacht und die Entwicklung der Zellen negativ beeinflusst. Die Ergebnisse bestätigen die Arbeiten von Zeng und Chiarini.

Im Folgenden wurde die Entwicklung der SP genauer betrachtet. Die in dieser Studie im Fokus stehenden LSCs stellen sich durch ihre spezifische Eigenschaften, wie in Kapitel 2.1.7 beschrieben, in der SP dar. Betrachtet man die Entwicklung der SP 2n und 4n bei täglicher Medikamentengabe so bemerkt man eine deutliche Zunahme nach 72 Stunden.

Eine Zunahme des Anteils der SPs bedeutet dabei, dass es einen erhöhten Anteil an Zellen gibt, die in der Lage sind den Hoechst Farbstoff aus der Zelle zu transportieren. Recher et al. beschrieben 2005 eine Abnahme der colony forming unit der Lymphozyten (CFU-L) unter Rapamycin. Rapamycin ist der molekulare Vorgänger des Temsirolimus. Bei der Behandlung von Patientenproben mit Rapamycin wurde eine deutliche Abnahme (80%) der CFU-L gezeigt, während die übrigen CFU, bspw. für Monozyten und Erythrozyten, unbeeinflusst blieben. Sie schließen aus diesem Experiment auf die AML Vorläuferzellen als Angriffsort des Rapamycins und folgert eine Abnahme der LSC. Die Tatsache, dass 4EBP1 und p70S6Kinase durch Rapamycin dephosphoryliert wurden, konnten Recher et al. ebenfalls bestätigen. Diese Dephosphorylierung führt im Weiteren zu einer generellen Abnahme der Translation (Recher et al., 2005a).

Die vorliegende Studie zeigt, gegenteilig zu Recher, dass der Anteil der LSC unter Temsirolimus zunimmt. Diese Entwicklung kann drei unterschiedliche Ursachen haben. Zum einen könnte eine Proliferation der LSC stattfinden, eine ABC durch Temsirolimus aktiviert werden, so dass Zellen, die sich bisher nicht in der SP dargestellt haben, in diese Phase rutschen, oder es könnte zu einem verzögerten Eintritt der LSC in den Zellzyklusarrest kommen, wodurch LSCs, die sich bisher in Phase S des Zellzyklus befanden, in die SP 2n zurückkommen. Eine weitere nicht zu vernachlässigende Frage ist, ob es sich nicht um eine relative Erhöhung der SP 2n handelt.

Es ist nicht ausgeschlossen, dass es zu einer Proliferation der LSC kommt. Dies ist jedoch nicht besonders plausibel, wenn man den zellulären Mechanismus von Temsirolimus betrachtet. Wie bereits beschrieben, werden zellzyklusregulatorische Proteine von mTor Inhibitoren eher gehemmt als gefördert. Man könnte spekulieren, ob die LSCs über eine Ras Überaktivierung und dem Wegfallen des negativen Feedbacks durch eine dephosphorylierte p70S6K in Folge von Temsirolimus der Inhibierung des Zellzyklus entgehen. Es ist bekannt, dass in AML Ras übermäßig aktiviert ist (Farr et al., 1988). Es stellt sich dennoch die Frage, warum dieser Mechanismus erst nach 72 Stunden und nur in den LSC zu beobachten sein sollte. Die Ras-Überaktivierung ist charakteristischerweise in allen Zellen der AML gegeben, daher hätten weitere Zellen der Inhibierung des Zellzyklus entkommen sollen. Somit hätte im Verlauf ein deutlicherer Anstieg der absoluten Zellzahl festgestellt werden müssen. Außerdem wäre die Verschiebung der behandelten Zellen von G2/M zu G0/G1 nicht schlüssig mit der aufgestellten These, da er eben eher mit einer Verminderung der Proliferation begründbar ist.

Eine weitere Hypothese ist die mögliche Induktion einer ATP-binding cassette. Diese ABC Transporter, zu denen auch MDR1 gehört, sind die Ursache, weshalb sich Zellen in der SP darstellen lassen (vgl. Kapitel 2.1.7). In unbehandelten KG-1a Zellen findet man in den putativen LSC andere Ausprägungen an ABC als in den differenzierten Zellen. Würde es durch Temsirolimus zu einer Zunahme der ABC in den differenzierteren Zellen kommen, so wären diese im Bereich der SP messbar, ohne tatsächlich LSC Eigenschaften zu besitzen. In der Literatur finden sich keine diese Hypothese bestätigende Ergebnisse. In der das Mammakarzinom betreffenden Forschung spielen ABC Transporter eine bedeutende Rolle. Temsirolimus wurde auch hier als vielversprechendes Medikament experimentell geprüft. Es findet sich jedoch kein Anzeichen darauf, dass Temsirolimus einen Einfluss auf die Expression oder Aktivität der ABC Transporter hat (LoRusso, 2013).

Bei der Suche nach möglichen Resistenzen gegenüber Temsirolimus, so gesehen in Nierenzellkarzinomzelllinien, wurde deutlich, dass Temsirolimus vor allem über die konsekutive Aktivierung von PI3K und Akt seiner eigenen Hemmung entkommt (Kornakiewicz et al., 2014) und nicht über Mechanismen der ABCs. Durch die Hemmung von mTor1 kommt es zu einem massiven Anstieg von PI3K und Akt, wodurch mTor2 aktiviert wird. Dies geschieht, da Temsirolimus vor allem in niedrigen Konzentrationen eine sehr geringe hemmende Wirkung auf mTor2 hat (Reikvam et al., 2013). In der

vorliegenden Studie spielt dieser Mechanismus allerdings keine Rolle, da die Konzentrationen an Temsirolimus oberhalb dieser Schwelle liegen. Überdies schließen die Resultate Wachstumshemmung und Zellzyklusarrest in G0/G1 aus.

Nach Betrachtung der Möglichkeiten ist es wahrscheinlich, dass es sich bei dem Anstieg der SP nach 72 Stunden um einen relativen Anstieg handelt. Durch die Behandlung mit Temsirolimus vermindert sich die absolute Zellzahl im Gegensatz zur Leerprobe. Reife Zellen sind womöglich sensitiver auf diese Hemmung, als unreife Vorläuferzellen. Diese halten dem Druck der Behandlung nach 72 Stunden noch stand. Hierfür könnten erhöhte Resistenzmechanismen, wie sie in HSCs bekannt sind, ursächlich sein (Reya et al., 2001). Diese Resistenzmechanismen ermöglichen den HSCs dem Einfluss von Medikamenten zu entkommen. In der Diskussion, aber noch nicht vollständig verstanden ist die Frage, ob LSCs diese Mechanismen ebenfalls besitzen.

