

**Synergistische Apoptose-Induktion durch  
Valproinsäure und Dexamethason –  
Histondeacetylase-Inhibitoren als potentielle Wirkstoffe  
gegen Akute Lymphatische Leukämie**

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Kaiserslautern  
zur Verleihung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
genehmigte Dissertation

(D386)

vorgelegt von  
Diplom-Chemikerin  
Alexandra Groß

Tag der wissenschaftlichen Aussprache:  
26. Oktober 2006

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2001 bis September 2006 am Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thorsten Heinzel.

Die Betreuung an der Technischen Universität Kaiserslautern erfolgte durch Prof. Dr. Wolfgang Trommer, Fachbereich Chemie Abteilung Biochemie.

**Promotionskommission:**

Vorsitzender:	Prof. Dr.-Ing. S. Ernst
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Trommer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. T. Heinzel

*Für meine Familie*

Es ist nicht genug zu wissen, man muss auch anwenden;  
Es ist nicht genug zu wollen, man muss auch tun.

*Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Chromatinstruktur in Eukaryoten .....	1
1.2 Chromatin vermittelt basale Repression .....	3
1.3 Enzymatische Modifikationen des Chromatins .....	4
1.4 Histonacetyltransferasen und Histondeacetylasen .....	7
1.5 Abweichende HAT und HDAC Aktivität in Tumorzellen .....	9
1.6 Histondeacetylase-Inhibitoren .....	11
1.6.1 Strukturen und Eigenschaften verschiedener Histondeacetylase-Inhibitoren .....	11
1.6.2 Mechanismen der HDACi-vermittelten Anti-Tumor Wirkung .....	14
1.6.3 Histondeacetylase-Inhibitoren in klinischen Studien .....	16
1.7 Apoptose .....	17
1.8 Glucocorticoide .....	19
1.8.1 Struktur von Glucocorticoiden .....	20
1.8.2 Domänenstruktur des Glucocorticoid-Rezeptors .....	21
1.8.3 Signaltransduktion durch den Glucocorticoid-Rezeptor .....	21
1.8.4 Apoptose durch Glucocorticoide .....	22
1.9 Akute Lymphatische Leukämie .....	24
1.9.1 Hämatopoese und Entstehung von akuten lymphatischen Leukämien .....	24
1.9.2 Therapiekonzept bei ALL im Kindesalter .....	27
<b>2 Aufgabenstellung .....</b>	<b>29</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>30</b>
3.1 Material .....	30
3.1.1 Chemikalien .....	30
3.1.2 Puffer und Lösungen .....	31
3.1.3 Kits zur Isolierung von DNA bzw. RNA aus leukämischen Zellen .....	34
3.1.4 Antikörper und Reagenzien zur Proteinerkennung .....	35
3.1.5 Medien zur Kultivierung eukaryotischer Zellen .....	35
3.1.6 Verwendete eukaryotische ALL-Zelllinien .....	36
3.2 Methoden der Zellkultur .....	36
3.2.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen .....	36
3.2.2 Langzeitaufbewahrung von eukaryotischen Zellen .....	37
3.3 Protein - Methoden .....	37
3.3.1 Herstellung von Proteinextrakten aus ganzen Zellen .....	37
3.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford .....	37
3.3.3 SDS-PAGE nach Lämmli .....	38

3.3.4	Herstellung von Polyacrylamidgelen .....	39
3.3.5	Westernblot und Immunfärbung .....	39
3.4	DNA - Methoden.....	40
3.4.1	Isolierung genomischer DNA aus humanen Leukämiezellen.....	40
3.4.2	Quantifizierung von DNA.....	40
3.4.3	Nachweis internukleosomaler DNA-Spaltung.....	41
3.5	RNA - Methoden.....	41
3.5.1	Zum Umgang mit RNA .....	41
3.5.2	Herstellung von RNase-freien Lösungen .....	41
3.5.3	Isolierung von RNA.....	42
3.5.4	Bestimmung von Konzentration und Reinheit der isolierten RNA.....	42
3.5.5	Agarosegelelektrophorese der RNA-Proben .....	42
3.5.6	Präparation von m-RNA für die Genexpressionsanalyse .....	43
3.6	Durchflusszytometrische Methoden.....	45
3.6.1	Theorie der Durchflusszytometrie.....	45
3.6.2	Bestimmung des Zellzyklusprofils mittels Propidiumiodidfärbung .....	45
3.6.3	Erfassung frühapoptotischer Zellen mittels Annexin V-Anfärbung.....	47
3.6.4	Detektion von Nalm-6 Zellen im Mausgewebe.....	49
3.7	Tierversuche an SCID (severe combined immunodeficient) Mäusen .....	51
3.7.1	Tierschutzrechtliche Bestimmungen und Tierhaltung .....	51
3.7.2	Verwendeter Tierstamm .....	51
3.7.3	Tierschutzgerechtes Töten der Tiere .....	51
3.7.4	Einbringen von Nalm-6 Zellen in SCID Mäuse.....	52
3.7.5	Behandlung der Nalm-6-Mäuse.....	52
3.7.6	Entnahme von Milz und Femur.....	53
3.7.7	Histologische Schnitte der Milz.....	53
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>55</b>
4.1	Apoptose in ALL-Zellen durch Dexamethason und HDACi.....	55
4.2	Synergistische Apoptose-Induktion in Nalm-6 Zellen durch Dexamethason und HDACi....	57
4.2.1	Synergismus zwischen Dexamethason und VPA .....	57
4.2.2	Konzentrationsabhängiges Zusammenwirken von Dexamethason und TSA .....	59
4.3	Verstärkte Apoptose in weiteren ALL-Zelllinien durch Dexamethason und VPA .....	61
4.4	Nalm-6-Mausmodell für Akute Lymphatische Leukämie .....	63
4.5	Behandlung der ALL-Mäuse mit Dexamethason und VPA .....	65
4.5.1	Verträglichkeitstest und Vorversuch.....	65
4.5.2	Untersuchungen zur Gewebe-Infiltration durch Nalm-6 Zellen .....	66
4.5.3	Kombinationstherapie hemmt Gewebeeinfiltration durch Nalm-6 Zellen.....	67
4.5.4	Kombinationstherapie erhöht Überlebenschancen.....	74
4.6	VPA kombiniert mit weiteren Chemotherapeutika der Induktionstherapie bei ALL.....	76
4.6.1	Synergistisches Zusammenwirken mit Vincristin und L-Asparaginase .....	76
4.6.2	Konzentrationsabhängiges Zusammenwirken von VPA und Daunorubicin .....	79

---

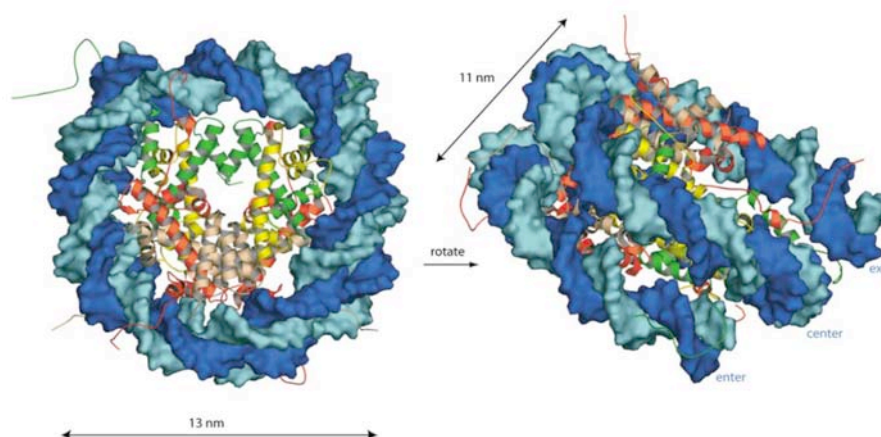
4.7	Molekulare Mechanismen der Apoptose-Induktion durch Dexamethason und VPA .....	80
4.7.1	Genexpressionsanalyse nach Behandlung mit HDACi und Dexamethason .....	80
4.7.2	Hyperacetylierung von Histon H4 durch VPA und TSA .....	86
4.7.3	Aktivierung der Caspasen 8 und 9 in verschiedenen ALL-Zelllinien .....	87
4.7.4	Herunterregulation von anti-apoptotischem Aven in Nalm-6 Zellen .....	88
4.7.5	Induktion von pro-apoptotischem Bim .....	89
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>91</b>
5.1	Chemotherapie – moderne Wirkstoffe und Kombinationen .....	91
5.2	Behandlung von ALL im Kindesalter .....	92
5.3	Synergistische Apoptose-Induktion in ALL-Zellen durch VPA und Dexamethason .....	93
5.4	Ursachen der Apoptose-Induktion durch Dexamethason und VPA .....	97
5.5	Therapeutischer Nutzen der Kombination von VPA und Dexamethason .....	106
5.6	VPA in Kombination mit weiteren Chemotherapeutika und der mögliche Einsatz in der Therapie gegen ALL .....	110
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>116</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>129</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>131</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>132</b>

# 1 Einleitung

Die charakteristischen Hauptmerkmale von Krebszellen sind unkontrollierte Zellteilung, unvollständige Differenzierung sowie das Ausbleiben von Apoptose. Diesen Eigenschaften liegt häufig eine veränderte Genexpression zu Grunde, die zum Verlust von Tumorsuppressoren sowie zur Generierung von Onkoproteinen führt. Die Transformation von normalen Zellen zu Krebszellen zerstört jedoch nicht notwendigerweise das Potential Entwicklungsprozesse wie Differenzierung und Apoptose in diesen Zellen mit geeigneten Mitteln zu induzieren. Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) sind therapeutisch wirksame Substanzen, die Hyperacetylierung von Chromatin, Transkriptionsfaktoren und weiteren Proteinen bewirken. Auf diese Weise nehmen HDACi Einfluss auf die Genexpression, was in vielen malignen Zellen zur Hemmung der unkontrollierten Zellteilung bzw. zur Auslösung von programmiertem Zelltod bzw. Differenzierung führt. Der potentielle Einsatz von HDACi in der Krebstherapie wird daher gegenwärtig intensiv untersucht.

## 1.1 Chromatinstruktur in Eukaryoten

Chromatin bezeichnet den im Kern eukaryotischer Zellen vorliegenden Komplex aus DNA, Histonen sowie Nicht-Histon-Proteinen. Histone sind Proteine mit evolutionär hochkonservierten Domänen. Ihr Molekulargewicht liegt bei 11-21 kDa. Auf Grund ihres hohen Gehalts an Lysin und Arginin sind sie stark basisch und dadurch in der Lage das polyanionische Rückgrat der DNA zu binden und zu neutralisieren [1].



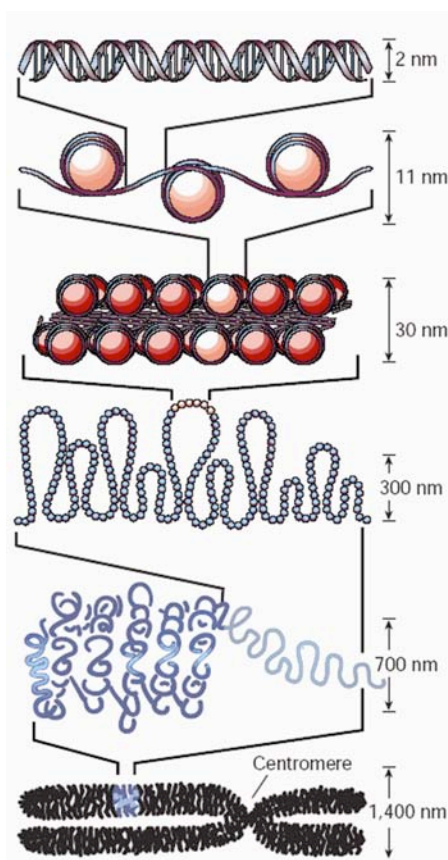
**Abbildung 1.1: Das Nukleosom als Grundbaustein des Chromatins**

Die komplementären DNA-Stränge sind in hell- bzw. dunkelblau angezeigt. Die DNA ist mit 1,75 Windungen linksgängig um das Histon-Oktamer gewickelt, welches sich aus einem H3-H4 Tetramer (grün/gelb) und zwei H2A-H2B Dimeren (rot/rosa) zusammensetzt. (aus Ref.: [2])



Die so genannten Core-Histone vermitteln die Verpackung der DNA in Nukleosomen, welche die funktionellen, sich wiederholenden Grundbausteine des Chromatins darstellen (Abb. 1.1). Das Nukleosom besteht aus einem Core-Histonoctamer, gebildet durch Interaktion der globulären Domänen von jeweils zwei Molekülen H2A, H2B, H3 und H4 [3], um welches DNA mit einer Länge von 146 Basenpaaren gewunden ist [4]. Die DNA bildet dabei eine linksgänige Superhelix mit 1,75 Windungen pro Histonoktamer.

Ein Viertel der Aminosäuren der Histone liegt außerhalb der Histonfaltungsdomäne und ragt aus der nukleosomalen Struktur heraus. Diese exponierten Seitenketten sind durch ihre Sensitivität gegenüber Protease-Verdau charakterisiert. Sie entsprechen etwa 15-30 Aminosäuren der N-Termini der Core-Histone, sowie den C-Termini von H2A und H2B. Die proteolytische Abspaltung der N-Termini zeigte keinen Einfluss auf die Konformation oder Positionierung einzelner Nukleosomen [5]. Man konnte diesen N-Termini allerdings eine wichtige Bedeutung bei der Ausbildung internukleosomaler Kontakte und der Kompaktierung der DNA nachweisen [6,7]. Durch Exposition der N-terminalen Regionen der Core-Histone außerhalb des Nukleosoms, stehen diese für den Kontakt mit benachbarter DNA sowie weiteren Proteinen zur Verfügung. Derartige internukleosomale DNA-Histon-Kontakte konnten unter verschiedenen Bedingungen nachgewiesen werden [8,9].



**Abbildung 1.2: Verpackungsstufen der DNA**

Die erste Verpackungsstufe der DNA-Doppelhelix ist die Chromatinstruktur mit den Nukleosomen. Es entsteht eine Art Perlenkette mit einem Durchmesser von ca. 11 nm, wobei die einzelnen Nukleosomen durch Linker-DNA (10-80 bp) voneinander getrennt sind.

Durch den nächsten Verpackungsschritt entsteht eine Faser mit einem Durchmesser von 30 nm, die dann wiederum Schleifen mit einer Länge von 50-300 kb bildet. Es folgt die Ausbildung noch höher geordneter Strukturen, bis hin zur Bildung eines Chromosoms, einer mikroskopisch erkennbaren Struktur während der Metaphase der Mitose. Die Details der einzelnen Verpackungsstufen, die nach der nukleosomalen Verpackung erfolgen, sind noch weitestgehend unbekannt. (aus Ref.: [10])

Es ist zudem eine große Anzahl von enzymatischen Modifikationen an diesen basischen Seitenketten bekannt, die einen wichtigen Einfluss auf die Aktivierung bzw. Repression von Genen haben (Kap. 1.3).

Die einzelnen Nukleosomen sind durch DNA-Zwischenstücke mit einer variablen Länge von 10-80 Basenpaaren verbunden, an welche das Linker-Histon H1 bindet. Man stellt sich die Chromatinfaser (11 nm Durchmesser) wie eine Perlenkette vor, die im nächsten Kompaktierungsschritt eine 30 nm-Faser bildet (Abb. 1.2), deren Struktur durch das Linker-Histon H1 stabilisiert wird [11]. Hierbei werden zwei mögliche Strukturen diskutiert, zum einen das ältere Solenoid-Modell (Helixstruktur) sowie das aktuellere Zick-Zack-Modell (zusammengestellt in [2]). Diese 30 nm-Faser faltet sich wiederum zu vielen Schleifen (50-300 kb), an deren Bildung Nicht-Histon-Proteine beteiligt sind, die insgesamt etwa 10 % der Proteinmenge innerhalb des Chromatins ausmachen. Auf Grund der enormen Größe der DNA ( $6 \times 10^9$  bp  $\approx$  2 m; diploides humanes Genom) ist eine bis zu zehntausendfache Verkürzung des Chromatinfadens nötig für eine kompakte Verpackung des Erbguts im Zellkern. Jedes der 46 Chromosomen weist in der Metaphase der Mitose (Zellteilung) nur eine Länge von wenigen Mikrometern und eine Breite von etwa einem Mikrometer auf. Trotz intensiver Forschung ist nur wenig über die Mechanismen bekannt, die zur vollständigen Verpackung des Chromatins beitragen.

## 1.2 Chromatin vermittelt basale Repression

Die Einbindung und Kondensierung der DNA in ein Chromatingerüst durch Interaktion mit Histonen sowie Nicht-Histonproteinen und die mögliche Modifikation dieser Chromatinstruktur, stellen einen Mechanismus zur Regulation der Genexpression dar. Eine kompakte Chromatinstruktur erschwert auf Grund sterischer Behinderungen erheblich den Zugang von DNA-bindenden Faktoren, wie Transkriptions- und Initiationsfaktoren, zu den entsprechenden Erkennungssequenzen in den Promotorregionen von Genen [12,13]. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Bindungsaffinität verschiedener Transkriptionsfaktoren um das  $10^2$ - $10^3$ fache reduziert ist, wenn ihre spezifischen Erkennungssequenzen nicht frei, sondern eingebettet im Chromatin vorliegen [14]. So wird die basale Transkription durch Chromatisierung *in vitro* äußerst effizient inhibiert [15]. Ausnahmen stellen die zu den nukleären Hormonrezeptoren gehörenden Transkriptionsfaktoren, wie der Glucocorticoidrezeptor (GR) und der Thyroidhormonrezeptor (TR) dar, weil sie die Fähigkeit besitzen ihre Bindungsstellen auch in kompakter Chromatinstruktur zu erkennen [14,16]. Durch posttranslationale Modifikation der N-terminalen Domänen der Core-Histone kann die Histon-DNA-Wechselwirkung und die Zugänglichkeit von DNA-bindenden Faktoren beeinflusst werden. Untersuchungen an der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bestätigten, dass die N-Termini der Core-Histone essentiell für die Repression der basalen Transkription

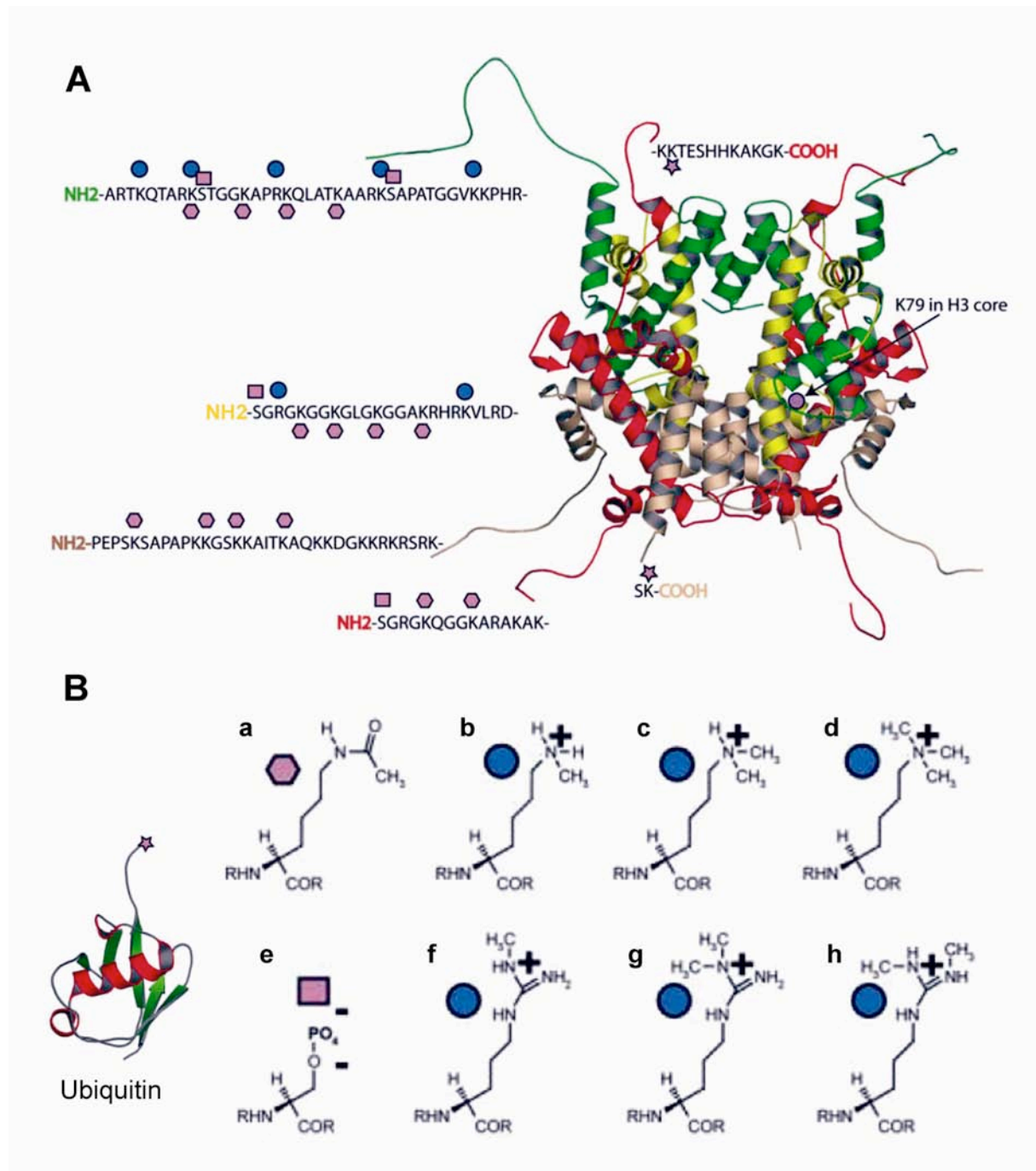
notwendig sind [17]. Punktmutationen, die durch Basenaustausch die Basizität dieser N-terminalen Domänen verringern, ermöglichen die Transkription von Genen unabhängig von spezifischen Coaktivatoren [18].

### 1.3 Enzymatische Modifikationen des Chromatins

Die transkriptionelle Aktivierung der Expression eines Gens erfordert, wie die Replikation und Reparatur des Genoms, die Dekondensierung (Auflockerung) des Chromatins [19]. Derzeit unterscheidet man zwei Klassen von Histon-modifizierenden Protein-Komplexen, welche gemeinsam die Zugänglichkeit von DNA-bindenden Faktoren regulieren. Hierbei handelt es sich zum einen um die ATP-abhängigen chromatinmodifizierenden Komplexe (CRC). Sie besitzen als Gemeinsamkeit eine „SNF2“-ATPase Einheit, unterscheiden sich jedoch in ihren Erkennungsmotiven [20]. Je nach Subtyp besitzen diese Komplexe die Fähigkeit Nukleosomen entlang der DNA zu verschieben, Histonoktamere zu entfernen oder einzelne Histonvarianten auszutauschen. Die DNA wird dazu von den Histonoktamern gelöst [21,22]. CRC-Komplexe tragen zur Aktivierung von Genen ebenso bei wie zur Genrepression, je nach Zusammensetzung des vorliegenden Multiprotein-Komplexes [20].

Daneben existiert eine große Klasse von Komplexen, die Nukleosome durch das Anhängen bzw. Entfernen kleiner Moleküle an die exponierten, basischen Seitenketten des Histonoktamers, chemisch modifizieren können (Abb. 1.3). Zu den bisher charakterisierten, kovalenten Histonmodifikationen zählen Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung sowie Ubiquitylierung, ADP-Ribosylierung und Sumolierung [2]. Diese chemischen Histonmodifikationen haben einen Einfluss auf die Interaktion der betroffenen Core-Histone mit der DNA sowie weiteren Proteinen, was häufig in einer Veränderung des Kondensationszustands des Chromatins resultiert [23,24]. So kommt es beispielsweise durch Acetylierung von Lysinresten zum Verlust positiver Ladungen, was als Ursache für verminderte Wechselwirkungen zwischen Nukleosomen und negativ geladener DNA angesehen wird. Dies trägt zur Entstehung von transkriptionell aktivem Chromatin (Euchromatin) bei. Weiterhin geht man heute davon aus, dass die chemischen Markierungen ein Muster entstehen lassen, welches von Protein-Komplexen mit spezifischen Bindungsdomänen (z.B. Bromo- oder Chromodomänen, s.u.) erkannt wird. Solche Domänen findet man in Transkriptionsfaktoren, ATP-abhängigen chromatinmodifizierenden Komplexen und in vielen weiteren Chromatin-assoziierten Proteinen [25,26]. Die Motive können dabei einzeln wie auch in mehrfacher Kopie bzw. in Kombination innerhalb eines Komplexes vorliegen. Auf Grund der großen Vielfalt und der variablen Kombinationen der kovalenten Histonmodifikationen, die teilweise wechselseitig voneinander abhängig sind oder sich unter Umständen auch gegenseitig ausschließen, wurde die Hypothese des epigenetischen „Histon Codes“ formuliert [27]. Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung sind, im

Gegensatz zu den anderen Histonmodifikationen, mittlerweile recht gut charakterisiert. Im Folgenden wird an Hand dieser Beispiele die Hypothese des „Histon-Codes“ näher erläutert.



**Abbildung 1.3: Posttranslationale Modifikationen der Histonschwänze**

A) Abgebildet ist ein Histon-Oktamer mit den globulären Domänen sowie den ungefalteten N-Termini der Core-Histone und den C-Termini von H2A und H2B. Aminosäuren, die chemisch modifiziert werden können sind entsprechend gekennzeichnet. Das H3-H4 Tetramer ist grün (H3) und gelb (H4) eingezeichnet und die zwei H2A-H2B Dimere sind rot (H2A) bzw. rosa (H2B) markiert. Zur Vereinfachung werden nur die Modifikationen an jeweils einer Kopie der Proteine angezeigt. B) An Lysinreste (K) kann Ubiquitin angehängt werden, aber auch Acetylgruppen sowie bis zu drei Methylgruppen. Es kommt zur Bildung von: a)  $\epsilon$ -N-acetyl-Lysin, b)  $\epsilon$ -N-monomethyl-Lysin, c)  $\epsilon$ -N,N-dimethyl-Lysin, d)  $\epsilon$ -N,N-trimethyl-Lysin. Phosphorylierung führt zur Bildung von e) O-phospho-Serin. Bei Methylierung von Arginin gibt es folgende Varianten: f)  $\omega$ -N-methyl-Arginin, g)  $\omega$ -N,N-dimethyl-Arginin, h)  $\omega$ -N,N'-dimethyl-Arginin (symmetrisch). (aus Ref.: [2])

Die häufigste postrtranslationale Modifikation ist die reversible Acetylierung der N-Termini der Core-Histone an spezifischen Lysinresten. Dieser äußerst dynamischen Vorgang wird über Histonacetyltransferasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC) reguliert (Kap. 1.4). Proteine, die Bromodomänen enthalten, können die Acetylierung von Lysinen erkennen und an entsprechend modifizierte Histone binden. Hierbei werden einzelne Acetyllysine mit geringer Affinität und zweifach acetylierte N-Termini, über Tandem-Bromodomänen, mit hoher Affinität gebunden [2,25]. Da viele Transkriptionsfaktoren solche Bromodomänen besitzen (z.B. Gcn5, PCAF, CBP/p300, TAF<sub>II</sub>250), wird die Acetylierung als transkriptionsaktivierendes Signal angesehen. Dies folgt auch aus der Beobachtung, dass aktiv transkribierte Gene stark acetyliert sind, während reprimiertes Heterochromatin nur schwach acetyliert vorliegt [28,29]. Im Einklang hiermit steht auch, dass HAT Domänen in Transkriptions-aktivierenden Komplexen gefunden werden, HDAC Aktivität dagegen in Repressor-Komplexen.

Die Phosphorylierung von Serin10 im H3 Peptid führt zu zusätzlichen Wechselwirkungen mit HAT-Aktivität und dient als ein Beispiel dafür, wie eine chemische Modifikation eine weitere nach sich ziehen kann. Durch die Phosphorylierung von Serin10 wird die Acetylierung von Lysin14 verstärkt [30].

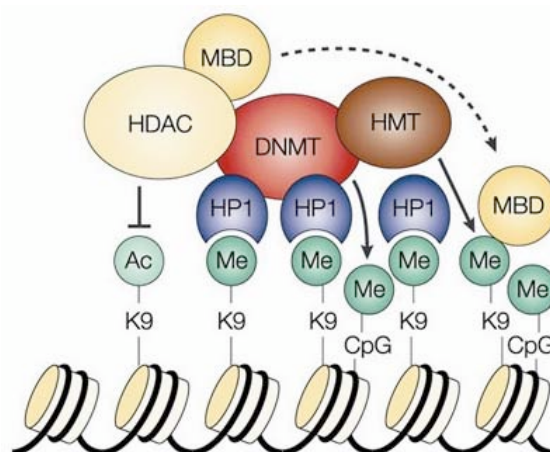
Man ist lange davon ausgegangen, dass die Methylierung von Histonen durch Histonmethyltransferasen (HMT) im Gegensatz zur Acetylierung und den anderen Modifikationen eine dauerhafte Markierung darstellt. Aktuelle Studien belegen allerdings die Existenz von Histon-Lysindemethylasen [31,32]. Die Methylierung von Lysinen wird in direkte Verbindung mit epigenetischer Vererbung gebracht [33]. Als Kofaktor für die Methylierung dient S-adenosyl-L-methionin, wobei bis zu drei Methylgruppen übertragen werden können. In Abhängigkeit davon, welcher Lysinrest betroffen ist, wirkt die Methylierung aktivierend oder reprimierend. Die Methylierung von Histon H3 an Lysin 4 wird z.B. im transkriptionell aktiven Euchromatin gefunden. Dahingegen findet man Methylierung von H3Lys9 im dauerhaft nicht transkribierten Heterochromatin. Beispiele hierfür sind inaktive X-Chromosomen, inaktive Allele von Genen und Zentromere.

Chromodomänen erkennen und binden N-termini, die methylierte Lysine aufweisen, wobei sie die höchste Affinität für Trimethyllysine besitzen und für Monomethyllysine die niedrigste. Die Chromodomäne in HP1 (Heterochromatin Protein 1) bewirkt eine spezifische Bindung an methyliertes H3Lys9 [26,34]. Das gebundene HP1 kann weitere HMTs sowie DNA-Methyltransferasen (DNMT) rekrutieren. Die DNA-Methylierung führt zur Rekrutierung weiterer reprimierender Komplexe, unter anderem mit HDAC Aktivität. Zusammen mit der verstärkten Kondensation des Chromatins durch Assoziation von HP1 mit den umgebenden Histonen kann dies zur Bildung stark reprimierter Genbereiche (Heterochromatin) sowie der weiteren Ausbreitung dieser Bereiche führen (Abb. 1.4). Ein zusätzliches Beispiel in diesem

Zusammenhang ist das Polycomb Protein, das über eine Chromodomäne spezifisch an methyliertes H3Lys27 bindet und das Abschalten von Genen in verschiedenen Entwicklungsstadien bewirkt [35].

Die Methylierung von Arginin wird hingegen mit Genaktivierung in Zusammenhang gebracht. Beispielsweise führt die Methylierung von Arginin3 in Histon H4 zur anschließenden Acetylierung von H4 und verstärkt so die Aktivierung der Transkription durch nukleäre Hormonrezeptoren [36].

Die posttranslationalen Histonmodifikationen bieten einen komplexen Mechanismus zur Genregulation an, der bis heute nicht in seiner Gesamtheit erfasst ist. Neuere Forschungen haben gezeigt, dass es noch viele weitere Modifikationen bzw. modifizierte Aminosäuren gibt, wobei sich die Modifikationen keinesfalls nur auf die exponierten N-Termini beschränken [20]. Methylierung von Histon H3 an Lysin79 innerhalb der globulären Domäne wurde beispielsweise im Zusammenhang mit Genrepression in der Hefe gefunden [37].



**Abbildung 1.4: Zusammenwirken von Chromatin- und DNA-modifizierenden Komplexen**

Die kooperative und sich selbst verstärkende Organisation von Chromatin- und DNA-modifizierenden Komplexen stellt eine sehr effiziente Methode dar Gene auszuschalten, in gesundem Gewebe wie auch in transformierten Krebszellen. Das Heterochromatin Protein 1 (HP1) erkennt mittels Chromodomäne die Methylierung von Lysin9 im N-Terminus von Histone H3. Das gebundene HP1 kann weitere HMTs und auch DNA-Methyltransferasen (DNMT) rekrutieren. Die Methylierung der DNA an den CpG-Inseln führt zur Rekrutierung von weiteren reprimierenden Komplexen, unter anderem auch mit HDAC Aktivität. Es kommt zur Bildung von stark reprimierten Genbereichen (Heterochromatin) und deren weiteren Ausbreitung. (aus Ref.: [38])

## 1.4 Histonacetyltransferasen und Histondeacetylasen

Im Jahr 1966 wurde von Allfrey et al. zum ersten Mal der Zusammenhang zwischen transkriptioneller Aktivität und Histonacetylierung beschrieben [23]. Erst etwa 30 Jahre später konnten die ersten entsprechenden Enzyme charakterisiert werden [39,40]. Mit Bezug auf Ihre Funktionen werden diese Enzyme Histonacetyltrasen (HATs) bzw. Histondeacetyltrasen (HDACs) genannt.

HATs werden auf Grund ihrer konservierten Sequenzmotive in drei Familien unterteilt. Es handelt sich hierbei um die Gruppe der MYST-Proteine, die GNAT-Familie sowie die p300/CBP-Familie [21,41]. Diese Enzyme übertragen die aktivierte Acetylgruppe von Acetyl-Coenzym A auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe konservierter Lysinreste in den N-terminalen Regionen der Core-Histone. Die Acetylierung der Lysinreste neutralisiert die unter physiologischen Bedingungen positiv geladene Aminogruppe durch Bildung einer Amidbindung und bewirkt daher eine Verringerung der Wechselwirkung zwischen DNA und Histon. Dies führt zur Bildung von transkriptionell aktivem Euchromatin (Kap. 1.3). Neben den Histonen zählen aber auch viele weitere zelluläre Proteine zu den Substraten der HATs. Unter denen, die mittlerweile recht gut charakterisiert wurden, befinden sich Transkriptionsfaktoren wie E2F, p53, MyoD, TFIIEb, Stat1, Stat6 und GATA. Die Acetylierung der Proteine wirkt sich dabei auch auf deren biologische Aktivität aus [42-46]. Dies führt zu einer weiteren Erhöhung der Komplexität, mit welcher die Acetylierung die Genexpression beeinflusst.

HDACs reprimieren die Transkription von Genen durch Deacetylierung der N-Acetyl-Lysinreste der Core-Histone. Durch Entfernen der neutralisierenden Acetatgruppe wird die positive Ladung der  $\epsilon$ -Aminogruppe wieder generiert und die Bindung an die DNA durch Wechselwirkung mit deren negativem Zucker-Phosphat-Rückgrat verstärkt. Folgen sind stärkere Chromatinkondensation und transkriptionelle Inaktivierung (Heterochromatin). Neben dieser Funktion wurden auch Einflüsse von HDACs auf die Stilllegung von Genomabschnitten durch DNA-Methyltransferasen [47,48], die zytoplasmatische Signaltransduktion [49], die DNA-Reparatur [50] sowie die DNA-Replikation [51] festgestellt. In Hefe konnte sogar die Aktivierung von Transkription nachgewiesen werden [52]. Diese Vielzahl an Funktionen von HDACs beruht sehr wahrscheinlich darauf, dass neben den Histonen noch weitere Substrate modifiziert werden. So werden beispielsweise p53, E2F, Rb, RelA und verschiedene basale Transkriptionsfaktoren (TFIIE, TFIF) von ihnen deacetyliert [49,53-56].

Es wurden bis heute 18 Histondeacetylasen kloniert und teilweise näher charakterisiert [57,58]. Die Enzyme werden in drei Klassen aufgeteilt: HDACs der Klasse I (HDAC 1, 2, 3 und 8) besitzen Homologien zu Rpd3, einer Histondeacetylase der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Bis auf HDAC3 sind die Enzyme der Klasse I vornehmlich im Nukleus lokalisiert [59]. Klasse I HDACs werden ubiquitär exprimiert und weisen eine Größe zwischen 40 und 55 kDa auf. Die HDACs der Klasse II (HDAC 4, 5-7, 9 und 10) sind der Hefe Histondeacetylase HDA1 homolog und sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma nachzuweisen [60]. Sie kommen im Gegensatz zu Klasse I HDACs zumindest auf mRNA Ebene gewebespezifisch vor [61]. Ihre Größe reicht von 100-130 kDa. HDAC6 und HDAC10 besitzen als Besonderheit zwei Deacetylasedomänen [57] und können außerdem nur mit bestimmten HDAC-Inhibitoren gehemmt werden [62] (Kap. 1.6). HDAC6 bildet eine weitere



Ausnahme, da es primär im Zytoplasma vorkommt und Proteine wie  $\alpha$ -Tubulin und das Hitzeschockprotein 90 (hsp90) deacetyliert [63,64]. HDAC11 stellt ebenfalls eine Besonderheit dar, denn es besitzt Motive der Klasse I sowie der Klasse II und kann somit nicht eindeutig zugeordnet werden. Die dritte Klasse umfasst NAD<sup>+</sup>-Cofaktor abhängige Enzyme (SIRT 1-7) mit Homologie zum Sir2 Protein in Hefe und Maus [65,66]. Sie besitzen keinerlei Homologie mit Klasse I und II HDACs und werden auch durch den pan-HDACi Trichostatin A (TSA) nicht gehemmt [62].

Spezifische Funktionen konnten den bisher bekannten HDACs nur bedingt zugeordnet werden. Es ist allerdings bekannt, dass sie unterschiedlich reguliert werden und zum Teil nicht redundante Funktionen ausüben [57]. HDACs können *in vivo* mit sehr vielen verschiedenen Proteinen sowie auch untereinander interagieren.

In erster Linie sind HDACs enzymatische Komponenten hochmolekularer Multiprotein-Komplexe mit Transkriptions-reprimierender Aktivität. Sie können direkt oder aber über Corepressoren an Sequenz-spezifische Transkriptionsfaktoren binden [67]. Zu den HDAC-rekrutierenden Transkriptionsfaktoren gehören unter anderem auch nukleäre Hormonrezeptoren, wie der Glucocorticoidrezeptor (GR) [68]. Bei den Corepressoren, die als Brückenproteine fungieren und eine Verbindung zwischen Transkriptionsfaktor und HDAC darstellen, handelt es sich um SMRT (silencing mediator or retinoic acid), N-CoR (nuclear receptor corepressor) oder SIN3 (switch independent 3) [69]. Die der HDAC-Enzymaktivität entgegengesetzte HAT-Aktivität bindet dementsprechend an sogenannte Coaktivatoren (N-CoA) oder ist bereits in diesen enthalten (p300/CBP). Die Rekrutierung von Corepressoren bzw. Coaktivatoren an Promotorbereiche kann beispielsweise durch reversible Ligandenbindung an nukleäre Hormonrezeptoren gesteuert werden [70].

## 1.5 Abweichende HAT und HDAC Aktivität in Tumorzellen

In gesundem Gewebe sorgen die beiden entgegengesetzten Enzymaktivitäten von HATs und HDACs für eine geordnete und zweckmäßige Acetylierung von Histonen und Transkriptionsfaktoren, was für eine optimale Genregulation unerlässlich ist. In etlichen Tumorzellen, zumeist mit lymphatischem Ursprung, konnten anomale HAT- bzw. HDAC-Aktivität nachgewiesen werden [62].

HAT-kodierende Gene können einer Translokation unterliegen, mutiert sein oder auf Grund von Amplifikation überexprimiert werden. So konnte man für die Histonacetylasen CBP und p300 verschiedene missense-Mutationen und Translokationen, mit einer daraus resultierenden Inaktivierung ihrer Acetylierungsfähigkeit, in verschiedenen Tumorzellen feststellen [71-73]. Chromosomale Translokationen von CBP und p300 können zur Bildung von fusionierten Onkoproteinen führen, wenn es sich bei den Fusionspartnern um Transkriptionfaktoren wie MLL, MOZ oder MORF handelt [74]. Die daraus resultierenden



konstitutiv aktiven Transkriptionfaktoren werden mit der Entstehung von hämatologischen Krebserkrankungen in Zusammenhang gebracht.

Sehr häufig findet man in Tumorzellen eine übermäßige Repression von Genen, die für Zellwachstumsstopp und Differenzierung wichtig sind. Dies ist zumeist auf Hypoacetylierung und Hypermethylierung der entsprechenden Chromatinbereiche zurückzuführen [62]. Die anomale Repression von Genen spielt vor allem bei der malignen Transformation von hämatopoetischen Zellen eine Rolle. Unangebrachte Repression von Differenzierungsgenen, durch übermäßige Rekrutierung von HDAC Aktivität, kann ebenfalls auf Chromosomentranslokationen zurückgeführt werden. In diesem Fall kommt es zur Bildung von Fusionsproteinen, bestehend aus der DNA-Bindungsdomäne eines Transkriptionsfaktors und einer Repressionsdomäne eines weiteren Proteins. So weisen z.B. die Krebszellen von Patienten mit Akuter Promyeloischer Leukämie (APL) Fusionsproteine auf, die sich aus dem Retinsäurerezeptor (RAR) und einem Teil von PML, PLZF oder Stat5 zusammensetzen [75,76]. Mit einer erhöhten (pharmakologischen) Retinsäuredosis kann in PML-RAR positiven Zellen die Dissoziation des Corepressorkomplexes vom PML-RAR-Fusionsprotein erreicht und somit der Differenzierungsblock aufgehoben werden. Bei PLZF-RAR positiven APL Patienten ist dies jedoch auch mit einer hohen Dosis an Retinsäure nicht möglich. Interessanterweise kann man aber, in Leukämiezellen mit dem PLZF-RAR-Genotyp, den als Krankheitsursache angesehenen Differenzierungsblock durch eine Kombination von Retinsäure mit Inhibitoren der HDAC-Aktivität überwinden [77,78].

Auch in einer häufigen Form der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) wird eine Translokation beobachtet. Die hier zu Grunde liegende Translokation lässt das Fusionsprotein AML1-ETO entstehen. Die Transaktivierungsdomäne von AML1 kann dabei durch das annähernd komplette ETO-Protein ersetzt werden. ETO rekrutiert N-CoR, SMRT, mSin3 und HDACs und reprimiert so konstitutiv Gene, die von dem Transkriptionsfaktor AML1 normalerweise positiv wie negativ reguliert werden können. Hierbei handelt es sich im Wesentlichen um myeloische Differenzierungsgene [79,80]. In etwa 22 % der Fälle von Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL) im Kindesalter findet man das Fusionsprotein TEL-AML1, das ebenfalls konstitutive Genrepression durch HDAC Rekrutierung bewirkt [81]. In Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen liegen vergleichbare Translokationen vor. Diese führen zur Überexpression des Onkogens LAZ3/BCL-6, was auch hier einhergeht mit anomaler transkriptionaler Repression und Rekrutierung von HDAC-Aktivität [82,83].

Zusammenfassend kann man sagen, dass fehlgerichtete transkriptionale Repression als eine häufige Ursache für die Entstehung von Tumorzellen, beziehungsweise deren Weiterentwicklung, angesehen werden kann. Über das genaue Ausmaß wird derzeit noch spekuliert, da die molekularen Mechanismen der malignen Transformation bisher nur für eine Minderheit an Tumorzellen aufgeklärt worden sind.

Die Aufhebung von anomaler Genrepression über die Hemmung von HDAC Aktivität stellt ein neues Konzept einer Mechanismus-orientierten Krebstherapie dar.

## 1.6 Histondeacetylase-Inhibitoren

### 1.6.1 Strukturen und Eigenschaften verschiedener Histondeacetylase-Inhibitoren

Erst vor wenigen Jahren erwachte das große Interesse an Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) und ihrem potentiellen Nutzen für die Krebstherapie. Zunächst ging man davon aus, dass sich die Funktion solcher Inhibitoren darauf beschränkt, ganz spezifisch, die unangemessen starke Repression von Genen, wie z.B. in PLZF-RAR positiven Leukämiezellen, aufzuheben (Kap. 1.5). Eine Hyperacetylierung der Core-Histone wird zwar in jedem Fall beobachtet, allerdings geht man heute davon aus, dass sich nur ein geringer Anteil der Gene dadurch beeinflussen lässt. Laut zahlreichen Expressionsstudien, werden nach Behandlung mit diversen HDACi im Schnitt cirka 2-10 % der analysierten Gene signifikant verändert. Überraschenderweise fand man etwa gleich viele Gene hoch- wie herunterreguliert [62]. Dies wird dadurch begründet, dass neben den Core-Histonen auch viele weitere Proteine, unter ihnen Transkriptionsfaktoren, in ihrer Wirkungsweise durch Acetylierung beeinflusst werden. Das Interesse an HDACi ist stetig weiter gestiegen, da sich herausgestellt hat, dass die verschiedenen Inhibitoren in einer Vielzahl von Tumorzellen Proliferationsstopp und auch Apoptose bzw. Differenzierung induzieren. Normale Zellen sind dagegen kaum von diesen Auswirkungen betroffen, was einen enormen Vorteil für die potentiellen Chemotherapeutika darstellt (Kap. 1.6.2).

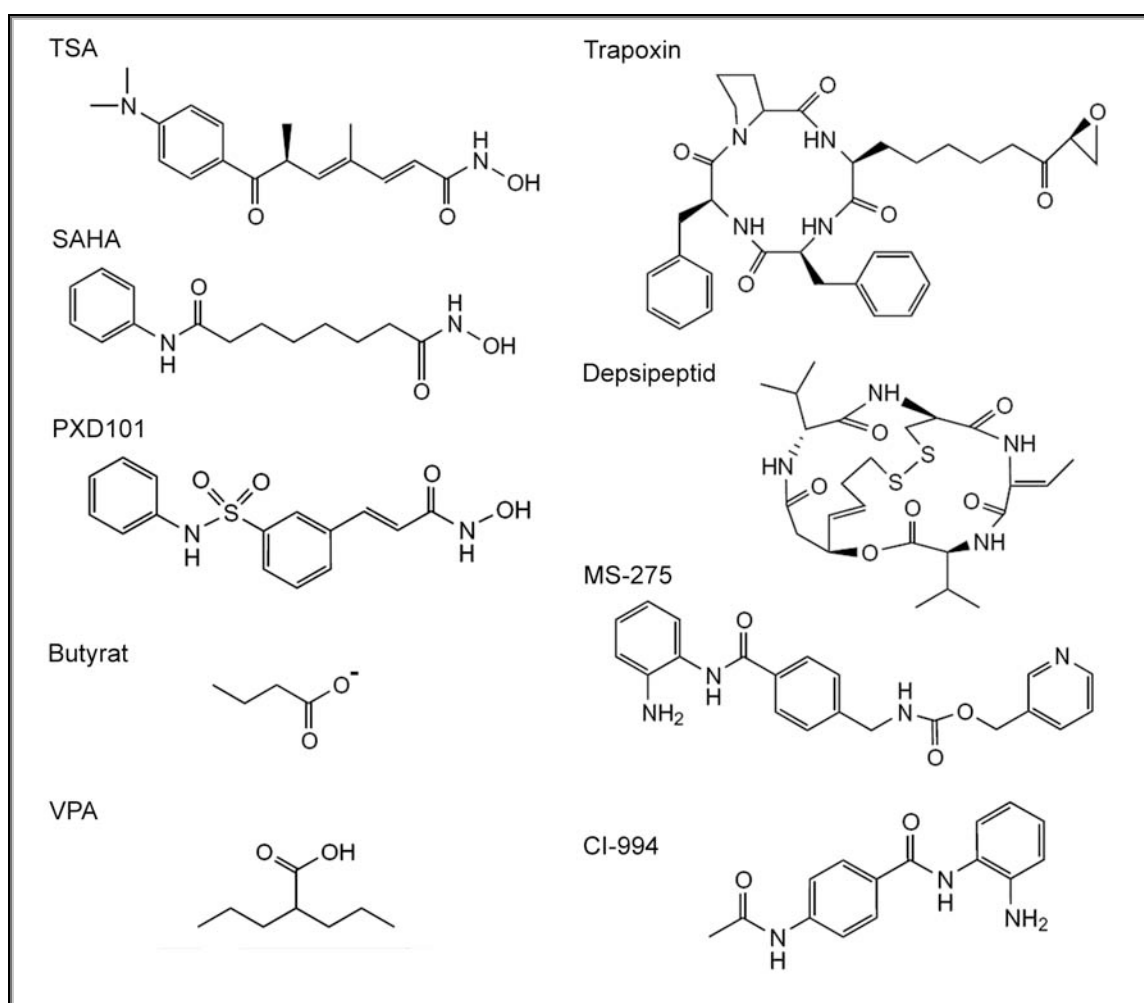
Als HDAC-Inhibitoren werden Substanzen bezeichnet, die Hyperacetylierung der Core-Histone bewirken und in der Lage sind HDACs der Klasse I und II zu inhibieren. HDACs der Klasse III können nicht durch diese Substanzen gehemmt werden.

Entsprechend ihrer chemischen Struktur (Abb. 1.5) werden sie wie folgt unterteilt [84,85]:

- 1) Hydroxamsäuren: Trichostatin A (TSA), SAHA, CBHA, ABHA, NVP-LAQ824, Oxamflatin, PXD101, Sciptaid, Pyroxamid
- 2) Zyklische Peptide: Trapoxin (TPX), Depsipeptid (FK228), Apicidin, CHAP (TSA-TPX-hybrid),
- 3) Kurzkettige und aromatische Fettsäuren: Valproinsäure (VPA), Natriumbutyrat, Natriumphenylbutyrat, Phenylacetat
- 4) Benzamide: MS-275, CI-994
- 5) Ketone: Trifluormethyl-Ketone,  $\alpha$ -Ketoamide

Eine Außenseiterrolle übernimmt Tubacin, ein auf der Hydroxamsäure basierender Inhibitor der  $\alpha$ -Tubulin acetylierenden Domäne von HDAC6. Tubacin weist keinen Einfluss auf Hyperacetylierung und Zellzyklusstopp auf [86].

Bei den oben aufgezählten Substanzen handelt es sich nicht um isoenzymspezifische Inhibitoren. Die diversen Histondeacetylasen werden jedoch teilweise in unterschiedlichem Maße inhibiert. Dabei sind nur auf der Hydroxamsäurestruktur basierende HDACi in der Lage sämtliche HDACs, eingeschlossen die ansonsten resistenten Enzyme HDAC6 und HDAC10, effizient zu inhibieren. Aus diesem Grund werden sie auch als pan-HDAC-Inhibitoren bezeichnet.



**Abbildung 1.5: Strukturformeln ausgewählter Histondeacetylase-Inhibitoren**

Dargestellt sind die Hydroxamsäuren TSA, SAHA und PXD101; die kurzkettingen Fettsäuren Butyrat und VPA; die zyklischen Peptide Trapoxin und Depsipeptid sowie die Benzamide MS-275 und CI-994.

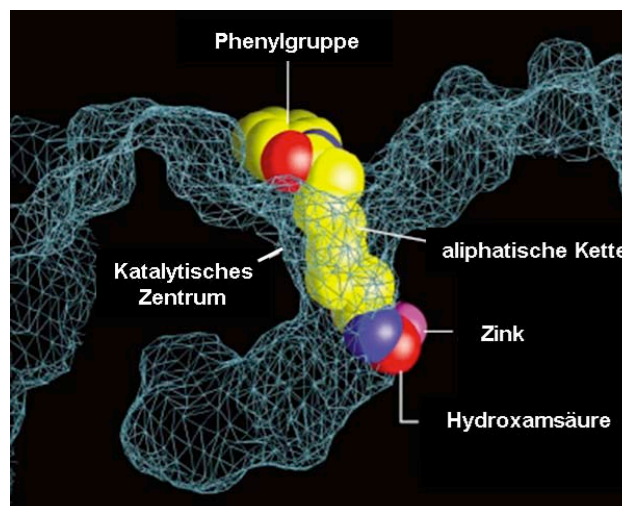
Trichostatin A (TSA) ist einer der potentesten HDACi und wirkt wie Trapoxin bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich. Auf Grund der hohen Toxizität und der geringen Halbwertszeit *in vivo* ist TSA allerdings für die Therapie von Patienten nicht verwendbar. Der

strukturell verwandte HDACi SAHA zeigt hingegen eine gute Bioverfügbarkeit und wurde bereits in klinischen Studien eingesetzt (Kap. 1.6.3). SAHA wirkt wie die meisten anderen HDACi bei mikromolaren Konzentrationen.

Als einer der ersten HDACi konnte Phenylbutyrat identifiziert und in Kombination mit Retinsäure erfolgreich bei der Behandlung eines Patienten mit Akuter Promyeloischer Leukämie angewendet werden [78]. Phenylbutyrat ist allerdings auf Grund der kurzen Halbwertszeit *in vivo* nur von bedingtem klinischem Nutzen.

Valproinsäure (VPA) wird seit mehr als 30 Jahren unter anderem in der Dauerbehandlung von Epilepsie eingesetzt und überzeugt als Medikament mit hoher Bioverfügbarkeit sowie geringen Nebenwirkungen. Für diesen HDAC-Inhibitor steht eine große Anzahl an klinisch relevanten Daten zur Verfügung. Das macht VPA zu einem potenten Kandidaten für die Krebstherapie. VPA wird derzeit in mehreren klinischen Studien dahingehend getestet. Wie Butyrat wirkt auch VPA erst bei millimolaren Konzentrationen (0,5-1,5 mM).

Durch Röntgenstrukturanalysen am archaebakteriellen HDAC-Homolog konnte der Mechanismus der Inhibition durch TSA und SAHA gezeigt werden [87]. Die Bindung von SAHA an das katalytische Zentrum des HDAC-homologen Proteins und das Ausbilden einer Chelatbindung mit  $Zn^{2+}$  führt zur Blockierung der Deacetylierungsaktivität (Abb.1.6). Für die HDAC-Inhibitoren Trapoxin und Depudecin konnte eine irreversible, kovalente Bindung an das katalytische Zentrum nachgewiesen werden [88,89].



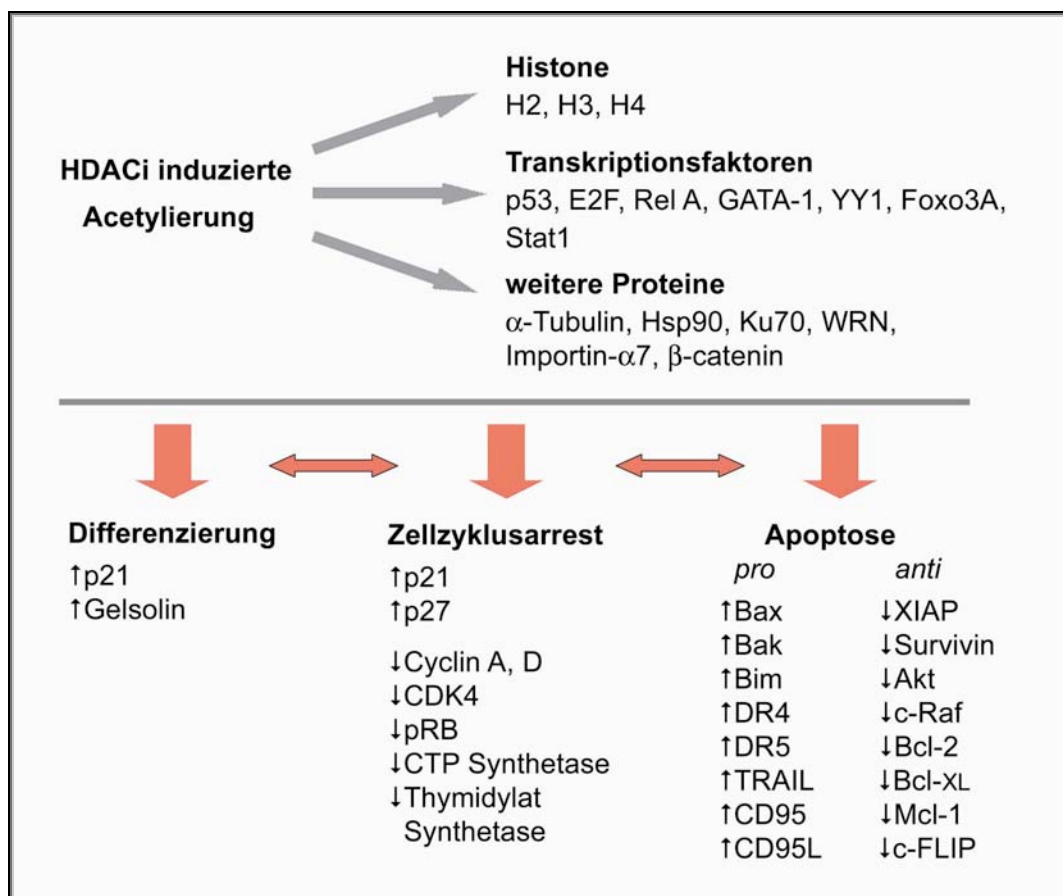
**Abbildung 1.6: Bindung von SAHA an ein HDAC-homologes Protein**

SAHA bindet im katalytischen Zentrum des homologen HDAC-Proteins (Netzstruktur). Die Struktur des dargestellten katalytischen Zentrums beruht auf Röntgenstrukturanalysen des HDAC-Homologs in *Aquifex aeolicus*. In dieser Studie wurde die Bildung eines Chelatkomplexes zwischen dem Zinkatom im Boden des röhrenförmigen katalytischen Zentrums und der Hydroxamsäure am Ende der aliphatischen Seitenkette des HDACi gezeigt. (aus Ref.: [87])

Untersuchungen zum VPA-vermittelten Mechanismus zeigten, dass VPA bevorzugt HDACs der Klasse I inhibiert und es auch hier möglicherweise zu einer Bindung an das katalytische Zentrum kommt [90]. Zusätzlich kann VPA den proteosomalen Abbau von HDAC2 induzieren [91].

### 1.6.2 Mechanismen der HDACi-vermittelten Anti-Tumor Wirkung

Zahlreiche Tumorzelllinien reagieren auf eine HDACi Behandlung mit Proliferationsstopp, Apoptose oder auch Differenzierung. Wie HDACi diese Effekte auslösen ist noch nicht vollständig geklärt. Man findet allerdings in den entsprechenden Zellen häufig eine veränderte Expression von Proteinen, die diese Prozesse steuern. Abbildung 1.7 fasst die Ergebnisse zahlreicher Studien zusammen. Welcher Prozess stattfindet und welche Proteine reguliert werden hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie der Struktur und der Konzentration des HDACi, der Behandlungsdauer sowie von der Art des verwendeten Zelltyps.



**Abbildung 1.7: HDACi induzieren Zellzyklusarrest, Differenzierung sowie Apoptose**

Die Behandlung von Zellen mit HDACi führt zur Acetylierung von Core-Histonen, Transkriptionsfaktoren sowie weiteren Proteinen. Es resultiert eine veränderte Genexpression von Zellzyklus-, Differenzierungs- und Apoptose-regulierenden Proteinen. (modifiziert nach Ref.: [62])

Sehr häufig findet man eine Induktion der Expression von p21<sup>WAF/CIP1</sup>. Das Gen kodiert für ein Protein, welches Cyclin-abhängige Kinasen inhibiert. Auf diese Weise wird das Fortschreiten des Zellzyklus verhindert und üblicherweise ein G1 Arrest ausgelöst [92,93]. Die transkriptionelle Induktion von p21<sup>WAF/CIP1</sup> ist dabei auf eine Hyperacetylierung des entsprechenden Promotors zurückzuführen [94]. Zellen, die kein funktionelles p21<sup>WAF/CIP1</sup> besitzen sind resistent gegenüber HDACi-induziertem Wachstumsstopp [92,95]. Dies ist ein gutes Beispiel dafür, wie ein HDACi-sensitives Gen einen wichtigen biologischen Effekt beeinflussen kann. Die Hochregulation von p21<sup>WAF/CIP1</sup> ist jedoch möglicherweise nicht allein für den G1 Arrest verantwortlich, da auch die Repression von Zellzyklusregulatoren, wie Cyclin A, Cyclin D und CDK4, häufiger beobachtet wurde [92]. Interessanterweise scheint die Induktion von p21<sup>WAF/CIP1</sup> der HDACi-vermittelten Apoptose entgegen zu wirken. So hat man herausgefunden, dass Zellen nach einem Knockout von p21<sup>WAF/CIP1</sup> wesentlich empfindlicher auf HDACi-induzierte Apoptose ansprechen [92,93]. Das Ausmaß sowie die Kinetik der Induktion von p21<sup>WAF/CIP1</sup> durch HDACi Behandlung bestimmt möglicherweise die Sensitivität der Zellen bezüglich HDACi-induzierter Apoptose.

Die Behandlung mit HDACi hat häufig zur Folge, dass pro-apoptotische Gene induziert und anti-apoptotische Gene reprimiert werden (Abb. 1.7). Der induzierte Zelltod verläuft dabei zumeist über die Aktivierung des intrinsischen (mitochondrialen) Signalwegs der Apoptose (Kap. 1.7) [96]. Dies steht im Einklang damit, dass die Überexpression des anti-apoptotischen Moleküls Bcl-2 die HDACi-induzierte Apoptose effizient blockieren kann [97]. In wenigen Fällen wurde die Aktivierung des extrinsischen Signalweges über die so genannten Todesrezeptoren (z.B. CD95) beobachtet [98,99].

Hyperacetylierung von Ku70 führt zur Freisetzung von gebundenem, pro-apoptotischem Bax und kann somit zur Sensibilisierung von Tumorzellen gegenüber Apoptose führen [100]. Dies ist ein eindeutiges Beispiel für einen HDACi-vermittelten Effekt, der nicht auf transkriptioneller Basis beruht.

Hydroxamsäure-basierende Inhibitoren sind fähig HDAC6 zu hemmen und bewirken dadurch die Hyperacetylierung und die darauffolgende Inaktivierung des Hitzeschockproteins Hsp90. Dies führt letztendlich zum proteosomalen Abbau der diversen, assoziierten Proteine. Unter diesen befinden sich auch anti-apoptotische Moleküle wie Akt und c-Raf, was somit ebenfalls zur Sensibilisierung gegenüber Apoptose führt [62]. Interessanterweise werden die in Leukämien weit verbreiteten Onko-Proteine (z.B. BCR-ABL, Flt-3) ebenfalls durch Bindung an Hsp90 stabilisiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Hydroxamsäure-basierende HDACi deren proteosomalen Abbau induzieren [64,101].

Auch die Hyperacetylierung von zentromerem Heterochromatin während der S-Phase des Zellzyklus scheint bei der HDACi-vermittelten Apoptose eine wichtige Rolle zu spielen [84]. Der Verlust einer höher geordneten Struktur des Chromatins an dieser Stelle kann in

Tumorzellen zu einer anomalen Mitose mit darauf folgender Apoptose führen [102]. Normale Zellen hingegen besitzen einen funktionierenden G2 Kontrollpunkt. Die Mitose wird hier nicht eingeleitet, da es zum G2 Arrest kommt. Dies dient zugleich als eine mögliche Erklärung für die hohe Zytotoxizität von HDAC-Inhibitoren gegenüber Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen [84]. Gesunde Zellen weisen zwar ebenfalls Hyperacetylierung, Induktion von p21<sup>WAF/CIP1</sup> und teilweise Zellzyklusarrest auf, sie bleiben von Apoptose jedoch weitestgehend verschont. Die tumorselektiven Effekte der HDACi könnten aber auch auf den Methylierungsstatus der DNA zurückzuführen sein. Man hat herausgefunden, dass maligne Zellen 20-60 % weniger genomisches methyl-CpG aufweisen [103]. Die DNA-Methylierung ist eine dominante Form der Genrepression, die nicht durch Hyperacetylierung aufgehoben werden kann. Somit wäre das hypomethylierte Genom von Tumorzellen sensibilisiert gegenüber dem transkriptionellen Einfluss von HDACi.

Die Behandlung mit HDACi verschiebt das Gleichgewicht von pro- und anti-apoptotischen Molekülen in der Zelle. Daraus resultiert eine Herabsetzung des Schwellenwertes für den programmierten Zelltod. Dies liefert eine plausible Erklärung dafür, dass HDACi mit einer Vielzahl von strukturell verschiedenen Chemotherapeutika synergistische Effekte zeigen (zusammengestellt in [84]). Die Behandlung mit HDACi führt möglicherweise generell zur Sensibilisierung der Tumorzellen für verschiedene apoptotische Stimuli. So wird z.B. spekuliert, dass HDACi-vermittelte Auflockerung des Chromatins eine Rolle beim beobachteten Synergismus mit DNA-interkalierenden Medikamenten (z.B. Anthrazyklinen) wie auch mit Strahlenbehandlung spielen könnte [104-106].

### 1.6.3 Histondeacetylase-Inhibitoren in klinischen Studien

Eine ganze Reihe von HDACi wird aktuell in verschiedenen klinischen Studien untersucht. Hierbei handelt es sich um Substanzen, die den unterschiedlichsten Strukturklassen entstammen: *kurzkettige Fettsäuren*: VPA; *zyklische Peptide*: Depsipeptid; *Hydroxamsäuren*: SAHA, Pyroxamid, LAQ-824, PXD101; *Benzamide*: MS-275, CI-994.

VPA wird derzeit in mehreren klinischen Studien (Gliom, Darmkrebs, Myelodysplastisches Syndrom, Akute Myeloische Leukämie) getestet [107]. In einigen dieser Studien kombiniert man VPA mit den Medikamenten der entsprechenden Standardtherapie [108]. Erste Ergebnisse dieser Studien deuten auf einen partiellen Behandlungserfolg durch VPA hin [107].

Depsipeptid konnte erfolgreich in einer Phase II Studie an 20 Patienten mit resistenten, T-Zell Lymphomen getestet werden [85]. In diesem Fall sprachen 2 Patienten sehr gut und 6 Patienten teilweise auf die Therapie an. Die Therapie wurde relativ gut vertragen und die Nebenwirkungen waren reversibel. Weitere Phase II Studien zu soliden und hämatologischen Tumoren sollen den klinischen Nutzen von Depsipeptid bestimmen [109,110].

Auch SAHA zeigte therapeutische Erfolge in Phase II Untersuchungen an Therapie-resistenten Patienten mit T-Zell Lymphomen [85]. In weiteren Studien konnte nach Behandlung mit SAHA eine objektive Rückbildung von Tumoren in Patienten mit diversen Karzinomen sowie B- und T-Zell Lymphomen festgestellt werden [111]. Es wurden nur reversible Nebenwirkungen beobachtet. SAHA wird weiterhin für den Einsatz gegen solide und hämatologische Krebserkrankungen getestet. Ein weiteres, vielversprechendes Hydroxamsäurederivat, PXD101, wird ebenfalls in Phase II Studien untersucht.

HDACi weisen zwar als Monotherapieansatz bereits einige klinische Erfolge auf, man geht aber heute davon aus, dass der klinische Nutzen wesentlich größer ist, wenn man die Substanzen mit weiteren Chemotherapeutika bzw. mit Strahlentherapie kombiniert.

## 1.7 Apoptose

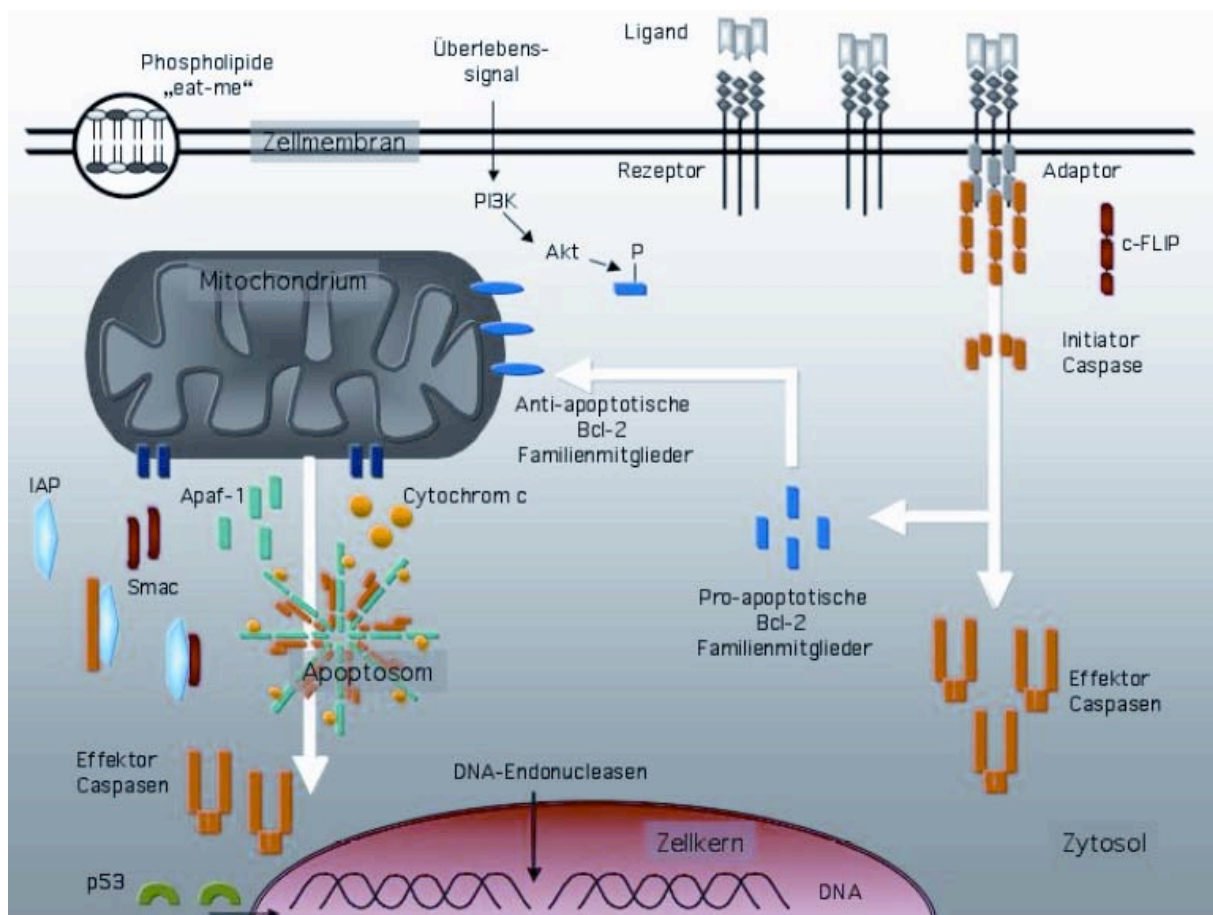
Die häufigste Form des programmierten Zelltods (PCD, programmed cell death) ist die Apoptose, ein physiologisches „Selbstmord“-Programm der Zelle. Dieses ist in multizellulären Organismen von essentieller Bedeutung für die embryonale Entwicklung und die Organogenese, sowie für die Aufrechterhaltung des Immunsystems und der Homöostase von Geweben [112-114]. Fehlregulationen der Apoptose sind im Zusammenhang mit einer Vielzahl von Erkrankungen beschrieben worden. Dazu gehören neurodegenerative Störungen, Autoimmunerkrankungen sowie Krebs. In einem Großteil der charakterisierten Tumorzellen fehlt ein funktionierender Tumorsuppressor namens p53. In gesunden Zellen kann p53 über transkriptionsabhängige sowie –unabhängige Mechanismen Apoptose einleiten, sollte es in der Zelle zu Störungen kommen, wie beispielsweise DNA-Schädigungen [115]. Das Auslösen von Apoptose in Tumorzellen ist eines der Hauptziele bei der Behandlung von Krebserkrankungen [116,117].

Die für die Ausführung der Apoptose essentiellen Schlüsselenzyme, die so genannten Caspasen, gehören zur Familie der Aspartat-spezifischen Cystein-Proteasen [118]. Um eine Regulation des apoptotischen Programms zu gewährleisten, werden Caspasen zunächst als inaktive Proenzyme exprimiert. Nach dem Auslösen der Apoptose durch Aktivierung von Initiator-Caspasen, wie Caspase-8 und Caspase-9 spalten diese in einer Kaskade die inaktiven Formen von Effektor-Caspasen. Dazu gehören Caspase-3, -6 und -7. Die aktivierten Effektor-Caspasen spalten wiederum eine spezifische Gruppe von intrazellulären Substraten und induzieren so die biochemischen und morphologischen Veränderungen des apoptotischen Phänotyps. Diese sind Chromosomen-Kondensation und internukleosomale Spaltung des Chromatins, Auflösen der Kernmembran, zytoplasmatische Fragmentierung sowie Abschnürung von apoptotischen Vesikeln („apoptotic bodies“). Im Verlauf der Apoptose kommt es zur Translokation bestimmter, normalerweise intrazellulär lokalisierter



Phospholipide an die Außenseite der Zellmembran. Diese stellen ein „eat-me“ Signal für benachbarte Zellen dar, die daraufhin die apoptotische Zelle phagozytieren [119].

Die Aktivierung der Caspasen kann über zwei unterschiedliche Signalwege verlaufen (Abb. 1.8). Der extrinsische Signalweg wird durch Bindung von Liganden an so genannte Todesrezeptoren auf der Zellmembran aktiviert. Bindung von Liganden, wie FasL oder TNF (tumor necrosis factor) an den Fas- bzw. TNF-Rezeptor, induziert die intrazelluläre Bildung eines DISC-Komplexes (death induced signalling complex). DISC rekrutiert und aktiviert Initiator-Caspasen wie Caspase-8 und löst somit die Aktivierung der Signalkaskade aus [120].



**Abbildung 1.8: Signalübertragungswege der Apoptose**

Typ I: Nach Ligandenbindung an den Todesrezeptor (extrinsischer Signalweg) kommt es zur Aktivierung der Initiator-Caspase 8. Dies kann die direkte Aktivierung von Effektor-Caspasen nach sich ziehen, aber auch einen zweiten, intrinsischen Signalweg der Apoptose mitbenutzen. Typ II: Die Freisetzung von Cytochrom-c aus dem Mitochondrium initiiert die Bildung des Apoptosoms mit Apaf-1 und Caspase 9, wobei es zur Aktivierung dieser Initiator-Caspase kommt. Auch hier werden im weiteren Verlauf Effektor-Caspasen aktiviert. Diese verursachen die apoptotischen Veränderungen der Zelle, unter anderem durch Aktivierung von Endonucleasen, welche die DNA im Zellkern fragmentieren. (aus Ref.: [121])

Der intrinsische Signalweg kann durch verschiedene extra- sowie intrazelluläre Stress-Situationen ausgelöst werden, wie Entzug von Wachstumsfaktoren, DNA-Schäden aber auch durch Behandlung mit diversen Stimulantien wie z.B. Glucocorticoiden, HDACi, usw. Die intrazellulär ausgelösten Signale konvergieren hauptsächlich in biochemischen Ereignissen, die zur Schädigung der Mitochondrien-Membran führen [122]. Die Permeabilisierung der Membran führt schließlich zur Freisetzung von Cytochrom c und weiteren, pro-apoptischen Molekülen und zur Formation des Apoptosoms. Dieses ist ein großer Multiprotein-Komplex, bestehend aus Cytochrom-c, Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) und der Procaspase 9, die innerhalb dieses Komplexes gespalten und somit aktiviert wird [120,122].

Die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran wird durch Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie reguliert. Diese umfaßt sowohl pro- (Bid, Bim, Bax, Bak), als auch anti-apoptisch wirkende Mitglieder (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>) [123,124]. Das Verhältnis von pro- zu anti-apoptischen Proteinen dieser Familie wird als entscheidend für das Schicksal der Zelle angesehen. Die Permeabilisierung des Mitochondriums stellt den entscheidenden Schritt des intrinsischen Signalweges dar, denn die Freisetzung von Cytochrom-c, führt irreversibel zur Kaskade der Caspase-Aktivierung [125].

Die beiden Signalwege (Typ I und II) laufen nicht streng voneinander getrennt ab. Die Caspasen 8 und 9 können sich gegenseitig aktivieren. Zudem werden Bcl-2 Proteine auch durch die extrinsische Signalkaskade beeinflusst [120].

## 1.8 Glucocorticoide

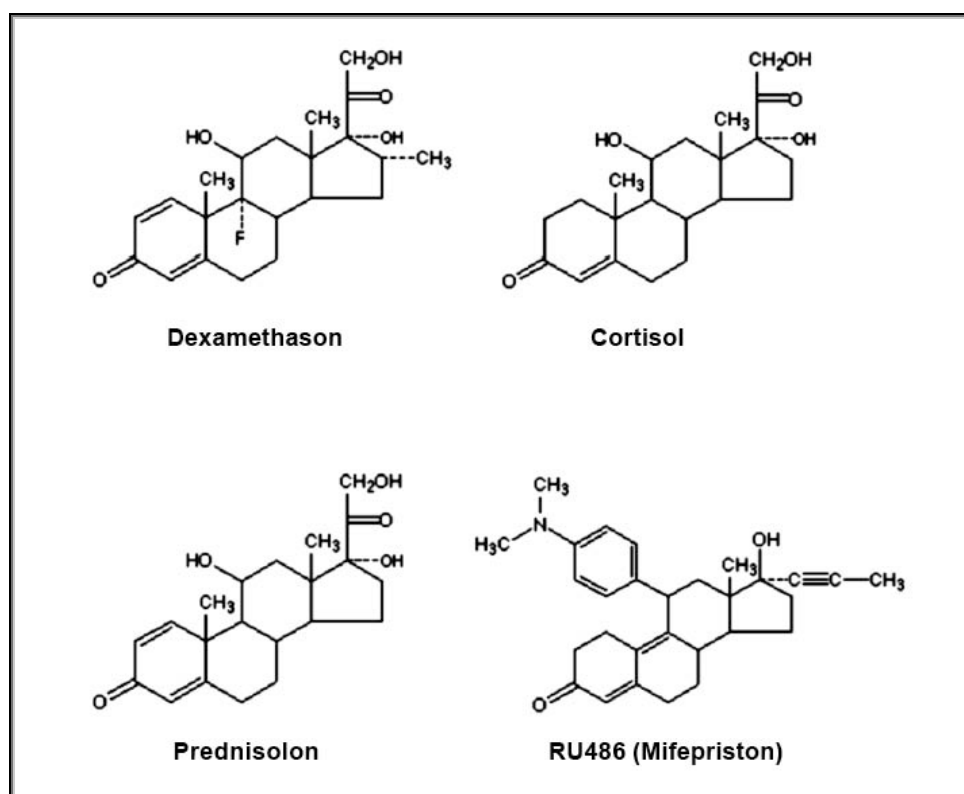
Das natürliche Glucocorticoid (GC) Cortisol ist an einer Vielzahl von Funktionen im Organismus beteiligt. Cortisol wirkt anti-inflammatorisch und vermittelt Reaktionen auf physischen sowie emotionalen Stress. Zudem stimuliert Cortisol die Gluconeogenese und trägt damit zur Regulation des Stoffwechsels bei.

Steroidhormone, zu denen neben den Glucocorticoiden auch Progesteron, Östrogene, Androgene und Mineralocorticoide zählen, werden im menschlichen Organismus in der Nebennierenrinde aus dem Vorläufer Cholesterin synthetisiert. Nach der Synthese werden diese Hormone in den Blutkreislauf abgegeben und auf Grund ihres lipophilen Charakters an Proteine gebunden zum Wirkungsort transportiert.

Die meisten intrazellulären Effekte von Glucocorticoiden werden über den Glucocorticoid-Rezeptor GR $\alpha$  vermittelt, der als Liganden-induzierbarer Transkriptionsfaktor agiert. GR $\alpha$  gehört zur Familie der Steroidhormonrezeptoren, die wegen ihres strukturell verwandten Aufbaus mit den Vitamin D-, Retinoid-, Thyroidhormon- und Peroxisom-Proliferator-Aktivator-Rezeptoren zur Überfamilie der nukleären Rezeptoren zählen.

### 1.8.1 Struktur von Glucocorticoiden

Die Grundstruktur sämtlicher Steroidhormone geht auf das Cholesterin-Grundgerüst zurück. Modifikationen des Steroidgrundgerüsts mit funktionellen Gruppen führen zu einer unterschiedlich starken und selektiven Bindung der Liganden an die verschiedenen Steroidhormon-Rezeptoren. Eine große strukturelle Ähnlichkeit besteht beispielsweise zwischen den Mineralocorticoiden und den Glucocorticoiden. Dies drückt sich in einer überschneidenden, wenn auch unterschiedlich starken Affinität für beide Rezeptoren aus [126].



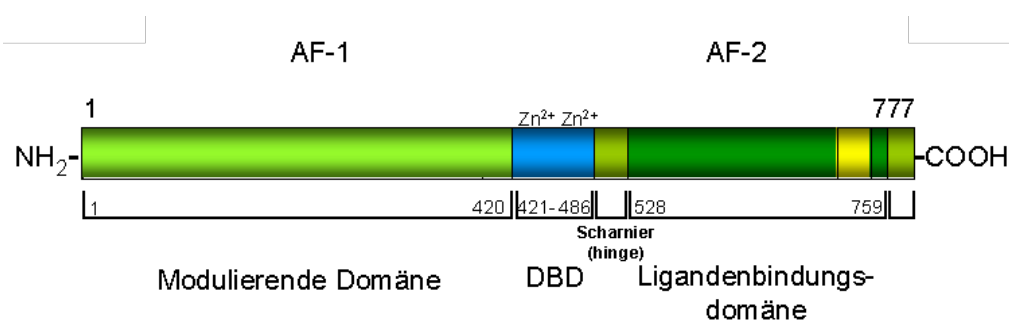
**Abbildung 1.9: Strukturformeln einiger Glucocorticoide**

Die Abbildung zeigt die Strukturformeln von Cortisol und den synthetischen Glucocorticoiden Dexamethason und Prednisolon. Bei RU486 (Mifepriston) handelt es sich um den GR-Antagonisten. Prednisolon und Dexamethason werden häufig eingesetzt in der GC-Therapie.

Durch chemische Modifikationen bei der synthetischen Herstellung von Glucocorticoiden (siehe Prednisolon und Dexamethason versus Cortisol, Abb. 1.9) konnte die Spezifität für den GR verbessert werden. Die chemischen Veränderungen wie das Einführen einer weiteren Doppelbindung, die Methylierung und die Halogenierung führte zu einer deutlich stärkeren Affinität der künstlichen Glucocorticoide zu GR $\alpha$  und einer verlangsamten proteolytischen Degradation des Rezeptors [126-128]. Diese Schritte führten zu einer enormen Verbesserung des therapeutischen Nutzens von Glucocorticoiden.

### 1.8.2 Domänenstruktur des Glucocorticoid-Rezeptors

Der Glucocorticoid-Rezeptor ist ein Phosphoprotein mit einer molaren Masse von 85-97 kDa und besteht aus drei Hauptdomänen (Abb. 1.10). Die N-terminale Hauptdomäne des GR enthält die Aktivierungsdomäne AF-1, deren Funktion in der Wechselwirkung mit basalen Transkriptionsfaktoren und den Co-Faktoren liegt [129-131]. Die DNA-Bindungsdomäne (DBD) vermittelt die Wechselwirkung und Bindung an spezifische Glucocorticoid-Erkennungssequenzen (GRE), die meist in der Enhancer-Region von Genen zu finden sind. Das DNA-Bindungsmotiv besteht aus zwei Zinkfinger-Motiven, wobei jeweils ein tetraedrischer Komplex aus vier Cysteinen und einem  $Zn^{2+}$ -Ion gebildet wird [132].



**Abbildung 1.10: Struktur des Glucocorticoid-Rezeptors**

Die dreiteilige Domänen-Struktur ist ein charakteristisches Merkmal der Steroidhormon-Rezeptoren. Die funktionale Bedeutung der einzelnen Domänen ist dem Text zu entnehmen.

Die C-terminale Liganden-Bindungsdomäne (LBD) besitzt eine komplexe Struktur von 250 Aminosäuren Länge, die 12 Helices und ein  $\beta$ -Faltblatt bildet [133]. Durch Proteinfaltung entsteht im Zentrum der LBD eine hydrophobe Tasche, in der die Ligandenbindung stattfindet. Die LBD enthält eine zweite, hochkonservierte Aktivierungsdomäne AF-2, die für die Liganden-abhängige Aktivierung der Transkription wichtig ist [134,135]. AF-2 entspricht der amphipathischen, C-terminalen Helix 12. Röntgenstrukturanalysen haben ergeben, dass die Position von Helix 12 stark von der Ligandenbindung abhängt und sehr wahrscheinlich als eine Art molekulare Schalter wirkt [136]. Bindet ein Agonist (Cortisol), dann platziert sich Helix 12 so, dass eine hydrophobe Koaktivator-Bindungsstelle entsteht. Zusätzlich wird durch diese Struktur die Bindung durch Korepressoren erschwert. Umgekehrtes gilt für die Bindung durch einen Antagonisten (Ru486). In der LBD konnte auch eine Bindungsstelle für das Hitzeschockprotein Hsp90 lokalisiert werden [136,137].

### 1.8.3 Signaltransduktion durch den Glucocorticoid-Rezeptor

In Abwesenheit des Liganden liegt GR $\alpha$  in einem Multiprotein-Komplex gebunden im Zytosol vor. An der Komplexbildung beteiligt sind ein Dimer des Hsp90 sowie weitere

Hitzeschockproteine und Immunophiline [138,139]. Die Hitzeschockproteine (Chaperone) gewährleisten eine korrekte Proteinfaltung und ermöglichen so eine effektive Ligandenbindung. Das GR-Monomer wird dadurch außerdem vor proteosomalem Abbau geschützt und bleibt in einem inaktiven Zustand erhalten [140]. Glucocorticoide können als kleine, lipophile Moleküle aus dem Blutkreislauf durch die Zellmembran in die Zielzelle hinein diffundieren und an den Rezeptor binden. Die Bindung des Liganden verursacht eine Konformationsänderung des GR, woraufhin dieser aus dem Multiproteinkomplex dissoziiert. Die Konformationsänderung bewirkt weiterhin eine Exposition der nukleären Lokalisationssignale und ermöglicht dadurch den Eintritt in den Zellkern.