Nach Analyse der Ergebnisse der Behandlungsversuche mit Temsirolimus stehen die Reduktion der absoluten Zellzahl, sowie die deutliche Induktion eines Zellzyklusarrests im Vordergrund.

4.4 Kritische Betrachtung der Hoechst Färbung im Hinblick auf die Identifikation von Stammzellen und Verhalten unter Behandlungsversuchen

4.4.1 Hoechst als funktionelles Assay vs. Antikörperfärbung von CD34

Bereits in Kapitel 1.2.4 wurde kurz das kontrovers diskutierte Thema der Phänotypisierung der LSCs angesprochen. Zur Identifikation der LSC wurde für die vorliegende Studie mit der Hoechst Färbung eine funktionelle Färbung gewählt. Funktionelle Färbungen sind im Gegensatz zu Antikörperfärbungen störanfälliger und benötigen besondere Vorsicht bei der Durchführung. Die exakte Einhaltung des Färbeprotokolls sowie möglichst kurze Bearbeitungszeiten der Zellen, wie zum Beispiel beim Waschen, sind nötig. Die Hoechst-Konzentration sowie die Inkubationsdauer haben hierbei einen relevanten Einfluss auf die Größe der SP. Dadurch sind die gemessenen Werte zwischen unterschiedlichen Laboren schwer vergleichbar, denn eine einheitlich verwendete Konzentration des Hoechstfarbstoffes ist nicht Standard (Golebiewska et al., 2011).

Ein weiterer Aspekt ist die Auswertung der gewonnenen Daten. Das subjektive Moment beim Gating der einzelnen Populationen kann zu schwankenden Ergebnissen bei unterschiedlichen Auswertern führen. Bei der Auswertung der vorliegenden Behandlungsdaten wurden daher sämtliche Messungen von der gleichen Person ausgewertet, um interpersonell bedingte Schwankungen der SP zu vermeiden. Weiter begegneten wir diesem Problem durch die Untergliederung der SP in die Subpopulationen Early SP, Intermediate SP sowie Late SP. Die Early SP und Intermediate SP liegen hierbei am nächsten zum Achsenursprung (vgl. Kapitel 2.1.7). Diese Zellen haben nun keinen fließenden Übergang mehr zur Hauptpopulation, sondern sind fest definiert (Mattes, 2013).

In Kapitel 2.1.7.1.1 wurde das Prinzip der Hoechstfärbung und die Bedeutung der SP beschrieben. In der Diskussion der Identifikation von LSCs zeigten Goodell et al. bei der Färbung von gesundem Knochenmark, dass sich in der SP vor allem HSCs mit dem Phänotyp CD34⁺/CD38⁻ befinden (Goodell et al., 1997). Diese Zellen waren in der Lage in vitro CFU zu bilden. Außerdem konnten sie in tödlich bestrahlten Mäusen ein hämatopoetisches System regenerieren, so dass die Mäuse überlebten (Goodell et al., 1996). Daraufhin ergab sich die Frage, ob sich dieses Erkenntnis und die Tatsache der hierarchischen Struktur der Leukämie (vgl. Kapitel 1.2.2) kombinieren ließe. Das heißt, ob die SP bei der Hoechstfärbung von AML Proben ebenfalls den Phänotyp CD34⁺

/CD38⁻ hat und in NOD/SCID anwachsen kann. Feuring-Buske (2001) zeigte in der Tat, dass in Patientenproben mit AML der überwiegende Teil der SP CD34⁺/CD38⁻ ist. Allerdings konnte durch diese Population in NOD/SCID Mäusen kein Anwachsen der AML bewirkt werden.

Als Grundlage für weitere Diskussionen, ist hier ein Einschub über die Identifizierung der putativen LSCs mit Hilfe der CDs an dieser Stelle essentiell. Als eine gängige Methode zur Abgrenzung des LSCs gilt immer noch die Darstellung über CDs. CD34⁺/CD38⁻ gilt weit verbreitet immer noch als gebräuchlicher Nachweis für LSCs. Es existieren einige Arbeiten, die das Anwachsen einer AML durch die Transplantation von CD34⁺/CD38⁻ in NOD/SCID Mäuse zeigen (Bonnet and Dick, 1997, Blair et al., 1998, Feuring-Buske, 2001). Anknüpfend an die Experimente von Feuring-Buske wurde dennoch festgestellt, dass CD34⁺/CD38⁻ Populationen ebenfalls in NOD/SCID Mäusen anwachsen können (Terpstra et al., 1996, Martelli et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass CD34⁺/CD38⁻ CD34⁺/CD38⁻ Zellen überlegen sind, was das Anwachsen in NOD/SCID Mäusen bzw. die CFU in vitro betrifft (Terpstra et al., 1996).

Die Tatsache, dass keine eindeutige Aussage über die Expression von CD34 in leukämischen Vorläuferzellen gemacht werden kann, macht CD34 nicht zum geeignetsten Marker für die Identifikation von LSCs. Einen allgemeinen „LSC-Phänotyp“, der über eine Kombination von CDs definiert wäre, gibt es höchstwahrscheinlich nicht (Ahlers, 2010). Dennoch zeigte sich während der Recherchen für diese Studie, dass viele Arbeiten die Wirkung einzelner Medikamente auf LSCs ausschließlich mit CD34 Immunophänotypisierung durchführen. Bug et al., als auch Nebbioso et al. postulieren in Kapitel 4.1, dass sich LSCs im gros der CD34⁺ Zellen finden. Durch ihre experimentelle Betrachtung dieser Population unter VPA beobachten sie dadurch eine Gattung an Zellen, die sich nicht bzw. kaum in der SP darstellen lassen.

Dadurch ergibt sich die Frage, in wie weit sich die erhobenen Daten mit jenen vergleichbar sind, die LSCs ausschließlich über CD34 charakterisieren.

Tatsächlich sind die Ergebnisse wahrscheinlich nicht direkt übertragbar, dennoch geben sie einen Anhaltspunkt. Medikamente, die CD34⁺ Zellpopulationen, d.h. Populationen, welche in NOD/SCID Mäusen anwachsen, reduzieren können, sind vielversprechend für die Reduktion von LSCs in unserem Versuchsaufbau.

Da in der vorliegenden Studie in einigen Fällen diese Reduktion durch bspw. VPA nicht bestätigt werden konnte, kann gemutmaßt werden, dass die Medikamente erst auf Zellen

in einem geringfügig differenzierteren Stadium wirken. Es ist vor allem für HSCs, aber auch für LSCs bekannt, dass diese ausgeprägte Resistenzmechanismen besitzen (Reya et al., 2001).

4.4.2 Verhalten der Hoechstfärbung unter Behandlungsversuchen

Um die Beurteilung der Daten der vorliegenden Studie zu komplettieren, wird im folgenden Absatz auf die Verwendung der Hoechstfärbung unter Medikamentengabe eingegangen.

In Kapitel 2.1.7.1.1 wurde beschrieben, dass bei der Hoechstfärbung die Abgrenzung der SP von der Hauptpopulation durch gerichteten Transport des Farbstoffs aus der Zelle erfolgt. Dieser Transport erfolgt mit Hilfe von Transmembrankanälen der ABC-Subfamilie. Nach Sequenzierung des menschlichen Genoms geht man davon aus, dass es 500 bis 1000 solcher Transporter gibt. Am besten beschrieben sind ABCB1 (auch MDR1 genannt), ABCC1-5 (auch MRP1-5 genannt) und ABCG2 (auch BRCP1 genannt) (Golebiewska et al., 2011).

Beeinflussung des Färbeverfahrens mit Hoechst durch VPA

Interessant bei der Verwendung von VPA ist in diesem Zusammenhang die Induktion von MDR1 und BRCP1 durch das Medikament. Nach Inkubation von KG-1a Zellen für 24 Stunden mit 3mM VPA zeigte sich ein milder Anstieg von MDR1 und eine Verdopplung von BRCP1 auf RNA Level (Hauswald et al., 2009). Dies müsste, in Konsequenz des oben genannten, in einen Anstieg der SP münden. MDR1 Expression scheint bei der Ausbildung der SP jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass MDR1 Knock-out Mäuse einen normalen Prozentsatz an SP im Knochenmark aufweisen. Erwartet wäre bei großem Einfluss von MDR1 auf die Bildung der SP ein verminderter Prozentsatz. Somit scheint MDR1 die SP nicht maßgeblich zu beeinflussen (Zhou et al., 2001). Hierauf aufbauende Experimente zeigten, dass es bei der Induktion von MDR1 mittels retroviralem Vektor zu einem Anstieg der SP um 3% kommt (Bunting et al., 2000). Bunting et al. verwendeten zwar dieselbe Konzentration an Hoechstfarbstoff wie hier, aber sie setzten die Inkubationszeit auf 90 Minuten herab. Die Expression der SP ist eine Funktion der Zeit. Der Anteil der SP wird größer, je länger die Zellen Zeit haben den Farbstoff herauszupumpen und anders herum (Ibrahim et al., 2007). Daher sind die Ergebnisse zwischen Bunting und dieser Arbeit nicht direkt zu übertragen.

Bei einem generell großen Anteil an SP sind Schwankungen von 3% von geringen Auswirkungen. Da die KG-1a Zelllinie allerdings unbehandelt nur eine SP von 1,2% besitzt (Mattes, 2013), fallen derartige Schwankungen sehr stark ins Gewicht.

Anders verhält es sich im Fall von BRCP1. BRCP1 Knock-out Mäuse zeigen multiple Defekte und eine deutliche Reduktion der SP in Knochenmark und Muskel. In funktionellen Assays weisen diese Mäuse eine normale Anzahl an HSCs auf, was bedeutet, dass sich HSCs durch das Fehlen des Transporters außerhalb der SP darstellen. Die induzierte Überexpression von BRCP1 wiederum führte zu einem Anstieg der SP um 62,5% (Zhou et al., 2001). Dies könnte bedeuten, dass für die vorliegende Studie ein Anstieg der SP, zumindest für 3,12mM, zu erwarten wäre. In Kapitel 3.1.2 findet sich ein leichter Anstieg der SP für 1,56mM und 3,12mM nach 24 Stunden, allerdings deutlich unter den von Zhou und Bunting beschriebenen 62% und auch 3%. Außerdem ist zu betonen, dass sich bei der Betrachtung der SP nach 48 und 72 Stunden kein Trend mehr ausmachen lässt, der in Bezug zu den genannten Veröffentlichungen gesetzt werden kann.

Beeinflussung des Färbeverfahrens mit Hoechst durch TDZD-8

In Kapitel 4.2 wurde der membrandestabilisierende Effekt von TDZD-8 kurz angesprochen. Als hydrophobes Molekül ist TDZD-8 in der Lage sich in die Lipidmembran der Zellen einzulagern. Die Unversehrtheit der Zellmembran ist für die Hoechstfärbung äußerst wichtig. Die Aufnahme von Hoechstfarbstoff kann durch relativ kleine Veränderungen in der Permeabilität der Membran gesteigert werden. Genauso kann es zu einem vermehrten Ausstrom von Farbstoff in Zellen kommen, die sich normalerweise nicht in der SP darstellen würden (Guzman et al., 2007). Folglich könnte die Aussagekraft der Hoechstfärbung unter TDZD-8 eingeschränkt sein. Der Effekt, den Guzman et al. beschreiben, findet allerdings sehr schnell statt und führt in vielen Fällen zur Apoptose der behandelten Zellen. Diesem verzerrenden Effekt wird dadurch entgangen, dass in der vorliegenden Studie der früheste Messpunkt 24 Stunden nach Behandlung mit TDZD-8 liegt. In dieser Zeitspanne ist davon auszugehen, dass Zellen, deren Membran durch TDZD-8 permeabel gemacht wurde, in die Apoptose gegangen sind. Spätestens nach 72 Stunden sollte dieser Effekt gänzlich unerheblich sein.