Hier kann der Rezeptor nun auf verschiedene Arten agieren. Die Bindung an GR-Bindungselemente (GREs) in Promotorregionen von Genen führt zur Homodimerisierung des GR. Das Homodimer übt nun als Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor einen positiven Einfluss auf die Genexpression aus (Cis-Aktivierung). Umgekehrt kommt es zur Genrepression bei Bindung an negative GR-Bindungselemente (nGREs), wobei der Mechanismus der Cis-Repression noch relativ unklar ist. Weiterhin kann der GR auch als Monomer, über DNA-unabhängige Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, die Genexpression negativ beeinflussen (Trans-Repression) [141,142].

Eine zweite, alternative Splicevariante des Glucocorticoid Rezeptors ist GR $\beta$ . Dieser ist im Gegensatz zu GR $\alpha$  konstitutiv nukleär lokalisiert. Es wird allgemein vermutet, dass er durch Proteininteraktion mit GR $\alpha$  und Heterodimerisierung an positive GREs bindet und somit die cis-Aktivierung durch homodimere GR $\alpha$  verhindert [143,144].

#### **1.8.4 Apoptose durch Glucocorticoide**

Seit vielen Jahrzehnten ist bekannt, dass Glucocorticoide auf entartete Zellen mit lymphatischem Ursprung stark zytotoxisch wirken. In der Regel wird dabei Apoptose (Kap.1.6) ausgelöst. Dementsprechend werden GC seit langem sehr erfolgreich in der Behandlung von Leukämien, Lymphomen und Multiplen Myelomen eingesetzt [145-147].

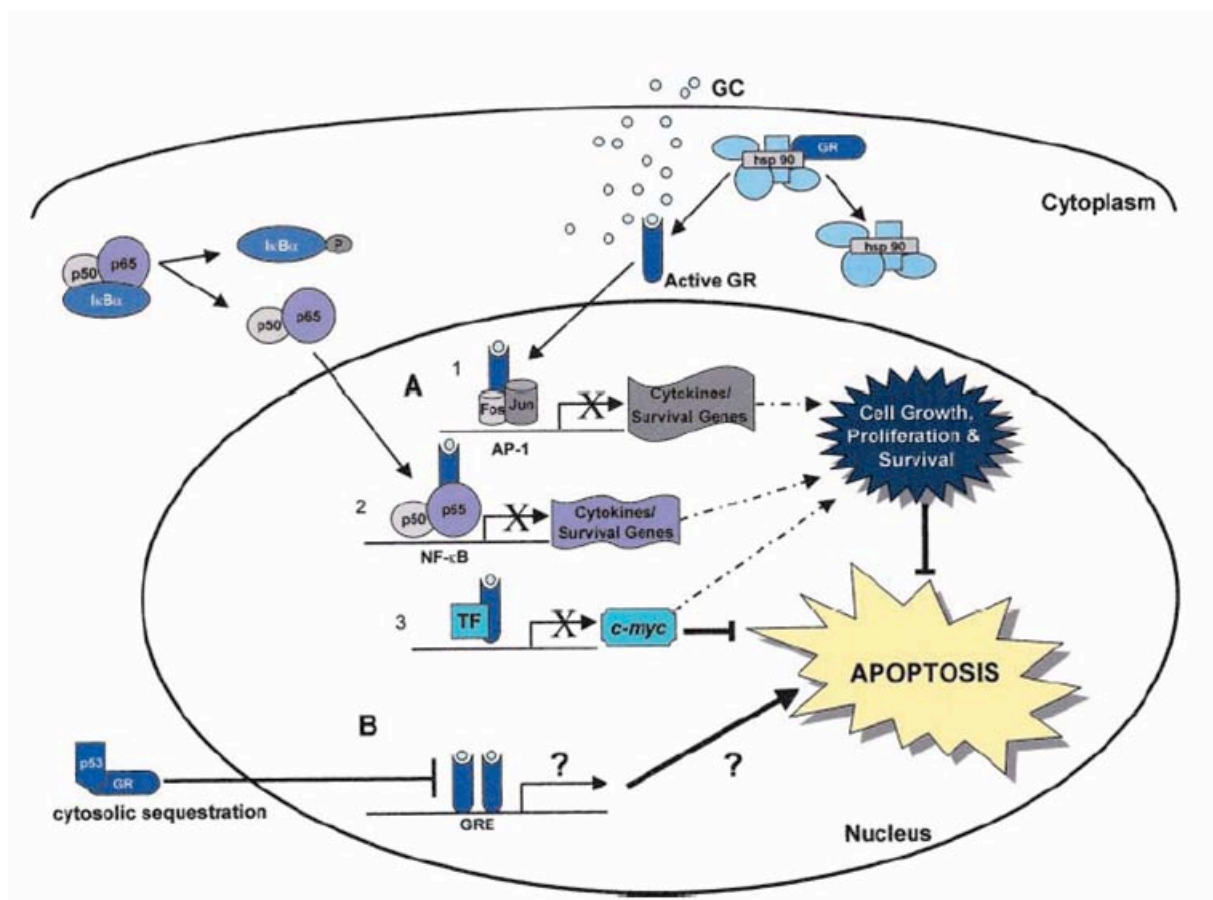
Interessanterweise wirken GC auf die meisten anderen Zellarten wie z.B. Erythrozyten, Neutrophile und viele nicht-hämatologische Gewebezellen wachstumsfördernd [148].

Trotz zahlreicher Untersuchungen ist es bis heute nicht gelungen einen generellen molekularen Mechanismus für die GC vermittelte Apoptose zu finden. Man hat allerdings mit der Zeit einige Modelle entwickelt, die zumindest teilweise die pro-apoptische Wirkung von Glucocorticoiden erklären.

Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, dass für die GC induzierte Apoptose ein funktionierender GR $\alpha$  unerlässlich ist [149-152]. Versuche mit Dimerisierungs-defizientem GR deuten darauf, dass Homodimerisierung und somit die Cis-Aktivierung für die Apoptose essentiell ist [149]. Man hat allerdings bislang noch kein pro-apoptisches Gen identifiziert,

welches direkt über diesen Weg induziert wird. Andere Studien belegen sogar die Bedeutung der Trans-Repression für den zytotoxischen Effekt von Glucocorticoiden [152,153].

Abbildung 1.11 zeigt ein Modell wie Trans-Repression das Gleichgewicht zwischen Überleben und Apoptose in der Zelle verschieben kann. Durch direkte Interaktion von monomerem GR mit den Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 kommt es zu einer Repression der nachgeschalteten Genexpression, wobei es sich um Gene handelt, die Zellwachstum und Zellteilung beschleunigen und an anti-apoptischen Prozessen beteiligt sind [153-155]. Wahrscheinlich tragen sowohl Cis-Aktivierung als auch Trans-Repression zur Auslösung der Apoptose in Lymphozyten bei [156].



**Abbildung 1.11: Mögliche Mechanismen der GC-vermittelten Apoptose**

GC-induzierte Apoptose kann über die Regulation der Genexpression erfolgen. Nach der nukleären Translokation des Liganden-gebundenem GR kann DNA-Bindung an GRE als Homodimer (Cis-Aktivierung) oder Interaktion als Monomer mit Transkriptionsfaktoren (Trans-Repression) erfolgen.

**A)** AP-1 (1) und NF- $\kappa$ B (2) aktivieren die Transkription von Zytokinen und weiteren Wachstumsfaktoren und dies resultiert in vermehrter Zell-Proliferation. GR blockiert diese transkriptionelle Aktivität über Trans-Repression. Auch das Protoonkogen *c-myc* (3) steuert Zellzyklus und Proliferation und wirkt darüber wachstumsfördernd. GR reprimiert die Expression von *c-myc* durch einen bisher unbekanntem Mechanismus. **B)** GR bindet als Homodimer an positive GRE und aktiviert die Expression von möglicherweise pro-apoptisch wirkenden Genen. Die cis-repressive Wirkung von GR ist nicht dargestellt (siehe Text). (aus Ref.: [157])

Da der GC-vermittelten Apoptose offensichtlich eine veränderte Genexpression zu Grunde liegt, hat man zahlreiche Expressionsprofile mit Hilfe von Mikrochip-Technologie erstellt (zusammengestellt in [156]). Je nach Studie findet man pro-apoptotische Gene (z.B. Bim) hochreguliert sowie wachstumsfördernde Gene (z.B. c-myc) herunterreguliert. Die Schnittmenge für Gene, die in den verschiedenen Studien (mit unterschiedliche Zellen) auf gleiche Weise reguliert wurden, ist aber verschwindend gering. Leider stellt diese Beobachtung aber auch ein grundsätzliches Problem beim Vergleichen von Microarray-Analysen dar [158].

Wie Glucocorticoide Apoptose auslösen ist offenbar stark vom entsprechenden Zellkontext abhängig. In fast allen Systemen wird aber letztendlich der intrinsische Signalweg durchlaufen, welcher mit der Aktivierung von Caspase 9 einhergeht [157].

Es kommt immer wieder vor, dass lymphatische Krebszellen gegen GC Behandlung resistent sind oder es im Laufe der Behandlung werden. Hier gibt es multiple Mechanismen, die dem zu Grunde liegen können. Teilweise ist der GR nicht in ausreichender Menge exprimiert oder liegt in mutierter Form vor. Eine weitere Ursache ist eine zu niedrige intrazelluläre Konzentration an GC, beispielsweise durch Überexpression von ABC-Transportern, was eine häufige Ursache für die Entstehung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika darstellt. Aber auch wichtige Assoziationspartner des Glucocorticoid Rezeptors sowie dessen induzierte Signalwege („downstream“-Mechanismen) können von Fehlfunktionen betroffen sein [156] und somit die Resistenz gegen GC verursachen.

## **1.9 Akute Lymphatische Leukämie**

### **1.9.1 Hämatopoese und Entstehung von akuten lymphatischen Leukämien**

Unter dem Begriff der Leukämie (weißes Blut) fasst man maligne Erkrankungen der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) des hämatopoetischen Systems zusammen. Unter der Hämatopoese versteht man die Entstehung sämtlicher Zellen des blutbildenden Systems aus den hämatopoetischen Stammzellen (Abb.:1.12).

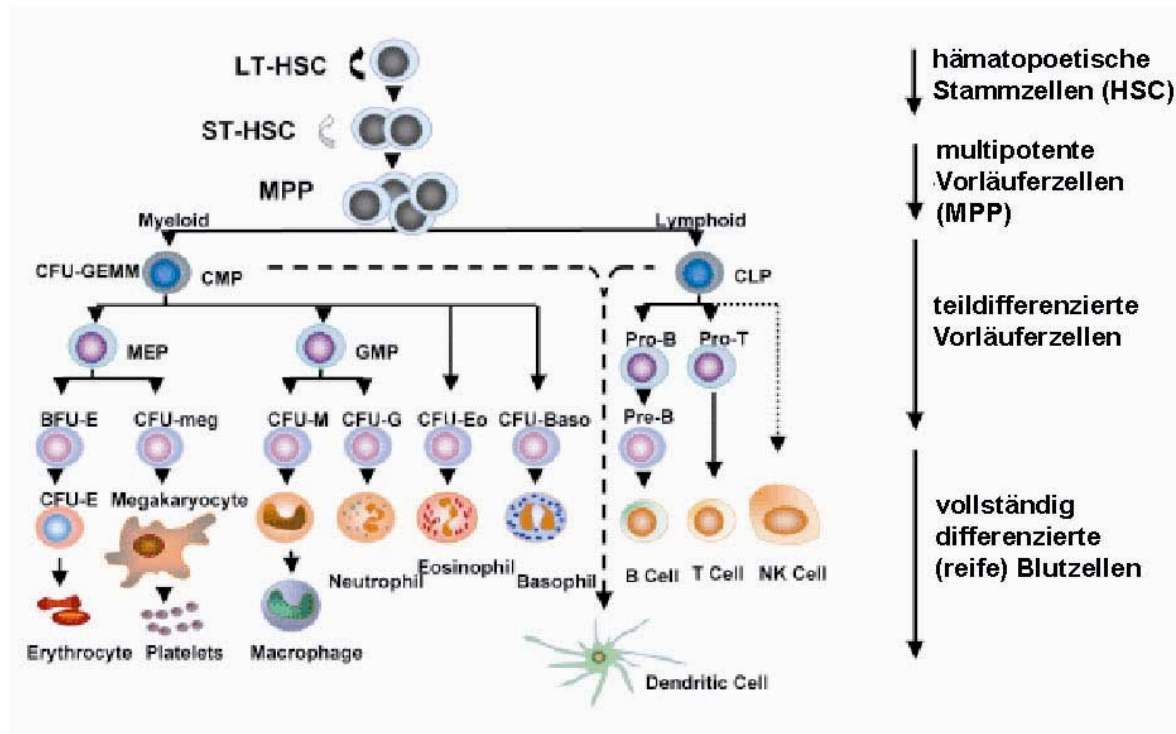
Das klonale Wachstum von entarteten hämatopoetischen Zellen ist die Grundlage der Entstehung von Leukämien. Die Leukämiezellen (Blasten) können aus den unterschiedlichsten Differenzierungsstadien der hämatopoetischen Entwicklung, einschließlich der pluripotenten Stammzellen, hervorgehen. Sie sind gemeinsam charakterisiert durch unkontrollierte Proliferation und Akkumulation unreifer, morphologisch veränderter und funktionell gestörter Leukozyten im Blut, aber auch in Organen wie Knochenmark, Milz, Leber und Lymphknoten.

Abhängig von den entsprechenden Ursprungszellen können Leukämien wie folgt klassifiziert werden. Man unterscheidet prinzipiell zwischen myeloischer und lymphatischer Leukämie



und weiterhin zwischen einem chronischen bzw. einem akuten Verlauf. Bei den lymphatischen Leukämien unterscheidet man zwischen der B- und der T-Zellreihe.

In den einzelnen Gruppen gibt es dann noch weitere Klassifizierungsmerkmale, wie beispielsweise in welchem Differenzierungsstadium die Zelle arretiert ist. Akute lymphatische Leukämien haben häufig ihren Ursprung im prä-B-Zell Stadium.



**Abbildung 1.12: Normale Hämatopoese**

Die hämatopoetischen Stammzellen sind je nach Subtyp (longterm,LT bzw. shortterm,ST) in der Lage sich viele Male zu teilen bzw. sich selbst zu erneuern. Aus ihnen entstehen multipotente Vorläuferzellen, die dann weiter differenzieren in die beiden Hauptlinien. Dies ist einerseits die myeloische Linie (links) und andererseits die lymphatische Linie (rechts). Über verschiedene Zwischenstufen entstehen die diversen reifen Blutzellen.

Die Ursachen der Leukämieentstehung sind bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch wurden im Zusammenhang mit Leukämien zahlreiche chromosomale und genetische Veränderungen beschrieben [159]. Ein großer Teil der Veränderungen geht auf chromosomale Translokationen zurück. Diese können zur Entstehung von Fusionsgenen führen, die für Onkoproteine kodieren. Die transformierende Wirkung solcher Proteine konnte bereits mehrfach gezeigt werden. Gut untersuchte Beispiele stellen die beiden Fusionsproteine PML-RAR $\alpha$  (Akute Promyeloische Leukämie, APL) und AML1-ETO (Akute Myeloische Leukämie, AML) dar [74,75]. Diese Proteine sind in der Lage Differenzierungsgene konstitutiv zu reprimieren (Kap. 1.5).

Eine große Zahl der gefundenen chromosomalen Translokationen, beinhalteten hämatopoetische Transkriptionsfaktoren wie TEL, AML oder MLL als Fusionspartner [74].



Für die akuten lymphatischen Leukämien gibt es Schätzungen, nach denen die gefundenen spezifische Genotypen mit folgender Verteilung auftreten [81,160]:

Bei Kindern:

- Hyperdiploider Chromosomensatz (>50 Chromosomen)  $\approx$  25 %
- TEL-AML1 (konstitutive Repression durch HDAC Rekrutierung)  $\approx$  22 %
- T-Zell Linie: (TAL1, HOX11L2, LYL1, HOX11,MLL-ENL)  $\approx$  12 %
- MLL-Fusionen  $\approx$  8 %
- E2A-PBX1  $\approx$  5 %
- BCR-ABL  $\approx$  3 %
- MYC  $\approx$  2 %
- Hypodiploider Chromosomensatz (<45 Chromosomen)  $\approx$  1 %
- Rest (teils nicht näher klassifiziert)  $\approx$  22 %

Bei Erwachsenen:

- BCR-ABL  $\approx$  25 %
- T-Zell Linie: (TAL1, HOX11L2, LYL1, HOX11,MLL-ENL)  $\approx$  24 %
- MLL-Fusionen  $\approx$  10 %
- Hyperdiploider Chromosomensatz (>50 Chromosomen)  $\approx$  7 %
- MYC  $\approx$  4 %
- E2A-PBX1  $\approx$  3 %
- TEL-AML1 (konstitutive Repression durch HDAC Rekrutierung)  $\approx$  2 %
- Hypodiploider Chromosomensatz (<45 Chromosomen)  $\approx$  1 %
- Rest (teils nicht näher klassifiziert)  $\approx$  23 %

Gut charakterisiert ist auch das so genannte Philadelphia-Chromosom (bcr-abl), welches wie viele andere Onkogene für eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase kodiert [161,162]. Auf diese Weise wird der Signalweg für Wachstumsfaktoren ständig positiv beeinflusst. Es handelt sich hierbei um eine häufige Translokation, die in myeloischen wie auch in lymphatischen Leukämien gefunden wird.

Leukämie stellt mit einem Anteil von 35 % die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter dar. Die Inzidenzrate für eine pädiatrische Leukämie ist in den letzten 20 Jahren von 4 auf fast 5 Fälle pro 100.000 Kinder in Deutschland gestiegen [163]. Am häufigsten tritt die Leukämie im Alter zwischen 2 und 5 Jahren auf. Es handelt sich hierbei zumeist um akute Leukämien, wobei die akuten lymphatischen Leukämien (ALL) einen Anteil von ca. 80 % und die akuten myeloischen Leukämien (AML) von ca. 15 % ausmachen [163]. In den restlichen Fällen handelt es sich um die im Kindesalter sehr seltene Chronisch Myeloische Leukämie (CML) oder um nicht näher klassifizierbare Formen der Leukämie.

### 1.9.2 Therapiekonzept bei ALL im Kindesalter

Seit mehr als 50 Jahren setzt man Chemotherapie gegen ALL im Kindesalter ein. Maligne Zellen mit lymphatischem Ursprung sind im Vergleich zu anderen Krebszellen oft sehr sensitiv gegenüber einer Behandlung mit zytotoxischen Substanzen. Das exzellente Ansprechen auf die angewandte Polychemotherapie hat die Heilungschancen für ALL im Kindesalter enorm erhöht. War die Fünfjahresüberlebensrate vor 1965 nur 5%, so lag sie zwischen 1999 und 2003 in Deutschland bei 87 % [163]. Allerdings können bislang nur etwa 30 bis 40% der erwachsenen Patienten mit ALL geheilt werden, was zum Teil auf den höheren Anteil an Leukämieformen mit schlechter Prognose (BCR-ABL positiv, T-Zell-Leukämie) zurückzuführen ist [160].

Die weitestgehend standardisierte Chemotherapie bei ALL besteht aus drei Stufen [164]. Zunächst erfolgt eine 4-wöchige Induktionsphase zur Reduktion der Blastenzahl. Es folgt die Konsolidierungstherapie mit dem Ziel noch verbliebene leukämische Blasten zu vernichten. Anschließend erhält der Patient noch eine mehrjährige Erhaltungstherapie, um der Entstehung von Rezidiven (Rückfällen) vorzubeugen. Nur bei Patienten mit schlechter Prognose bzw. nach einem Rezidiv wird zusätzlich noch eine Bestrahlungstherapie oder gegebenenfalls eine Stammzelltransplantation durchgeführt.

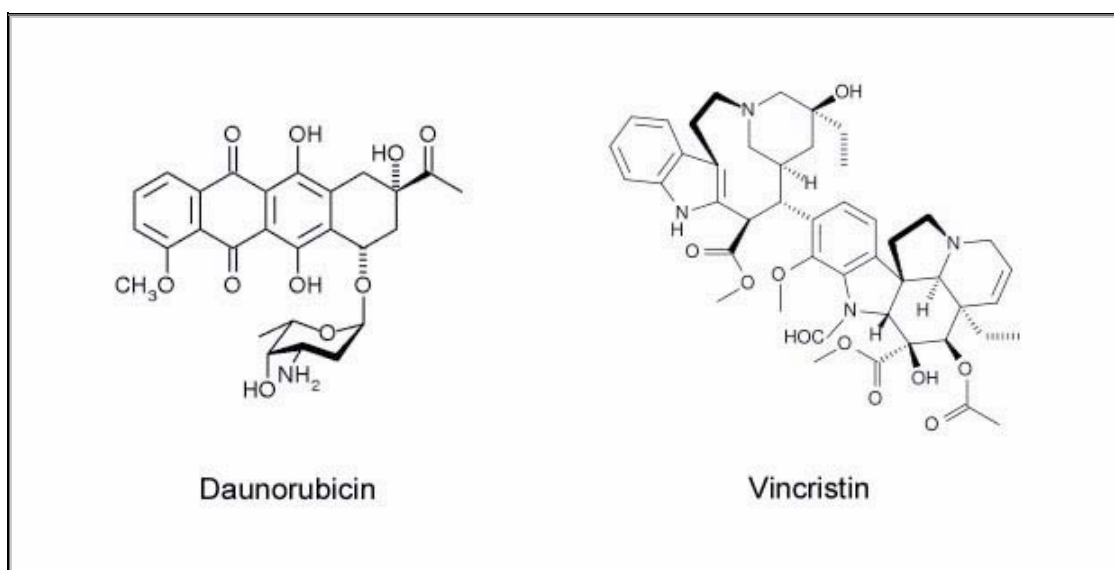
Eine Schlüsselrolle in der Induktionstherapie kommt den Glucocorticoiden zu [145], wobei zurzeit in der klinischen Praxis weitestgehend Prednisolon eingesetzt wird. Dies wird aber wahrscheinlich in Zukunft durch das effektivere Dexamethason ersetzt, welches bereits in mehreren klinischen Studien erfolgreich getestet wurde [165,166]. Das Ansprechen auf die Therapie mit Glucocorticoiden ist einer der wichtigsten prognostischen Faktoren [167]. Bei schlechtem Ansprechen während der Induktionstherapie werden die Patienten als Hochrisikofälle eingestuft. Dies resultiert dann in einer Therapieintensivierung.

Die Kombination von Glucocorticoiden mit Vincristin und L-Asparaginase in der Induktionsphase hat dazu geführt, dass die meisten pädiatrischen Patienten (95 %) nach 4 Wochen eine Remission (Blastenzahl im Blut < 5 %) erreichen [168].

Vincristin, ein pflanzliches Alkaloid, bindet Tubulin und verhindert so die Tubulinpolymerisation zu Spindeln, die normalerweise in der Metaphase der Zellteilung die duplizierte DNA auseinander ziehen. Auf diese Weise wird die Zellteilung effektiv inhibiert. L-Asparaginase ist ein tetrameres Protein mit einem Molekulargewicht von 130 kDa [169]. Es kommt in humanem Gewebe nicht vor und wird üblicherweise aus E. coli Bakterien gewonnen. Das Enzym katalysiert die Hydrolyse von L-Asparagin zu L-Asparaginsäure und Ammoniak im Serum und im Extrazellulärraum. In zahlreichen Tumorzellen, besonders in ALL-Zellen, liegt häufig ein Mangel an L-Asparagin-Synthetase vor, wodurch diese Zellen auf das Einbringen von externem L-Asparagin angewiesen sind. Eine Behandlung mit

L-Asparaginase bewirkt in diesen Zellen eine verminderte Proteinbiosynthese und die Induktion von Apoptose [170].

Bei Hochrisikopatienten kann zusätzlich noch ein Anthrazyklinderivat, wie beispielsweise Doxo- oder Daunorubicin verabreicht werden [168]. Diese extrem toxischen Substanzen verhindern Zellwachstum und DNA-Replikation auf mehrere Weisen. Sie hemmen die für die Replikation benötigte Topoisomerase, interkalieren in die DNA und bewirken außerdem radikalische DNA-Strangbrüche. Die hohe Effektivität dieser Substanzgruppe geht leider mit enormen Nebenwirkungen und der Gefahr von Erbgutschädigungen einher.



**Abbildung 1.13: Strukturformeln von Daunorubicin und Vincristin**

Trotz des erwähnten Fortschritts erleiden etwa 20 % der Kinder ein Rezidiv der Erkrankung. Dabei treten im Allgemeinen die meisten Rezidive innerhalb von fünf Jahren nach der Erstdiagnose einer ALL auf. Die Überlebenschance nach einem Rezidiv ist generell schlecht. Es kommt hinzu, dass der aktuelle Behandlungserfolg im Wesentlichen auf eine Risiko orientierte, sehr aggressive Behandlung zurückzuführen ist [171]. Da immer mehr junge Patienten die Krankheit überleben, ist nun das Problem der Langzeit-Nebenwirkungen der Chemotherapie und dabei vor allem das Risiko zur Bildung von Sekundärtumoren hochaktuell geworden [163,172,173].

## 2 Aufgabenstellung

Die Kombination von etablierten Wirkstoffen mit Histondeacetylase-Inhibitoren wird gegenwärtig als ein sehr erfolgsversprechender Ansatz angesehen, der bei vielen verschiedenen Krebserkrankungen zur Verbesserung der Standardtherapie beitragen könnte. Etliche HDACi werden derzeit in klinischen Studien dahingehend getestet, darunter auch VPA. Diese kurzkettige Fettsäure wird seit Jahrzehnten weltweit gegen Epilepsie eingesetzt. Für VPA liegen daher, im Gegensatz zu den anderen HDACi, sehr viele klinisch relevante Daten vor.

Von 100.000 Kindern in Deutschland erkranken pro Jahr etwa vier an akuter lymphatischer Leukämie. Obwohl man mit einer modernen Polychemotherapie die Heilungschancen für die pädiatrischen Patienten enorm verbessert hat, erleiden immer noch 20 % der Kinder einen Rückfall. Die aggressive Chemotherapie bringt, neben steigenden Heilungschancen, auch ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Organschäden bzw. Sekundärtumoren mit sich. Die gegenwärtige Behandlungsstrategie gegen ALL im Kindesalter muss daher dringend weiter verbessert werden.

Die Behandlung mit Glucocorticoiden wie Dexamethason bzw. Prednisolon ist die Hauptsäule der Induktionstherapie bei ALL. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von Histondeacetylase-Inhibitoren auf den anti-leukämischen Effekt von Dexamethason gegenüber humanen ALL-Zelllinien untersucht werden. Die Kombination von HDACi und Glucocorticoiden ist besonders interessant, da beide Substanzklassen die Genexpression beeinflussen können und pro-apoptotisch auf malignes lymphatisches Gewebe wirken. Zur Aufklärung der Ursachen für die synergistische Wirkung von Dexamethason und VPA bezüglich der Apoptose-Induktion in Nalm-6 Zellen sollten Genexpressionsanalysen mittels Mikrochip-Technologie durchgeführt werden.

Ein Hauptziel der Arbeit war, den therapeutischen Nutzen der Kombinationsbehandlung mit Dexamethason und VPA an einem Mausmodell für ALL zu untersuchen. Das entsprechende Tiermodell sollte, über das Einbringen von humanen ALL-Zellen in immundefiziente SCID Mäuse, generiert werden. Eine wichtige Aufgabe war, an diesem ALL-Mausmodell, den Einfluss der Kombinationstherapie auf die Infiltration des murinen Gewebes durch die humanen Blasten zu untersuchen. Zusätzlich sollte in einer weiteren Studie der Effekt auf die Überlebensrate der Tiere beobachtet werden.

Abschließend sollte der Einfluss von VPA auf die Zytotoxizität von Vincristin, L-Asparaginase und Daunorubicin untersucht werden, da diese Wirkstoffe weitere Säulen der Induktionstherapie bei pädiatrischer ALL darstellen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.3 Chemikalien

Acrylamid-Lösung mit 0,8 % Bisacrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen
Antipain	Sigma, Taufkirchen
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
Badstabil	NeoLab, Heidelberg
Benzamidin	Sigma, Taufkirchen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Bradford-Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Fluka, Buchs (Schweiz)
Natriumbutyrat	Upstate: Biomol, Hamburg
Chloramphenicol	AppliChem, Darmstadt
DAPI	Sigma, Taufkirchen
Daunorubicin	Apotheke, Uni-Klinikum Frankfurt
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Taufkirchen
Dexamethason	Sigma, Taufkirchen
Dexamethason (wasserlöslich)	Sigma, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Taufkirchen
DNA-Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Marker (smart ladder)	Eurogentec, Köln
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
ECL Lösung 1 / 2	Appllichem Darmstadt
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure (Eisessig)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (rein/technisch)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FCS (fetal calf serum)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Gelatine	Sigma, Taufkirchen
Glutamin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glyzin	Roth, Karlsruhe
HCl	Roth, Karlsruhe
Hepes	Roth, Karlsruhe
Isopropanol (2-Propanol, reinst)	Roth, Karlsruhe
KCl (Kaliumchlorid)	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Roth, Karlsruhe
Ketamin® (Ketaminhydrochlorid)	Gräub AG, Bern (Schweiz)
L-asparaginase	Apotheke, Uni-Klinikum Frankfurt

Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
Milchpulver	Heirler Cenovis, Radolfzell
Moviol® 4-88	Sigma, Taufkirchen
MS-27-275 (MS-275)	Boehringer, Wien
3-[N-morpholino] propan-sulfonic acid (MOPS)	Sigma, Taufkirchen
NaCl (Natriumchlorid)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	AppliChem, Darmstadt
Ovalbumin	Sigma, Taufkirchen
PBS (phosphate buffered saline, tissue culture grade)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Polyvinylidendifluorid	Millipore, Eschborn
Ponceaurot	Roth, Karlsruhe
Protein-Marker	NEB, Frankfurt am Main BioRad, München
Propidiumiodid (PI)	Sigma, Taufkirchen
Protease-Inhibitor Tabletten	Roche, Mannheim
Protein-Assay (entspricht 5x)	BioRad, München
Rompun® (Xylazinhydrochlorid)	Bayer AG, Leverkusen
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton-X 100	Fluka, Buchs (Schweiz)
Trypan-Blau	Sigma, Taufkirchen
Trypsin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
TSA (Trichostatin A)	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Roth, Karlsruhe; Sigma, Taufkirchen
Valproinsäure (VPA, 2-Propyl-Pentansäure)	Sigma, Taufkirchen
Vincristin	Apotheke, Uni-Klinikum Frankfurt
Wasser (bidestilliert, autoklaviert)	Spülküche, zentral fürs Haus

### 3.1.4 Puffer und Lösungen

Annexin V Bindungspuffer (2-8°C)	10 mM HEPES, mit NaOH auf pH 7,4 140 mM NaCl 2,5 mM CaCl <sub>2</sub>
DNA-Probenpuffer (4 x) für Agarose-Gelelektrophorese (Raumtemperatur)	20% (w/v) Glycerol 100 mM EDTA 0.25% (w/v) Bromphenolblau 0.25% (w/v) Xylencyanol in H <sub>2</sub> O

DNA-Extraktionspuffer für FACS-Analyse (2-8°C)	38 mM Natriumcitrat pH 7,4 50 µg/ml Propidiumjodid 10 µg/ml Rnase
Ethanol 70% (Zellfixierung:-20°C; Desinfektion: RT)	70% Ethanol (v/v) in H <sub>2</sub> O
FA-Gelpuffer (10x) (Raumtemperatur)	200 mM 3-[N-morpholino] propan- sulfonic acid (MOPS, freie Säure), 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA pH 7,0 mit NaOH
FA-Laufpuffer (1x) (Raumtemperatur, frisch zubereiten)	100 ml FA Gelpuffer, 20 ml 37% Formaledhyd, 880 ml DEPC-Wasser
Natriumcitrat-Puffer für FACS-Analyse (2-8°C)	38 mM Natriumcitrat pH 7,4
NETN-Puffer (Zell-Lysepuffer) (Raumtemperatur)  erst kurz vor Gebrauch zugeben: (2-8°C)	10 mM Tris pH 8 2 M NaCl 1 mM EDTA 10% Glycerol 0,5% NP-40 (Detergenz) 1mM DTT 0,5mM PMSF 1 Proteaseinhibitor-Tablette/ 10 ml oder PIC (1:500)
PIC (Protease Inhibitor Cocktail) (-20°C)	1 mg/ml Leupeptin 2 mg/ml Antipain 100 mg/ml Benzamidin 10.000 Units/ml Aprotinin
Propidiumiodid, (2-8°C, lichtgeschützt)	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O

PBS (phosphate buffered saline) (Raumtemperatur)	6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,5 mM KCl 140 mM NaCl pH 7,25 mit HCl-Lösung für Westernblotting: (+ 0,05 % Tween)
Ponceau-S (Raumtemperatur)	0,1% Ponceaurot (w/v) 5% Essigsäure (v/v)
RNA-Ladepuffer (5 x) (2-8°C, 3 Monate haltbar)	16 µl Bromphenolblaulösung, übersättigt 80 µl EDTA (0.5M) 720 µl Formaldehyd (37%, 12,3 M) 2 ml Glycerol (100%) 3084 µl Formamid 4 ml FA-Gelpuffer ad 10 ml DEPC-Wasser
RNase A-Stocklösung (-20°C)	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE) (Raumtemperatur)	1M Tris-HCl pH 6.8
SDS-Lämmli-puffer (6 x) (Raumtemperatur)	3,5 ml 1M Tris/HCl pH 6,8 3 ml β-Mercaptoethanol (14,3M) 1 g SDS 3 ml Glycerol 200 µl 1 % (w/v) Bromphenolblau ad 10 ml H <sub>2</sub> O
SDS-Laufpuffer (10 x) (Raumtemperatur)	0,25 M Tris Base (30,3g) 2,5 M Glycin (187,7g) 1% SDS (50ml 20% SDS in Wasser) ad 1 l H <sub>2</sub> O



TAE (Tris-Acetat-Ethanol) (50 x) (Raumtemperatur)	242 g Tris-Base 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8,0) 57.1 ml Hac ad 1 l H <sub>2</sub> O
TBE (Tris-Borat-EDTA) (10 x) (Raumtemperatur)	108 g Tris-Base 55 g Borsäure 40 ml 0.5 M EDTA (pH 8,0) ad 1 l H <sub>2</sub> O
TE (Tris-EDTA) (10 x) (Raumtemperatur, frisch zubereiten für RNA)	100 mM Tris-HCl (pH 7,4, 7,5 oder 8) 10 mM EDTA pH 8 in steril filtriertem H <sub>2</sub> O (DNA) in DEPC-H <sub>2</sub> O (RNA)
Transferpuffer (1 x) für Westernblotting (Raumtemperatur)	200 ml 1xSDS-Laufpuffer 200 ml Ethanol ad 1l H <sub>2</sub> O
Trenngelpuffer für SDS-PAGE (Raumtemperatur)	1 M Tris-HCl pH 8,8
Westernblot Stripping Buffer (2-8°C)	Hersteller Pierce Biotechnologie 20 ml pro Membran, mehrfach verwendbar

### 3.1.5 Kits zur Isolierung von DNA bzw. RNA aus leukämischen Zellen

Name	Zweck	Hersteller
QIAamp Blood Kit	Isolierung von genomischer DNA aus Blutzellen	Quiagen
RNeasy Mini Kit	Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen	Quiagen

### 3.1.6 Antikörper und Reagenzien zur Proteinerkennung

Spezifität	Spezies	Verwendung	Konz./ Verd.	Quelle
β-Aktin	Kaninchen	Westernblot	1:2000	Sigma, Taufkirchen
Human-Aven	Kaninchen	Westernblot	1:500	Labor Zörnig, Frankfurt
Human-Bim	Kaninchen	Westernblot	1:500	Biomol
Caspase 8	Maus	Westernblot	1:1000	Cell Signalling
Caspase 9	Kaninchen	Westernblot	1:500	NEB
Acetyl-Histon H4 (T <sub>25</sub> )	Maus	Westernblot	1:1500	Labor Pelicci, Mailand
Kaninchen- IgG-HRP	Ziege	Westernblot (2.Antikörper)	1:15000	ImmunoResearch Jackson
Maus-IgG-HRP	Schaf	Westernblot (2.Antikörper)	1:5000	Amersham Bioscience
Maus-IgG-FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)	Ziege	Histologische Schnitte	1:400	BD Pharmingen
Human-CD19	Maus	Histologische Schnitte	1:10	BD Pharmingen
Human-CD10-PE (R-Phycoerythrin)	Maus	FACS	20 µl/10 <sup>6</sup> Zellen	BD Pharmingen
Maus-CD16/CD32 (Mouse Fc Block™)	Ratte	Blockiert unspezifische Bindung	1 µg/10 <sup>6</sup> Zellen	BD Pharmingen
Annexin V-FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) <i>erkennt</i> Phosphatidylserine	Protein, rekombinant und aufgereinigt	FACS	5 µl/Test	BD Pharmingen

### 3.1.7 Medien zur Kultivierung eukaryotischer Zellen

RPML (Roosevelt Park Memorial Institute Medium)	von Gibco/Invitrogen, Karlsruhe.
Voll-Medium zur Kultivierung:	Medium (RPML) versetzt mit: 10 % bzw. 15 % FCS (Fetal Calf Serum) 5 % Glutamin (2 mM) 1 % Penicillin (100U/ml) 1 % Streptomycin (100µg/ml)

### 3.1.8 Verwendete eukaryotische ALL-Zelllinien

Zelllinie	Herkunft/Eigenschaften	Referenz
BV-173	B-Vorläuferzellen, etabliert 1980 aus dem Blut eines 45-jährigen Mannes mit Chronisch Myeloischer Leukämie in der Blastenkrise.	[174]
Jurkat	Leukämische T-Zelllinie, 1976 aus dem Blut eines 14-jährigen Jungen mit Akuter Lymphatischer Leukämie etabliert.	[175]
Nalm-6	B-Vorläuferzellen, etabliert 1976 aus dem Blut eines 19-jährigen Mannes mit Akuter Lymphatischer Leukämie.	[176]
SD-1	B-Vorläuferzellen, etabliert aus dem Blut einer Frau mit Akuter Lymphatischer Leukämie.	[177]
SUP-B15	B-Vorläuferzellen, 1984 aus dem Knochenmark eines 9-jährigen Jungen mit Akuter Lymphatischer Leukämie etabliert.	[178]

## 3.2 Methoden der Zellkultur

### 3.2.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Sämtliche Arbeiten werden in einem S1 Labor unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Es wird ausschließlich speziell für die Zellkultur hergestelltes, steriles Einweg-Arbeitsmaterial (Pipetten, Kulturgefäße) verwendet. Alle anfallenden Abfälle werden vor dem Entsorgen autoklaviert.

Die Zellen werden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und zweimal wöchentlich mit frischem Medium versetzt. Durch mehrmaliges Hochziehen und Herablassen mit der Pipette werden die Zellen zur homogenen Zellsuspension gebracht und anschließend ihre Zelldichte mittels Neubauerscher-Zählkammer bei mikroskopischer Betrachtung bestimmt. Hierfür wird ein Aliquot der abgenommenen Zellsuspension 1:5 mit Trypanblau-Lösung verdünnt. Da nur die Membran von toten Zellen für den Farbstoff durchgängig ist, können auf diese Weise die abgestorbenen Zellen von den Lebendigen durch ihre Blaufärbung unterschieden werden. Die Zellen werden daraufhin mit dem vorgewärmten Kulturmedium auf eine Zelldichte von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und weiter kultiviert. Die Zellen werden so in der exponentiellen Wachstumsphase gehalten. Für die Behandlung der Zellen wird eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  eingestellt.

### **3.2.2 Langzeitaufbewahrung von eukaryotischen Zellen**

Die Langzeitaufbewahrung erfolgt in der Gasphase von flüssigem Stickstoff in einem Medium aus 70 % RPMI, 20 % FCS und 10 % DMSO. Der Einfriervorgang sollte möglichst langsam verlaufen (in einer Styroporbox zunächst bei -20°C, dann bei -80°C). Im Gegensatz dazu sollten die Zellen immer recht schnell aufgetaut werden. Bevor die Zellen wieder in Kultur kommen, werden sie einmal mit vorgewärmtem Kulturmedium gewaschen (Zentrifugation für 10 min, 500 x g, 20°C).

## **3.3 Protein - Methoden**

### **3.3.1 Herstellung von Proteinextrakten aus ganzen Zellen**

Bei der Herstellung von Proteinextrakten werden alle Arbeitsschritte auf Eis bzw. unter Kühlung durchgeführt, um die Degradation von Proteinen zu vermeiden. Zunächst müssen die Zellen aus der Suspensionskultur durch Zentrifugation (10 min, 500 x g, 4°C) angesammelt werden. Das Zellsediment wird dann mit kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und die Zellen zur Lyse in 800 µl kaltem NETN-Puffer aufgenommen, gründlich resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran werden die Zelllysate sonifiziert (10x 0,5s Pulse, 70% Amplitude) und die Zelltrümmer mittels Zentrifugation (10.000 x g, 10 min, 4°C) abgetrennt. Die proteinhaltigen Überstände werden bei -80°C gelagert.

### **3.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den NETN-Zelllysaten wird ein von Bradford entwickeltes, schnelles wie sensitives Verfahren angewandt.

Das Prinzip beruht auf dem Farbumschlag der Substanz Coomassie-Blue G-250 von rot-braun nach blau in Folge von Proteinbindung. Der negativ geladene Farbstoff bindet positiv geladene Argininy- und Lysinylreste, dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. An Hand der Absorptionswerte der Proben und einer mitgeführten Standard-Eichreihe werden die Proteinkonzentrationen mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms (Excel) ermittelt. Dabei sollte die Messung im linearen Bereich der Eichkurve (Extinktion zwischen 0,1-1) erfolgen, da hier eine proportionale Zunahme der Extinktion zur Lichtabsorption und somit zur Proteinkonzentration vorliegt.

Durchführung:

Die Stammlösung des Proteinfärbereagens (Protein-Assay mit Coomassie G-250, BioRad) wird 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. Jeweils 1 µl der Zellextrakte werden mit 200 µl

der Bradfordlösung in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion der Proben bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Es wird eine Doppelbestimmung durchgeführt und der Mittelwert verwendet. Die Eichreihe wird mit 0,5 bis 10 µg BSA (Rinderserumalbumin in wässriger Lösung) in Bradfordlösung ad 200 µl erstellt.

### **3.3.3 SDS-PAGE nach Lämmli**

Die SDS-Gelelektrophorese (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) dient der Auftrennung von Proteingemischen nach Molekulargewicht und ermöglicht so die anschließende spezifische Detektion von Proteinen. Dazu müssen die Proteine zunächst mit dem Detergenz SDS denaturiert werden. Die meisten Proteine binden SDS und werden zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis (1,4 g SDS/g Protein in 1% SDS-Lösung). Die Denaturierung der Proteine durch SDS unterbindet externe und interne Protein-Wechselwirkungen. Dieser Prozess wird durch vorherige Reduktion von Disulfidbrücken der Proteine mit Mercaptoethanol (bzw. auch mit Dithiothreitol (DTT)) weiter verstärkt. SDS-Protein-Komplexe verschiedener Proteine unterscheiden sich so nur noch in ihrer Grösse und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. Bei der SDS-Elektrophorese wandert der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zum Plus-Pol (Anode). Die elektrophoretische Trennung wird in porösen Polyacrylamidgelen durchgeführt. Diese sind chemisch inert und trennen die SDS-Protein-Komplexe durch ihren Molekularsiebeffekt nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht auf. Im Gel polymerisieren Acrylamidmonomere und Quervernetzer aus Bisacrylamid durch die Bildung freier Sulfatradikale aus dem Katalysator der Reaktion, Ammoniumpersulfat. Diese Reaktion wird durch den Radikalstabilisator TEMED beschleunigt. Hier wurde das diskontinuierliche Lämmli-System mit Tris-Puffern verwendet. Ein Sammelgel (Tris-Puffer pH 6,8; 3-5% Acrylamid) überschichtet ein Trenngel (Tris-Puffer pH 8,8; 5-20% Acrylamid). Im Sammelgel werden die Proteine auf gleicher Höhe fokussiert. Dies geschieht durch das Zusammenspiel der Glycinat- und Chlorid-Ionen aus dem Elektrodenlaufpuffer: Die langsameren Glycinat-Ionen bilden hinter den mobileren Chloridionen eine Front, an der sich die Feldstärke lokal erhöht. Dadurch erfährt die Glycinatfront eine Beschleunigung. Auf ihrem Weg zur Anode nimmt sie die SDS-Protein-Komplexe auf. Je länger das Trenngel bzw. der Lauf, desto besser ist die Separierung der Proteine. Das Ladungs- zu Masse-Verhältnis einiger Proteine weicht von der Norm ab. So binden zum Beispiel stark hydrophile, glykosylierte Proteine SDS nur sehr schlecht und unterscheiden sich damit im Laufverhalten von nicht glykosylierten Proteinen. Auch Phosphorylierungen verändern das Laufverhalten von Proteinen auf Grund der negativen Phosphatgruppen.

### 3.3.4 Herstellung von Polyacrylamidgelen

Die Gele werden in Minigelkammern von BioRad (0,75 mm oder 1 mm) gegossen. Dabei wird zuerst das Trenngel und dann das Sammelgel eingefügt. Dazwischen wird gewartet, bis das mit Isopropanol überschichtete Trenngel polymerisiert ist. In das noch flüssige Sammelgel wird ein Kamm zur Erstellung von 10 Lade-Taschen eingefügt. Die Proben werden in 6x SDS-Probenpuffer nach Lämmli für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht, um Tertiärstrukturen zu unterbinden und Proteasen zu inaktivieren. Das im Probenpuffer enthaltene Glycerin erhöht die Dichte der Proben, und das Bromphenolblau markiert die Lauffront. Aufgetragen werden in der Regel zwischen 45 und 60 µg Protein (NETN-Extrakte) pro Tasche. Die folgende Tabelle zeigt das Pipetierschema zur Herstellung von jeweils 2 kompletten Gelen.

<b>Trenngel</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>15%</b>
30% Acrylamid/ 0.8% Bisacrylamid	5 ml	6 ml	6 ml
1M Tris pH 8.8	5.6 ml	5.6 ml	5.6 ml
20% SDS	75 µl	75 µl	75 µl
H <sub>2</sub> O	4,24 ml	3,24 ml	3,24 ml
10% APS	75 µl	75 µl	75 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

<b>Sammelgel</b>	
30% Acrylamid/ 0.8% Bisacrylamid	830 µl
1M Tris pH 6.8	625 µl
20% SDS	25 µl
H <sub>2</sub> O	3.49 ml
10% APS	25 µl
TEMED	5 µl

### 3.3.5 Westernblot und Immunfärbung

Beim Western-Blotting werden Proteine, die zuvor in einem SDS-Gel aufgetrennt wurden, elektrophoretisch auf eine Membran (mit Nitrocellulose oder Polyvinylidendifluorid beschichtet) übertragen und für die nachfolgende Immundetektion durch hydrophobe Wechselwirkungen immobilisiert. Der Transfer wird für 1,5h bei 100 mA/Membran in einer BioRad-Blotkammer, gefüllt mit Transferpuffer, durchgeführt.

Nach dem Blotten wird der Proteintransfer mit reversibler Ponceaurot-Färbung überprüft. Das Ponceaurot wird vor dem Blocken mit bidestilliertem Wasser wieder gewaschen. Freie Proteinbindungsstellen auf der Membran werden anschließend mit einer Lösung aus fettfreiem Milchpulver (5% in 0,05%-Tween-PBS) für mindestens drei Stunden bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C geblockt.

Beim Hybridisierungsverfahren mit spezifischen Antikörpern bindet im ersten Schritt ein für eine bestimmte Aminosäuresequenz (Epitop) spezifischer Antikörper an das auf die Nitrocellulose-Membran übertragene Protein. Im Anschluss erfolgt eine Inkubation mit einem

zweiten Antikörper, welcher spezifisch an den F<sub>c</sub>-Teil des ersten Antikörpers bindet. Dieser zweite Antikörper trägt neben der Erkennungssequenz kovalent gebundene Meerrettich-Peroxidase. Diese ist in der Lage, in der ECL-Lösung (enhanced chemo-luminescence, enthält Luminol) enthaltene Wasserstoffperoxide zu oxidieren, welche dann ihrerseits das Luminol unter Lichtemission oxidieren. Diese enzymatisch erzeugte Chemolumineszenz kann auf einem Röntgenfilm (Fuji) festgehalten werden.

Die Erstinkubation mit dem Primärantikörper (2% Milch, 0,05% Tween in PBS) erfolgt für drei Stunden bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C. Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wird die Membran dreimal für 10 min in 0,05%-Tween-PBS gewaschen und dann bei Raumtemperatur für 30 bis maximal 60 min mit dem Zweitantikörper (2% Milch, 0,05% Tween in PBS) inkubiert. Nach der Inkubation wird die Membran erneut dreimal für 10 min in 0,05%-Tween-PBS gewaschen. Die Membran wird aus dem Puffer genommen und für circa 1 Minute mit ECL-Lösung bedeckt. Die Membran wird in eine Entwicklungskammer gelegt und mit Folie abgedeckt. In der Dunkelkammer wird dann der Röntgenfilm aufgelegt. Die Expositionsdauer bis zur anschließenden Filmentwicklung variiert entsprechend der Stärke des Signals zwischen einigen Sekunden und mehreren Minuten.

Um auf der gleichen Membran eine weitere Detektion gegen andere Proteine durchzuführen, müssen bereits gebundene Antikörper wieder von der Membran entfernt werden. Zu diesem Zweck wird die Membran für 20-30 min in einem Puffer mit saurem pH-Wert (Restore Westernblot Stripping Buffer von Pierce) inkubiert. Anschließend wird die Membran für 10 min in 0,05 %-T-PBS gewaschen und wieder mindestens für 3h bei Raumtemperatur (5 % Milch in 0,05 %-T-PBS) geblockt.

## **3.4 DNA - Methoden**

### **3.4.1 Isolierung genomischer DNA aus humanen Leukämiezellen**

Die Isolierung der genomischen DNA aus den Zellen nach vorhergehender Behandlung erfolgte mit dem QIAamp Blood Kit der Firma Qiagen. Es werden pro Aufreinigung  $1 \times 10^7$  Zellen eingesetzt. Bei der Durchführung wird sich an das Protokoll des Herstellers gehalten. Die DNA wird nach der Aufreinigung in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Die DNA-Lösungen werden bei -20°C gelagert.

### **3.4.2 Quantifizierung von DNA**

Durch die aromatischen Ringsysteme der Basen besitzen Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Dadurch ist es möglich die Menge an DNA mit Hilfe eines Photometers zu bestimmen. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA pro Milliliter Lösung. Proteine weisen

dagegen durch die Ringsysteme der aromatischen Aminosäuren ein Maximum bei 280 nm auf. Aus dem Quotienten (260nm/280nm) der beiden Extinktionen wird der Grad der Proteinverunreinigung der DNA-Probe ersichtlich. Bei einem Quotienten zwischen 1,7 – 1,9 in TE-Puffer gilt die DNA-Probe als „rein“. Zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen werden jeweils wenige Mikroliter der Probe mit TE-Puffer 1:100 verdünnt und die Absorption bei 260 nm und 280 nm im Vergleich zu einer Referenzprobe ohne DNA bestimmt.

### **3.4.3 Nachweis internukleosomaler DNA-Spaltung**

Die isolierte genomische DNA wird in 1,2%-Agarosegelen mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gelelektrophorese wird in TAE-Puffer durchgeführt. Die DNA-Proben werden mit 4x-DNA-Ladepuffer eingestellt und als DNA-Marker dient "Smart Ladder" (Eurogentec). Die anliegende Spannung beträgt 10 V/cm. Auf Grund des negativ geladenen Phosphat-Rückgrats der DNA-Moleküle bewegen sich diese zur Anode. Die Beweglichkeit der Moleküle im Agarosegel ist proportional zu ihrer Länge und zur Agarosekonzentration. Das Ethidiumbromid ermöglicht den quantitativen und qualitativen Nachweis der DNA durch Detektion der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 366$  nm (UV-Licht), da es in die Doppelhelix der DNA interkaliert.

## **3.5 RNA - Methoden**

### **3.5.1 Zum Umgang mit RNA**

Ribonukleasen (RNasen) sind sehr stabile und aktive Enzyme. RNasen sind kaum durch Hitzebehandlung zu inaktivieren, da die meisten Enzyme aus nur einer Polypeptidkette aufgebaut sind. Dies hat zur Folge, dass sie bei Hitzeeinwirkung zwar denaturieren, aber beim Abkühlen wieder renaturieren können. Schon kleinste Mengen des Enzyms können ausreichen, um RNA abzubauen. Es werden daher, während der gesamten Versuchsdurchführung, sterile Einweg-Artikel aus Polypropylen benutzt. Arbeitsflächen sowie Hände (Handschuhe!) müssen stets vor Beginn der Arbeiten von möglichen RNase-Kontaminationen mit SDS-haltigen Waschlösungen befreit werden.

### **3.5.2 Herstellung von RNase-freien Lösungen**

Sämtliche Lösungen sowie das benötigte Wasser werden mit DEPC (Diethylenpyrocarbonat) in einer Endkonzentration von 0,1% (v/v) behandelt. DEPC bindet kovalent an das aktive Zentrum des RNase Enzyms, wodurch dieses irreversibel inhibiert wird. Zur Herstellung werden 0,1 ml DEPC auf 100 ml H<sub>2</sub>O gegeben, gemischt und die Lösung über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Lösung 15 min autoklaviert, um DEPC-Reste zu entfernen. Das DEPC zerfällt unter Hitzeeinwirkung in die beiden flüchtigen Produkte CO<sub>2</sub> und Ethanol. Das Entfernen von überschüssigem DEPC ist wichtig, da ansonsten



Purinbasen in der RNA durch Carboxylierung kovalent modifiziert werden, was nachfolgende Experimente negativ beeinflussen würde.

### **3.5.3 Isolierung von RNA**

Die Isolierung von RNA aus Nalm-6 Zellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy-Mini Kits von Qiagen. Hierzu werden  $1 \times 10^7$  Zellen in einem 15 ml Falkonröhrchen durch zentrifugieren (500x g, 7 min, 4°C) sedimentiert und der Zelleniederschlag mit 600 µl Puffer RLT lysiert. Die in dem Lysat enthaltene RNA wird entsprechend dem Standardprotokoll von Qiagen aufgereinigt. Da bei dieser Art der RNA-Aufarbeitung eine vollständige Eliminierung der genomischen DNA nicht gewährleistet ist, wird ein DNaseI-Verdau auf der Silica-Membran für 15 min bei Raumtemperatur durchgeführt (Protokoll Quiagen). Gelöst wird die RNA in 30 µl RNase-freiem DEPC-Wasser. Bis zur weiteren Verwendung wird die RNA bei -80 °C gelagert.

### **3.5.4 Bestimmung von Konzentration und Reinheit der isolierten RNA**

Die RNA-Konzentration einer Probe wird, wie in Kap. 3.4.9 für DNA beschrieben, photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm entspricht hierbei einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Diese Relation gilt nur für Messungen in Wasser. Die RNA-Lösung wird vor der Messung 1:100 mit DEPC-Wasser verdünnt. Das Verhältnis der Absorptionswerte von 260 nm und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) ist ein Maß für die Reinheit der RNA. Dieses Absorptionsverhältnis ist abhängig vom pH-Wert. Relativ reine RNA hat in Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 7,5 ein  $A_{260}/A_{280}$ -Verhältnis von 1,9-2,1.

### **3.5.5 Agarosegelelektrophorese der RNA-Proben**

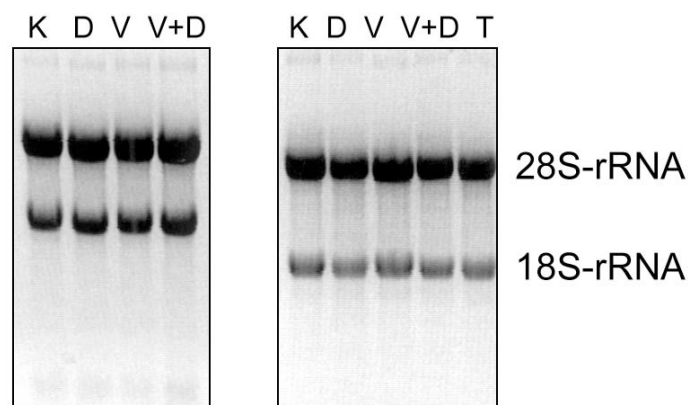
Einzelsträngige RNA bildet durch intra- und intermolekulare Basenpaarungen Sekundär- und Tertiärstrukturen sowie Aggregate aus. Eine exakte, reproduzierbare Auftrennung von RNA nach dem Molekulargewicht ist nur in denaturierenden Gelen möglich, da unter diesen Bedingungen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren aufgehoben werden. Für die Elektrophorese werden 1%ige Agarose-Formaldehydgele benutzt. Die denaturierende Wirkung von Formaldehyd beruht darauf, dass seine Aldehydgruppe mit den Aminogruppen von Adenin, Guanin und Cytosin Schiff'sche Basen ausbildet. Für den FA-Laufpuffer wird ein Gemisch aus MOPS und Natriumacetat/EDTA verwendet. Da Formaldehyd mit den Aminogruppen von Tris reagiert, sind Tris-Puffer für die RNA-Analyse ungeeignet. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel sollte die RNA für 5 min bei 65°C im Heizblock erhitzt werden, um vorhandene Sekundärstrukturen aufzuheben.

Durch die Gelelektrophorese (1h, 60V) mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung kann der Zustand der isolierten Gesamt-RNA überprüft werden. Zytoplasmatische RNA

eukaryotischer Zellen enthält ca. 95% rRNA, zusammengesetzt aus 28S-, 18S-, 5,6S- und 5S-rRNA. Bei guten RNA-Präparationen laufen die 28S- (5,1 kb) und 18S-rRNA (1,9 kb) als zwei scharfe, getrennte Banden und dienen als Nachweis für die Integrität der isolierten RNA. Das Mengenverhältnis der beiden RNAs, abgeschätzt an der Intensität der Banden, sollte ungefähr 2:1 sein. Wenn die rRNA-Banden nicht scharf sind, sondern verschmiert in Richtung kleinere Banden verlaufen, so deutet dies auf eine RNA-Degradation während der Präparation hin.

### 3.5.6 Präparation von m-RNA für die Genexpressionsanalyse

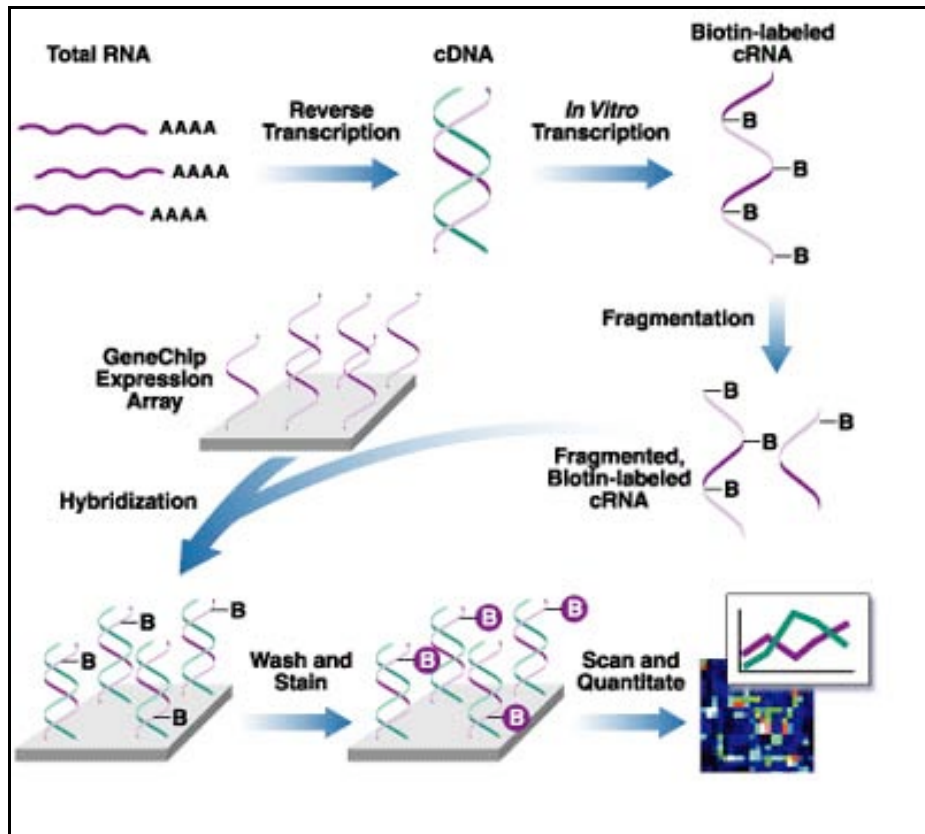
Jeweils  $1 \times 10^7$  Nalm-6 Zellen in 10 ml Medium wurden für 13h mit VPA (1,5 mM), Dexamethason (100 nM) und der entsprechenden Kombination der Substanzen behandelt. Für die Wiederholungsstudie wurde zusätzlich noch die Wirkung von TSA (100 nM) untersucht. Die RNA wurde, wie in den Kapiteln 3.3.13 bis 3.3.15 beschrieben, isoliert und bezüglich Konzentration, Reinheit und Unversehrtheit untersucht.



**Abbildung 3.1: Integrität der RNA für die Genexpressionsanalyse**

Die Bilder zeigen das Ergebnis der Agarosegelelektrophorese der RNA-Proben, die für die Genexpressionsanalysen eingesetzt wurden.

Da die Qualität der isolierten RNA gut war, wurden von jeder Probe 20  $\mu$ g im Eppendorfgeläß auf Trockeneis an Dr. Ludger Klein-Hitpass (Institut für Zellbiologie, Universität Duisburg-Essen) gesandt. Dort erfolgte die Probenaufbereitung und Hybridisierung der Affymetrix Chips (Abb. 3.2). In unserem Fall wurden *Human Genom U133A 2.0 Arrays* verwendet. Der Chip umfasst etwas mehr als 22000 Probensets, 14500 davon entsprechen charakterisierten, humanen Genen. Ein Probenset besteht aus 11 bis 20 Probenpaaren. Ein Probenpaar besteht immer aus einem Perfekt Match und einem Mismatch (trägt abweichende Mutation). Diese auf dem Chip befindlichen Oligonucleotid-Proben bestehen jeweils aus 25 Nucleotiden.



**Abbildung 3.2: Probenvorbereitung und Hybridisierung des Affymetrix-Chips**

Die in der Gesamt-RNA enthaltenen protein-kodierenden mRNAs (ca. 0.2-0.4%) werden zunächst in einzelsträngige cDNA umgeschrieben, danach wird der komplementäre cDNA-Strang synthetisiert. Es folgt die Umschreibung der cDNA in biotinylierte Antisense-cRNA, die partiell komplementär zu den auf dem Chip enthaltenen PM-Oligonukleotiden ist. Da jedes cDNA-Molekül viele Male abgeschrieben wird (lineare Amplifizierung), erhält man durch diesen Schritt genügend Material für die Mikroarray-Hybridisierung (ca. 10 µg cRNA). Die biotin-markierten cRNAs (Target) werden nach Fragmentierung auf den Array hybridisiert. Nach dem Auswaschen nicht-komplementärer cRNAs werden die gebundenen komplementären cRNAs durch Bindung von Streptavidin gekoppeltem Phycoerythrin gefärbt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff kann dann nach Aktivierung mit Laserlicht von einem speziellen Scanner detektiert und quantifiziert werden.

Die Auswertung der Daten erfolgt in Anlehnung an die von Affymetrix herausgegebenen Broschüre *Statistical Algorithms Reference Guide*. Für die vergleichende Genexpressionsanalyse ergeben sich in erster Linie zwei wichtige Werte. Zum einen *Signal Log Ratio*, dieser Wert entspricht der Änderung des Expressionslevels eines Transkripts beim Vergleich von zwei Arrays. Der Wert wird als Logarithmus zur Basis 2 ausgedrückt. Nur Werte  $> 1,32$ , was einer 2,5-fachen Regulation entspricht, werden bei der Auswertung berücksichtigt. Der zweite bedeutende Wert ist *Change p-value*. Geht der Wert gegen null, kennzeichnet er eine Induktion. Umgekehrt weist ein *Change p-value* von beinahe 1, auf die Herunterregulation des Transkripts. Signifikant ist die Änderung nur, wenn der Wert hinter dem Komma für eine Induktion mindestens drei Nullen bzw. bei einer Repression drei Neunen aufweist. Nur signifikante Änderungen sollten bei der Auswertung berücksichtigt werden.

## 3.6 Durchflusszytometrische Methoden

### 3.6.1 Theorie der Durchflusszytometrie

Mit einem Durchflusszytometer lassen sich Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner, in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Zellen detektieren. Das so genannte FACS-Gerät (Fluorescence Activated Cell Sorter) besteht aus einem Flüssigkeitssystem, einem optischen System und dem Bereich für die Signalverarbeitung. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, Kleinwinkelbereich) liefert Daten über die Zellgröße, während das Seitwärtsstreulicht (SSC, 90° Winkel) über Granularität, Membranfaltung und die äußere Form der Zelle informiert. Die im Seitwärtsstreulicht gemessene Fluoreszenz gibt Auskunft über das Vorhandensein eines fluorochrommarkierten Moleküls im Zytoplasma bzw. auf der Zelloberfläche.

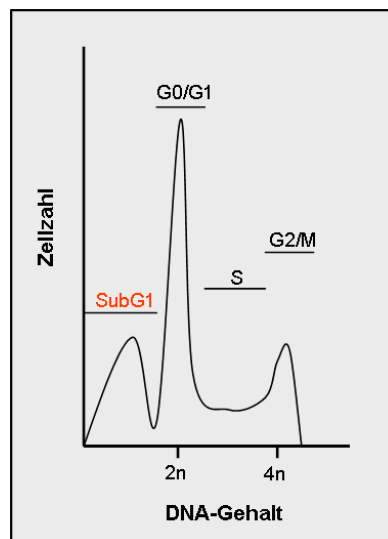
Das Flüssigkeitssystem eines FACS-Geräts besteht aus zwei Leitungen. Eine transportiert Zellen vom Probenröhrchen zur Messkammer. In einer weiteren wird Hüllstromflüssigkeit durch die Messkammer in einen Abfallbehälter gepumpt. Die Zuleitung der Probenflüssigkeit in das Zentrum des laminaren Stroms der Messküvette erfolgt mit Hilfe einer Kapillare. Der Probenstrom verengt sich auf das Zentrum des Lumens hin, wo es auf eine Geschwindigkeit von 7 m/s beschleunigt wird (hydrodynamische Fokussierung). Dies gewährleistet, dass Einzelzellen die optimale Fokussierungsebene des für die Anregung eingesetzten Laserstrahls (Argon, 488 nm) passieren. Jede Zelle emittiert dabei Lichtsignale proportional zur gebundenen Fluorochrommenge in einem konstanten Zeitrahmen. Dies ermöglicht, neben der Ermittlung der Durchflussrate der Zellen pro Zeiteinheit, die Bestimmung der Fluorochrommenge, die jede einzelne Zelle trägt. Die Wellenlänge des emittierten Lichts ist vom verwendeten Fluorochrom abhängig und wird im FL1 (530±30 nm)-, FL2 (585±42 nm)- oder FL3 (>650 nm)-Kanal detektiert. Das Licht wird dabei von Sammellinsen eingefangen und über verschiedene Spiegel und Filter an Detektoren und Signalverstärker weitergeleitet. Die Durchflusszytometrie bietet vielfältige Anwendungsmöglichkeiten. Neben der Charakterisierung von Zellen ist auch die Auftrennung von Zellgemischen nach vorhandenen Markern möglich. Zur Bestimmung von Apoptose kann man ebenfalls auf mehrere, gut etablierte durchflusszytometrische Methoden zurückgreifen.

### 3.6.2 Bestimmung des Zellzyklusprofils mittels Propidiumiodidfärbung

Der Zellzyklus einer proliferierenden Zelle besteht aus vier Phasen, die durch eine Änderung des DNA-Gehalts der Zelle charakterisiert sind. Die G0/G1-Phase (Gap 1) bezeichnet den Zeitraum nach einer mitotischen Teilung. Während dieser Phase liegt in der Zelle der diploide DNA-Gehalt vor ( $2n$ ). Je nach Typ kann die Zelle nun differenzieren oder weiter proliferieren. Proliferierende Zellen treten in die Phase der DNA-Synthese (S-Phase) ein. Am Ende der S-Phase besitzen die Zellen den doppelten diploiden Gehalt an DNA ( $4n$ ). In der

darauf folgenden G2-Phase bleibt der DNA-Gehalt unverändert und die Zelle synthetisiert mitotisch aktive Enzyme. Während der G2-Phase können außerdem post-replikative Reparaturen durchgeführt werden. Bei der anschließenden Mitose (M) teilt sich die Zelle in zwei diploide Tochterzellen, die damit in die G0/G1-Phase eintreten.

DNA lässt sich mit dem starken, in die DNA interkalierenden, Fluorochrom Propidiumjodid gut anfärben. Hierdurch kann der DNA-Gehalt durchflusszytometrisch bestimmt und darüber das Zellzyklusprofil einer Zellpopulation ermittelt werden. Dieses wird dann als Histogramm graphisch dargestellt (Abb. 3.3).



**Abbildung 3.3: Zellzyklusverteilung - ein Histogramm mit SubG1-Fraktion**

Apoptotische Zellen besitzen einen hypodiploiden DNA-Gehalt (SubG1) bezogen auf die Gesamtpopulation.

Der DNA-Gehalt apoptotischer Zellen beträgt weniger als  $2n$  (Sub G1). Diese Hypodiploidität ist die Folge der DNA-Fragmentierung im Zuge der Apoptose. Um auch früh-apoptotische Zellen gut sichtbar zu machen, werden die Zellen zunächst in 70% Ethanol fixiert. Dadurch wird die Membran permeabilisiert und niedermolekulare DNA-Fragmente können aus der Zelle extrahiert werden.

Durchführung:

Diese Methode wurde angewandt bei der Bestimmung der Apoptoserate in leukämischen Zelllinien nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren und dem Glucocorticoid Dexamethason. Nach der Behandlung der Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml, in 12- oder 24- Lochplatte) werden jeweils 1 bis 2 ml der Suspensionskultur in FACS-Röhrchen überführt und zentrifugiert (5 min,  $400 \times g$ ,  $4^\circ C$ ), der Überstand abgesaugt und das Zell-Sediment mit 2 ml kaltem PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren werden die Zellen in 1 ml 70%igem Ethanol über

Nacht fixiert. Vor der Messung wird erneut zentrifugiert und der ethanolische Überstand durch Absaugen entfernt. Das Zell-Sediment wird anschließend in 500 µl DNA-Extraktionspuffer (38 mM Natriumcitrat pH 7,4, 50 µg/ml Propidiumjodid und 10 µg/ml RNase A) aufgenommen. Das im Puffer enthaltene Natriumcitrat verhindert die Koagulation der Zellen und verstärkt die Extraktion der fragmentierten DNA. Die Proben werden 30 Minuten lichtgeschützt bei 37°C inkubiert. Dann wird das Zellzyklusprofil am Durchflusszytometer im FL2-Kanal (aufgetrennt in FL2-A und FL2-W, Doublet Discrimination Modul) bestimmt. Es werden aus jeder Probe 20.000 Zellen vermessen. Für alle Messungen wurde ein FACSCalibur von Becton Dickinson benutzt. Die Auswertungen wurden mit dem Programm CellQuest Pro durchgeführt.

### 3.6.3 Erfassung frühapoptotischer Zellen mittels Annexin V-Anfärbung

Im Zuge der Apoptose finden Veränderungen an der Zelloberfläche statt. Ein frühes Ereignis ist dabei der Verlust der Asymmetrie bei der Verteilung der Zellmembran-Phospholipide. In lebenden Zellen befinden sich anionische Phospholipide wie z.B. das Phosphatidylserin hauptsächlich an der Innenseite der Zytoplasmamembran, während neutrale Phospholipide an der äußeren Seite lokalisiert sind. Wird Apoptose ausgelöst, erfolgt auch die Translokation von Phosphatidylserinen an die Außenseite der Membran. *In vivo* bewirkt dies die Erkennung und Entfernung der apoptotischen Zelle, bzw. der daraus entstandenen apoptotischen Vesikeln, durch phagozytierende Zellen. Das 35-36 kDa große Protein Annexin V bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an Phospholipide und weist eine hohe Affinität zu Phosphatidylserinen auf. Daher kann fluorochrommarkiertes Annexin V zur Detektion von frühapoptotischen Zellen mit dem FACS-Gerät benutzt werden.

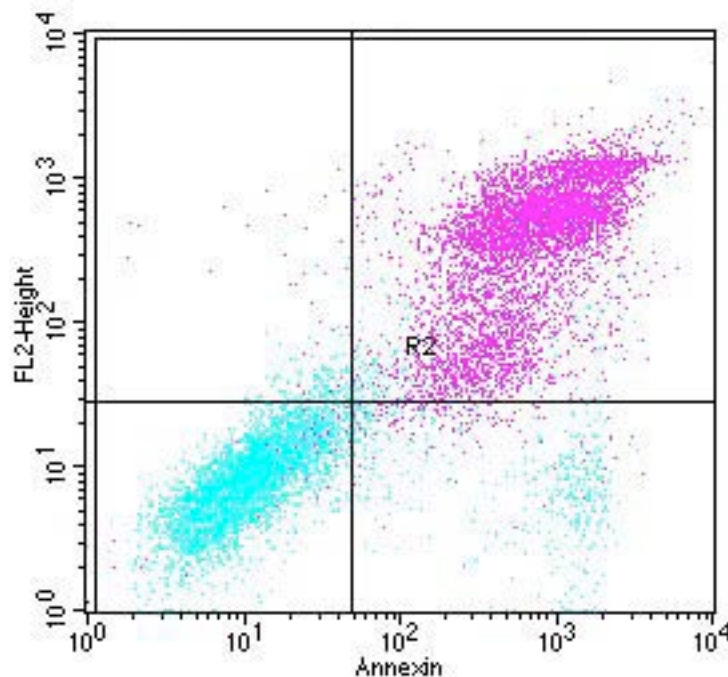
Eine zusätzliche Inkubation mit Propidiumiodid (PI) wird benutzt, um zwischen früh- und spät-apoptotischen Zellen zu unterscheiden. Nur die Membranen von Zellen, die sich im fortgeschrittenen Stadium der Apoptose befinden, sind für PI durchlässig.

Durchführung:

Diese Methode wurde eingesetzt zur Bestimmung der Apoptoserate nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren und weiteren Chemotherapeutika wie Vincristin, L-Asparaginase und Daunorubicin.

Nach Ablauf der Inkubationszeit ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml, in 12- oder 24- Lochplatte) werden jeweils 1 bis 2 ml der Suspensionskultur in FACS-Röhrchen überführt und zentrifugiert (5 min, 200 x g, 4°C), der Überstand wird abgesaugt und das Zell-Sediment zweimal mit je 2 ml kaltem PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen in kaltem Annexin V Bindungspuffer resuspendiert und auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Es wird auf Eis gearbeitet. 100 µl dieser Zellsuspension werden in ein neues FACS-Röhrchen

überführt. 5 µl der gebrauchsfertigen Annexin V-FITC Lösung werden dazu pipettiert und vorsichtig gemischt. Nach 5 Minuten Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur werden 5 µl einer PI-Lösung (50 µg/ml PBS) zugegeben, vorsichtig gevortext und erneut 5 Minuten inkubiert. Dann werden 400 µl kalter Annexin V Bindungspuffer zugegeben, gemischt und lichtgeschützt auf Eis gestellt. Die durchflusszytometrische Vermessung der Zellen erfolgt direkt. Das FITC-markierte Annexin V wird im FL1-Kanal detektiert. PI wird mit dem FL2-Kanal bestimmt. Zur Optimierung der Messparameter für eine gute Auftrennung von unterschiedlich markierten Zellpopulationen werden folgende Kontrollen benötigt: ungefärbte Zellen, nur Annexin V-FITC markierte sowie nur PI gefärbte Zellen. Für diese Positivkontrollen werden behandelte Zellen verwendet, in denen sich apoptotische Zellen befinden. Als Negativkontrolle dienen doppelt markierte, unbehandelte Zellen. Es werden aus jeder Probe 20.000 Zellen vermessen. Für alle Messungen wurde ein FACSCalibur von Becton Dickinson benutzt. Die Auswertungen wurden mit dem Programm CellQuest Pro durchgeführt.



**Abbildung 3.4: Bestimmung von früh- und spätapoptotischen Zellen mittels Annexin V / PI Färbung**

Das Histogramm zeigt die Auftrennung der Zellpopulationen nach Annexin V-FITC positiv und PI-positiv (FL2). Zellen im Quadrant links unten sind ungefärbt und entsprechen der lebenden Population. Früh-apoptotische Zellen findet man rechts unten, sie sind nur Annexin V-positiv. Zellen im Quadrant rechts oben sind doppelt positiv, sie befinden sich in einem fortgeschrittenen Stadium der Apoptose. Dieses Histogramm zeigt Zellen, die für 48 h mit VPA (1,5 mM) und Dexamethason (100 nM) behandelt wurden.

### 3.6.4 Detektion von Nalm-6 Zellen im Mausgewebe

Nalm-6 Zellen besitzen wie alle Lymphozyten eine Vielzahl von Oberflächenproteinen, anhand derer sie durchflusszytometrisch charakterisiert werden können. Dies geschieht über die spezifische Erkennung durch Fluorochrom-markierte Antikörper.

Auf der Oberfläche der Nalm-6 Zellen befinden sich große Mengen an CD10. Der Anteil an Nalm-6 Zellen im Mausgewebe konnte somit über die Markierung von humanem CD10 mit einem spezifischen, R-Phycoerythrin (PE)-gekoppelten Antikörper (CD10PE) bestimmt werden.

Isolierung der Knochenmarkszellen aus dem Femur:

Alle Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt. Die kompletten Oberschenkelknochen beider Hinterläufe der zuvor eingeschläferten Mäuse werden entnommen und gründlich mit dem Skalpell gereinigt. Der Knochenmarkkanal wird durch zwei Schnitte mit dem Skalpell jeweils knapp unterhalb der beiden Gelenkkapseln freigelegt. Das Knochenmark wird mit einer 0,4 × 19 mm Kanüle und 1 ml kaltem PBS herausgespült. Es wird mehrmals durchgespült. Mit einer Pipette wird resuspendiert, bis keine Zellklumpen mehr zu erkennen sind. Die Zellen werden vom Überstand durch Zentrifugation (5 min, 200 x g, 4°C) getrennt. Das Zellpellet wird in 1 ml kaltem PBS resuspendiert und mit 1 ml kaltem PBS mit 2 % Formaldehyd zur Fixierung gemischt. Nach 20 Minuten wird erneut zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen werden in 1 ml kaltem PBS aufgenommen und bis auf weiteres im Kühlschrank aufbewahrt.

Aufarbeitung der Milzen zu Einzelzellsuspensionen:

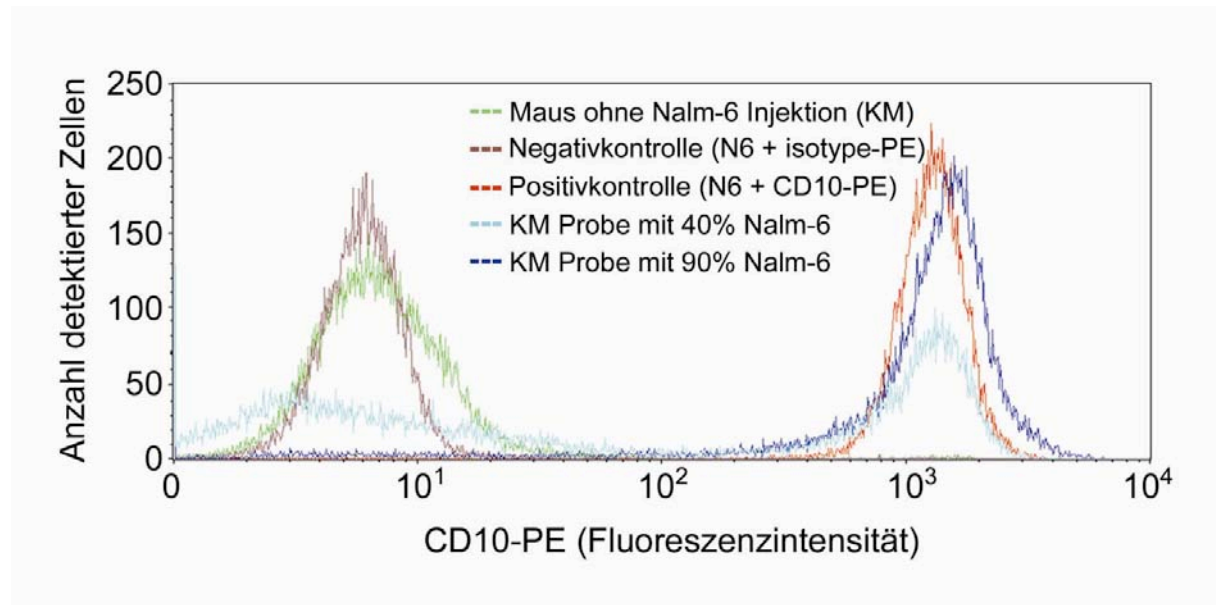
Alle Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt. Ein kleiner Teil der Milz wird für die histologischen Schnitte entfernt. Der Rest der Milz wird zu einer Einzelzellsuspension aufgearbeitet. Dazu wird die Milz mit dem Stempel einer 5 ml Einwegspritze durch ein 70 µm Zellsieb in ein 50 ml PE-Gefäß gedrückt. Es wird zwischendurch mehrmals mit kaltem PBS gespült. Die Suspension wird zentrifugiert (10 min, 200 x g, 4°C), der Überstand entfernt und das Zellpellet in 1 ml kaltem PBS resuspendiert. Es wird 1 ml kaltes PBS mit 2 % Formaldehyd zur Fixierung zugegeben. Nach 20 Minuten wird erneut zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen werden in 1 ml kaltem PBS aufgenommen und bis auf weiteres im Kühlschrank aufbewahrt.

Markierung und durchflusszytometrische Detektion der Nalm-6 Zellen:

Es wird auf Eis gearbeitet. Zunächst wird die Zelldichte der Zellsuspensionen aus der Aufarbeitung der Milzen und des Knochenmarks bestimmt. Von jeder Probe werden dann  $2 \times 10^5$  Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen werden durch Zentrifugation



(5 min, 200 x g, 4°C) vom Überstand getrennt. Der Überstand wird abgesaugt. Das Zellpellet wird in 100 µl kaltem PBS (versetzt mit 2 % BSA) resuspendiert. Es werden jeweils 0,2 µg Mouse Fc Block™ (in PBS gelöst) hinzu pipettiert, durch Verrühren gemischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Mouse Fc Block™ enthält Antikörper gegen die Fcγ Rezeptoren CD16/CD32, die sich auf der Oberfläche von zahlreichen Mauszellen befinden. Dadurch kann die unspezifische Bindung des CD10PE Antikörpers an Zellen aus Mausgewebe verhindert werden.



**Abbildung 3.5: Detektion von PE-konjugiertem anti-humanes CD10 Antikörper mit dem FACS**

Die Fluoreszenzintensität im FL2-Kanal entspricht der Menge an CD10-PE pro Zelle. Grün markiert ist die Negativkontrolle des Mausexperiments. Hierzu wurde das Knochenmark (KM) einer Maus, die keine Nalm-6 Zellen erhalten hatte, mit CD10-PE angefärbt. Als Positivkontrolle (rot) dienten CD10-PE markierte Nalm-6 Zellen (N6) aus der Zellkultur. Um unspezifische Bindung auszuschließen, wurden Nalm-6 Zellen aus der Zellkultur mit einem isotypen PE-Antikörper behandelt, dem das Epitop gegen CD10 fehlt (Negativkontrolle, in braun). Unspezifische Bindung des CD10-PE Antikörpers an Mausgewebe konnte durch den Einsatz von Mouse Fc Block™ vollständig unterdrückt werden. Das ist auch gut zu erkennen an den Messungen zweier Knochenmarksproben (hellblau, dunkelblau). Die Nalm-6 Zellen im Mausgewebe zeigen eine deutliche Fluoreszenz-Verschiebung, wohingegen für die Knochenmarkszellen der Maus keine erhöhte Fluoreszenz gemessen werden konnte.

Es werden pro Probe 4 µl R-Phycoerythrin (PE)-gekoppelter Antikörper gegen humanes CD10 eingebracht. Nach sorgfältigem Mischen wird für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit 2 ml kaltem PBS (versetzt mit 2 % BSA) gewaschen (5 min, 200 x g, 4°C), der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 400 µl PBS (versetzt mit 2 % BSA) aufgenommen und lichtgeschützt bei 4°C bis zur Messung aufbewahrt.

Die Messung erfolgt möglichst unmittelbar im Anschluss an die Markierung. Die Fluoreszenz wird im FL2 Kanal detektiert (Abb. 3.5). Pro Probe werden 10.000 Zellen vermessen. Für alle Messungen wurde ein FACSCalibur von Becton Dickinson benutzt. Die Auswertungen wurden mit dem Programm CellQuest Pro durchgeführt.

## **3.7 Tierversuche an SCID (severe combined immunodeficient) Mäusen**

### **3.7.1 Tierschutzrechtliche Bestimmungen und Tierhaltung**

Die Genehmigung für die Tierversuche, die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden, war durch das Regierungspräsidium Darmstadt erteilt worden (Gen. Nr. F 123/23). Sämtliche Studien wurden entsprechend der getroffenen Vereinbarungen durchgeführt. Das Einbringen der humanen Nalm-6 Zellen in die Schwanzvene der Mäuse sowie die Betäubung der Tiere wurde durch den Veterinärmediziner Dr. Boris Brill durchgeführt bzw. beaufsichtigt. Die Tiere wurden mindestens einmal täglich bezüglich ihres Gesundheitszustandes kontrolliert. Tiere, die starken Gewichtsverlust (> 20 %) aufwiesen oder ein Leiden zeigten wurden sofort getötet.