Zusammengefasst zeigt sich die Hoechstfärbung als ein deutlich störanfälliges Assay, sowohl auf Ebene der Durchführung, als auch auf zellulärer Ebene. Nach Stand der Wissenschaft wurden die Umwelteinflüsse so gering wie möglich gehalten. Dennoch

bleibt offen, ob die aufgetretenen Schwankungen auf die Wirkung des Medikamentes oder auf die Hoechstfärbung zurückzuführen sind.

4.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit dient als Ausgangspunkt für weitere Versuche. Es wird interessant sein, VPA sowie TDZD-8 in Langzeitversuchen mit täglicher Medikamentengabe zu untersuchen.

Die erhobenen Ergebnisse werden in die Arbeit der AG Ebinger eingehen. Spannend wird auch die Prüfung der drei verwendeten Medikamente in einem in vivo Modell sein. In vitro Studien, wie im vorliegenden Fall, sind ein künstliches System verglichen mit in vivo Modellen. Sie sind eine Methode mit nur einem Kompartiment und können immer nur einen kleinen Teil des Systems wiedergeben. So lassen sich gezielt einzelne Glieder einer langen Kette an Ereignissen untersuchen. Um die vollständige Auswirkung auf den Organismus noch näher zu untersuchen, ist es aber hilfreich die erhobenen Ergebnisse in einer in vivo Studie zu verifizieren und noch weitere Auswirkungen der Behandlung zu ergründen. Übertragen geben die Erkenntnisse über die Förderung des Zellzyklusarrests durch VPA, TDZD-8 und Temsirolimus in vitro für eine solche Untersuchung eine interessante Grundlage.

VPA wird in der letzten Zeit klinisch vor allem in Kombination mit anderen Medikamenten getestet. Dabei wird sich der antiproliferative Effekt zu Nutze gemacht und die Kombinationen zur Krankheitsstabilisierung getestet. Vor allem bei näheren Erkenntnissen über die Inhibierung der Differenzierung von AML-Zellen unter VPA gilt es, das Medikament genauer zu untersuchen.

Es konnten einige Auswirkungen von TDZD-8, die in vorliegendem Fall relevant erscheinen, erläutert und analysiert werden. Im Vordergrund steht abschließend die schnelle Apoptoseinduktion von TDZD-8 auf Zellen der AML, sowie die deutliche Förderung des Zellzyklusarrests. In aktuellen Veröffentlichungen wird TDZD-8 in unterschiedlichen Bereichen getestet. So finden sich Publikationen zum Einfluss von TDZD-8 auf die Entwicklung einer Fibrose nach renaler Ischämie, die Rolle für die Amphetaminausschüttung im präfrontalen Cortex und den Stellenwert in der Differenzierung von T-regulatorischen Zellen (Singh et al., 2015, Xia et al., 2015, Yen et al., 2015). Dieser vielfältige Einsatz macht noch einmal deutlich, dass die Rolle von TDZD-8 noch ungewiss ist und Erkenntnisse zum Wirkmechanismus noch nicht

vollständig begriffen sind. Somit gilt es, die multiplen Wirkorte der GSK3 β und die Folgen ihrer Inhibierung in nachfolgenden Experimenten noch weiter zu differenzieren.

Temsirolimus zeigte in den vorliegenden Experimenten den stärksten Einfluss auf die Zellzahl, ohne eine hohe Toxizität auf die Zellen zu haben. Die deutliche Förderung eines Zellzyklusarrests wird zurzeit in klinischen Studien, vor allem in Kombinationstherapien genutzt. Von Temsirolimus ist bekannt, dass es in vitro mit Stromazellen interagiert. Durch die Inhibierung des mTor Signalwegs werden die Proliferation der Stromazellen (Fibroblasten, Endothelzellen, Osteoblasten) und die Ausschüttung von angioproliferativen Substanzen gehemmt (Reikvam et al., 2013). Diese Erkenntnisse und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind beachtlich im Hinblick auf die Durchführung einer Versuchsreihe mit einem in vivo Leukämiemodell.

Interessant wäre die Kombinationstherapie von VPA und Temsirolimus, die in Burkitt Lymphomen einen deutlichen synergistischen Effekt zeigten. Die Autophagozytoseaktivität wurde stark erhöht und das Zellwachstum unterdrückt, während gesunde Zellen von diesen Auswirkungen nicht betroffen waren (Dong et al., 2013). Eine Versuchsreihe in vitro mit einer Kombination von VPA und Temsirolimus wäre ein möglicher erster Schritt diesen Beobachtungen zu folgen.

Das Vorhandensein von LSCs ist nicht mehr Teil der Diskussion in der Forschung. Fest steht, dass es eine solche Zellart gibt. Es stellt sich aktuell die Frage, wie man diese Zellen charakterisieren und pharmakologisch angreifen kann. Drei verschiedene Möglichkeiten wurden in der vorliegenden Arbeit getestet. Auswirkungen dieser Medikamente auf die AML Zelllinie KG-1a wurden gesammelt und diskutiert. Neue Erkenntnisse wurden mit bestehenden Publikationen verglichen und erörtert. Somit wurde ein Baustein in der Erkenntnis der Vorgänge in der AML und der Wirkungen einzelner Medikamente gelegt.

Abschließend kann nach ausführlichem Studium der Thematik gesagt werden, dass die Diskussion um den Phänotyp und den Nachweis der LSCs noch mehr Klarheit braucht um Versuche auf dem Gebiet der Reduktion von Stammzellen zu validieren.

5 Literaturverzeichnis

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2012) Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Saunders/Elsevier.
- Ahlers J (2010) Identifikation einer Zellpopulation mit Stammzellmarkern mit Korrelation zum klinischen Verlauf bei Diagnosestellung. In: Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Abteilung Kinderheilkunde I Tübingen: Universität Tübingen.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404:193-197.
- Bar-Natan M, Nelson EA, Xiang M, Frank DA (2012) STAT signaling in the pathogenesis and treatment of myeloid malignancies. *Jak-Stat* 1:55-64.
- Barbetti V, Gozzini A, Cheloni G, Marzi I, Fabiani E, Santini V, Dello Sbarba P, Rovida E (2013) Time- and residue-specific differences in histone acetylation induced by VPA and SAHA in AML1/ETO-positive leukemia cells. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 8:210-219.
- Berger DP (2006) Das rote Buch : Hämatologie und internistische Onkologie. Landsberg/Lech: Ecomed Medizin.
- Berger DP, Engelhardt R, Mertelsmann R (2014) Das Rote Buch : Hämatologie und Internistische Onkologie. Heidelberg; München; Landsberg; Frechen; Hamburg: ecomed Medizin.
- Bertoncello I, Williams B (2004) Hematopoietic stem cell characterization by Hoechst 33342 and rhodamine 123 staining. *Methods in molecular biology* 263:181-200.
- Blair A, Hogge DE, Sutherland HJ (1998) Most acute myeloid leukemia progenitor cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo have the phenotype CD34(+)/CD71(-)/HLA-DR. *Blood* 92:4325-4335.
- Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF, Davis RE, Naumovski L, Ohtsuki K, Kopiwoda S, Abrams MJ, Strauss HW (1999) Imaging of apoptosis (programmed cell death) with 99mTc annexin V. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 40:184-191.
- Bonnet D, Dick JE (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* 3:730-737.
- Bradbury CA, Khanim FL, Hayden R, Bunce CM, White DA, Drayson MT, Craddock C, Turner BM (2005) Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia* 19:1751-1759.
- Bug G, Ritter M, Wassmann B, Schoch C, Heinzl T, Schwarz K, Romanski A, Kramer OH, Kampfmann M, Hoelzer D, Neubauer A, Ruthardt M, Ottmann OG (2005) Clinical trial of valproic acid and all-trans retinoic acid in patients with poor-risk acute myeloid leukemia. *Cancer* 104:2717-2725.
- Bug G, Schwarz K, Schoch C, Kampfmann M, Henschler R, Hoelzer D, Ottmann OG, Ruthardt M (2007) Effect of histone deacetylase inhibitor valproic acid on progenitor cells of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 92:542-545.

- Bunting KD, Zhou S, Lu T, Sorrentino BP (2000) Enforced P-glycoprotein pump function in murine bone marrow cells results in expansion of side population stem cells in vitro and repopulating cells in vivo. *Blood* 96:902-909.
- Buss H, Dorrie A, Schmitz ML, Frank R, Livingstone M, Resch K, Kracht M (2004) Phosphorylation of serine 468 by GSK-3 β negatively regulates basal p65 NF- κ B activity. *The Journal of biological chemistry* 279:49571-49574.
- Campana D (2008) Status of minimal residual disease testing in childhood haematological malignancies. *British journal of haematology* 143:481-489.
- Challen GA, Goodell MA (2011) Bridge over troubled stem cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19:1756-1758.
- Challen GA, Little MH (2006) A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem cells* 24:3-12.
- Cheng YC, Lin H, Huang MJ, Chow JM, Lin S, Liu HE (2007) Downregulation of c-Myc is critical for valproic acid-induced growth arrest and myeloid differentiation of acute myeloid leukemia. *Leukemia research* 31:1403-1411.
- Cheng YL, Huang WC, Chen CL, Tsai CC, Wang CY, Chiu WH, Chen YL, Lin YS, Chang CF, Lin CF (2011) Increased galectin-3 facilitates leukemia cell survival from apoptotic stimuli. *Biochemical and biophysical research communications* 412:334-340.
- Chiarini F, Lonetti A, Teti G, Orsini E, Bressanin D, Cappellini A, Ricci F, Tazzari PL, Ognibene A, Falconi M, Pagliaro P, Iacobucci I, Martinelli G, Amadori S, McCubrey JA, Martelli AM (2012) A combination of temsirolimus, an allosteric mTOR inhibitor, with clofarabine as a new therapeutic option for patients with acute myeloid leukemia. *Oncotarget* 3:1615-1628.
- Collino M, Thiemermann C, Mastrocola R, Gallicchio M, Benetti E, Miglio G, Castiglia S, Danni O, Murch O, Dianzani C, Aragno M, Fantozzi R (2008) Treatment with the glycogen synthase kinase-3 β inhibitor, TDZD-8, affects transient cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat hippocampus. *Shock* 30:299-307.
- Conway O'Brien E, Prideaux S, Chevassut T (2014) The epigenetic landscape of acute myeloid leukemia. *Advances in hematology* 2014:103175.
- Creutzig U, van den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B, Dworzak MN, Adachi S, de Bont E, Harbott J, Hasle H, Johnston D, Kinoshita A, Lehrnbecher T, Leverger G, Mejstrikova E, Meshinchi S, Pession A, Raimondi SC, Sung L, Stary J, Zwaan CM, Kaspers GJ, Reinhardt D, Group AMLCotIBS (2012) Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood* 120:3187-3205.
- Dempke W (2006) *Lehrbuch Hämato-Onkologie*. Hans Huber Verlag, Bern.
- Dong LH, Cheng S, Zheng Z, Wang L, Shen Y, Shen ZX, Chen SJ, Zhao WL (2013) Histone deacetylase inhibitor potentiated the ability of MTOR inhibitor to induce autophagic cell death in Burkitt leukemia/lymphoma. *Journal of hematology & oncology* 6:53.
- Farr CJ, Saiki RK, Erlich HA, McCormick F, Marshall CJ (1988) Analysis of RAS gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:1629-1633.

- Feuring-Buske M (2001) Hoechst 33342 efflux identifies a subpopulation of cytogenetically normal CD34+CD38- progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 97:3882-3889.
- Golebiewska A, Brons NH, Bjerkvig R, Niclou SP (2011) Critical appraisal of the side population assay in stem cell and cancer stem cell research. *Cell stem cell* 8:136-147.
- Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *The Journal of experimental medicine* 183:1797-1806.
- Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, Grupp SA, Sieff CA, Mulligan RC, Johnson RP (1997) Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nature medicine* 3:1337-1345.
- Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *The EMBO journal* 20:6969-6978.
- Guzman ML, Li X, Corbett CA, Rossi RM, Bushnell T, Liesveld JL, Hebert J, Young F, Jordan CT (2007) Rapid and selective death of leukemia stem and progenitor cells induced by the compound 4-benzyl, 2-methyl, 1,2,4-thiadiazolidine, 3,5 dione (TDZD-8). *Blood* 110:4436-4444.
- Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, Grimes B, Howard DS, Rizzieri DA, Luger SM, Jordan CT (2001) Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 98:2301-2307.
- Hauswald S, Duque-Afonso J, Wagner MM, Schertl FM, Lubbert M, Peschel C, Keller U, Licht T (2009) Histone deacetylase inhibitors induce a very broad, pleiotropic anticancer drug resistance phenotype in acute myeloid leukemia cells by modulation of multiple ABC transporter genes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15:3705-3715.
- Hay N, Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development* 18:1926-1945.
- Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 406:86-90.
- Hourigan CS, Karp JE (2013) Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Nature reviews Clinical oncology* 10:460-471.
- Ibrahim SF, Diercks AH, Petersen TW, van den Engh G (2007) Kinetic analyses as a critical parameter in defining the side population (SP) phenotype. *Experimental cell research* 313:1921-1926.
- Jordan CT (2007) The leukemic stem cell. *Best practice & research Clinical haematology* 20:13-18.
- Kern W, Schoch C, Haferlach T, Schnittger S (2005) Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Critical reviews in oncology/hematology* 56:283-309.