Die Tiere wurden unter pathogenfreien Bedingungen im Tierlabor des Georg-Speyer-Instituts gehalten. Der Raum wurde nur nach dem Angelegen von Schutzkittel, Handschuhen und Überschuhen betreten. Die Tiere erhielten Trockenfutter und steriles Wasser. Sie wurden auf Weichholzgranulat in geschlossenen Käfigen gehalten, die mit Reinluft versorgt wurden. Ein Käfig wurde maximal mit 5 Tieren besetzt. Das Wiegen und Spritzen der Mäuse erfolgte unter einer Sterilwerkbank.

### **3.7.2 Verwendeter Tierstamm**

Die Versuchstiere wurden mit einem Alter von 3-4 Wochen von Harlan Winkelmann in Borcheln bezogen. Die aus dem C.B-17 Stamm abgeleiteten Mäuse trugen die folgende Genmanipulation: IcrHanHsd-scid. Diese SCID Mäuse weisen ein schwerwiegendes Immundefizit auf. Sie besitzen eine stark reduzierte Anzahl an B- und T-Zellen. Die B-Zellen dieser Tiere sind zudem weitestgehend unfähig, Immunglobuline zu produzieren. SCID Mäuse sind fruchtbar und können unter pathogenfreien Bedingungen zwischen 9 und 12 Monate alt werden. Es wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet.

### **3.7.3 Tierschutzgerechtes Töten der Tiere**

Die Tiere werden mit einem Gemisch aus 3 Teilen Ketamin® und 2 Teilen Rompun® in 15 Teilen sterilem PBS narkotisiert. Abhängig vom Gewicht und dem Gesundheitszustand des Tieres werden 150 bis 250 µl dieses Gemisches intraperitoneal verabreicht. Die Narkosetiefe wird durch Überprüfung der Spontanbewegung, Kopfhaltung, Reflexe, Spontanatmung und des Herzschlags festgestellt. Die Tiere werden dann durch Genickbruch sicher getötet.

### 3.7.4 Einbringen von Nalm-6 Zellen in SCID Mäuse

Nach dem Erhalt der 3-4 Wochen alten SCID Mäuse wurden diese gewogen und wie in Kap. 3.7.2 beschrieben untergebracht. Die Tiere wurden 2 Wochen lang beobachtet, bis sie sich an die neue Umgebung gewöhnt hatten und sich ein mittleres Durchschnittsgewicht von 18 bis 20 g pro Tier eingependelt hatte. Erst dann wurde mit dem Versuch begonnen. Jeweils 5 Tiere bildeten eine Gruppe (in einem Käfig). Die Tiere einer Gruppe wurden zur Unterscheidung mit Lackstiften farblich gekennzeichnet. Es wurde auf ein ausgeglichenes Durchschnittsgewicht der einzelnen Gruppen geachtet.

Zur Generierung eines Tiermodells für Akute Lymphatische Leukämie wurde den immundefizienten Mäusen je nach Experiment eine Menge von  $0,75 \times 10^6$  bzw.  $1 \times 10^6$  Zellen der humanen ALL-Zelllinie Nalm-6 in die seitliche Schwanzvene injiziert.

Die Nalm-6 Zellen wurden dazu aus einer exponentiell wachsenden Kultur entnommen. Vor dem Einbringen in die SCID Mäuse wurden die Zellen zweimal mit PBS (vorgewärmt auf  $37^\circ\text{C}$ ) gewaschen. Zentrifugiert wurde mit  $200 \times g$  bei Raumtemperatur. Die Nalm-6 Zellen wurden mit warmem PBS auf eine Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen pro ml eingestellt. Die Injektion dieser Suspension in die Schwanzvene der Tiere erfolgte dann sobald wie möglich durch den Veterinärmediziner Dr. Boris Brill. Der Vorgang wurde genau beobachtet und dokumentiert. Tiere, bei denen es Schwierigkeiten beim Einbringen der Nalm-6 Zellen gab, wurden gegebenenfalls vom Experiment ausgeschlossen.

### 3.7.5 Behandlung der Nalm-6-Mäuse

Nachdem sich die Nalm-6 Zellen 3-4 Tage lang in den SCID Mäusen ansiedeln konnten, wurde mit der Behandlung begonnen. Die Mäuse wurden nach folgendem Schema behandelt: 5 Tage Therapie - 9 Tage Behandlungspause - 5 Tage Therapie. Die Verabreichung der Wirkstoffe (in  $100 \mu\text{l}$  sterilem PBS) erfolgte intraperitoneal jeweils morgens und abends.

Die VPA-Gruppen sowie die VPA+Dexamethason-Gruppen erhielten zweimal täglich  $350 \text{ mg}$  VPA pro kg Körpergewicht. Die Dexamethason-Gruppen sowie die VPA+Dexamethason-Gruppen bekamen einmal täglich abends  $3 \text{ mg}$  Dexamethason pro kg Körpergewicht. Die reinen Dexamethason-Gruppen erhielten morgens nur PBS als Kontrolle. Die Kontrollgruppen erhielten morgens und abends  $100 \mu\text{l}$  PBS.

Die Mäuse wurden täglich gewogen und ihr Gesundheitszustand kontrolliert. Wenn Tiere starken Gewichtsverlust ( $> 20 \%$ ) aufwiesen oder Lähmungen zeigten wurden sie sofort wie unter Kap.3.7.4 beschrieben getötet.

### 3.7.6 Entnahme von Milz und Femur

Zur Organentnahme wird das tote Tier in Rückenlage fixiert und mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die Maus wird geöffnet und zunächst die Milz entnommen. Diese wird in einem Eppendorfgeläß auf Eis kurzfristig aufbewahrt. Dann werden die beiden Oberschenkelknochen von der Hüfte bis unterhalb des Knies freigelegt. Das Muskelgewebe wird grob, aber vorsichtig entfernt, um den Knochen nicht zu verletzen. Der Femur wird komplett mit den Gelenkkapseln abgetrennt und entnommen. Beide Oberschenkelknochen werden zur kurzfristigen Lagerung in ein Eppendorfgeläß auf Eis gegeben. Die Aufarbeitung der Knochenmarkzellen und der Milz für durchflusszytometrische Untersuchungen ist unter Kap. 3.6.4 beschrieben. Die Milzen werden vor der entsprechenden Präparation gewogen und ein kleiner Teil der Milz für histologische Schnitte verwendet.

### 3.7.7 Histologische Schnitte der Milz

Um die Nalm-6 Zellen im Milzgewebe der Maus sichtbar zu machen, wurden sie mit einem fluoreszierenden Antikörper markiert. Von dieser Markierung wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografische Aufnahmen erstellt.

Ein kleines Stück der Milz (etwa 2 mm breit) wird mit dem Skalpell abgetrennt und in ein Tissue-Tek® Cryomold® (Fa. Sakura) Schälchen gegeben. Das Gewebestück wird mit Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (Fa. Sakura) überschichtet und das Schälchen für 5-10 min auf Trockeneis gestellt. Die Gefrierschnitte wurden durch Frau Renate Hanagarth in der Zentralen Forschungseinrichtung (ZFE) am Universitäts-Klinikum Frankfurt angefertigt. Die Schnitte werden auf Objektträger überführt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

#### Färbung:

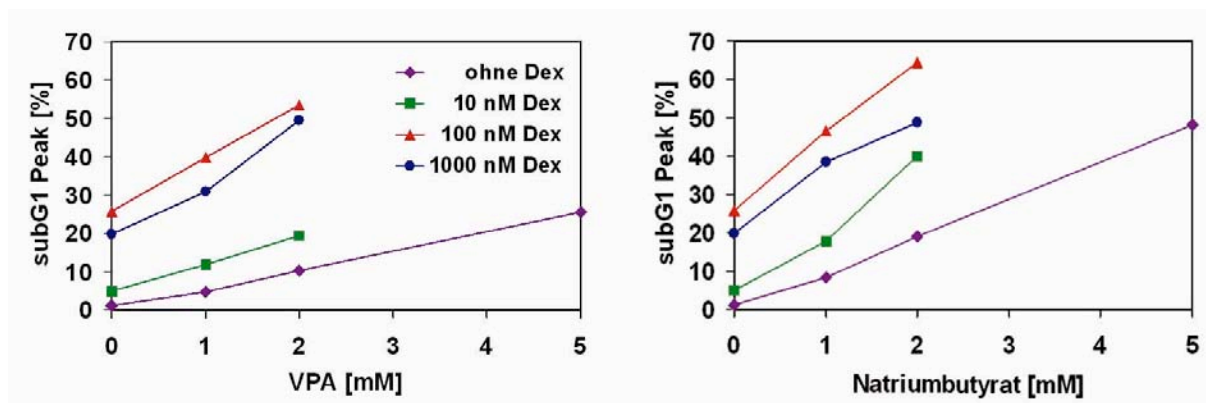
Die Fixierung erfolgt in PBS mit 1 % Formaldehyd versetzt für 10 min bei RT. Anschließend wird zweimal je 10 min mit PBS bei RT gewaschen. Mit einem Wachsstift wird der Schnitt auf dem Objektträger umrandet. Peroxidase-Aktivität wird geblockt mit 30-50 µl Blocklösung (0,1% Ovalbumin; 0,5% Gelatine in PBS) in einer Feuchtkammer für 30 min bei RT. Die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen humanes CD19 (20µl, 1:10) erfolgt über Nacht in der Feuchtkammer im Kühlschrank. Am nächsten Tag wird dreimal mit PBS bei RT gewaschen und anschließend mit dem FITC-konjugierten Sekundärantikörper Ziege α Maus (1.400 in Blocklösung) für 1-2 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Die folgenden Schritte werden, wenn möglich, im Dunkeln durchgeführt. Es wird wieder dreimal für 10 min mit PBS gewaschen. Vor dem Trocknen wird der PBS Puffer mit destilliertem Wasser gewaschen. Dann wird der Schnitt in Mowiol® plus DAPI (zur Kernfärbung, 1 µg/µl) eingebettet und möglichst bald die Aufnahmen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Eclipse T300, Nikon) gemacht.

Die Färbung nach der H&E-Methode wurde am Universitäts-Klinikum Frankfurt von Frau Renate Hanagarth durchgeführt. H&E-gefärbte Gefrierschnitte lassen sich vor Licht geschützt bei Raumtemperatur aufbewahren. Die Auswertung erfolgt unter einem normalen Lichtmikroskop.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Apoptose in ALL-Zellen durch Dexamethason und HDACi

Mit Pilotexperimenten sollte herausgefunden werden, ob die beiden HDAC-Inhibitoren VPA und Butyrat die Dexamethason-induzierte Apoptose in ALL-Zellen verstärken können. Dazu wurden Nalm-6 Zellen, im exponentiellen Wachstumsstadium, auf  $1 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter eingestellt und entsprechend behandelt (Abb. 4.1). Ein großer Teil der Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde an der humanen prä-B-Zelllinie Nalm-6 durchgeführt. Diese ALL-Zelllinie zeichnet sich durch ein ausgesprochen gleichmäßiges und unempfindliches Wachstum aus, was zu einer entsprechend hohen Reproduzierbarkeit der Messdaten führt. Die Zelltodrate wurde über die durchflusszytometrische Bestimmung der subG1 Population mittels PI-Färbung bestimmt (Kap. 3.6.2).



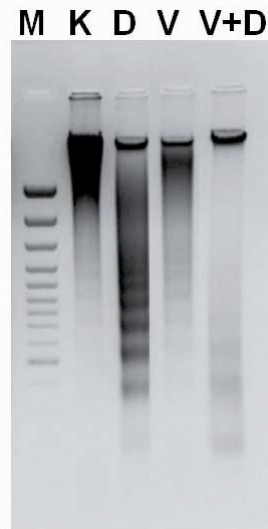
**Abbildung 4.1: Pilotversuche zur Behandlung von Nalm-6 mit Dexamethason, VPA und Butyrat**

Nalm-6 Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden für 48h, wie in der Legende angezeigt mit verschiedenen Konzentrationen an Dexamethason (Dex) behandelt. Zum einen wurde die Behandlung mit VPA (links) und zum anderen mit Natriumbutytrat (rechts) kombiniert. Die Zelltodrate entspricht der subG1 Population. Die Datenpunkte entstammen den Mittelwerten einer Doppelbestimmung.

Sowohl für VPA als auch für Butyrat wurde eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität für Nalm-6 Zellen gefunden. Dabei erwies sich Butyrat als etwas potenter. Interessanterweise führten sehr hohe Dexamethason-Konzentrationen (1000 nM) zu einem rückläufigen Effekt bezüglich der Apoptose-Induktion. VPA- sowie Butyrat-Behandlung führten eindeutig zu einer Verstärkung des Dexamethason-vermittelten Zelltods. Die beobachteten Effekte waren dabei stets größer als additiv. Ausführliche Untersuchungen, die den Synergismus zwischen Dexamethason und VPA belegen, sind in Kap. 4.2 beschrieben.

Zunächst sollte geklärt werden, ob es sich bei dem induzierten Zelltod um Apoptose handelt. Dazu wurde die genomische DNA der entsprechend behandelten Nalm-6 Zellen isoliert und

mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Das Vorhandensein einer so genannten DNA-Leiter (200 bp, 400 bp, 600 bp, usw.), die durch internukleosomale Spaltung von Chromatin im Verlauf des apoptotischen Prozesses entsteht, dient als ein eindeutiger Hinweis auf programmierten Zelltod.



**Abbildung 4.2: DNA-Leiter als Nachweis für Apoptose-Induktion in Nalm-6 Zellen**

Nalm-6 Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden für 48h mit 100 nM Dexamethason (D), mit 2 mM VPA (V) und einer Kombination beider Substanzen (V+D) behandelt. Die genomische DNA wurde isoliert und pro Spur 10  $\mu$ g im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Im Vergleich zur Kontrolle ist die DNA-Leiter bei den behandelten Zellen deutlich stärker ausgeprägt.

Das Agarosegel in Abbildung 4.2 zeigt, dass sich in den unbehandelten Kontrollzellen ein sehr geringer Anteil an Zellen in einem apoptotischen Prozess befand. Die Behandlung mit VPA allein führte bereits zu einer etwas deutlicheren DNA-Leiter. Sehr ausgeprägte DNA-Fragmentierung durch Apoptose wurde bei Dexamethason-behandelten Zellen gefunden. Die kombinierte Behandlung mit Dexamethason und VPA führte zur nahezu vollständigen Fragmentierung der genomischen DNA. Die jeweilige Stärke der DNA-Leiter steht somit im Einklang mit den zuvor ermittelten, durchflusszytometrischen Daten. Für den HDACi Butyrat wurde eine vergleichbare DNA-Fragmentierung gefunden (Daten nicht gezeigt).

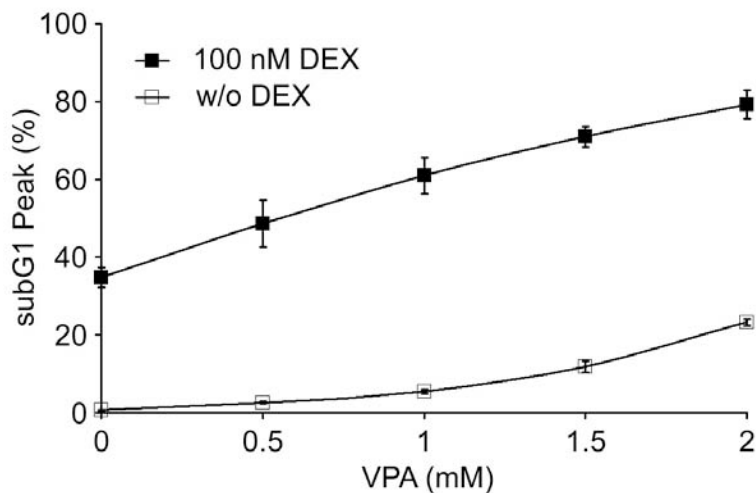
Auch morphologische Beobachtungen deuteten darauf hin, dass es sich bei dem vorliegenden Zelltod um einen apoptotischen Prozess handelt. So konnte, nach der Behandlung von Nalm-6 Zellen mit Dexamethason und VPA, unter dem Mikroskop das Abschnüren von apoptotischen Vesikeln beobachtet werden.

Zudem dient die beobachtete Aktivierung von Initiator-Caspasen (Caspase 8 und 9) als ein weiterer, eindeutiger Nachweis für Apoptose (Kap. 4.8).

## 4.2 Synergistische Apoptose-Induktion in Nalm-6 Zellen durch Dexamethason und HDACi

### 4.2.8 Synergismus zwischen Dexamethason und VPA

Da die Vorversuche (Kap 4.1) auf eine synergistische Apoptose-Induktion in Nalm-6 Zellen durch Dexamethason und VPA hindeuteten, sollte dem nun in weiteren Untersuchungen nachgegangen werden. Hierzu wurden Nalm-6 Zellen in mehreren unabhängigen Experimenten mit Dexamethason, VPA und der Kombination beider Substanzen behandelt. Die induzierte Apoptoserate wurde durchflusszytometrisch mittels PI-Färbung bestimmt (Abb. 4.3).



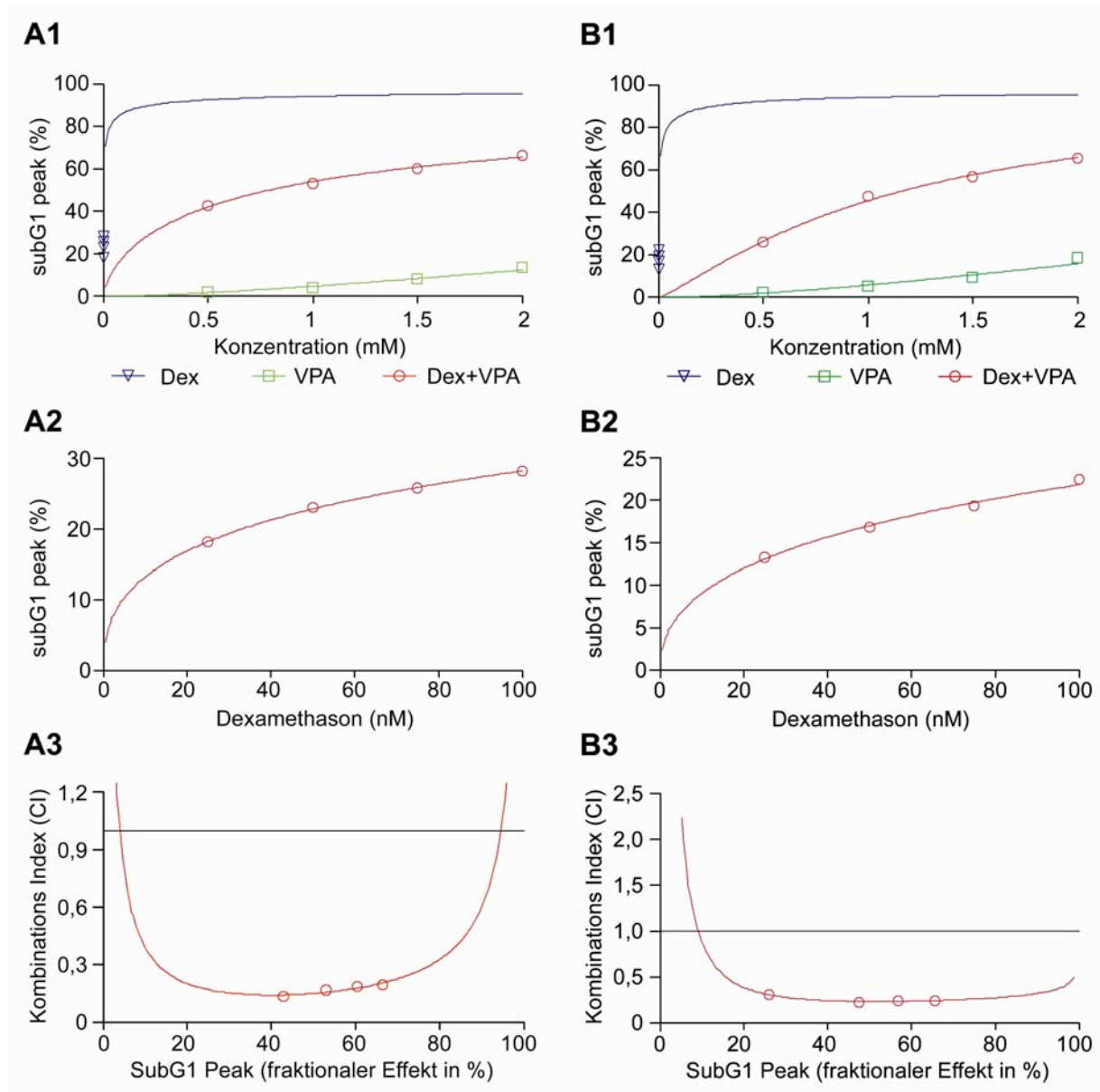
**Abbildung 4.3: Bestimmung der zytotoxischen Wirkung von Dexamethason und VPA**

Nalm-6 Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden für 48h entsprechend der angegebenen Konzentrationen mit VPA allein bzw. in Kombination mit Dexamethason (100 nM) behandelt. Mittels PI-Färbung wurde der subG1 Peak, der dem Anteil an apoptotischen Zellen entspricht, bestimmt. Die Werte repräsentieren jeweils die Mittelwerte einer Doppelbestimmung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

Die Behandlung von Nalm-6 Zellen mit VPA führt, wie im Vorversuch bereits beobachtet, zu einem konzentrationsabhängigen Ansteigen der subG1 Population, die den Anteil an apoptotischen Zellen repräsentiert. Bei einer Konzentration von 2 mM VPA befinden sich nach 48 h etwa 23 % der Zellen in Apoptose. Dexamethason (100 nM) als Einzelsubstanz tötet in der gleichen Zeit ca. 34 % der Nalm-6 Zellen. Die Apoptoserate war signifikant erhöht im Falle der Kombinationsbehandlung. Bei einer Valproinsäure-Konzentration von 2 mM und 100 nM Dexamethason wurde ein subG1 Peak von 80 % gemessen. Dabei ist zu beachten, dass Werte > 80 % mit dieser Detektionsmethode nicht mehr nachweisbar sind.

Die Apoptoserate, die für die Kombination von VPA und Dexamethason gemessen wurde, war verglichen mit den Werten der Einzelsubstanzen somit deutlich mehr als additiv erhöht.





**Abbildung 4.4: Synergistische Apoptose-Induktion durch Dexamethason und VPA**

Nalm-6 Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden für 48h mit VPA (0,5, 1, 1,5 und 2 mM), mit Dexamethason (25, 50, 75, 100 nM) und der entsprechenden Kombination der beiden Wirkstoffe behandelt. Es wurde ein konstantes Konzentrationsverhältnis von VPA zu Dexamethason von 20000:1 eingehalten. Der subG1 Peak wurde durchflusszytometrisch nach PI-Färbung bestimmt. **A** bzw. **B** stehen für zwei unabhängige Experimente. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten aus Dreifachbestimmungen. Alle sechs Diagramme wurden mit der Calcsyn Software erstellt. Das Programm bietet leider nicht die Möglichkeit die Skalierung der Achsen zu beeinflussen, diese passt sich vielmehr automatisch an die berechneten Daten an. **A1/B1**) zeigen die so genannten „Dosis-Effekt“ Kurven. **A2/B2**) zeigt noch einmal die „Dosis-Effekt“ Kurve für die Dexamethason-Behandlung, aber diesmal mit einer Konzentrationsachse in nanomolarer Größenordnung. **A3/B3**) zeigt den berechneten Kombinations-Index in Abhängigkeit vom fraktionalem Effekt, der hier dem subG1 Peak der jeweiligen Kombinationsbehandlung entspricht. Der horizontale Strich markiert einen CI-Wert von 1.

Über eine „Dosis-Effekt“-Analyse mit der kommerziellen Calcsyn Software sollte der Kombinations-Index zwischen Dexamethason und VPA bezüglich der Apoptose-Induktion in Nalm-6 Zellen bestimmt werden. Das Prinzip dieser Analyse ist auf eine Theorie von Chou

und Talalay zurückzuführen [179]. Es gelten die folgenden Definitionen: Ein Kombinations-Index (CI) von 1 entspricht einem additiven Effekt, ein  $CI > 1$  charakterisiert einen antagonistischen und  $CI < 1$  einen synergistischen Effekt. Ist der  $CI < 0,3$  kann man von einem stark synergistischen Effekt sprechen.

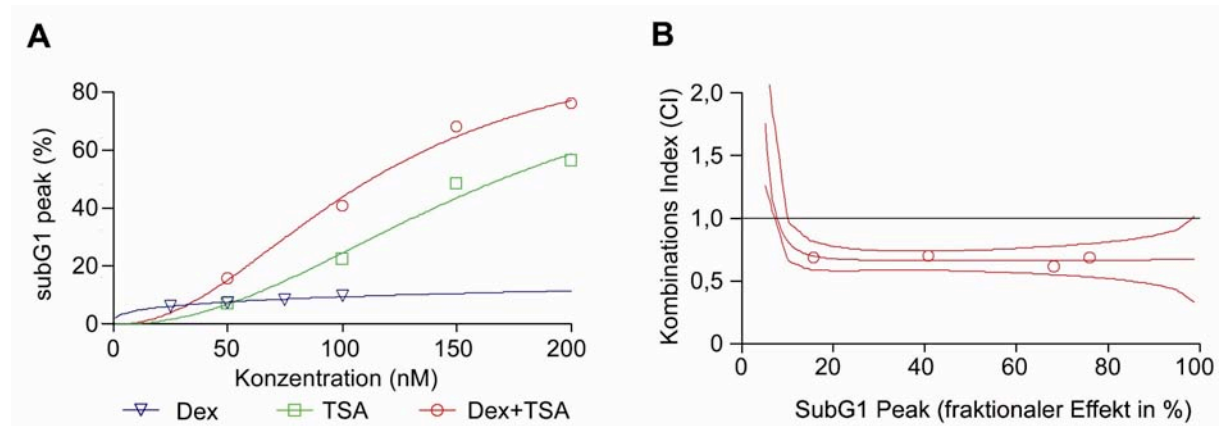
Für die Analyse wurden die Apoptoseraten nach den Einzelbehandlungen mit Dexamethason bzw. VPA sowie die Werte nach entsprechender Kombinationsbehandlung benötigt. Für die Kombinationen musste ein festes Konzentrationsverhältnis eingehalten werden. VPA wurde von 0,5-2 mM und Dexamethason von 25-100 nM variiert. Das Konzentrationsverhältnis von VPA zum Glucocorticoid betrug für alle vier Kombinationen 20000:1. Zur Ermittlung der Apoptoserate wurde der subG1 Peak bestimmt. Es wurden zwei unabhängige Synergie-Berechnungen durchgeführt (Abb. 4.4).

Nach der Eingabe der Daten in das Calcsyn Programm berechnet dieses zunächst die „Dosis-Effekt“-Kurven, die den „fraktionalen Effekt“ (hier subG1 Peak) in Abhängigkeit von den eingesetzten Konzentrationen zeigen. Daraufhin erfolgt die Kalkulation der Kombinations-Indices. Der CI-Wert bezieht sich dann auf den „fraktionalen Effekt“, der für eine bestimmte Kombination gemessen wurde. Aus den vier analysierten Kombinationen ergeben sich somit vier CI-Werte, die als Datenpunkte eingezeichnet sind. Die durchgezogenen Kurven in Abbildung 4.4 A3 und B3 stellen die CI-Simulationen für weitere, potentielle „fraktionale Effekte“ dar.

Die CI-Werte in Experiment A reichen von 0,14 bis 0,19. Dies entspricht einem stark synergistischen Effekt zwischen Dexamethason und VPA. Das zweite Experiment (B) bestätigte das Ergebnis. Hier wurden Kombinations-Indizes von 0,22 bis 0,32 errechnet.

#### **4.2.9 Konzentrationsabhängiges Zusammenwirken von Dexamethason und TSA**

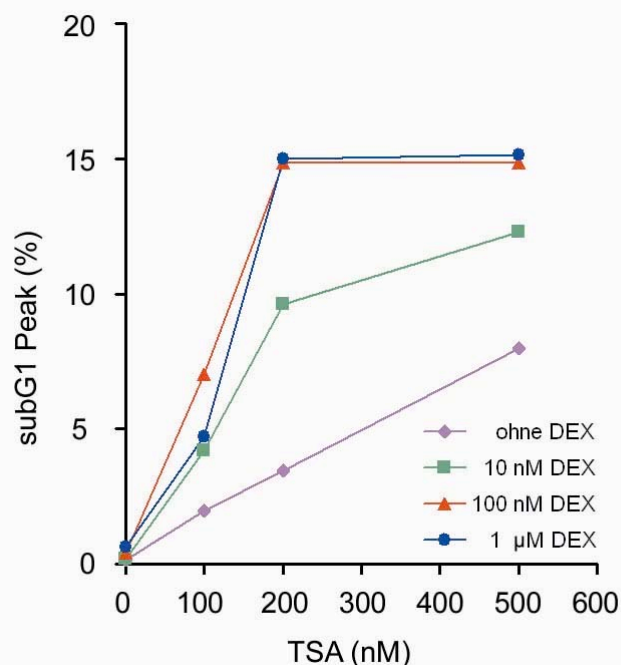
Als nächstes wurde untersucht, ob auch andere HDACi den Dexamethason-vermittelten Zelltod verstärken können. Das vorherige Experiment wurde nun mit TSA an Stelle von VPA durchgeführt. Die Behandlung mit Dexamethason, TSA sowie der Kombination beider Substanzen erfolgte wieder in einem festen Konzentrationsverhältnis. Die Konzentration von TSA wurde variiert von 50-200 nM. Dexamethason wurde wie zuvor von 25-100 nM eingesetzt. Das Verhältnis der Konzentrationen lag bei 2:1 (TSA zu Dexamethason). Die mit Calcsyn berechnete „Dosis-Effekt“-Kurve zeigt, dass auch TSA den zytotoxischen Effekt von Dexamethason verstärkt (Abb. 4.5). Die nach 28-stündiger Behandlung ermittelten Apoptoseraten erstreckten sich über den gesamten messbaren Wertebereich. Die berechneten CI-Werte liegen bei  $\leq 0,7$ , was einem synergistischen Zusammenwirken entspricht, allerdings wesentlich weniger stark ausgeprägt, als es bei VPA und Dexamethason der Fall war. Im Rahmen einer Diplomarbeit in unserer Arbeitsgruppe konnten auch für weitere HDACi positive Effekte auf die anti-leukämische Wirkung von Dexamethason gefunden werden (Kap. 5.3) [180].



**Abbildung 4.5: Wechselwirkung zwischen Dexamethason und TSA**

Nalm-6 Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden für 28h mit TSA (50, 100, 150 und 200 nM), mit Dexamethason (25, 50, 75, 100 nM) und der Kombination beider Substanzen behandelt. Ein konstantes Konzentrationsverhältnis von TSA zu Dexamethason von 2:1 wurde eingehalten. **A**) zeigt die „Dosis-Effekt“ Kurve der Calculus-Berechnung. Der subG1 Peak entspricht der Apoptoserate. Die Datenpunkte entstammen Mittelwerten aus Dreifachbestimmungen. **B**) zeigt den kalkulierten Kombinations-Index in Abhängigkeit vom fraktionalem Effekt (subG1 Peak) der jeweiligen Kombinationsbehandlung. Ein CI-Wert von 1 ist eingezeichnet.

Interessanterweise hat sich herausgestellt, dass der hier beobachtete Synergismus bei hohen Konzentrationen an TSA wieder rückläufig ist (Abb. 4.6). Dieser Effekt wurde bereits von Bernhard *et al.* beobachtet [181].



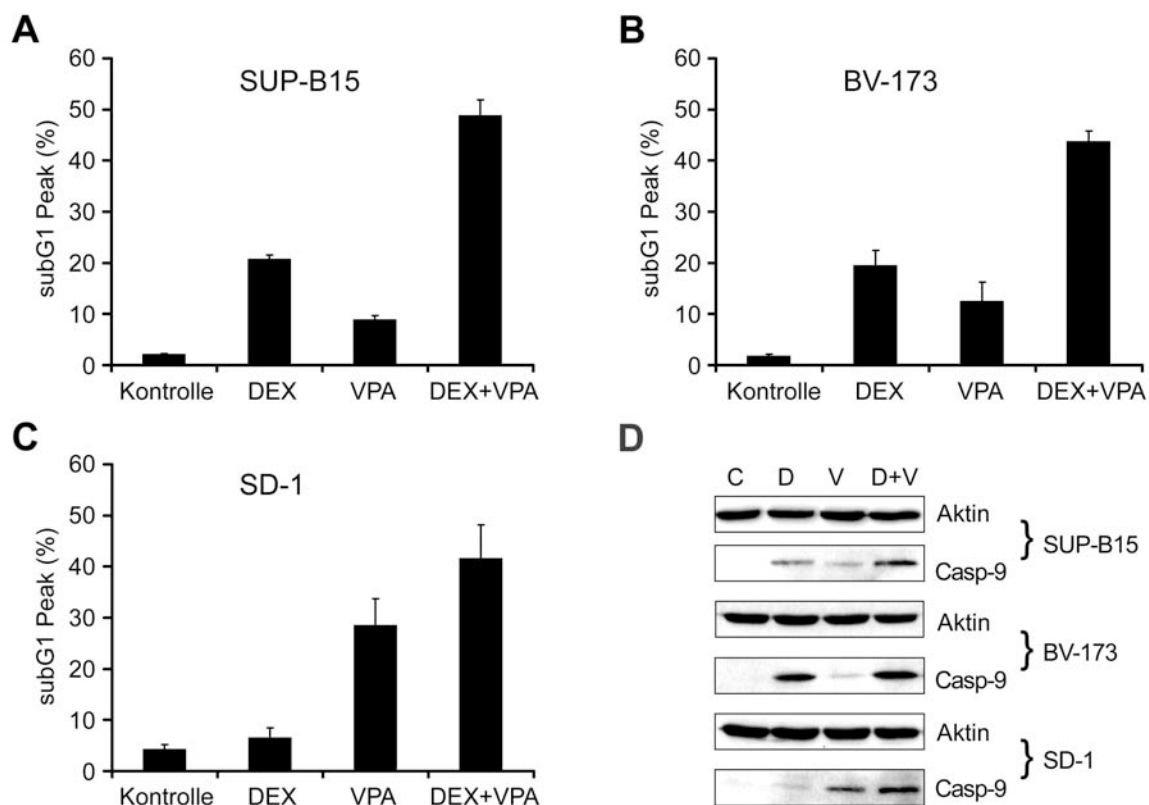
**Abbildung 4.6: Dexamethason kombiniert mit TSA bei höheren Konzentrationen**

Nalm-6 Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden für 24h mit TSA (100, 200 und 500 nM) allein und wie in der Legende angezeigt mit verschiedenen Konzentrationen an Dexamethason (DEX) kombiniert behandelt. Der subG1 Peak repräsentiert die Apoptoserate. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten aus Dreifachbestimmungen.

Auf Grund der kurzen Behandlungsdauer von 24h wurden nur niedrige Apoptoseraten nach Dexamethason-Behandlung gemessen. Um in der subG1 Population detektiert zu werden, müssen die Zellen bereits ein fortgeschrittenes Stadium der Apoptose mit DNA-Fragmentierung erreicht haben. Die Behandlungsdauer wurde so gewählt, da wegen der hohen TSA Konzentrationen eigentlich deutlich höhere Apoptoseraten erwartet wurden.

### 4.3 Verstärkte Apoptose in weiteren ALL-Zelllinien durch Dexamethason und VPA

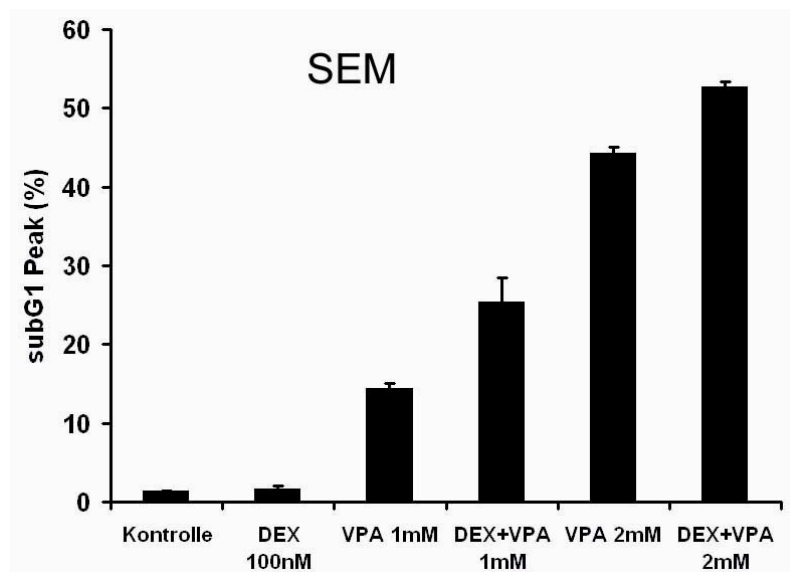
Ein positives Zusammenwirken von VPA und Dexamethason bezüglich der Apoptose-Induktion wurde ebenfalls in drei weiteren prä-B-Zelllinien gefunden: SUP-B15, BV-173 and SD-1 (Abb. 4.7).



**Abbildung 4.7: VPA verstärkt die Zytotoxizität von Dexamethason in weiteren ALL-Zelllinien**

**A)** SUP-B15 Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden für 24h mit 50 nM Dexamethason, 1 mM VPA und der Kombination beider Substanzen behandelt. Als Maß für den Zelltod dient der subG1 Peak. **B)** BV-173 Zellen und **C)** SD-1 Zellen wurden ebenso behandelt, allerdings für 28h. Die Daten entsprechen jeweils den Mittelwerten von Doppelbestimmungen aus zwei unabhängigen Experimenten. **D)** Die drei Zelllinien wurden für 24h mit 50 nM Dexamethason (D), 1 mM VPA (V) und der entsprechenden Kombination (D+V) behandelt. Die aktive Form von Caspase 9 (Casp-9) wurde mit dem entsprechenden Antikörper mittels Westernblot-Analyse sichtbar gemacht. Aktin diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung des Gels mit Proteinextrakt.

Alle drei Zelllinien reagierten sehr sensitiv auf die Wirkstoffkombination, so dass hier eine kurze Behandlungsdauer von 24 h gewählt wurde. Aus den Daten für die SUP-B15 Zelllinie ist ein synergistischer Effekt sehr gut zu erkennen. Im Vergleich zur Zelltodrate von 48,7 % bei kombinierter Behandlung, ergibt die Summe aus den Einzelbehandlungen mit Dexamethason und VPA lediglich 29,4 %. Dieses Ergebnis wurde mittels Westernblot-Analyse von Caspase 9 bestätigt. Die Behandlung mit VPA und Dexamethason führte zu einem stark vermehrten Auftreten der aktiven Form von Caspase 9. In BV-173 Zellen kommt es ebenfalls zu einer deutlichen Erhöhung der gemessenen Todesrate bei der Kombination von HDACi und Glucocorticoid. Auch hier ist eine verstärkte Aktivierung von Caspase 9 zu erkennen, allerdings nicht so ausgeprägt wie in SUP-B15 Zellen. SD-1 Zellen reagierten besonders empfindlich auf VPA. Dahingegen ist der zytotoxische Effekt von Dexamethason in dieser Zelllinie geringer. Die Kombination von Dexamethason und VPA bewirkte jedoch auch in dieser Zelllinie einen mehr als additiven Effekt, was sich hier ebenfalls in der vermehrten Spaltung von Procaspase 9 widerspiegelte (Abb. 4.7D).



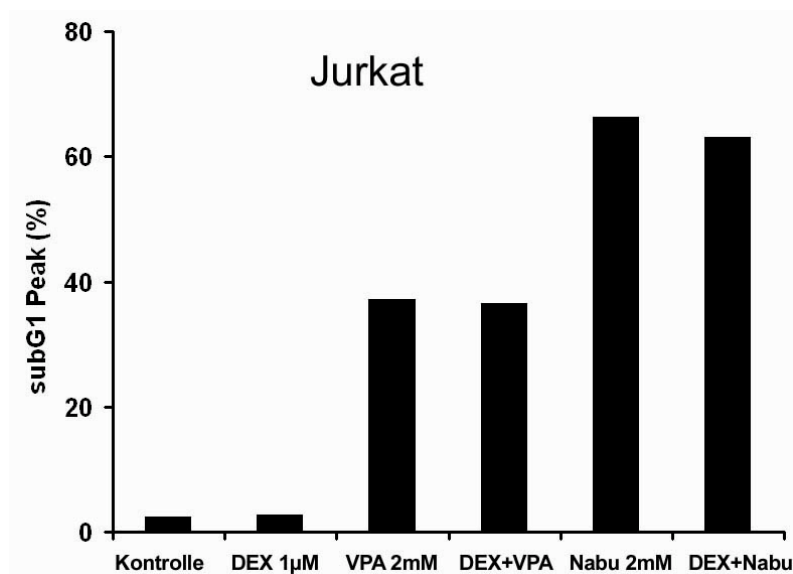
**Abbildung 4.8: Zusammenwirken von VPA und Dexamethason in SEM Zellen**

SEM Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden für 40h wie angezeigt mit 100 nM Dexamethason, 1 mM bzw. bzw 2 mM VPA und den entsprechenden Kombinationen behandelt. Der subG1 Peak entspricht der Todesrate. Die Daten entsprechen jeweils den Mittelwerten von Doppelbestimmungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Auch in der prä-B-Zelllinie SEM wurde eine sehr schwache anti-leukämische Wirkung von Dexamethason gefunden (Abb. 4.8), trotz 40-stündiger Behandlungsdauer. Ähnlich wie zuvor bei den SD-1 Zellen, wurde hier ebenfalls ein sehr gutes Ansprechen auf die Behandlung mit VPA festgestellt. Die Kombination von 1 mM VPA (14,3 % tote Zellen) mit 100 nM

Dexamethason (1,6 % tote Zellen) führte zu einer Apoptoserate von 25,2 %, was auch in den SEM Zellen auf ein positives Zusammenwirken der beiden Substanzen schließen lässt.

Im Vergleich dazu konnte in der T-Zelllinie Jurkat kein positives Zusammenwirken von HDACi und GC gefunden werden. Jurkat Zellen zeigten auch nach 48 h Behandlung mit Dexamethason keinen Anstieg der Zelltodrate im Vergleich zur Kontrolle. Es handelt sich hier offensichtlich um eine echte Resistenz. Diese Resistenz wird darauf zurückgeführt, dass in dieser Zelllinie, in einem der beiden GR Allele, eine Funktionsbeeinträchtigende Punktmutation vorliegt [182]. VPA und Natriumbutyrat töteten nach 48-stündiger Exposition mit jeweils 2 mM bereits 37 % bzw. 66 % der Jurkat Zellen. Die Art der Resistenz gegenüber Dexamethason konnte nicht durch die HDAC-Inhibitoren aufgehoben werden.