- Kornakiewicz A, Solarek W, Bielecka ZF, Lian F, Szczylik C, Czarnecka AM (2014) Mammalian Target of Rapamycin Inhibitors Resistance Mechanisms in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Current signal transduction therapy* 8:210-218.
- Kuendgen A, Schmid M, Schlenk R, Knipp S, Hildebrandt B, Steidl C, Germing U, Haas R, Dohner H, Gattermann N (2006) The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid as monotherapy or in combination with all-trans retinoic acid in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer* 106:112-119.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367:645-648.
- LoRusso PM (2013) Mammalian target of rapamycin as a rational therapeutic target for breast cancer treatment. *Oncology* 84:43-56.
- Manning BD, Cantley LC (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261-1274.
- Martelli AM, Chiarini F, Evangelisti C, Cappellini A, Buontempo F, Bressanin D, Fini M, McCubrey JA (2012) Two hits are better than one: targeting both phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin as a therapeutic strategy for acute leukemia treatment. *Oncotarget* 3:371-394.
- Martelli AM, Chiarini F, Evangelisti C, Grimaldi C, Ognibene A, Manzoli L, Billi AM, McCubrey JA (2010) The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/mammalian target of rapamycin signaling network and the control of normal myelopoiesis. *Histology and histopathology* 25:669-680.
- Mattes M (2013) Manipulation der Zellpopulation mit differenziellen Stammzellkriterien in definierten Zelllinien akuter Leukämien. Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Abteilung Kinderheilkunde I Tübingen: Universität Tübingen.
- McCubrey JA, Davis NM, Abrams SL, Montalto G, Cervello M, Basecke J, Libra M, Nicoletti F, Cocco L, Martelli AM, Steelman LS (2014) Diverse roles of GSK-3: tumor promoter-tumor suppressor, target in cancer therapy. *Advances in biological regulation* 54:176-196.
- Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K (2000) AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:7521-7526.
- Musgrove EA (2006) Cyclins: roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation. *Growth factors* 24:13-19.
- Nebbioso A, Clarke N, Voltz E, Germain E, Ambrosino C, Bontempo P, Alvarez R, Schiavone EM, Ferrara F, Bresciani F, Weisz A, de Lera AR, Gronemeyer H, Altucci L (2005) Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nature medicine* 11:77-84.
- Ogawa M (2002) Changing phenotypes of hematopoietic stem cells. *Experimental hematology* 30:3-6.
- Patel S, Woodgett J (2008) Glycogen synthase kinase-3 and cancer: good cop, bad cop? *Cancer cell* 14:351-353.

- Recher C, Beyne-Rauzy O, Demur C, Chicanne G, Dos Santos C, Mas VM, Benzaquen D, Laurent G, Huguet F, Payrastre B (2005a) Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood* 105:2527-2534.
- Recher C, Dos Santos C, Demur C, Payrastre B (2005b) mTOR, a new therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Cell cycle* 4:1540-1549.
- Reikvam H, Nepstad I, Bruserud O, Hatfield KJ (2013) Pharmacological targeting of the PI3K/mTOR pathway alters the release of angioregulatory mediators both from primary human acute myeloid leukemia cells and their neighboring stromal cells. *Oncotarget* 4:830-843.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105-111.
- Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA (2000) Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:10014-10019.
- Robles-Escajeda E, Lerma D, Nyakeriga AM, Ross JA, Kirken RA, Aguilera RJ, Varela-Ramirez A (2013) Searching in mother nature for anti-cancer activity: anti-proliferative and pro-apoptotic effect elicited by green barley on leukemia/lymphoma cells. *PloS one* 8:e73508.
- Rossig L, Badorff C, Holzmann Y, Zeiher AM, Dimmeler S (2002) Glycogen synthase kinase-3 couples AKT-dependent signaling to the regulation of p21Cip1 degradation. *The Journal of biological chemistry* 277:9684-9689.
- Ryningen A, Reikvam H, Nepstad I, Paulsen Rye K, Bruserud O (2012) Inhibition of Mammalian target of rapamycin in human acute myeloid leukemia cells has diverse effects that depend on the environmental in vitro stress. *Bone marrow research* 2012:329061.
- Sanchez JF, Sniderhan LF, Williamson AL, Fan S, Chakraborty-Sett S, Maggirwar SB (2003) Glycogen synthase kinase 3beta-mediated apoptosis of primary cortical astrocytes involves inhibition of nuclear factor kappaB signaling. *Molecular and cellular biology* 23:4649-4662.
- Schmitz S (2011) *Der Experimentator: Zellkultur*: Spektrum Akademischer Verlag.
- Singh SP, Tao S, Fields TA, Webb S, Harris RC, Rao R (2015) Glycogen synthase kinase-3 inhibition attenuates fibroblast activation and development of fibrosis following renal ischemia/reperfusion in mice. *Disease models & mechanisms*.
- ten Cate B, de Bruyn M, Wei Y, Bremer E, Helfrich W (2010) Targeted elimination of leukemia stem cells; a new therapeutic approach in hemato-oncology. *Current drug targets* 11:95-110.
- Terpstra W, Prins A, Ploemacher RE, Wognum BW, Wagemaker G, Lowenberg B, Wielenga JJ (1996) Long-term leukemia-initiating capacity of a CD34-subpopulation of acute myeloid leukemia. *Blood* 87:2187-2194.
- Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L (1964) A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 51:29-36.

- Tung JW, Heydari K, Tirouvanziam R, Sahaf B, Parks DR, Herzenberg LA, Herzenberg LA (2007) Modern flow cytometry: a practical approach. *Clinics in laboratory medicine* 27:453-468, v.
- Valent P (2011) Targeting of leukemia-initiating cells to develop curative drug therapies: straightforward but nontrivial concept. *Current cancer drug targets* 11:56-71.
- Vidal A, Koff A (2000) Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 247:1-15.
- Wang Z, Smith KS, Murphy M, Piloto O, Somerville TC, Cleary ML (2008) Glycogen synthase kinase 3 in MLL leukaemia maintenance and targeted therapy. *Nature* 455:1205-1209.
- Weissman IL, Anderson DJ, Gage F (2001) Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annual review of cell and developmental biology* 17:387-403.
- Xia Y, Zhuo H, Lu Y, Deng L, Jiang R, Zhang L, Zhu Q, Pu L, Wang X, Lu L (2015) Glycogen synthase kinase 3beta inhibition promotes human iTreg differentiation and suppressive function. *Immunologic research* 62:60-70.
- Xie C, Edwards H, Lograsso SB, Buck SA, Matherly LH, Taub JW, Ge Y (2012) Valproic acid synergistically enhances the cytotoxicity of clofarabine in pediatric acute myeloid leukemia cells. *Pediatric blood & cancer* 59:1245-1251.
- Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA (2007) Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 26:5541-5552.
- Yen YC, Gassen NC, Zellner A, Rein T, Landgraf R, Wotjak CT, Anderzhanova E (2015) Glycogen synthase kinase-3beta inhibition in the medial prefrontal cortex mediates paradoxical amphetamine action in a mouse model of ADHD. *Frontiers in behavioral neuroscience* 9:67.
- Zeng Z, Sarbassov dos D, Samudio IJ, Yee KW, Munsell MF, Ellen Jackson C, Giles FJ, Sabatini DM, Andreeff M, Konopleva M (2007) Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. *Blood* 109:3509-3512.
- Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP (2001) The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nature medicine* 7:1028-1034.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: FAB-Klassifikation der AML.....	2
Tabelle 1.2: WHO Klassifikation akuter myeloischer Leukämien 2008	3
Tabelle 2.1: Geräte und Verbrauchsmaterial.....	19
Tabelle 2.2: Allgemeine Chemikalien	20
Tabelle 2.3: Stammlösungen	20
Tabelle 2.4: Verwendete Reagenzien	21
Tabelle 2.5: EDV.....	21
Tabelle 2.6: Laserkonfiguration.....	29
Tabelle 2.7: Behandlungsansatz Valproat.....	36
Tabelle 2.8: Behandlungsansatz TDZD-8	36
Tabelle 2.9: Behandlungsansatz Temsirolimus.....	37

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Resultat der Leukämiebehandlung unter Betrachtung der MRD	8
Abbildung 2: Hämatopoese.....	11
Abbildung 3: Hypothesen zur Entwicklung der LSC	12
Abbildung 4: Leukämie folgt einer hierarchischen Ordnung.	13
Abbildung 5: Charakteristisches Bild der SP	25
Abbildung 6: Beispiel der Inhibierung mit Verapamil	26
Abbildung 7: Konfiguration des blauen Lasers (488nm),	29
Abbildung 8: Konfiguration des violetten Lasers (405nm) und des roten Lasers (633nm)	30
Abbildung 9: Konfiguration UV-Laser (355nm).....	30
Abbildung 10: Gate-Hierarchie.....	31
Abbildung 11: SP 2n	33
Abbildung 12: Backgating Darstellung der SP 4n(a) und 2n (b) im Scatterplot innerhalb des vital Gates.....	33
Abbildung 13: Wirkung von Valproat auf die Zellzahl der AML im Verlauf von 72h.....	38
Abbildung 14: Entwicklung des Anteils toter Zellen an der Gesamtmenge der Zellen unter Behandlung mit Valproat über 72h.....	39
Abbildung 15: Wirkung von Valproat auf die Entwicklung des Zellzyklus nach FACS Analyse der behandelten KG-1a Zellen	41
Abbildung 16: Wirkung von Valproat auf die Entwicklung der Zellen in SP early+intermediate 2n anteilig an G0/G1 bei Medikamentengabe an Tag 0	42
Abbildung 17: Wirkung von Valproat auf die Entwicklung der Zellen in SP early+intermediate 4n anteilig an G2/M bei Medikamentengabe an Tag 0	43
Abbildung 18: Wirkung von TDZD-8 auf die Zellzahl der AML nach Analyse mittels ABX CellCount.....	44
Abbildung 19: Entwicklung toter Zellen unter TDZD-8 im Verlauf von 72h	45
Abbildung 20: Wirkung von TDZD-8 auf die Entwicklung des Zellzyklus der AML. Nach FACS Analyse der Versuchsreihe mit KG-1a Zellen	46
Abbildung 21: Wirkung von TDZD-8 auf die Entwicklung von Zellen in SP early+intermediate 2n anteilig an G0/G1.....	47
Abbildung 22: Wirkung von TDZD-8 auf die Entwicklung von Zellen in SP early+intermediate 4n	48
Abbildung 23: Wirkung von Temsirolimus auf die Zellzahl der AML im Verlauf von 72h	49

Abbildung 24: Wirkung von Temsirolimus auf die Entwicklung des Zellzyklus der AML bei einmaliger Medikamentengabe an Tag 0 51

Abbildung 25: Wirkung von Temsirolimus auf die Entwicklung des Zellzyklus der AML bei täglicher Medikamentengabe 52

Abbildung 26: Wirkung von Temsirolimus auf die Entwicklung von Zellen in SP early+intermediate 2n anteilig an G0/G1 bei Medikamentengabe an Tag 0 53

Abbildung 27: Wirkung von Temsirolimus auf die Entwicklung von Zellen in SP early+intermediate 2n anteilig an G0/G1 bei täglicher Medikamentengabe..... 54

Abbildung 28: Wirkung von Temsirolimus auf die Entwicklung von Zellen in SP early+intermediate 4n anteilig an G2/M bei Medikamentengabe an Tag 0 55