**Abbildung 4.9: Jurkat Zellen zeigen Resistenz gegenüber Dexamethason und der Kombination mit HDACi**

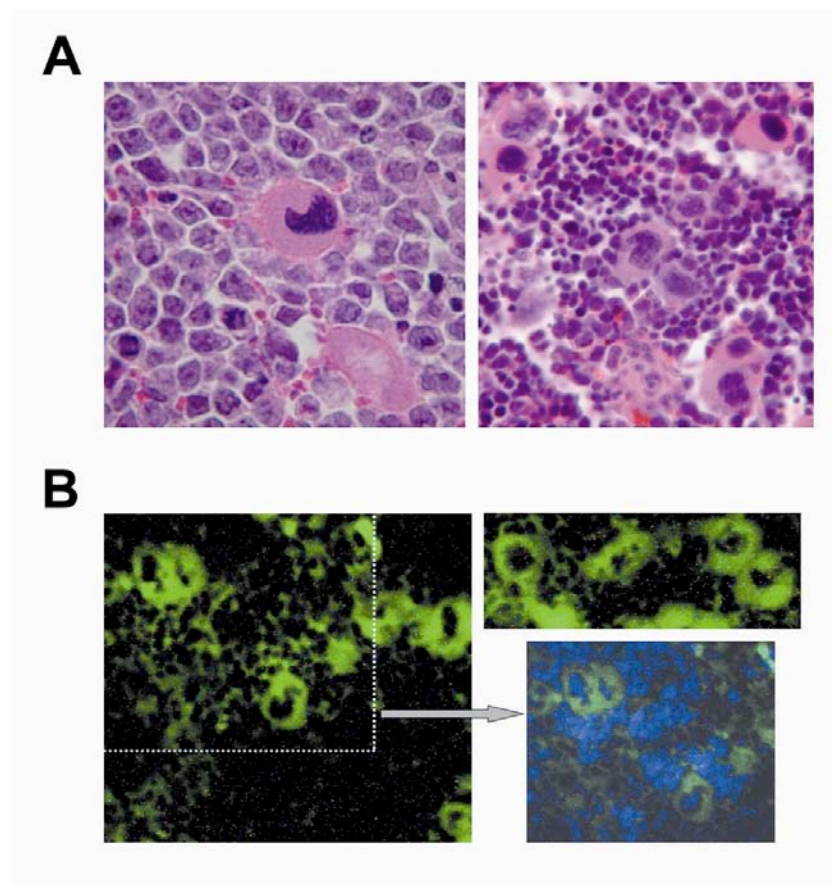
Jurkat Zellen wurden für 48h mit 1 µM Dexamethason, 2 mM VPA, 2 mM Natriumbutyrat (Nabu) und den entsprechenden Kombinationen behandelt. Der induzierte Zelltod wird über den subG1 Peak bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

#### 4.4 Nalm-6-Mausmodell für Akute Lymphatische Leukämie

Zur Untersuchung des therapeutischen Nutzens einer Kombinationsbehandlung mit Dexamethason und VPA *in vivo* wurde ein Tiermodell für Akute Lymphatische Leukämie benötigt. So wurde in Anlehnung an ein von Kamel-Reid *et al.* beschriebenes Modell für ALL ein ähnliches Mausmodell in unserer Forschungseinrichtung eingeführt. Die humanen Leukämiezellen, in unserem Fall Nalm-6 Zellen, wurden immundefizienten SCID Mäusen in die Schwanzvene injiziert. Vier Wochen nach dem Einbringen der Zellen traten bei den Mäusen Bewegungseinschränkungen an den Hinterbeinen auf, die sich dann innerhalb

weniger Tage zu einer vollständigen Lähmung der Hinterbeine entwickelte. Starke Lähmungserscheinungen und ein Gewichtsverlust von 20 % stellten die Abbruchkriterien dar. Tiere, die eins dieser Kriterien erreicht hatten, wurden getötet.

Zunächst wurde untersucht, ob SCID Mäuse nach dem Einbringen der Nalm-6 Zellen, analog zum Tiermodell von Kamel-Reid *et al.*, eine modellhafte Leukämie entwickelten. Das äußere Krankheitsbild mit den Lähmungserscheinungen deutete auf eine ausgeprägte Infiltration des mauseigenen Knochenmarks durch humane Nalm-6 Blasten. Das darauf folgende Ansiedeln von Nalm-6 Zellen in der Milz konnte durch Färbung der entsprechenden Gefrierschnitte gezeigt werden.



**Abbildung 4.10: Nachweis von Nalm-6 Zellen in der Milz von SCID Mäusen**

In der Milz einer ALL-Maus mit starker Hinterbeinlähmung konnten Nalm-6 Zellen sichtbar gemacht werden. **A)** zeigt nach der H&E Methode gefärbte Gefrierschnitte. Links ist eine einzelne Nalm-6 Zelle vergrößert dargestellt. Die rechte Abbildung zeigt die starke Infiltration durch humane Blasten. **B)** Mit einem Antikörper gegen humanes CD19 wurden Nalm-6 Zellen markiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe eines FITC-konjugierten Sekundärantikörpers sichtbar gemacht (grün). Der Ausschnitt (rechts unten) zeigt die Blaufärbung der Kerne mittels Dapi.

Abbildung 4.10A zeigt H&E-gefärbte Gefrierschnitte. Die humanen Blasten sind auf Grund ihrer Form und Größe eindeutig vom umgebenden Milzgewebe der Maus zu unterscheiden, wie man der vergrößerten Abbildung (links) entnehmen kann. Das rechte Bild zeigt, dass die Milz massiv von Nalm-6 Zellen infiltriert wurde. Als ein weiterer Nachweis für die Infiltration des Gewebes diente die Markierung mit einem fluorochromgekoppelten Antikörper gegen



humanes CD19, welches sich in großer Menge auf der Oberfläche von Nalm-6 Zellen befindet. Die Fluoreszenzmikroskopaufnahme zeigt eine Grünfärbung (CD19 Markierung) von Oberfläche sowie Zytoplasma der Nalm-6 Zellen in den Gefrierschnitten (Abb. 4.10B). Die Zellkerne der humanen Blasten sowie das angrenzende Gewebe blieben ungefärbt (schwarz). Der Ausschnitt in Abbildung 4.10B (rechts unten) zeigt, zusätzlich zur CD19 Markierung, die Färbung der DNA mit Dapi. Die entsprechend gefärbten Zellkerne erschienen blau unter dem Fluoreszenzmikroskop. Hierdurch wurden auch die Zellkerne des mauseigenen Gewebes sichtbar gemacht.

In der Leber sowie im peripheren Blut konnten keine Nalm-6 Zellen nachgewiesen werden, da die Tiere dieses späte Stadium der Krankheit auf Grund der Abbruchkriterien nicht erreichten. Da die Krankheitssymptome und Gewebeeinfiltrationen einheitlich auftraten, liefert das Nalm-6 Maus Modell ein geeignetes System um neue Behandlungsstrategien gegen ALL zu testen.

## **4.5 Behandlung der ALL-Mäuse mit Dexamethason und VPA**

### **4.5.1 Verträglichkeitstest und Vorversuch**

In einem Vorversuch mit einer kleinen Anzahl an SCID Mäusen sollte die Verträglichkeit einer kombinierten Therapie mit Dexamethason und VPA getestet werden. Dazu wurde sechs Tieren eine Injektion von  $1 \times 10^6$  Nalm-6 Zellen in die Schwanzvene verabreicht. Am sechsten Tag nach der Injektion wurde mit der Therapie begonnen. Drei Mäuse erhielten zweimal täglich 350 mg VPA pro kg Körpergewicht sowie täglich einmal 1 mg Dexamethason pro kg Körpergewicht. Die Substanzen wurden in 100  $\mu$ l PBS gelöst intraperitoneal gespritzt. Die drei Kontrolltiere erhielten parallel dazu PBS. Bei der Erstellung des Therapieplans wurden Erfahrungswerte berücksichtigt, die innerhalb der Arbeitsgruppe bzw. in kooperierenden Forschungsgruppen vorlagen. Die Behandlung wurde zunächst 5 Tage lang durchgeführt und nach einer 9-tägigen Pause nochmals für 5 Tage wiederholt. Die Mäuse wurden täglich gewogen und beobachtet. Die Behandlung wurde gut vertragen. Die Tiere, die Dexamethason und VPA erhielten, schliefen sehr viel und verloren an Körpergewicht während der beiden Behandlungsperioden. An den Tagen nach der Behandlung folgte wiederum eine stetige Gewichtszunahme.

Am 31. Tag nach der Nalm-6 Injektion mussten die drei Kontrolltiere auf Grund von Lähmungserscheinungen getötet werden. Zwei der Mäuse mit kombinierter Behandlung überlebten die Kontrolltiere um 3 Tage. Die dritte behandelte Maus musste erst an Tag 38 getötet werden. Die Wirkstoffkombination mit den hier eingesetzten Konzentrationen an Dexamethason und VPA wurde gut vertragen. Das Ergebnis des Pilotversuchs deutet zudem auf eine Wirksamkeit der Behandlung hin.



#### 4.5.2 Untersuchungen zur Gewebe-Infiltration durch Nalm-6 Zellen

Um die Wirksamkeit der Kombinationstherapie zuverlässig abschätzen zu können, wurde im folgenden Experiment die Anzahl der eingesetzten Versuchstiere erhöht. Es sollte der Einfluss der Kombinationstherapie auf das Ausmaß der Infiltration des Knochenmarks und der Milz durch die eingebrachten, humanen Blasten untersucht werden. 20 SCID Mäusen wurden  $5 \times 10^5$  Nalm-6 Zellen in die Schwanzvene injiziert. Die eingebrachte Menge an Nalm-6 Zellen wurde im Vergleich zum Vorversuch reduziert, um den Krankheitsverlauf etwas zu verlangsamen. In vier Fällen gelang es nicht die gesamte Zellsuspension auf einmal zu injizieren. Diese Tiere wurden auf die vier Gruppen zu jeweils fünf Tieren verteilt und bei der Auswertung des Experiments besonders gekennzeichnet (Tab. 4.1), da in diesen Fällen möglicherweise weniger als  $5 \times 10^5$  Nalm-6 Zellen eingebracht wurden.

Gruppe	CD10-positiv (%) PBS	CD10-positiv (%) DEX + VPA
1	45,3	21,6
	43,6	12,7
	18,1*	17,8*
	49,2	46,1
	49,8	27,8
2	49,8	12,9
	32,0	31,6
	10,8*	6,6*
	25,4	34,1
	16,2	38,3
<b>Mittelwert</b>	<b>34,0</b>	<b>24,9</b>
<b>Mittelwert ohne *</b>	<b>38,9</b>	<b>28,1</b>

**Tabelle 4.1: Nalm-6 Infiltration von mauseigenem Knochenmark**

Die Knochenmarksproben der Versuchstiere wurden mit einem fluorchrommarkierten (R-Phycoerythrin, PE) Antikörper gegen humanes CD10 angefärbt, um den Anteil an Nalm-6 Zellen in der Zellsuspension mit einem Durchflusszytometer zu bestimmen. Tiere, bei denen es Schwierigkeiten mit der Nalm-6 Injektion gab, sind mit einem Sternchen markiert. Der Mittelwert ist einmal mit und einmal ohne diese Tiere angegeben.

Am fünften Tag nach der Verabreichung der Leukämiezellen wurde mit der Behandlung begonnen. Die Mäuse wurden wieder nach folgendem Schema behandelt: 5 Tage Therapie - 9 Tage Behandlungspause – 5 Tage Therapie. Zwei Gruppen (10 Tiere) erhielten zweimal täglich 350 mg VPA pro kg Körpergewicht sowie täglich einmal 3 mg Dexamethason pro kg Körpergewicht. Die Dexamethason-Dosis wurde, im Vergleich zum Vorversuch, noch einmal erhöht. Die beiden Kontrollgruppen (10 Tiere) erhielten PBS nach dem gleichen Schema. Die

tägliche Beobachtung und Gewichtskontrolle der Tiere ergab, dass auch die höhere Dexamethason-Dosis gut vertragen wurde.

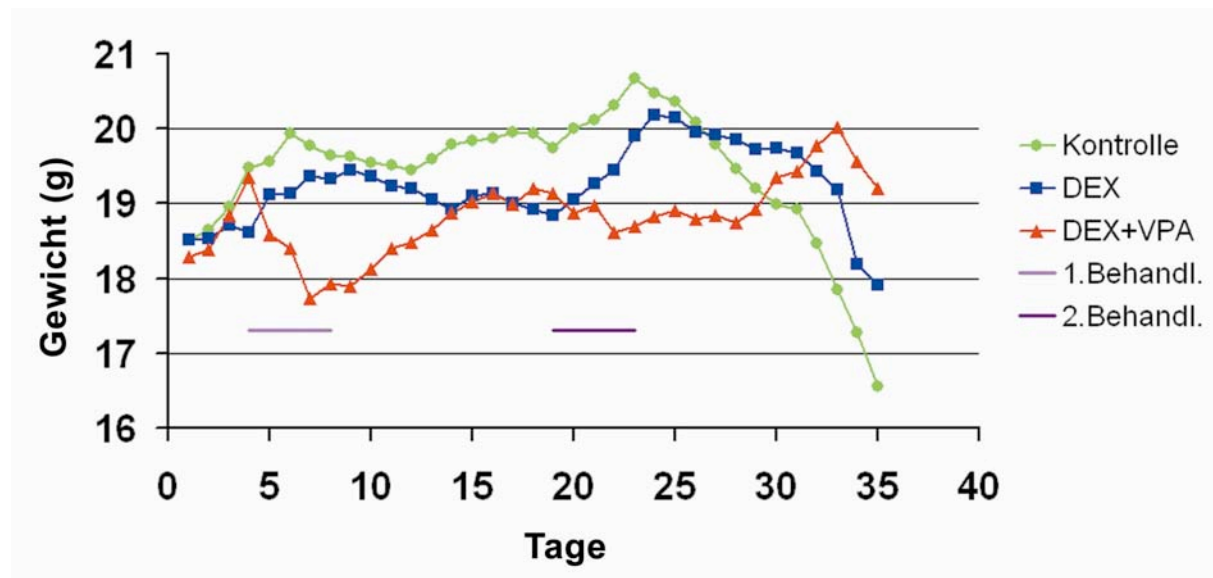
Um das Fortschreiten der Krankheit in behandelten bzw. unbehandelten Tieren direkt miteinander vergleichen zu können, wurden alle Versuchstiere am 32. Versuchstag getötet, nachdem die erste Maus eine Lähmung zeigte. Milz und Knochenmark der Mäuse wurden entnommen und zu Zellsuspensionen aufgearbeitet. Mit einem spezifischen Antikörper gegen humanes CD10, welches sich auf der Oberfläche von Nalm-6 Zellen befindet, konnten die humanen Blasten markiert und deren Anteil im jeweiligen Mausgewebe durchflusszytometrisch bestimmt werden (Abb. 3.5). Da sich die Mäuse noch in einem frühen Krankheitsstadium befanden, ließen sich in den wenigsten Tieren Nalm-6 Zellen in der Milz nachweisen. Die Infiltration des Knochenmarks durch die humanen Leukämiezellen war jedoch gut messbar und lieferte die Daten für den angestrebten Vergleich. Es wurde ein signifikant reduzierter Anteil an Nalm-6 Zellen im Knochenmark der behandelten Mäuse (28,1 %) im Vergleich zu den Kontrolltieren (38,9 %) gefunden. Das Einbringen der Nalm-6 Zellen in die Schwanzvene der Maus stellt den größten Unsicherheitsfaktor, des ansonsten sehr gut reproduzierbaren Mausmodells, dar. Mäuse, die gegebenenfalls nicht die korrekte Menge an humanen Leukämiezellen erhalten hatten, wurden daher ab sofort vom anschließenden Experiment ausgeschlossen.

#### **4.5.3 Kombinationstherapie hemmt Gewebeinfiltration durch Nalm-6 Zellen**

Nachdem in den Vorversuchen die Verträglichkeit sowie die Wirksamkeit einer Kombinationstherapie mit Dexamethason und VPA in Nalm-6 Mäusen nachgewiesen werden konnte, sollte das Experiment zur Gewebeinfiltration durch Nalm-6 Zellen ausgeweitet werden. Neben der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Dexamethason und VPA als Kombinationsbehandlung, wurde eine reine Dexamethason-Gruppe eingeführt. Auf eine VPA-Gruppe wurde verzichtet. Die Mäuse sollten wieder zeitgleich getötet werden, allerdings erst bei Anzeigen von Symptomen eines fortgeschritteneren Krankheitsstadiums. Dabei sollten in jedem Fall die festgelegten Abbruchkriterien für die einzelnen Mäuse eingehalten werden. Tiere, die starke Lähmungserscheinungen bzw. großen Gewichtsverlust (annähernd 20 %) aufwiesen wurden vorzeitig getötet und bei der Auswertung entsprechend gekennzeichnet.

30 SCID Mäuse wurden mit  $7,5 \times 10^5$  Nalm-6 Zellen beimpft. Die Injektion erfolgte diesmal bei allen Tieren ohne Komplikationen. Es wurden sechs Gruppen zu je fünf Tieren gebildet, wobei auf ein ausgeglichenes Gewichtsverhältnis zwischen den einzelnen Mäusegruppen geachtet wurde. Die Behandlung erfolgte nach dem bereits erprobten Schema: 5 Tage Therapie - 9 Tage Behandlungspause – 5 Tage Therapie. Mit der Behandlung wurde an Tag 4 nach der Nalm-6 Injektion begonnen. Zwei Fünfergruppen erhielten die

Kombinationsbehandlung mit VPA (350 mg/kg Körpergewicht, 2× täglich) und Dexamethason (3 mg/kg, 1× täglich). Zwei weitere Gruppen wurden mit Dexamethason (3 mg/kg, 1× täglich) behandelt. Die anderen beiden Gruppen erhielten PBS zur Kontrolle. Die Tiere wurden täglich beobachtet und gewogen. Der Gewichtsverlauf zeigt, dass die Tiere mit Kombinationstherapie während der ersten 5 Behandlungstage stark abnahmen und in der Behandlungspause rasch wieder an Gewicht zulegten. In der zweiten Behandlungswoche war dieser Effekt dann nicht mehr so ausgeprägt. Die mit Dexamethason und VPA behandelten Mäuse schliefen deutlich mehr als die Tiere der anderen Gruppen. Die daraus resultierende Verringerung der Nahrungsaufnahme könnte eine mögliche Ursache für den Gewichtsverlust darstellen. Schläfrigkeit und Gewichtsabnahme in Folge einer intensiven Behandlung mit VPA hatte man bereits in vorangegangenen Mausexperimenten, die in kooperierenden Arbeitsgruppen durchgeführt wurden, beobachtet [183]. Das Spritzen von Dexamethason bzw. PBS führte hingegen zu einer stetigen Gewichtszunahme während der beiden 5-tägigen Behandlungsphasen.



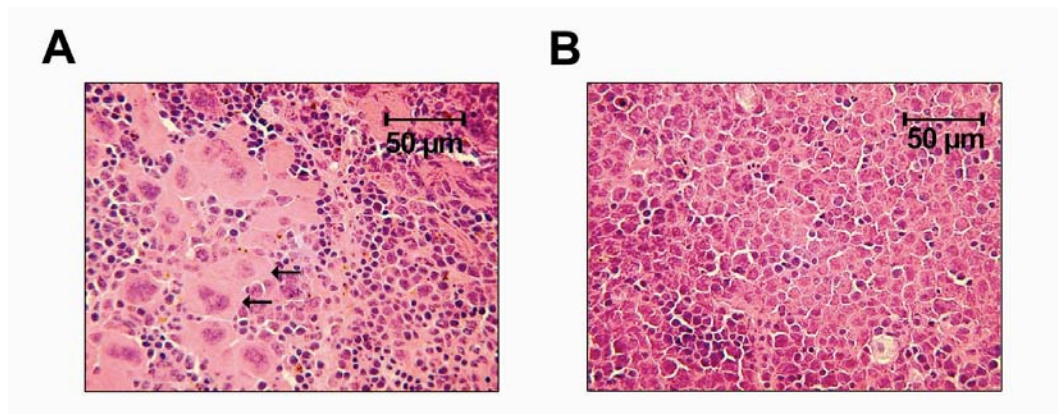
**Abbildung 4.11: Gewichtsverlauf des Infiltrationsexperiments mit Nalm-6 Mäusen**

Die drei unterschiedlichen Behandlungsgruppen (Kontrolle (PBS), Dexamethason und Dexamethason plus VPA) umfassten jeweils 10 Tiere. Gezeigt wird der Verlauf der Durchschnittsgewichte der drei Gruppen. Am Tag 1 des Experiments wurden den Tieren  $7,5 \times 10^5$  Nalm-6 Zellen injiziert. Die jeweilige Behandlung erfolgte vom 4. - 8. bzw. 19. - 23. Tag des Experiments. Am Tag 35 wurde das Experiment beendet und alle Tiere getötet.

An Tag 30 nach der Nalm-6 Injektion musste die erste Maus einer Kontrollgruppe wegen starker Gewichtsabnahme getötet werden. Drei Tage später wurden zwei weitere Mäuse aus den Kontrollgruppen sowie eine Maus einer Dexamethason-Gruppe getötet, da sie ebenfalls Abbruchkriterien aufwiesen. Am Tag 35 wurde das Experiment beendet, da fünf weitere Tiere der Kontrollgruppen starke Lähmungserscheinungen zeigten. Auch in den

Dexamethason-Gruppen entwickelten die Tiere zunehmend Lähmungen und litten zum Teil unter Gewichtsverlust. Die Tiere, die mit VPA und Dexamethason therapiert wurden, waren bis auf eine Ausnahme in einer guten Verfassung. Die Entwicklung von Lähmungen an den Hinterbeinen war an einen raschen Gewichtsverlust gekoppelt. So zeigte auch die Entwicklung der Gewichtskurve, dass sich die Krankheit in den Kontrolltieren am schnellsten ausbreitete.

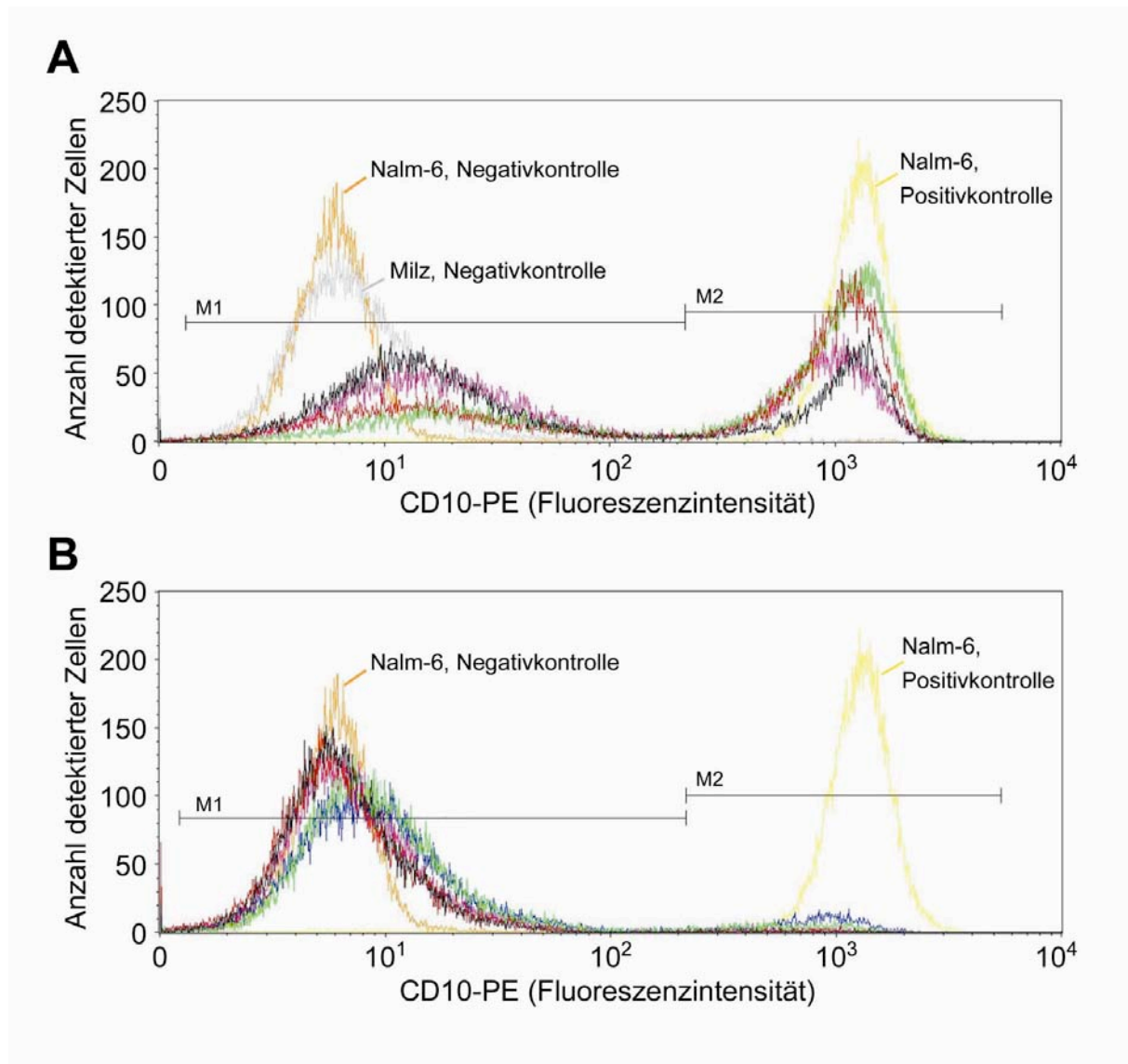
Nach dem Einschläfern der Mäuse wurden die Milz sowie jeweils beide Oberschenkelknochen entnommen. Die Milzen wurden gewogen und ein kleiner Teil wurde zur Anfertigung von Gefrierschnitten verwendet. Die nach der H&E Methode gefärbten Schnitte in Abbildung 4.12 zeigen zum einen stark durch Nalm-6 Zellen infiltrierte Milzgewebe einer Kontrollmaus (Abb. 4.12A) sowie unauffälliges Milzgewebe einer Maus, die mit der Kombination von VPA und Dexamethason behandelt wurde (Abb. 4.12B).



**Abbildung 4.12: Gefrierschnitte der Milz zeigen massive Nalm-6 Infiltration in unbehandelten Kontrollmäusen**

H&E gefärbte Gefrierschnitte der Milz entnommen aus SCID Mäusen, die **A)** mit PBS als Kontrolle und **B)** mit Dexamethason plus VPA behandelt wurden, gaben den ersten Hinweis darauf, dass die Infiltration der Milz durch die Kombinationsbehandlung stark gehemmt wurde. Die Pfeile kennzeichnen beispielhaft die Nalm-6 Zellen.

Aus dem restlichen Milzgewebe und dem Knochenmark der Oberschenkelknochen wurden Zellsuspensionen hergestellt, die mit einem fluorochrommarkierten (R-Phycoerythrin, PE) Antikörper gegen humanes CD10 angefärbt wurden. Auf diese Weise konnte der Anteil an Nalm-6 Zellen im jeweiligen Mausgewebe durchflusszytometrisch bestimmt werden. In diesem Experiment war die Infiltration der Milz durch die humanen Blasten so weit vorangeschritten, dass auch diese Messwerte für einen Vergleich zwischen den unterschiedlichen Behandlungsgruppen dienen konnten.



**Abbildung 4.13: Durchflusszytometrische Detektion von Nalm-6 Zellen im Mausegewebe**

Die Histogramme zeigen einen starken Fluoreszenz-Shift der CD10-positiven Nalm-6 Zellen im Vergleich zum Milzgewebe der SCID Mäuse, nach der Markierung mit dem entsprechenden PE-gekoppelten Antikörper. Als Positivkontrolle dienten CD10-PE markierte Nalm-6 Zellen aus der Zellkultur. Um unspezifische Bindung auszuschließen, wurden Nalm-6 Zellen mit einem Isotyp-PE Antikörper behandelt, dem das Epitop gegen CD10 fehlte (Negativkontrolle). Als zweite Negativkontrolle diente das Milzgewebe einer Maus, die keine Nalm-6 Zellen erhalten hatte. Unspezifische Bindung des CD10-PE Antikörpers an Mausegewebe konnte mit Mouse Fc Block™ vollständig unterdrückt werden. Nach dem Anfärben der Proben wurde die Fluoreszenzintensität mit einem Durchflusszytometer bestimmt. Alle detektierten Zellen im Markerbereich M2 wurden als CD10-positiv definiert. Darüber wurde dann der Anteil an Nalm-6 Zellen im untersuchten Gewebe (M1+M2) bestimmt. **A)** Das Histogramm zeigt neben den beschriebenen Kontrollen die Messungen von vier Milzen aus der Kontrollgruppe 2. **B)** In den fünf Milzproben aus der Dexamethason plus VPA Gruppe 5 wurde nur ein sehr geringer Anteil an Nalm-6 Zellen detektiert. Alle weiteren Milz- sowie Knochenmarksproben wurden auf die gleiche Weise untersucht. Es wurden jeweils  $1 \times 10^4$  Zellen detektiert.

Beispielhaft für alle durchgeführten durchflusszytometrischen Messungen der Milz- bzw. der Knochenmarksproben, werden im Folgenden zwei Histogramme näher erläutert. Wie aus dem ersten Histogramm (Abb. 4.13A) ersichtlich, wurden neben den eigentlichen Messungen

immer eine Positivkontrolle der Methode sowie zwei Negativkontrollen zur Überprüfung der Spezifität des verwendeten Antikörpers mitgeführt. Die starke Fluoreszenz-Erhöhung ist auf das gute Fluorochrom (PE), die Qualität des Antikörpers sowie auf eine hohe Konzentration an CD10 auf der Oberfläche von Nalm-6 Zellen zurückzuführen.

<b>PBS Gruppen</b>	<b>CD10-pos. (%) Knochenmark</b>	<b>CD10-pos. (%) Milz</b>	<b>Milz Gewicht (mg)</b>	<b>Krankheits-Symptome</b>
1	77,8	21,3	100	XX
	80,4	47,1	160	XX
	66,9	0,3	80	X
	74,4	11,7	120	XX
	86,7	19,2	80	X
2	87,3	63,7	200	XX) <sup>2</sup>
	---	---	---	---) <sup>1</sup>
	87,8	72,1	390	XX
	78,8	33,1	210	XX
	89,7	41,1	110	XX) <sup>2</sup>
<b>Mittelwert</b>	<b>81,1</b>	<b>34,4</b>	<b>161,1</b>	

**Tabelle 4.2: Knochenmark- und Milz-Infiltration in den Kontroll-Gruppen**

Gegenüberstellung der Daten aus den durchflusszytometrischen Messungen von Knochenmark und Milz und den klinischen Beobachtungen der PBS-behandelten Mäuse. Krankheitssymptome wurden folgendermaßen beurteilt: N = nicht gelähmt, X = leicht gelähmt, XX = stark gelähmt.

<sup>1</sup>Maus wurde vorzeitig (Tag 30, 20 % Gewichtsverlust) getötet und aus dem Experiment genommen.

<sup>2</sup>Mäuse mussten auf Grund starker Lähmungserscheinungen zwei Tage vor Versuchende (Tag 33) getötet werden. Die Daten dieser Mäuse wurden bei der Auswertung mitberücksichtigt.

<b>DEX Gruppen</b>	<b>CD10-pos. (%) Knochenmark</b>	<b>CD10-pos. (%) Milz</b>	<b>Milz Gewicht (mg)</b>	<b>Krankheits-Symptome</b>
3	76,4	21,6	60	XX
	83,1	44,6	130	XX
	73,6	10,8	40	X
	87,0	4,7	50	XX
	90,8	55,6	140	XX) <sup>2</sup>
4	88,7	10,0	70	N
	75,7	62,5	250	X
	86,5	25,3	80	X
	55,8	1,5	60	N
	68,3	1,0	30	N
<b>Mittelwert</b>	<b>78,6</b>	<b>23,8</b>	<b>91,0</b>	

**Tabelle 4.3: Knochenmark- und Milz-Infiltration in den Dexamethason-Gruppen**

Zusammenfassung der Daten der Dexamethason-behandelten Nalm-6 Mäuse. Siehe auch Tab. 4.2.

Das obere Histogramm zeigt die Messungen der Milzproben von vier Kontrollmäusen aus Gruppe 2 (Abb. 4.13A). In allen vier Proben sind erhebliche Mengen an Nalm-6 Zellen nachzuweisen. Im Gegensatz dazu findet man in den Milzen der Tiere aus Gruppe 5, welche die kombinierte Behandlung mit Dexamethason und VPA erhielten, nur eine geringe Anzahl an CD10-positiven Zellen. Zur Auswertung des Experiments werden die Untersuchungsergebnisse der einzelnen Mäuse in Tabellenform gegenüber gestellt.

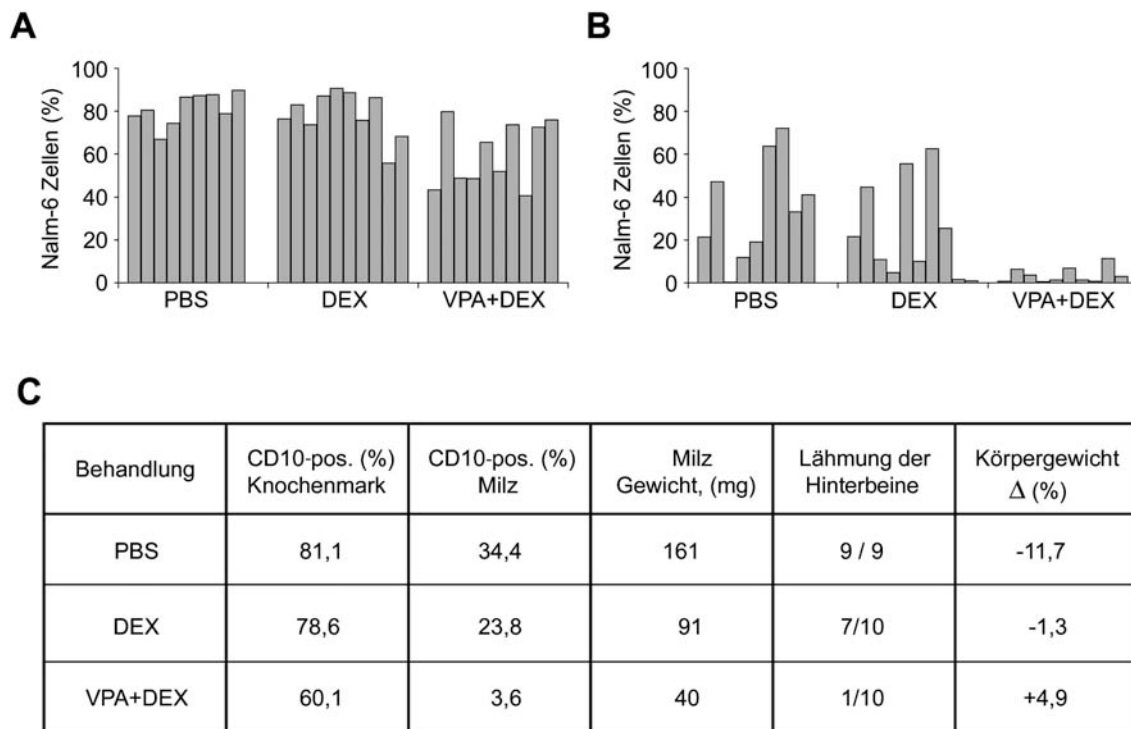
<b>DEX + VPA Gruppen</b>	<b>CD10-pos. (%) Knochenmark</b>	<b>CD10-pos. (%) Milz</b>	<b>Milz Gewicht (mg)</b>	<b>Krankheits- Symptome</b>
5	43,3	0,7	30	N
	79,9	6,4	50	N
	48,8	3,7	20	X
	48,6	0,4	30	N
	65,6	1,3	20	N
6	52,0	6,7	50	N
	73,8	1,4	50	N
	40,7	0,6	40	N
	72,7	11,4	80	N
	75,9	3,0	30	N
<b>Mittelwert</b>	<b>60,1</b>	<b>3,6</b>	<b>40,0</b>	

**Tabelle 4.4: Knochenmark- und Milz-Infiltration in den Gruppen mit Wirkstoffkombination**

Die Tabelle zeigt die Daten der Nalm-6 Mäuse, die mit der Kombination von Dexamethason und VPA behandelt wurden. Siehe auch Tab. 4.2.

Der beobachtete Gesundheitszustand stand meistens im Einklang mit den ermittelten Daten zur Gewebeeinfiltration. Mäuse mit starken Lähmungserscheinungen wiesen häufig eine besonders hohe Rate an Nalm-6 Zellen im Knochenmark auf. Im Knochenmark der Maus einer Dexamethason-Gruppe, die auf Grund von Lähmungserscheinungen vorzeitig getötet werden musste, wurde ein Anteil von 90,8 % an CD10-positiven Zellen ermittelt. Dies ist zugleich der höchste Wert, der innerhalb dieses Experiments für Knochenmark gefunden wurde. Die Milz dieser Maus bestand zu 55,6 % aus Nalm-6 Zellen und wies mit einem Gewicht von 140 mg etwa das 3-4 fache einer gesunden Milz auf. Eine ansteigende Infiltration der Milzen durch humane Leukämiezellen führte zu einer kontinuierlichen Erhöhung des Organgewichts. In einer 390 mg schweren Milz einer Kontrollmaus wurden dementsprechend 72,1 % Nalm-6 Zellen detektiert. Eine starke Infiltration der Milz war aber nicht unbedingt an besonders hohe Werte für das Knochenmark gekoppelt. Umgekehrt verhielt es sich ebenso. In den meisten Fällen war jedoch ein tendenzieller Zusammenhang zu erkennen.

Zur besseren Übersicht werden die Daten der Gewebeeinfiltration durch Nalm-6 Zellen in zwei Balkendiagrammen dargestellt (Abb. 4.14). Die Infiltration des Knochenmarks der SCID Mäuse wurde durch die Kombinationsbehandlung mit Dexamethason und VPA wesentlich stärker gehemmt, als durch die Behandlung mit Dexamethason allein. Die graphische Darstellung der Werte für die Milzen zeigt noch deutlicher, dass die Kombinationstherapie wirksamer war als die einfache Gabe von Dexamethason.



**Abbildung 4.14: Die zusätzliche Verabreichung von VPA führt zu einer signifikanten Erhöhung der therapeutischen Wirkung von Dexamethason**

Die Balkendiagramme zeigen für jede einzelne Maus der drei Behandlungsgruppen die Infiltration von **A)** Knochenmark und **B)** Milz durch die Nalm-6 Zellen. **C)** In der Tabelle sind jeweils die Gruppenmittelwerte angegeben. ( $\Delta$  Körpergewicht (%) = Anfangsgewicht – Endgewicht, bezogen auf das jeweilige Anfangsgewicht)

Die Tabelle (Abb. 4.14C) fasst noch einmal die Gruppenmittelwerte der durchflusszytometrischen Ergebnisse und die dazugehörigen beobachteten Befunde zusammen. Im Knochenmark der PBS- behandelten Kontrolltiere hatten sich nach 35 Tagen im Mittel 81,1 % Nalm-6 Zellen angesiedelt. Die Behandlung mit Dexamethason resultierte in einer minimalen Reduzierung des Wertes auf 78,6 %. Die Kombination von Dexamethason mit VPA führte in den entsprechend behandelten Mäusen zu einem Rückgang der Knochenmarksinfiltration auf 60,1 %. Die klinischen Beobachtungen bestätigten die ermittelten Daten. Sämtliche Mäuse der Kontrollgruppen wiesen Lähmungserscheinungen auf. Bei nur einem von zehn Tieren mit Kombinationsbehandlung wurde eine Lähmung beobachtet, im



Gegensatz zu 70 % Lähmungserscheinungen bei Behandlung mit Dexamethason als Einzelsubstanz.

Dass die kombinierte Therapie deutlich effektiver war als eine reine Dexamethason-Behandlung, wurde auch an den Daten zur Milz-Infiltration deutlich. In den Milzen der Kontrollmäuse wurden im Durchschnitt 34,4 % Nalm-6 Zellen gefunden. Mäuse der Dexamethason-Gruppen zeigten eine Infiltrationsrate von 23,8 %. Die Behandlung mit Dexamethason und VPA führte zu einem drastischen Rückgang der Milzinfiltration durch humane Blasten auf 3,6 %. Dementsprechend wiesen die Mäuse aus den Kombinationsgruppen im Durchschnitt ein normales Milzgewicht von 40 mg auf. Die Milzen der PBS-behandelten Tiere hatten ein durchschnittliches Gewicht von 161 mg, was in etwa einer vierfachen Vergrößerung entspricht. Aus den Dexamethason-behandelten Tieren wurden Milzen isoliert, die ebenfalls deutlich vergrößert waren (91 mg).

Der mittlere Gewichtsverlust der Kontrolltiere betrug am letzten Tag des Experiments -11,7 %. Zu diesem Zeitpunkt war für die Mäuse der Kombinationsgruppen eine mittlere Gewichtszunahme von 4,9 % zu verzeichnen.

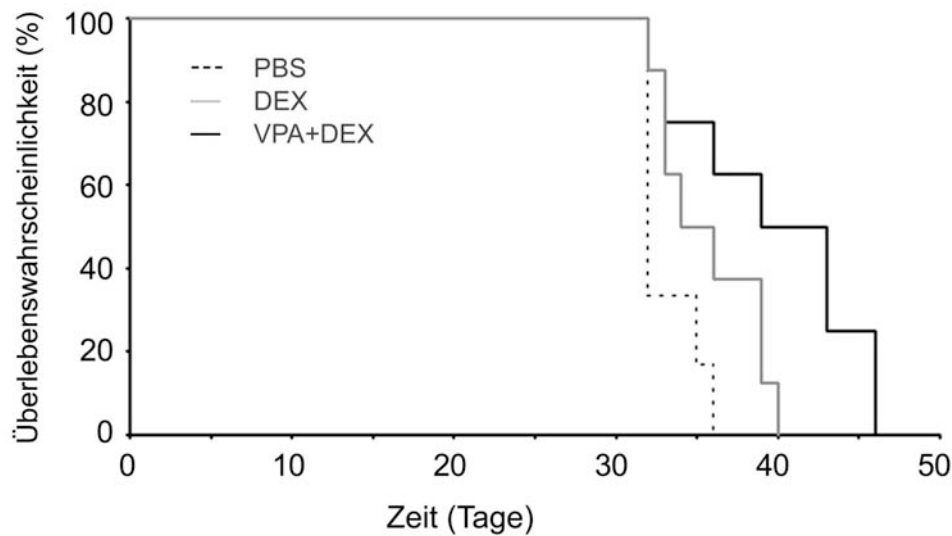
#### **4.5.4 Kombinationstherapie erhöht Überlebenswahrscheinlichkeit**

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Kombinationsbehandlung mit Dexamethason und VPA auch einen positiven Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit, der mit Nalm-6-Zellen angeimpften SCID Mäuse, hat. Hierzu wurden 24 SCID Mäuse mit  $5 \times 10^5$  Nalm-6 Zellen angeimpft und wieder nach dem etablierten Schema, 5 Tage Therapie - 9 Tage Behandlungspause – 5 Tage Therapie, behandelt. Mit der ersten Behandlung wurde an Tag 4 nach der Nalm-6 Injektion begonnen. Es wurden drei Gruppen zu je 8 Tieren gebildet. Eine Gruppe erhielt die Kombinationsbehandlung mit VPA (350 mg/kg Körpergewicht, 2x täglich) und Dexamethason (3 mg/kg, 1x täglich). Eine weitere Gruppe wurde nur mit Dexamethason (3 mg/kg, 1x täglich) behandelt. Die Tiere der letzten Gruppe erhielten, nach dem gleichen Injektionsschema, PBS zur Kontrolle. Für die Dauer des Experiments wurden die Tiere täglich beobachtet und gewogen. Wenn bei einer Maus eines der Abbruchkriterien festgestellt wurde, d.h. wenn Lähmungserscheinungen bzw. Gewichtsverlust (annähernd 20 %) auftraten, wurde das Tier eingeschläfert und die Daten in die Kaplan-Meier-Analyse zur Bestimmung der Überlebenswahrscheinlichkeit aufgenommen (Abb. 4.15).

Bis zum Tag 36 des Experiments mussten bereits sämtliche Kontrolltiere erlöst werden. Die beiden letzten Tiere aus der Kombinationsgruppe mussten erst an Tag 46 getötet werden. Die letzte mit Dexamethason behandelte Maus wurde an Tag 40 eingeschläfert.

Für die Gruppe, deren Tiere mit einer Kombination von Dexamethason und VPA behandelt wurden, ergab sich somit eine signifikant erhöhte Überlebenswahrscheinlichkeit ( $p = 0,027$ ) im Vergleich zur PBS-Gruppe. Im Gegensatz dazu, führte die Behandlung mit

Dexamethason als Einzelsubstanz nicht zu einer statistisch signifikanten Verlängerung des Überlebens der Nalm-6 Mäuse ( $p = 0.124$ ).



**Abbildung 4.15: Die Kombinationstherapie mit Dexamethason und VPA führt zur Erhöhung der Überlebenswahrscheinlichkeit in Nalm-6 Mäusen**

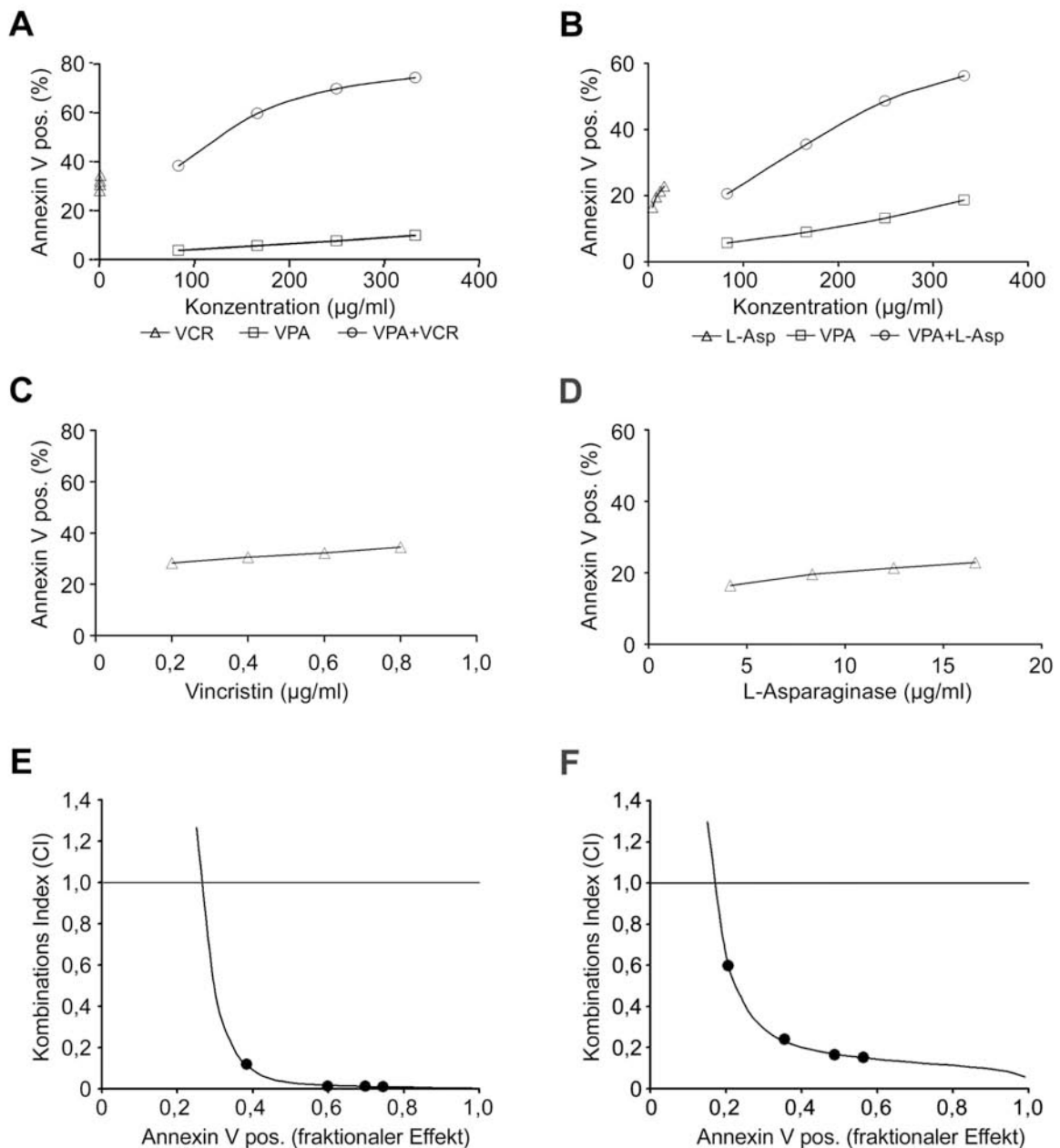
Die Überlebenszeit ist angegeben vom Tag der Nalm-6 Injektion bis zum notwendigen Einschlafen der Maus, wenn ein Abbruchkriterium erreicht wurde. Die Kaplan-Meier-Analyse berechnet die Überlebenswahrscheinlichkeit (in %) in den drei unterschiedlichen Behandlungsgruppen. Es gilt die Definition, dass ein  $p$ -Wert  $< 0,05$  eine statistisch signifikante Abweichung kennzeichnet. Die alleinige Behandlung mit Dexamethason (DEX) führt nicht zu einer statistisch relevanten Verlängerung der Überlebenszeit ( $p = 0.124$ ) verglichen mit der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung mit VPA und Dexamethason ( $p = 0.027$ ) zu einer signifikanten Erhöhung der Überlebenswahrscheinlichkeit.

## 4.6 VPA kombiniert mit weiteren Chemotherapeutika der Induktionstherapie bei ALL

### 4.6.1 Synergistisches Zusammenwirken mit Vincristin und L-Asparaginase

Auf Grund der Tatsache, dass VPA die Dexamethason-vermittelte Apoptose synergistisch verstärken kann, sollte nun der Effekt von VPA auf die zytotoxische Wirkung weiterer Chemotherapeutika untersucht werden. Vincristin und L-Asparaginase sind neben Dexamethason bzw. Prednisolon zwei weitere Hauptsäulen der Induktionstherapie, die in der Regel zu einer kompletten Remission bei erstmals diagnostizierter pädiatrischer ALL führt. Der Zelltod durch das so genannte Spindelgift Vincristin stellt sich bereits nach sehr kurzer Behandlungsdauer ein. Es kommt zudem zu einer raschen Zerstörung der Zellmembranen. Im fortgeschrittenen Stadium des Zelltods durch Vincristin zeigen die Zellen somit eher einen nekrotischen als einen apoptotischen Phänotyp. Um die Apoptoserate korrekt zu bestimmen, musste der Zelltod in einem möglichst frühen Stadium detektiert werden. Hierbei wurde ausgenutzt, dass die Externalisierung von normalerweise intrazellulär lokalisiertem Phosphatidylserin bereits im Anfangsstadium der Apoptose stattfindet und mit fluorochromgekoppeltem Annexin V an der Zelloberfläche detektiert werden kann.

Nalm-6 Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an VPA und Vincristin behandelt. Hierbei musste wegen der anschließenden „Dosis-Effekt“-Analyse zur Bestimmung der Kombinations-Indices (CI) ein konstantes Konzentrationsverhältnis eingehalten werden. Bei der Festlegung der Konzentrationsbereiche wurde sich an den in der Zellkultur üblicherweise eingesetzten Konzentrationen orientiert. Die jeweiligen mittleren Konzentrationsbereiche entsprechen in etwa den Werten, die *in vivo* erreicht werden können. Die Zelltodrate wurde durchflusszytometrisch mittels Annexin V / PI- Färbung bestimmt (Abb. 4.16A). Auf Grund der enormen Unterschiede in den Konzentrationsbereichen ist die Kurve für Vincristin noch einmal mit einer angepassten Konzentrationsachse dargestellt (Abb. 4.16C). Die Kombination von VPA mit Vincristin führte zu einer starken Erhöhung der Apoptoserate über den gesamten verwendeten Konzentrationsbereich. Nach 20-stündiger Behandlung mit 2 mM VPA wurden 10 % Annexin V-positive Zellen gefunden. Die zusätzliche Verabreichung von 2 mM VPA zur Behandlung mit 8 µg/ml Vincristin erhöhte die Apoptoserate von 35 % auf 75 %. Die Behandlung der Nalm-6 Zellen mit VPA und L-Asparaginase lieferte ein ähnliches Bild, allerdings weniger stark ausgeprägt (Abb. 4.16B u. D).

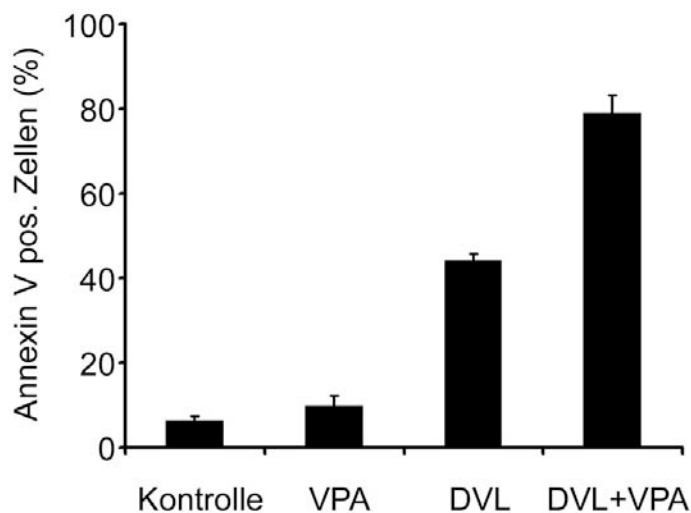


**Abbildung 4.16: Synergistisches Zusammenwirken von VPA mit Vincristin bzw. L-Asparaginase bezüglich der Apoptose-Induktion in Nalm-6 Zellen**

Die entsprechend behandelten Nalm-6 Zellen wurden mit Annexin V und Propidiumiodid angefärbt. Der Anteil an Annexin V-positiven Zellen entspricht der Apoptoserate. **A)** Die Behandlung mit den Einzelsubstanzen sowie deren Kombination erfolgte mit steigenden Konzentrationen an VPA (0,5-2 mM = 83-332 µg/ml) und Vincristin (VCR, 0,2-0,8 µg/ml) für 20h bei einem konstanten Konzentrationsverhältnis von 415:1. **B)** Bei der Kombination von VPA mit L-Asparaginase (L-asp, 4,2-16,6 µg/ml) wurde ein Verhältnis von 20:1 eingehalten. Die Behandlungsdauer betrug 24h. Für die Darstellung der Apoptoseraten aus den beiden Kombinationsbehandlungen wurden die VPA Konzentrationen zu Grunde gelegt. Die Apoptoseraten von Vincristin und L-Asparaginase sind in **C)** bzw. **D)** noch einmal adaptiert dargestellt. **E)** bzw. **F)** zeigen die berechneten Kombinations-Indices (CI) für die Kombinationen von VPA mit Vincristin bzw. L-Asparaginase in Abhängigkeit von der Apoptoserate. Der horizontale Strich markiert einen CI-Wert von 1. CI-Werte < 0,7 kennzeichnen einen Synergismus und CI-Werte < 0,3 einen starken Synergismus.

Die mit der Calcosyn Software berechneten CI-Werte machen das Ergebnis der Untersuchung noch einmal deutlicher. Für die kombinierte Behandlung mit VPA und Vincristin wurden, für Zelltodraten von 40 % bis 75 %, CI-Werte von 0,12 bis 0,01 gefunden, was einem sehr stark synergistischen Effekt entspricht. Die Kombination von VPA mit L-Asparaginase resultierte in CI-Werten von 0,68 bis 0,25 bei Apoptoseraten von 20 % bis 56 %. In diesem Fall war der vorliegende Synergismus vor allem bei höheren Konzentrationen deutlich sichtbar.

Im Rahmen der Induktionstherapie bei ALL im Kindesalter wird meist eine Kombination der Wirkstoffe Dexamethason (Prednisolon), Vincristin und L-Asparaginase eingesetzt. Daher sollte im folgenden Experiment der Einfluss von VPA auf die zytotoxische Wirkung dieser Wirkstoffkombination DVL auf Nalm-6 Zellen untersucht werden. Die Zellen wurden mit einer Kombination aus 100 nM Dexamethason, 2 µg/ml Vincristin und 10 µg/ml L-Asparaginase behandelt. Nach 18h wurde eine Apoptoserate von 44 % ermittelt. Die alleinige Behandlung mit 1,5 mM VPA führte in der gleichen Zeit zu einem Anteil von 8 % an Annexin positiven Zellen. Das Hinzunehmen von VPA zur Wirkstoffkombination DVL führte zu einer Erhöhung der Apoptoserate auf 78 %. Dies entspricht beinahe einer Verdopplung des Wertes der Wirkstoffkombination DVL.

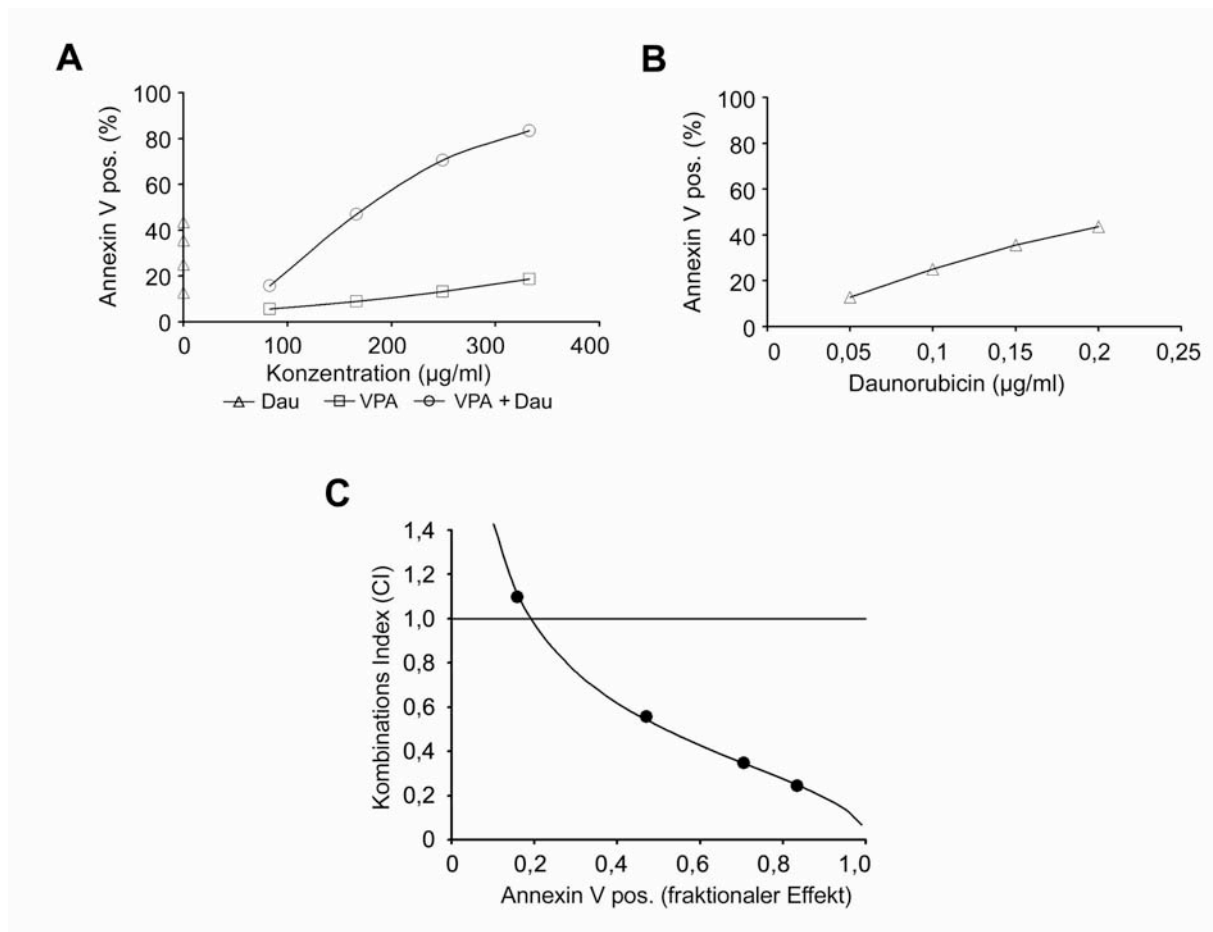


**Abbildung 4.17: VPA verstärkt den zytotoxischen Effekt der Wirkstoffkombination aus Dexamethason, Vincristin und L-Asparaginase**

Die Behandlung der Nalm-6 Zellen erfolgte mit VPA (1,5 mM), der Wirkstoffkombination DVL aus Dexamethason (100 nm), Vincristin (2 µg/ml) und L-Asparaginase (10 µg/ml) sowie der Kombination aus VPA und der Wirkstoffkombination DVL. Nach 18h wurden die Zellen geerntet und mit Annexin V und Propidiumiodid angefärbt. Der Anteil an Annexin V-positiven Zellen entspricht der Apoptoserate. Die Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten.

#### 4.6.2 Konzentrationsabhängiges Zusammenwirken von VPA und Daunorubicin

Wenn ein pädiatrischer ALL-Patient in eine Hochrisikogruppe eingestuft wird, hat dies eine Therapieintensivierung zur Folge. Zusätzlich zur Standardtherapie wird in diesen Fällen häufig ein Anthrazyklinderivat wie Daunorubicin verabreicht. Es handelt sich hierbei um eine äußerst toxische Substanzgruppe, die neben Krebszellen auch gesunde Zellen des menschlichen Körpers stark schädigen kann. Auch Nalm-6 Zellen reagierten sehr sensitiv auf die Behandlung mit Daunorubicin. Daher musste Daunorubicin in den durchgeführten Experimenten innerhalb eines sehr niedrigen Konzentrationsbereichs eingesetzt werden.



**Abbildung 4.18: VPA erhöht die Toxizität von Daunorubicin**

**A)** Nalm-6 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an VPA (0,5-2 mM = 83-332 µg/ml), Daunorubicin (Dau, 0,05-0,2 µg/ml) sowie der Kombination beider Substanzen behandelt. Das Konzentrationsverhältnis von VPA zu Daunorubicin betrug 1660:1. Nach 24h wurden die Zellen geerntet und mit Annexin V und Propidiumiodid angefärbt. Die Zelltodrate wurde über den Anteil an Annexin V-positiven Zellen bestimmt. Die Darstellung der Apoptoseraten nach Kombinationsbehandlung orientiert sich an den VPA Konzentrationen. **B)** Wegen der enormen Konzentrationsunterschiede wurde die Kurve für Daunorubicin noch einmal mit einer entsprechend angepassten Skala abgebildet. **C)** zeigt das Ergebnis der „Dosis-Effekt“-Analyse mit Calcsyn. Die Kombinations-Indices (CI) sind in Abhängigkeit von der Apoptoserate dargestellt. Der horizontale Strich markiert einen CI-Wert von 1, der einem additiven Effekt entsprechen würde. Werte über 1 entsprechen einem Antagonismus. CI-Werte < 0,7 kennzeichnen einen Synergismus und CI-Werte < 0,3 einen starken Synergismus.

Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an VPA und Daunorubicin behandelt, wobei wieder ein festes Konzentrationsverhältnis eingehalten wurde (Abb. 4.18). Für die durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoseraten wurde hier ebenfalls die Annexin V-Färbemethode verwendet. Die Kurven der Einzelsubstanzen zeigen einen konzentrationsabhängigen Anstieg an Annexin V-positiven Zellen. Vor allem im mittleren und im höheren Konzentrationsbereich kommt es zu einer starken Erhöhung der Zelltodraten durch die Wirkstoffkombination. Die kombinierte Behandlung mit 1,5 mM VPA und 0,15 µg/ml Daunorubicin führte in 71 % der Nalm-6 Zellen zum Einleiten eines apoptotischen Prozesses, wohingegen die Einzelsubstanzen im Vergleich dazu nur 13 % bzw. 36 % der Zellen töteten. Die für die Wirkstoffkombination von VPA und Daunorubicin ermittelten CI-Werte erstreckten sich über einen Bereich von 1,1 bis 0,24 bei Apoptoseraten von 16 bis 83 %. Somit ergab sich für das niedrigste Konzentrationspaar ein antagonistischer Effekt, wohingegen für die höchsten verwendeten Konzentrationen sogar ein starkes synergistisches Zusammenwirken zwischen den beiden Substanzen gefunden wurde.

## **4.7 Molekulare Mechanismen der Apoptose-Induktion durch Dexamethason und VPA**

### **4.7.1 Genexpressionsanalyse nach Behandlung mit HDACi und Dexamethason**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass VPA die anti-leukämische Wirkung von Dexamethason stark positiv beeinflusst, sollten nun die Ursachen auf molekularer Ebene untersucht werden. Nach der entsprechenden Behandlung der Nalm-6 Zellen wurde jeweils die Gesamt-mRNA isoliert. Nach dem Überprüfen der Qualität der mRNA mittels UV-Spektroskopie und Agarosegel-Elektrophorese wurde eine vergleichende Genexpressionsanalyse in einem externen Labor durchgeführt. Die Behandlungsdauer wurde auf 13h festgelegt, da nach diesem Zeitraum die ersten Anzeichen von Apoptose in Folge der Behandlung mit Dexamethason und VPA, mittels Annexin V Färbung, festgestellt wurden. Es wurden zwei voneinander unabhängige Microarray-Studien durchgeführt. Tabelle 4.5 fasst die Daten zusammen, die den globalen Einfluss der jeweiligen Behandlung auf die Genregulation in Nalm-6 Zellen zeigen. Im ersten Microarray wurde für die kombinierte Behandlung mit VPA und Dexamethason in 2,1 % der 22280 Probesets eine um das mehr als 2,5 fache abweichende Regulation, bezogen auf die Kontrolle, festgestellt. Der Einfluss auf die Genregulation durch VPA bzw. Dexamethason als Einzelsubstanzen lag bei 1,8 % bzw. 0,4 %. Die Daten des zweiten Arrays lieferten das gleiche Ergebnis. Nach der Behandlung mit VPA als Einzelsubstanz sowie in Kombination mit Dexamethason waren, im Vergleich zur Kontrolle, etwa dreimal so viele Gene hoch- wie herunterreguliert. Ein solches Verhältnis wurde im zweiten Microarray auch für den HDAC Inhibitor TSA gefunden. Das

Verhältnis von hoch- zu herunterreguliert betrug für Dexamethason je nach Array 6,5 bzw. 2,5. Diese starke Schwankung ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass durch reine Dexamethason-Behandlung nur eine sehr kleine Anzahl (85-90) von Genen abweichend reguliert wurde.

Microarray 1	VPA+DEX vs. K	VPA vs. K	DEX vs. K	VPA+DEX vs. DEX	VPA+DEX vs. VPA
insgesamt reguliert	452	423	90	303	37
hochreguliert	339	330	78	206	35
runterreguliert	113	93	12	97	2
<i>Verhältnis hoch/runter</i>	<i>3,0</i>	<i>3,5</i>	<i>6,5</i>	<i>2,1</i>	<i>17,5</i>

Microarray 2	VPA+DEX vs. K	VPA vs. K	DEX vs. K	VPA+DEX vs. DEX	VPA+DEX vs. VPA	TSA vs. K
insgesamt reguliert	465	394	85	340	29	447
hochreguliert	337	285	61	257	28	322
runterreguliert	128	109	24	83	1	125
<i>Verhältnis hoch/runter</i>	<i>2,6</i>	<i>2,6</i>	<i>2,5</i>	<i>3,1</i>	<i>28,0</i>	<i>2,6</i>

**Tabelle 4.5: Einfluss von HDACi und Dexamethason auf die Genexpression in Nalm-6 Zellen**

Nalm-6 Zellen wurden für 13h mit VPA (1,5 mM), Dexamethason (100 nM) und der Kombination beider Substanzen behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (K). Die Gesamt-mRNA der Zellen wurde isoliert und eine Expressionsanalyse mittels Microarray (Human Genom U133A, Affymetrix) durchgeführt. Der Chip enthält 22280 Probesets, etwa 14500 davon entsprechen humanen Genen. Die Tabelle gibt an wie viele Gene jeweils mehr als 2,5-fach reguliert wurden im Vergleich zur Kontrolle. Im Rahmen einer Wiederholungsanalyse (Microarray 2) wurde noch ein weiterer HDACi (TSA, 50 nM) untersucht.

Ziel der vergleichenden Expressionsanalyse war es, von der Kontrolle abweichend regulierte Gene zu finden, die für Proteine kodieren, die in Prozessen wie Apoptose bzw. Zellproliferation eine Rolle spielen könnten. Die erste Microarray-Studie lieferte bereits einige potentielle Kandidaten (Tab. 4.6). Gene, die in beiden Chip-Analysen gefunden wurden, sind schwarz dargestellt. Die Wiederholungsstudie (Tab. 4.7) lieferte weitere Hinweise auf die Ursache für den starken Zelltod in Nalm-6 durch Dexamethason und VPA und bestätigte zu einem großen Teil die Ergebnisse des ersten Arrays.

Die Gene mehrerer basaler und DNA-abhängiger Transkriptionsfaktoren erfuhren nach Behandlung mit Dexamethason und VPA eine Hochregulation. Für einige Transkriptionsfaktoren, die Zellzyklus und Proliferation positiv beeinflussen, ergab sich eine Herunterregulation ihrer Gene nach Kombinationsbehandlung. So wurde *cpr2* (*cell cycle poggession restoration protein 2*) in beiden Studien ausschließlich durch die Wirkstoffkombination reprimiert [184].

Die Kombination von Dexamethason mit VPA führte zur verstärkten Induktion des Gens, welches für den Transkriptionsfaktor GILZ (Glucocorticoid Induced Leucin Zipper) kodiert. Auch durch die alleinige Dexamethason-Behandlung wird *gilz* induziert, allerdings weniger stark ausgeprägt. Das bestätigte auch die Wiederholungsstudie. Der Transkriptionsfaktor



GILZ befindet sich vorwiegend in Zellen mit lymphatischem Ursprung. GILZ spielt eine potentielle Rolle bei der Dexamethason-vermittelten Apoptose von T-Zellen [185].

V+D/K	V/K	D/K	Name des Gens	Funktion des Proteins
51,6	69,1		<i>galectin 1</i>	Pro-Apoptose (T-Zellen)
30,1		19,2	<i>glucocorticoid-induced leucine zipper (gilz)</i>	Transkriptionsregulation (T-Zellen)
29,2	17,0		<i>caldesmon 1</i>	Ca <sup>2+</sup> -abhängige Beeinflussung v. Kontraktionen
19,2	9,1	6,7	<i>gelsolin</i>	Differenzierung
10,6	6,3		<i>transcription elongation factor A (SII), (tcea2)</i>	basale Transkriptionsregulation
10,2	1,0		<i>cystatin SA (cst2)</i>	Cystein-Protease Inhibitor
9,7	9,8		<i>H1 histone family, member 0 (h1f0)</i>	Chromatinorganisation
9,5	3,8		<i>cd69 antigen (p60)</i>	Signaltransduktion
9,1			<i>regulator of G-protein signalling 1 (rgs1)</i>	Signaltransduktion, B-Zell Aktivierung
7,6			<i>kruppel-like factor 9 (klf9)</i>	DNA-abhängige Transkriptionsregulation (Pol II)
7,5	13,4		<i>wilms tumor 1 (wt1)</i>	Transkriptionsfaktor (Proliferation/Differenzier.)
7,1	3,1		<i>inhibitor of DNA binding 2 (id-2)</i>	hemmt Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren
5,7	5,7		<i>caspase 2</i>	Pro-Apoptose
5,3	7,8		<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, kip2)</i>	Zellzyklus-Arrest
5,2	2,9		<i>RNase A family, k6 (rnase6)</i>	Endonuklease Aktivität (Immunabwehr)
5,1	10,9		<i>protein kinase C, beta 1</i>	Signaltransduktion
4,6	4,2		<i>RIPK1 cont. adaptor w. death domain (raidd)</i>	Todesrezeptor vermittelte Apoptose
3,5			<i>granzyme A</i>	Pro-Apoptose
3,4		23,3	<i>interferon stimulated gene 20kDa</i>	Exonuklease Aktivität
3,1	3,3		<i>H1 histone family, member X (h1fx)</i>	Chromatinorganisation
3,1			<i>peroxisome prolif. activated receptor (pparδ)</i>	Transkriptionsregulation
3,1			<i>ATP-binding cassette, sub-family A (abc1)</i>	ABC-Transporter
2,9	2,8		<i>cellular repressor of E1A-stimulated genes</i>	transkriptionale Co-Repression
-2,6			<i>chromosome condensation 1 (chc1)</i>	Chromatinkompaktierung
-2,8			<i>HLA class III protein Dom3z (dom3z)</i>	Immunantwort
-6,5			<i>cell cycle progression 2 protein (cpr2)</i>	Transkriptionsfaktor (Zellproliferation)
-13,0	-4,1		<i>mds032</i>	unbekannt (NF-kappaB Aktivierung?)
-16,4	-13,8		<i>aven</i>	Anti-Apoptose
-18,5	-12,0		<i>immunoglobulin lambda-like 1 (igll1, cd179b)</i>	B-Zellrezeptor, Signaltransduktion (Proliferation)
		8,7	<i>BCL2-like 11 (bim)</i>	Pro-Apoptose
1,1	1,2	1,3	<i>β-actin</i>	Negativkontrolle des Microarrays
1,0	1,0	1,1	<i>gapdh</i>	Negativkontrolle des Microarrays

**Tabelle 4.6: Ergebnisse der 1. Genexpressionsanalyse**

Die Tabelle zeigt eine Auswahl an Kandidaten, die in einem Zusammenhang mit dem zu untersuchenden Prozess stehen könnten. Aufgelistet ist die x-fache Regulation im Vergleich zur Kontrolle nach 13-stündiger Behandlung mit VPA und Dexamethason (V+D/K), VPA (V/K) bzw. Dexamethason (D/K). Es sind nur solche Gene aufgelistet, die mehr als 2,5-fach reguliert wurden. Die Daten sind nach absteigenden Werten für die Kombinationsbehandlung sortiert. Es sind der Name des Gens sowie die Funktion des Proteins, für welches es kodiert, angegeben. Kandidaten, die ebenfalls in Microarray 2 gefunden wurden, sind schwarz markiert (siehe auch Tab. 4.7). In Blau angegeben sind Gene, die nur in diesem Array detektiert wurden. Als Negativkontrollen des Experiments dienten *β-actin* und *gapdh* (grün markiert).

Es wurde zudem Gene beeinflusst, deren Proteine unmittelbare pro- bzw. anti-apoptotische Eigenschaften besitzen. In Folge der Kombinationsbehandlung wurden beispielsweise bedeutende Apoptose-relevante Proteine wie Caspase 2, RAIDD, Granzyme A und TAIP-2 hochreguliert. Für das durch die Kombinationsbehandlung stark induzierte Parathyroidhormon (PTH) wurde je nach Zelltyp und Entwicklungsstadium der untersuchten Zellen pro- bzw. anti-apoptotische Eigenschaften beschrieben [186].

V+D/K	V/K	D/K	T/K	Name des Gens	Funktion des Proteins
30,3	5,5			<i>gelsolin</i>	Differenzierung, Apoptose
22,9		15,0		<i>glucocorticoid-induced leucine zipper (gilz)</i>	Transkriptionsregulation (T-Zellen)
19,8	94,4		103	<i>galectin 1</i>	Apoptose
15,0				<i>parathyroid hormone (pth)</i>	Pro-Apoptose
9,9	4,1	4,5	12,0	<i>regulator of G-protein signalling 1 (rgs1)</i>	Signaltransduktion, B-Zell Aktivierung
9,7			7,3	<i>GABA(A) receptor-associated protein like 1</i>	Tumorsuppressor (Brustkrebs)
7,5	8,3		5,6	<i>H1 histone family, member 0</i>	Chromatinorganisation
6,6	7,0		15,1	<i>TGF-beta ind. apoptosis protein 2 (taip-2)</i>	Pro-Apoptose
5,2	7,1		6,4	<i>histone 1, h2bg</i>	Chromatinorganisation
5,1	6,4		4,4	<i>protein kinase C, beta 1</i>	Signaltransduktion
4,9	4,0		4,1	<i>glutaminase</i>	Stoffwechsel
4,8				<i>TNF receptor superfamily 10c (trail3)</i>	Rezeptor o. Todesdomäne, Anti-Apoptose
4,5				<i>caldesmon 1</i>	Ca <sup>2+</sup> -abhängige Bewegung
4,2		3,8	3,4	<i>protein tyr. phosphatase receptor C (cd45)</i>	Rezeptor vermittelte Signaltransduktion
4,1				<i>zinc finger protein 36, C3H type-like 2</i>	Transkriptionsfaktor (Proliferation)
4,0			3,0	<i>ATP-binding cassette, sub-family A (abc1)</i>	ABC-Transporter
4,0				<i>kruppel-like factor 9 (klf9)</i>	Transkriptionsregulation (Pol II)
3,9	3,0		3,2	<i>hairy/enhancer-of-split with YRPW motif 2</i>	DNA-abhängige Transkriptionsregulation
3,9			6,3	<i>granzyme A</i>	Pro-Apoptose
3,9	3,6		5,9	<i>transmembrane protease, serine 3</i>	Proteolyse
3,6				<i>nuclear receptor subfamily 1, group H, 4</i>	DNA-abhängige Transkriptionsregulation
3,5				<i>glutathione S-transferase M2 (gstm2)</i>	Zell-Entgiftung (elektrophile Substanzen)
3,3				<i>nescient helix loop helix 2</i>	Transkriptionsregulation (Differenzierung)
3,2	3,0		3,5	<i>thymus high mobility group box protein (tox)</i>	DNA-abhängige Transkriptionsregulation
3,2	2,8			<i>nuclear receptor subfamily 3, group C, 2</i>	DNA-abhängige Transkriptionsregulation
3,2		7,9		<i>interferon stimulated gene 20kDa</i>	Exonuklease Aktivität
3,1	2,5			<i>transcription elong. factor A (SII), (tcea2)</i>	basale Transkriptionsregulation
2,8			3,2	<i>RIPK1 cont. adaptor w. death domain (raidd)</i>	Todesrezeptor vermittelte Apoptose
2,8	3,1		2,9	<i>H1 histone family, member X</i>	Chromatinorganisation
2,7				<i>cellular repressor of E1A-stimulated genes</i>	Transkriptions Co-Repression
2,6				<i>GATA binding protein 3</i>	Transkriptionsaktivierung
2,5	2,5			<i>peroxisome prolifer. activated receptor (pparδ)</i>	Transkriptionsregulation

**Tabelle 4.7: Ergebnisse der 2. Genexpressionsanalyse**

Die Tabelle zeigt die wichtigsten Ergebnisse des zweiten Microarrays. In dieser Wiederholungsstudie wurden zusätzlich TSA-behandelte (50 nM, 13h) Nalm-6 Zellen untersucht (siehe auch Tab. 4.6). Eine Fortsetzung der Tabelle erfolgt auf der nächsten Seite.

Fortsetzung Tab. 4.7

V+D/K	V/K	D/K	T/K	Name des Gens	Funktion des Proteins
-2,5				<i>enolase 1, (alpha)</i>	neg. Transkriptionsregulation (Pol II)
-2,7			-3,6	<i>endonuclease G</i>	DNA Metabolismus
-2,8	-2,6			<i>myst histone acetyltransferase</i>	DNA-abhängige Transkriptionsregulation
-3,2	-4,6		-3,1	<i>E2F transcription factor 1</i>	Transkriptionsfaktor (Zellzyklus)
-3,2	-2,5		-2,8	<i>proliferation-associated 2G4, 38kDa</i>	Zellproliferation
-4,1				<i>cell cycle progression restoration 2 (cpr2)</i>	Transkriptionsfaktor (Zellproliferation)
-4,5	-3,7		-6,1	<i>aven, caspase activation inhibitor</i>	Anti-Apoptose
-4,5				<i>G1 to S phase transition 1 (gspt1)</i>	Zellproliferation
-4,8			-2,8	<i>three prime repair exonuclease 1</i>	DNA-Reparatur
-5,2	-4,7		-9,3	<i>activating transcription factor 5</i>	Transkriptionsregulation (Pol II, Zellzyklus)
-5,5				<i>zinc finger protein 202</i>	DNA-abh. Transkriptionsregulation (neg.)
-10,8	-9,2		-5,5	<i>immunoglobulin lambda-like 1 (igll1)</i>	Signaltransduktion (Proliferation/Diff.)
	15,3			<i>apoptosis-related protein pcar</i>	Apoptose
	11,8		10,5	<i>BCL2-related protein A1</i>	Anti-Apoptose
	11,1			<i>cyclin-depend. kinase inhibitor 1C (p57, kip2)</i>	Zellzyklus-Arrest
	3,4		3,7	<i>cyclin D2</i>	Zellzyklusregulation
	2,7			<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2H</i>	Ubiquitin-Übertragung (Proteinabbau)
	2,5			<i>vitamin D receptor</i>	DNA-abhängige Transkriptionsregulation
	-2,7			<i>E2F transcription factor 2</i>	Transkriptionsfaktor (Zellzyklus)
	-2,7			<i>ATP-binding cassette C (cfr/mrp)</i>	ABC-Transporter
	-2,8			<i>mds032</i>	unbekannt (NF-kappaB Aktivierung?)
1,0	1,2	1,1	1,1	<i>β-actin</i>	Negativkontrolle des Microarrays
1,1	1,2	1,1	1,2	<i>gapdh</i>	Negativkontrolle des Microarrays

Die pro-apoptotische Wirkung von Galektin-1 auf T-Zellen ist schon länger bekannt und kürzlich wurde veröffentlicht, dass es sich ebenfalls negativ auf die Proliferation von B-Zellen auswirkt [187]. Die Expression des entsprechenden Gens wurde durch die Behandlung sehr stark beeinflusst, allerdings mit VPA als Einzelsubstanz (70- bis 94-fach) in beiden Studien deutlich ausgeprägter als mit der Wirkstoffkombination (20- bis 52-fach). Die Induktion des *galektin-1*-Gens durch TSA war etwas mehr als 100-fach erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Besonders interessant ist die gefundene Repression des *aven*-Gens, dass für ein anti-apoptotisch wirkendes Protein kodiert [188]. Die Herunterregulation von *aven* durch VPA wurde in beiden Studien beobachtet. Der beobachtete Effekt war bei der Wirkstoffkombination (5- bis 16-fach) ausgeprägter als nach Behandlung mit VPA als Einzelsubstanz (4- bis 14-fach). Die reine Dexamethason-Behandlung übte keinen Einfluss auf die Expression von *aven* aus. Die Behandlung mit TSA führte zu einer 6-fachen Repression dieses Gens.

Die Induktion des Gens des Zyklin-abhängigen Kinase Hemmers p57, der Zellzyklus-Arrest in hämatopoetischen Zellen bewirken kann [189,190], wurde vor allem nach reiner VPA-

Behandlung festgestellt. Im Vergleich hierzu fiel die Hochregulation dieses Gens durch die Wirkstoffkombination geringer aus und konnte mit der Wiederholungsstudie auch nicht bestätigt werden. Für den bekannten Zyklin-abhängigen Kinase Hemmer p21 konnte hingegen nur für den Vergleich von Wirkstoffkombination mit reiner Dexamethason-Behandlung eine schwache 3-fache Induktion des entsprechenden Gens festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dexamethason als Einzelsubstanz hatte dabei eine leichte Repression von *p21* bewirkt. Das Gen *gspt1* (*G1 to S phase transition 1*) kodiert für ein Protein, für dessen Hefe-Homolog eine wichtige Rolle beim Übergang von der G1 Phase in die darauf folgende S Phase des Zellzyklus gezeigt werden konnte [191]. Eine Repression von *gspt1* wurde nur im zweiten Microarray nach Behandlung mit der Wirkstoffkombination von Dexamethason und VPA festgestellt.

Das Gen des noch relativ unbekanntes hämatopoetischen Stammzellproteins MDS032 wurde in beiden Studien durch VPA reprimiert. Über MDS032 wurde vor kurzem im Zusammenhang mit NF- $\kappa$ B-Aktivierung berichtet [192]. Die erste Microarray-Analyse ergab auch nach Kombinationsbehandlung eine Repression von *mds032*, die in diesem Fall sogar stärker war als der Effekt durch VPA als Einzelsubstanz.

Weiterhin wurden Gene abweichend reguliert, deren Proteine bei der Signaltransduktion und der B-Zellaktivierung eine Rolle spielen, wie beispielsweise Protein Kinase C (beta 1), RGS1, CD69 (p60) und CD45. Besonders interessant ist hier die starke (9-10-fache) Induktion von *rgs1* (*regulator of G-Protein signalling 1*) durch die kombinierte Behandlung mit Dexamethason und VPA. Der Effekt konnte durch beide Analysen nachgewiesen werden. Das Protein RGS1 wirkt negativ auf die G $\alpha$ (i) vermittelte Signaltransduktion und ist vor allem in B-Zellen mit fortgeschrittenem Reifestadium zu finden [193,194]. Daneben wurde in beiden Studien eine deutliche Repression von *igll1* (*immunoglobulin lambda-like polypeptide 1*) gefunden, die in Folge der Kombinationsbehandlung stärker war als nach reiner VPA- bzw. TSA-Behandlung. Dexamethason als Einzelsubstanz führte nicht zu einer Beeinflussung der Expression dieses Gens. IGLL1 (alias IGL5 oder Lambda 5) kodiert für einen B-Zellrezeptor, der mittels Signaltransduktion die Proliferation positiv beeinflussen kann [195].

Beide Chip-Analysen wiesen eine sehr starke Induktion (20 bis 30-fach) von *gelsolin* nach Kombinationsbehandlung auf. VPA als Einzelsubstanz zeigte eine etwas geringere Wirkung (6 bis 9-fach). Eine 7-fache Induktion von *gelsolin* durch Dexamethason konnte durch die Wiederholungsstudie nicht bestätigt werden. Das Protein Gelsolin reguliert Ca<sup>2+</sup>-abhängig die Entstehung und den Abbau von Aktin-Filamenten und ist somit ein wichtiger Akteur bei Prozessen wie Differenzierung und Zellbewegung. Heute geht man davon aus, dass Gelsolin zudem eine vielschichtige Aufgabe bei der Kontrolle und der Abwicklung von Apoptose übernimmt [196,197].

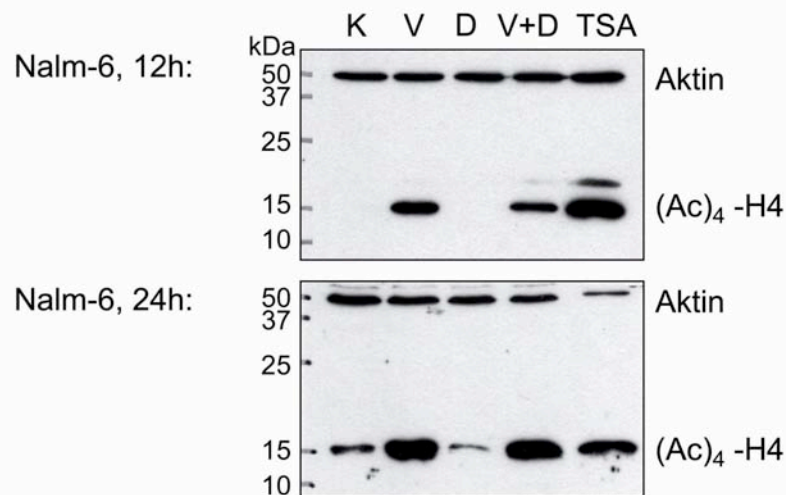
Nach Behandlung mit VPA allein wie auch in Kombination mit Dexamethason wurde in beiden Arrays eine Induktion des Gens von Histon H1 (Member 0) gefunden, dass einen Einfluss auf die Chromatinorganisation ausübt [198]. Weiterhin ergab sich, für die Behandlung mit der Wirkstoffkombination im ersten Microarray, die schwache Repression eines Gens, dass für CHC1 (Chromosome Condensation 1) kodiert. Dieses Protein ist an Prozessen der Chromatinkompaktierung beteiligt.

Eine Hochregulation von *bim* durch Dexamethason wurde nur im Rahmen der ersten Microarray-Analyse beobachtet. Das entsprechende Protein Bim ist ein pro-apoptisches Mitglied der BCL2-Familie [199].

Beide Studien ergaben eine schwache Induktion von *abca1* (*ATP-binding cassette A member 1*) nach Kombinationsbehandlung mit VPA und Dexamethason. ABCA1 gehört nicht zur klassischen Gruppe von ABC-Transportern, die Multi-Drug Resistenzen bewirken [200].

#### 4.7.2 Hyperacetylierung von Histon H4 durch VPA und TSA

Ein charakteristisches Merkmal, nach einer Behandlung von Zellen mit HDAC Inhibitoren ist die tetra-Acetylierung des Histons H4. Dies konnte auch in Nalm-6 nach Behandlung mit VPA bzw. TSA beobachtet werden (Abb. 4.19).



**Abbildung 4.19: Nachweis der Hyperacetylierung in Nalm-6 Zellen nach HDACi Behandlung**

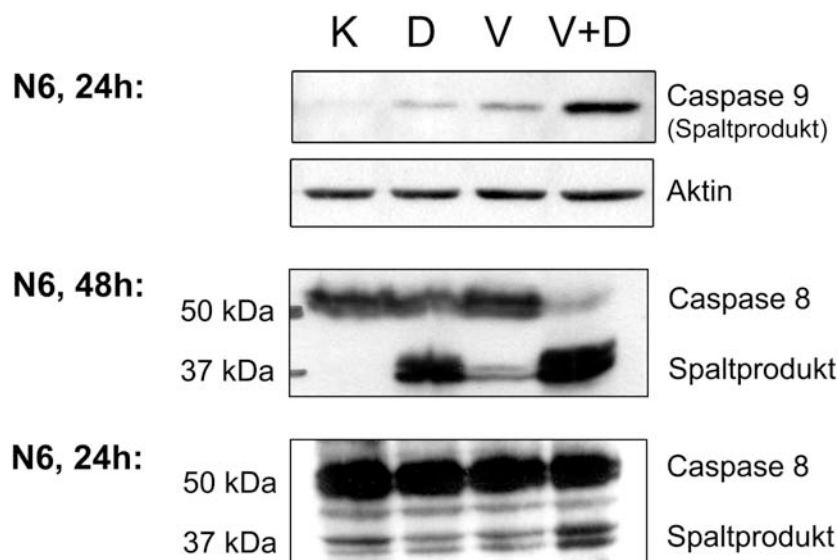
Nalm-6 Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden für 12 bzw. 24h mit 100 nM TSA, 100 nM Dexamethason (D), mit 1,5 mM VPA (V) und der Kombination dieser Substanzen (V+D) behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (K). Für die Westernblot-Analyse wurde ein spezifischer Antikörper gegen tetra-acetyliertes Histon H4 verwendet. Aktin diente als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung mit Zellextrakt.

Der Westernblot zeigt, dass die Hyperacetylierung von Histon H4 auch 24h nach der Gabe von VPA noch sehr stark vorhanden war. Dexamethason-Behandlung führte, wie erwartet, nicht zu einer Acetylierung des Histons H4. Für die Kombination von VPA mit Dexamethason

konnte dementsprechend auch keine Verstärkung der Hyperacetylierung gefunden werden. Das gleiche Bild ergab sich für die leukämischen B-Zelllinien SUP-B15 und BV173 [180].

#### 4.7.3 Aktivierung der Caspasen 8 und 9 in verschiedenen ALL-Zelllinien

Die katalytische Spaltung von Caspase 9 ist ein unmittelbares Ereignis in Folge der Aktivierung des intrinsischen, mitochondrialen Apoptosewegs. Die Bildung des aktiven Spaltprodukts leitet den apoptotischen Prozess unumkehrbar ein. Die Westernblot-Analyse zeigt, dass bereits nach 24-stündiger Behandlung der Nalm-6 Zellen mit VPA und Dexamethason große Mengen an aktiver Caspase 9 vorliegen (Abb. 4.20). Die Einzelsubstanzen bewirkten eine deutlich geringere Bildung an aktivem Spaltprodukt. Die enzymatische Spaltung von Caspase 8 erfolgt in erster Linie nach Aktivierung des extrinsischen Signalwegs über die Todesrezeptoren. Caspase 8 und 9 aktivieren sich aber auch gegenseitig. Nach 24h Behandlung von Nalm-6 Zellen mit der Wirkstoffkombination findet man nur einen kleinen Teil der Caspase 8 in aktivierter Form. Erst nach 48-stündiger Behandlung mit VPA und Dexamethason liegt in den Zellen überwiegend das aktive Spaltprodukt vor.

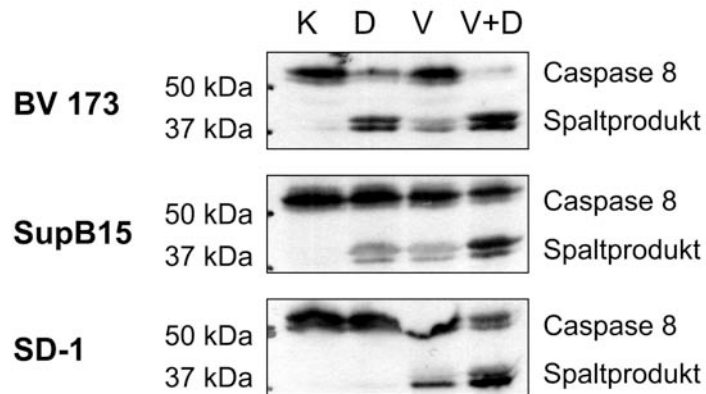


**Abbildung 4.20: Nachweis von Caspase-Aktivierung in Nalm-6 Zellen nach Behandlung**

Nalm-6 Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden für 24h und 48h mit 100 nM Dexamethason (D), 1,5 mM VPA (V) und der Wirkstoffkombination (V+D) behandelt. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (K). Es wurde ein spezifischer Antikörper gegen das aktive Spaltprodukt von Caspase 9 verwendet. Der Antikörper gegen Caspase 8 erkennt neben der aktiven Form auch das ungespaltene Protein. Aktin diente als Kontrolle für gleichmäßige Beladung der Gele mit Zellextrakt.

Die anderen untersuchten leukämischen B-Zelllinien enthielten bereits nach 24-stündiger Behandlung mit VPA und Dexamethason einen deutlichen Anteil an aktiver Caspase 8

(Abb.4.21). In BV-173 Zellen lag zu diesem Zeitpunkt bereits schon überwiegend aktives Spaltprodukt vor. Auch die Caspase 9 Aktivierung war zu diesem Zeitpunkt in allen drei Zelllinien, besonders nach Kombinationsbehandlung, schon deutlich ausgeprägt (Abb. 4.7).

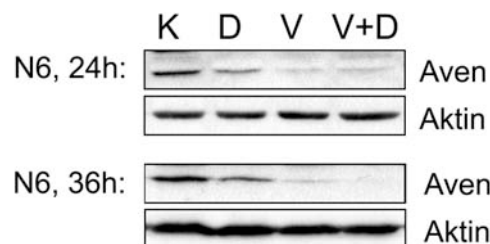


**Abbildung 4.21: Aktivierung von Caspase 8 in weiteren leukämischen B-Zelllinien**

Die Zellen wurden für 24h mit 100 nM Dexamethason (D), 1,5 mM VPA (V) und der entsprechenden Kombination (V+D) behandelt. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (K). Der Antikörper gegen Caspase 8 erkennt die Pro-Caspase sowie deren aktives Spaltprodukt.

#### 4.7.4 Herunterregulation von anti-apoptotischem Aven in Nalm-6 Zellen

Die im Rahmen der Genexpressionsanalyse gefundene Repression von *aven* in Nalm-6 Zellen (siehe Kap. 4.7) nach Behandlung mit VPA bzw. mit der Kombination von VPA und Dexamethason, konnte im Westernblot auch auf Proteinebene beobachtet werden. Bereits nach 24h hatte die Menge an Aven in der Zelle nach entsprechender Behandlung deutlich abgenommen (Abb. 4.22).

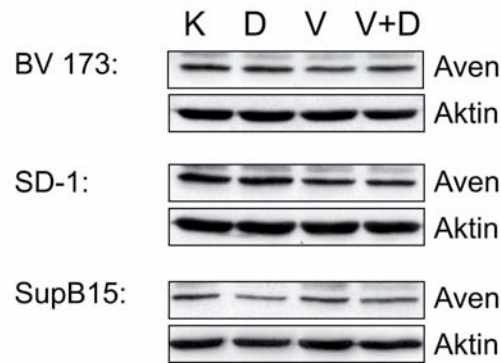


**Abbildung 4.22: Herunterregulation von Aven auf Proteinebene in Nalm-6 Zellen**

Die Behandlung der Nalm-6 Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) erfolgte mit 100 nM Dexamethason (D), 1,5 mM VPA (V) und der Kombination der Substanzen (V+D) für 24 bzw. 36h. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (K). Es wurde ein spezifischer Antikörper gegen Aven für den Westernblot eingesetzt. Aktin diente als Ladungskontrolle.

Nach 36-stündiger Behandlung mit VPA und Dexamethason ist das anti-apoptotische Protein mittels Westernblot nicht mehr zu detektieren. Als Einzelsubstanz bewirkte Dexamethason nur eine sehr schwache Herunterregulation von Aven.

Es wurden weitere B-Zelllinien bezüglich der Regulation von Aven untersucht (Abb.4.23). Die dargestellten Westernblots deuten zwar auf eine Herunterregulation des Proteins, die Effekte sind allerdings sehr schwach und liefern somit keine hinreichenden Beweise für eine konkrete Aussage.



**Abbildung 4.23: Regulation von Aven in weiteren leukämischen B-Zelllinien**

Die Zellen wurden für 24h mit 100 nM Dexamethason (D), 1,5 mM VPA (V) und der Wirkstoffkombination (V+D) behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (K). Es wurde ein spezifischer Antikörper gegen Aven für den Westernblot eingesetzt. Aktin diente als Ladungskontrolle.

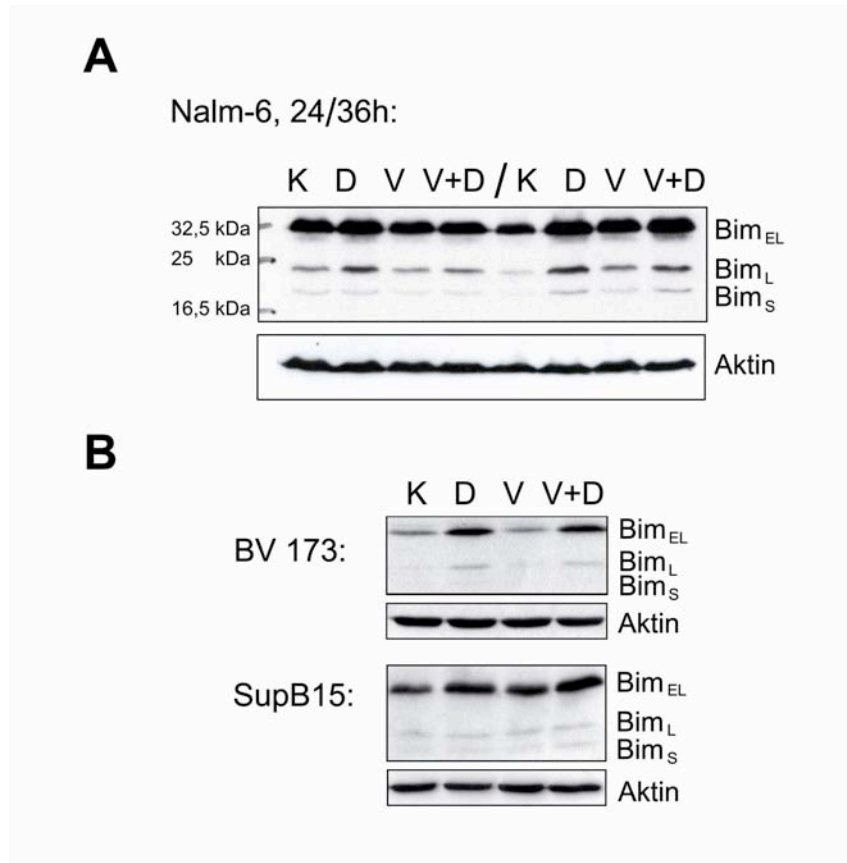
#### 4.7.5 Induktion von pro-apoptotischem Bim

Dass Dexamethason in Zellen mit lymphatischem Ursprung das Gen des pro-apoptotischen Proteins Bim induziert, wurde bereits durch mehrere unabhängige Studien festgestellt [156]. Auch eine der hier durchgeführten Microchip-Analysen (Kap. 4.7) ergab eine 8,7-fache Induktion von *bim* in Nalm-6 Zellen nach 13-stündiger Behandlung mit 100 nM Dexamethason. Allerdings konnte diese Induktion nicht nach Kombinationsbehandlung mit Dexamethason und VPA festgestellt werden. Es sollte daher überprüft werden, ob die zusätzliche Verabreichung von VPA tatsächlich der Dexamethason-vermittelten Induktion von *bim* entgegenwirkt.

Mittels Westernblot-Analyse konnte in den drei B-Zelllinien Nalm-6, BV-173 und SUP-B15 die Hochregulation von Bim auf Proteinebene, als Folge der Behandlung mit Dexamethason, nachgewiesen werden (Abb. 4.24). Die Kombination von Dexamethason mit VPA führte weder zu einer deutlichen Verstärkung dieses Effekts noch wurde ein eindeutig negativer Einfluss auf die Hochregulation von BIM durch Dexamethason gesehen. In den Nalm-6 Zellen könnte die Kombination von Dexamethason mit VPA möglicherweise zu einer leichten Hemmung der Induktion von Bim führen. Nach einer etwas längeren Behandlungsdauer (36 statt 24 Stunden) war für die detektierte Menge an Bim nach Dexamethason- bzw. nach Kombinationsbehandlung kein Unterschied mehr auszumachen.



Interessanterweise konnte in SD-1 Zellen kein Bim detektiert werden. Die Zelllinie SD-1 hatte sich als relativ resistent gegenüber Dexamethason und als sehr sensitiv gegenüber VPA und der Wirkstoffkombination herausgestellt (Abb. 4.7).



**Abbildung 4.24: Hochregulation von Bim auf Proteinebene in Nalm-6 Zellen**

Die Behandlung der Zellen erfolgte mit 100 nM Dexamethason (D), 1,5 mM VPA (V) und der Kombination dieser Substanzen (V+D). Wenn nicht anders angezeigt, wurden die Zellen für 24h behandelt. Als Kontrolle (K) dienen unbehandelte Zellen. Der verwendete Antikörper gegen Bim detektiert alle drei bekannten Proteinformen (EL, L, S). Aktin diente zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung.

## 5 Diskussion

### 5.1 Chemotherapie – moderne Wirkstoffe und Kombinationen

Die Kombination von Wirkstoffen mit unterschiedlichen molekularen Targets hat bei vielen Krebserkrankungen zu einer Verbesserung des Behandlungserfolges geführt, was unzählige Einträge von entsprechenden klinischen Studien in der Pubmed-Datenbank belegen. Je nach Art des Tumors können anti-neoplastische Substanzen wie DNA-Alkylanzien, Anti-Metabolite, Inhibitoren des mikrotubulären Systems, Topoisomerasehemmstoffe, Hormone, zytotoxische Zytokine, monoklonale Antikörper gegen spezifische Oberflächenproteine auf Tumorzellen und Ribonukleotidreduktase-Inhibitoren zur Hemmung der DNA-Reparatur miteinander kombiniert werden. Gerade auf Grund der Heterogenität innerhalb eines Tumors ist die Kombination von verschiedenen Wirkstoffen von großer Bedeutung für eine kurative Therapie [201]. Weiterhin versucht man, durch geeignete Kombinationen und hohe Dosen der Substanzen, möglichst schnelle therapeutische Erfolge zu erzielen, um die Bildung von ABC-Transporter-vermittelten Multi-Drug-Resistenzen zu verhindern, die sich bei längerer Behandlungsdauer sehr häufig entwickeln [202].

Ein gegenwärtig intensiv untersuchtes Target für eine neuartige Krebstherapie ist die epigenetische Modifizierung der DNA. Krebszellen weisen häufig starke Abweichungen bezüglich epigenetischer Markierungen wie DNA-Methylierung und Histon-Modifizierung auf [203]. Es hat sich herausgestellt, dass Histondeacetylase-Inhibitoren in einer Vielzahl von entarteten Zellen Zellwachstumsstopp, Apoptose sowie teilweise Differenzierung bewirken [85]. Interessanterweise sind gesunde Zellen von diesen Auswirkungen kaum betroffen (Kap. 1.6.2.). HDACi könnten somit potentielle Kandidaten für eine „epigenetische Therapie“ darstellen. Die Ergebnisse zahlreicher *in vitro*-Studien haben gezeigt, dass HDACi besonders effektiv sind in Kombination mit weiteren chemotherapeutischen Wirkstoffen, darunter auch DNA-Methylase-Inhibitoren [204]. Obwohl der konkrete molekulare Mechanismus der anti-neoplastischen Wirkung von HDACi und die beobachtete Spezifität für transformierte Zellen noch nicht völlig klar sind, wird eine Vielzahl von HDACi gegenwärtig, zum Teil erfolgreich, in klinischen Studien getestet. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kombinationsbehandlung mit HDAC-Inhibitor und synthetischem Glucocorticoid zur synergistischen Apoptose-Induktion in akuten lymphatischen Leukämiezellen führt.

## 5.2 Behandlung von ALL im Kindesalter

Die Leukämie stellt mit einem Anteil von 35 % die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter dar. In Deutschland erkranken pro Jahr von 100.000 Kindern etwa 4 bis 5 an Blutkrebs. In 80 % der Fälle lautet die Diagnose Akute Lymphatische Leukämie [163].

Die Chemotherapie gegen ALL wurde über die letzten 5 Jahrzehnte hinweg stetig weiterentwickelt und weist mittlerweile vor allem bei den betroffenen Kindern sehr gute Heilungschancen auf. Die Fünfjahresüberlebensrate lag in der Zeit von 1999 bis 2003 in Deutschland im Durchschnitt bei etwa 87 % [163]. Die moderne Standard-Chemotherapie bei ALL besteht aus drei Stufen: Induktions-, Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie [164].

Seit mehr als 50 Jahren werden Glucocorticoide gegen maligne Erkrankungen mit lymphatischem Ursprung eingesetzt. Obwohl GCs auf die meisten Zelltypen des menschlichen Körpers anti-apoptotisch wirken, besitzen sie eine ausgesprochen starke Potenz in proliferierendem lymphatischem Gewebe Apoptose zu induzieren. Sie spielen deshalb eine besondere Rolle in der Induktionstherapie. Das Ansprechen auf die Therapie mit Glucocorticoiden ist einer der wichtigsten prognostischen Faktoren für den weiteren Krankheitsverlauf [167]. Derzeit wird in der klinischen Praxis noch weitestgehend das synthetische GC Analog Prednisolon verwendet. Dieses wird aber sehr wahrscheinlich in naher Zukunft durch das effektivere Dexamethason ersetzt (Abb. 1.9), das bereits in mehreren klinischen Studien erfolgreich getestet wurde [165,166]. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden daher mit dem synthetischen Glucocorticoid Dexamethason durchgeführt.

Im Gegensatz zu vielen anderen Krebszellen reagieren maligne lymphatische Zellen meist sehr sensitiv auf eine Behandlung mit zytotoxischen Substanzen. Bei akuter lymphatischer Leukämie ließ sich das Prinzip der effektiven Polychemotherapie besonders erfolgreich anwenden. Die Kombination von Glucocorticoiden mit dem Tubulinpolymerase-Inhibitor Vincristin und dem Enzym L-Asparaginase hat dazu geführt, dass ca. 95 % der pädiatrischen ALL-Patienten nach der 4-wöchigen Induktionstherapie eine Remission (Blastenzahl im Blut < 5 %) erreichen [168]. Die anschließende Konsolidierungsphase beinhaltet eine umfangreiche Kombinationstherapie mit Antimetaboliten und Substanzen, welche die DNA-Reparatur hemmen (Methotrexat, Cytarabin, teilweise auch Mercaptopurin oder Teniposide) sowie weiterhin L-Asparaginase. Diese Kombination hat enorm dazu beigetragen, dass ein Großteil der pädiatrischen Patienten vollständig von ALL geheilt werden kann.

Trotz des Erfolges erleiden bis zu 20 % der Kinder ein Rezidiv der Erkrankung und die Prognose nach einem solchen Rückfall ist ziemlich schlecht. Hinzu kommt, dass das Problem der Langzeit-Nebenwirkungen der intensiven Chemotherapie bei steigenden Heilungsraten immer mehr in den Vordergrund tritt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde einem neuen Ansatz nachgegangen, um die gegenwärtige Standardtherapie weiter zu verbessern.

### 5.3 Synergistische Apoptose-Induktion in ALL-Zellen durch VPA und Dexamethason

Die therapeutische Wirkung von Histondeacetylase-Inhibitoren wird gegenwärtig an vielen unterschiedlichen Krebsarten als Einzelsubstanz und auch in Kombination mit verschiedenen anderen etablierten Wirkstoffen getestet (Kap. 1.6.1 und 1.6.3). Mehrere HDACi, darunter auch VPA, werden derzeit in klinischen Studien eingesetzt. Es hat sich herausgestellt, dass der therapeutische Nutzen der HDACi besonders hoch ist, wenn man die Substanzen mit weiteren Chemotherapeutika bzw. mit Strahlentherapie kombiniert [84,85,106].

Witzig *et al.* haben publiziert, dass der HDACi Phenylbutyrat als Einzelsubstanz in malignen B-Zellen Apoptose induziert und bei entsprechender Wirkstoffkombination die Zytotoxizität von Cytarabin, Etoposide und Topotecan in diesen Zellen synergistisch verstärkt [205]. Andere Studien haben gezeigt, dass VPA den durch Imatinib induzierten Wachstumsstopp und programmierten Zelltod von CML-Zellen deutlich verstärkt [206]. Ein weitere Studie zeigte die Erhöhung der anti-leukämischen Aktivität von 5-aza-2'-deoxycytidin durch VPA [204]. 5-aza-2'-deoxycytidin hemmt die DNA-Methylierung und führt somit wie Hyperacetylierung zu einer Auflockerung des Chromatins. Die kombinierte Behandlung mit 5-aza-2'-deoxycytidin und VPA führte auch in den hier untersuchten ALL-Zelllinien zu einer synergistischen Apoptose-Induktion (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen unterstützen die Idee von einer „epigenetischen Therapie“ bei Krebserkrankungen (Kap. 5.1). Da VPA seit mehr als 30 Jahren als Medikament der ersten Wahl zur Dauerbehandlung von Epilepsie eingesetzt wird, steht für diese Substanz eine große Anzahl an klinisch relevanten Daten zur Verfügung. VPA zeigt eine gute Bioverfügbarkeit und weist in der Regel moderate Nebenwirkungen auf. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher der therapeutische Effekt einer Kombinationsbehandlung mit dem Glucocorticoid Dexamethason und VPA untersucht.

Der überwiegende Teil der Untersuchungen wurde an der humanen prä-B-Zelllinie Nalm-6 durchgeführt, die 1976 aus dem Blut eines jungen Mannes mit rezidivierender akuter lymphatischer Leukämie etabliert wurde [174]. Das gleichmäßige und unempfindliche Wachstum dieser ALL-Zelllinie führte zu einer sehr guten Reproduzierbarkeit der einzelnen Experimente und somit zu aussagekräftigen Ergebnissen.

Pilotexperimente zeigten für die beiden HDAC-Inhibitoren VPA und Butyrat eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität gegenüber Nalm-6 Zellen (Abb. 4.1). Bei diesen beiden Substanzen handelt es sich um strukturell verwandte kurzkettige Fettsäuren, die im niedrigen millimolaren Konzentrationsbereich als HDACi wirken und dabei vorwiegend HDACs der Klasse I inhibieren. Es wurde bereits berichtet, dass Butyrat in der humanen leukämischen T-Zelllinie CCRF-CEM Apoptose induziert [207].

Sowohl für VPA als auch für Butyrat konnte eine deutlich mehr als additive Verstärkung des Dexamethason-vermittelten Zelltods festgestellt werden (Abb. 4.1). Ein synergistisches Zusammenwirken von Butyrat und Dexamethason bezüglich der Apoptose-Induktion war zuvor schon in der humanen leukämischen T-Zelllinie CEM-C7H2 beobachtet worden [181]. Da in der gleichen Studie für den HDACi TSA ein antagonistischer Effekt auf die Dexamethason-vermittelte Apoptose gefunden wurde, kamen die Autoren zu dem Schluss, dass der beobachtete Synergismus bei Butyrat nicht auf dessen HDAC-hemmende Wirkung zurückzuführen ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit widersprechen dieser sehr generellen Aussage. Eine hier durchgeführte „Dosis-Effekt“-Analyse ergab für das Zusammenwirken von Dexamethason und TSA (50-200 nM) bezüglich der Apoptose-Induktion in Nalm-6 Zellen hingegen einen schwach synergistischen Effekt (Abb. 4.5). Bei dieser Analyse werden, mit Hilfe einer speziellen Software von CalcuSyn, Kombinationsindices berechnet, anhand derer man die Art (synergistisch, additiv oder antagonistisch) und die Stärke der Wechselwirkung zwischen zwei oder auch mehreren Wirkstoffen ablesen kann. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Theorie von Chou und Talalay und dient gegenwärtig als Standardmethode zur Bestimmung von Kombinationseffekten [179].

Nun hatten die Autoren in ihrem publizierten Experiment ungewöhnlich hohe Konzentrationen an TSA eingesetzt [181]. Die Tatsache, dass TSA bei höheren Konzentrationen (>200 nM) einen kontraproduktiven Effekt auf den anti-leukämischen Effekt von Dexamethason ausübt, konnte wiederum experimentell bestätigt werden (Abb. 4.6). Neueste Forschungsergebnisse liefern einen plausiblen Ansatz, um dieses Phänomen zu erklären. TSA und SAHA sind auf der Hydroxamsäurestruktur basierende pan-HDAC-Inhibitoren und besitzen daher die besondere Fähigkeit auch HDACs der Klasse IIb und somit HDAC6 zu hemmen [62]. Vor kurzem wurde berichtet, dass HDAC6 das Hitzeschockprotein Hsp90 deacetyliert [208]. Kovacs *et al.* konnten zeigen, dass die Chaperonaktivität von Hsp90 durch reversible Acetylierung reguliert wird und dass diese Kontrolle durch die Deacetylase HDAC6 erfolgt. Die Inhibierung bzw. der siRNA-Knockdown von HDAC6 führt zur Hyperacetylierung von Hsp90, wodurch dieses eine geringere ATP-Bindungsaktivität aufweist und damit seine Fähigkeit verliert stabile Komplexe mit dem Glucocorticoidrezeptor zu bilden [209]. Wenn der GR nicht durch den Hsp90 Komplex stabilisiert wird, kann die Ligandenbindung nicht stattfinden. Die GC-vermittelte nukleäre Translokation und die darauf folgende Genregulation durch den Rezeptor bleiben somit aus. Es ist daher plausibel, dass TSA durch Inhibierung von HDAC6 die Dexamethason-induzierte Apoptose bei steigenden TSA-Konzentrationen immer stärker hemmt. Aus diesem Grund sollten pan-HDAC-Inhibitoren nicht für eine Kombinationstherapie mit Glucocorticoiden bei malignen Erkrankungen mit lymphatischem Ursprung eingesetzt werden.

Interessanterweise führt die Störung der Chaperonfunktion von Hsp90 durch HDAC6-Inhibierung unter Umständen aber auch zu einem erwünschten anti-leukämischen Effekt. Bekannte Onkoproteine und Signal-Proteinkinasen wie BCR-ABL, AKT und c-RAF werden ebenfalls durch Hsp90 Komplexe stabilisiert. Vor kurzem wurde publiziert, dass Acetylierung von Hsp90 nach HDAC6-Inhibierung zur Polyubiquitinylierung und zum proteosomalen Abbau dieser Substrate führt [64].

Im Rahmen einer Diplomarbeit in unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass TSA (100 nM) und SAHA (200 nM) auf die anti-leukämische Wirkung von Dexamethason (100 nM) auf Nalm-6 Zellen nur einen additiven bis schwach synergistischen Effekt ausüben. Dahingegen wurde für VPA, Butyrat und das Benzamid MS-275 ein deutlich synergistisches Zusammenwirken mit Dexamethason gefunden. Der beobachtete Synergismus war bei der Kombination mit VPA besonders stark ausgeprägt [180]. Die Ergebnisse dieser Diplomarbeit unterstützen die zuvor beschriebene Hypothese, denn nur die HDACi, welche HDAC6 nicht hemmen können, zeigten eine ausgeprägte synergistische Apoptose-Induktion mit Dexamethason. Es ist somit doch sehr wahrscheinlich, dass der Synergismus zwischen VPA (bzw. Butyrat) und Dexamethason auf die HDAC-inhibierende Wirkung zurückzuführen ist. Die hier durchgeführten Genexpressionsanalysen unterstützen diese Vermutung, denn der Einfluss von VPA auf die Genregulation trägt demnach dazu bei, dass in Nalm-6 Zellen das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptischen Signalen in Richtung Zellzyklusstopp und Apoptose verschoben wird. Diese Hypothese und die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen werden im weiteren Verlauf noch ausführlicher diskutiert (Kap. 5.2).

Wichtigstes Ziel einer kurativen Chemotherapie ist die Zerstörung und Eliminierung sämtlicher Krebszellen. Man weiß mittlerweile, dass die meisten Chemotherapeutika den programmierten Zelltod, die so genannte Apoptose auslösen. Bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe wird ebenfalls darauf geachtet dass ein geordneter Zelltod und nicht Nekrose ausgelöst wird [210]. Apoptose ist ein aktiver Prozess, der sich vor allem dadurch auszeichnet, dass während des gesamten Vorgangs die Zellmembran als schützende Hülle erhalten bleibt. Nach der Aktivierung der Caspase-Kaskade kommt es unter anderem zur Externalisierung von Phosphatidylserinen an die Zelloberfläche („eat-me“-Signal), zur internukleosomalen DNA-Fragmentierung durch aktivierte Endonukleasen sowie zur Abschnürung von apoptotischen Vesikeln (Kap. 1.7). Die Zellbestandteile der apoptotischen Zelle werden auf diese Weise abgebaut, verpackt und durch benachbarte Zellen mittels Phagozytose aufgenommen und weiterverwertet.

Mechanische Schädigung, Strahlung und hohe Konzentrationen von Chemotherapeutika wie beispielsweise Doxo- oder Daunorubicin können Nekrose auslösen [211]. Nekrotische Zellen weisen in der Regel nicht die genannten charakteristischen Merkmale eines geordneten

Zelltods auf. Der auffälligste Unterschied ist der rasche Verlust der Membranintegrität beim nekrotischen Zelltod. Der Zellinhalt entweicht ungehindert, was zu starken Entzündungsreaktionen führen kann. Dies ist besonders kritisch, wenn eine große Anzahl an leukämischen Blasten gleichzeitig lysiert wird. Aus diesem Grund wird beim Berlin-Frankfurt-Münster-Protokoll (ALL-BFM) die Remissionstherapie gegen ALL nach einer einmaligen Gabe von Methotrexat mit einer einwöchigen Monotherapie mit Glucocorticoiden begonnen. Die Blastenzahl kann so durch GC-vermittelte Apoptose zunächst einmal stark reduziert werden. Die ALL-BFM Studie (1990-95) ergab, dass bei Patienten mit hoher Blastenzahl die Komplikationen auf Grund von Tumorlyse reduziert werden konnten. Die durchschnittliche Fünfjahresüberlebensrate der Studie war vergleichbar mit den Ergebnissen, die aus anderen modernen Behandlungsprotokollen resultierten [212]. Trotz dieser Daten existiert die Theorie, dass Nekrose von Krebszellen das Immunsystem noch zusätzlich gegen den Tumor mobilisieren könnte [211].

Die hier durchgeführten Untersuchungen an Nalm-6 Zellen haben gezeigt, dass VPA den durch Dexamethason ausgelösten apoptotischen Prozess verstärkt. Anzeichen für einen nekrotischen Zelltod in Folge der Behandlung mit der Wirkstoffkombination konnten nicht festgestellt werden. Die behandelten Nalm-6 Zellen zeigten unter dem Mikroskop den Erhalt der Membranintegrität und das Abschnüren von apoptotischen Vesikeln. Westernblot-Analysen haben zudem die verstärkte Aktivierung der Initiator-Caspasen 8 und 9 gezeigt (Abb. 4.20). Weiterhin konnte die für Apoptose charakteristische DNA-Leiter nachgewiesen werden (Abb. 4.2). Auf der Basis der internukleosomalen DNA-Fragmentierung beruht auch die durchflusszytometrische Propidiumiodid-Färbemethode, mit der das Ausmaß der Apoptose bestimmt wurde [213]. Eine umfangreiche Untersuchung der Wirkstoffkombination mit dieser Messmethode hat gezeigt, dass die Apoptose durch Dexamethason-Behandlung (100nM) von VPA über einen weiten Konzentrationsbereich (0,5-2,0 mM) stark erhöht wird (Abb. 4.3). Es ist durchaus möglich im Serum von Patienten, nach einer Gabe von etwa 100 mg VPA pro Kilogramm Körpergewicht, Konzentrationen von bis zu 1 mM VPA zu erreichen [107,214]. Nach den Berechnungen mit der Calcsyn Software war das Zusammenwirken von Dexamethason und VPA bezüglich der Apoptose-Induktion in Nalm-6 Zellen stark synergistisch über den kompletten untersuchten Konzentrationsbereich (0,5-2,0 mM) (Abb. 4.4). Damit wird die gesamte, im Patienten erreichbare, therapeutische Konzentrationsspanne abgedeckt.

Sakajiri *et al.* konnten kürzlich zeigen, dass die HDAC-Inhibitoren SAHA und VPA in 14 humanen lymphatischen Krebszelllinien proliferationshemmend wirkten [215]. Das synergistische Zusammenwirken von VPA und Dexamethason ist ebenfalls nicht nur auf Nalm-6 Zellen beschränkt, sondern konnte auch in weiteren prä-B-Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 4.7). Für die Zelllinien SUP-B15 und BV-173 ergab sich ein ähnliches Bild wie

für die Nalm-6 Zellen. Die Apoptoseraten waren bei kombinierter Behandlung deutlich mehr als additiv erhöht. Im gleichen Maße, wie die Zelltodrate erhöht wurde, kam es auch zu einem vermehrten Auftreten der aktiven Form von Caspase 9. Daher kann auch hier davon ausgegangen werden, dass es sich um einen aktiven apoptotischen Prozess handelt. Die Zelllinien SD-1 und SEM reagierten besonders empfindlich auf VPA und im Gegensatz zu den anderen untersuchten Zelllinien nur sehr schwach auf Dexamethason (Abb. 4.7 und 4.8). Die Kombination von Dexamethason und VPA bewirkte aber auch in diesen Zelllinien einen deutlich mehr als additiven Effekt, was sich ebenfalls in der Spaltung von Procaspase 9 widerspiegelte.

Jurkat-Zellen hingegen erwiesen sich als vollständig resistent gegenüber der Behandlung mit Dexamethason. Diese Resistenz wird darauf zurückgeführt, dass in dieser Zelllinie in einem der beiden GR Allele eine funktionsbeeinträchtigende Punktmutation vorliegt [182]. Da der anti-leukämische Effekt von Glucocorticoiden in erster Linie vom Vorhandensein einer ausreichenden Menge an funktionstüchtigem GR in der behandelten Zelle abhängt, weisen Jurkat-Zellen offensichtlich eine „echte“ Resistenz gegen GCs auf [216]. Obwohl die Jurkat-Zellen äußerst sensitiv auf die Behandlung mit VPA und Butyrat reagierten, konnte die Resistenz gegenüber Dexamethason in diesem Fall nicht durch die HDAC-Inhibitoren aufgehoben werden. Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass VPA die Dexamethason-vermittelte Apoptose verstärkt, indem vorliegende pro-apoptotische Prozesse unterstützt beziehungsweise zusätzlich weitere Signalwege des programmierten Zelltods initiiert werden. Denkbar ist weiterhin eine mögliche Unterdrückung von pro-Survival Signalen. Diese Annahmen wurden durch die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen zum Teil bestätigt. Die Daten dieser Untersuchungen werden im folgenden Kapitel eingehend diskutiert.

## **5.4 Ursachen der Apoptose-Induktion durch Dexamethason und VPA**

Obwohl Glucocorticoide seit vielen Jahrzehnten zur Therapie von malignen Erkrankungen mit lymphatischem Ursprung eingesetzt werden, ist über den molekularen Mechanismus der GC-vermittelten Apoptose bislang nur relativ wenig bekannt (Kap. 1.8.4). Man ist inzwischen davon abgekommen, dass es einen generellen Mechanismus gibt, der für alle Zellen mit lymphatischem Ursprung gilt. Es ist sehr viel wahrscheinlicher, dass in den diversen Zellen unterschiedliche Signale bzw. Wege zur Initiation des apoptotischen Zelltods nach Glucocorticoid-Behandlung führen. Letztendlich wird aber, unabhängig von der Art und Weise der Initiation, in fast allen untersuchten Zellen nach GC Behandlung der intrinsische



Signalweg der Apoptose durchlaufen, der durch Permeabilisierung der Mitochondrienmembran mit darauffolgender Aktivierung von Caspase 9 ausgelöst wird [157].

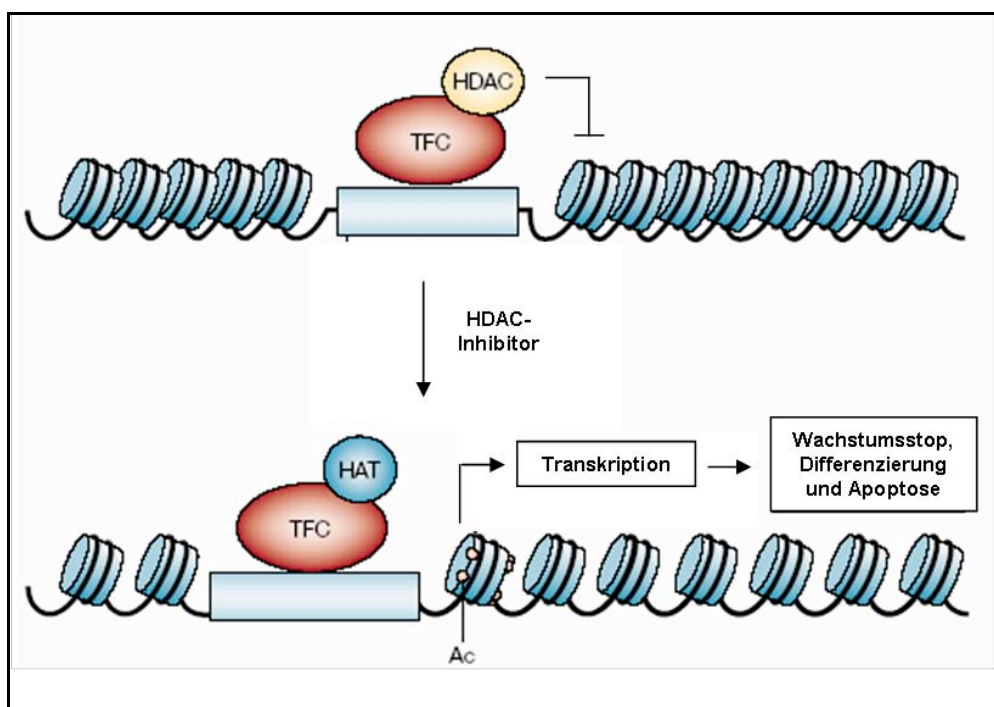
Die Hauptvoraussetzung für GC-induzierte Apoptose ist ein funktionierender Glucocorticoidrezeptor, der in ausreichender Menge vorliegt [149,216]. Da es sich bei diesem nukleären Rezeptor um einen Transkriptionsfaktor handelt, werden die Ursachen für den Zelltod vornehmlich in einer veränderten Genexpression gesucht. Es wird derzeit noch kontrovers diskutiert ob die Homodimerisierung des GR an der DNA-Bindestelle und somit die Cis-Aktivierung oder aber die Trans-Repression für die ausgelöste Apoptose essentiell ist (Kap. 1.8.4). Denkbar ist auch, dass beide Transkriptionsregulations-Mechanismen relevant sind [156]. Zahlreiche Expressionsprofile wurden mit Hilfe von Mikrochip-Technologien erstellt (zusammengestellt in [156]) und zeigten je nach Studie verschiedene pro-apoptotische Gene (z.B. Bim) hoch- beziehungsweise wachstumsfördernde Gene (z.B. c-myc) herunterreguliert. Nur in wenigen Studien waren mehrere Kandidatengene in unterschiedlichen Zelllinien auf gleiche Art und Weise reguliert.

Auch bei den HDAC-Inhibitoren geht man davon aus, dass sie über ihren Einfluss auf die Genexpression die Schwelle zur Apoptose in vielen verschiedenen entarteten Zellen herabsetzen. Das Schema in Abb. 5.1 zeigt auf stark vereinfachte Art, wie ein HDACi in transformierten Zellen die Transkription von