Abbildung 29: Wirkung von Temsirolimus auf die Entwicklung von Zellen in SP early+intermediate 4n anteilig an G2/M bei täglicher Medikamentengabe..... 56


Abbildung 30: FLT3 Signalweg in AML Zelllinien und Blasten..... 66

Abbildung 31: Die multiplen Auswirkungen von GSK3 68

Publikationsverzeichnis

Teile dieser Dissertationsschrift wurden bereits als Poster publiziert:

Im Rahmen der Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) 2014 in Hamburg



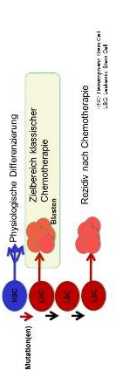
**UNIVERSITÄT
KLINIKUM
TÜBINGEN**

**Selektive Reduktion putativer Stammzellen der Leukämie
- anhand der AML Zell-Linie KG-1a -**

Sophie Mack, Kai Witte, Martin Ebinger
Abteilung Kinderheilkunde I Allg. Pädiatrie, Hämatologie, Onkologie
Kontakt: Sophie Mack • Abt. Kinderheilkunde I • Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin • Hippus-Str. 1 • 72076 Tübingen
E-mail: Sophie-Rosalie.Mack@student.uni-tuebingen.de


Einleitung

Akute myeloische Leukämie tritt als Folge der malignen Transformation in hämatopoetischen Stammzellen (LSC) auf. Diese Transformation ist der Ausgangspunkt für die Anbahnung von AML Blasten. Das Ziel der heute verwendeten klassischen Chemotherapie ist die Reduktion dieser Blasten, was in der Regel gelingt. Dennoch bleibt die Prognose für die Patienten mit akuter myeloischer Leukämie schleicht. Chemotherapie werden durch intensive Chemotherapie nicht vollständig verdrängt. Sie führen zum Progress der Krankheit und zu Rezidiven. Daher wird eine neue Klasse an Substanzen gesucht, um den Ursprung der AML, die leukämischen Stammzellen anzugreifen.



Fragestellung

Ziel der Studie ist es, verschiedene Medikamente auf ihre Potenz hin zu untersuchen, LSC zu reduzieren.



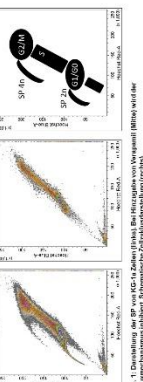
Temsirolimus ist ein Derivat des mTOR Inhibitors Rapamycin. Dadurch, dass der mTOR Pathway in vielen humanen AML erhöht ist, stellt Temsirolimus eine vielversprechende Möglichkeit der Behandlung dar.

Valproate ist ein Histoneacetylaseinhibitor. Vor allem in humanen Leukämien steht die Veränderung der Histoneacetylierung im Verdacht, Teil der Krankheitsentstehung zu sein. Die Wiederherstellung des aufgehobenen Mechanismus mit Hilfe von Valproate stellt eine neue Möglichkeit zur Behandlung der AML dar.

TDZD-8 ist ein Inhibitor der GSK-3beta. Leukämische Zellen nutzen den GSK3beta/Galactin3 Mechanismus um dem apoptotischen Stimuli zu entkommen.

Material und Methoden

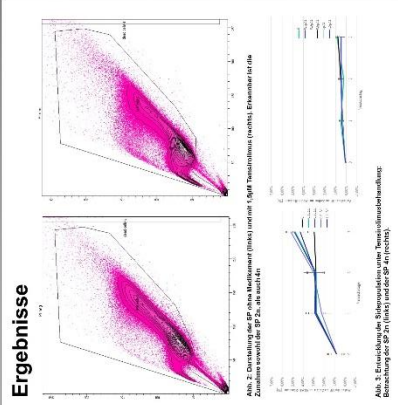
a) Hoechst-Färbung:
Der Färbstoff Hoechst 33342 lagert sich in die kleinen Furchen der DNA im Zellkern an. Das damit gemessene Signal ist abhängig vom DNA Gehalt der Stammzellen. Zellen in den frühen Stadien der Zellzyklus (Leukämische Stammzellen) zeigen ein höheres Fluoreszenzsignal. Eine Voranreicherung herauszuwählen, wodurch sich ihr Signal deutlich ändert. Diese Voranreicherung lässt sich nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten im Durchflusszytometer darstellen. Die LSC zeigen sich als Schwefel (Sidepopulation, SP) ausgehend von den Hauptpopulationen CD45⁺ und CD34⁺.



b) Verwendete Zelllinie:
KG-1a ist eine unimmortalisierte Variante der KG-1a Zelllinie. Sie weist im Gegensatz zu KG-1 eine deutlichere SP in der Hoechstfärbung auf.

c) Medikamente:
In Zellkultur gehaltene Zellen wurden mit folgenden Wirkstoffen für 72 Stunden bei unterschiedlichen Konzentrationen (0,1µM bis 10 µM) inkubiert, mit einem Zellcounter gezählt, die Morphologie mikroskopisch kontrolliert und anschließend mit Hoechst gefärbt.

Ergebnisse



Zusammenfassung und Ausblick
Bei einmaliger Medikamentengabe zeichnet sich nur bei TDZD-8 eine leichte Zunahme der SP ab. Für die beiden anderen Medikamente ist dies nicht zu beobachten. Grund dafür sind wahrscheinlich die kurzen Halbwertszeiten von unter 20 Stunden. Daher wurde eine tägliche Gabe angesetzt. Bei dieser mütterlich längeren Effektdauer konnte die Zahl der leukämischen Medikamentengabe zugänglich machen, da der Zustand der Quieszenz verlassen wird.

In weiteren Versuchen wird die tägliche Medikamentengabe für TDZD-8 und in zukünftigen Behandlungsversuchen gilt es außerdem Temsirolimus mit konventionellen Chemotherapeutika zu kombinieren um sich den oben beschriebenen Effekt zu Nutzen zu machen.

Danksagung

Herzlichen Dank an das IZKF-Promotionskolleg und der Deutschen José Carreras Leukämie-Stiftung e.V. für die finanzielle, so wie die fachliche Unterstützung dieser Arbeit im Rahmen der Ringvorlesungen und Kollegialenseminare. Besonderen Dank auch an Michael Maltas.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift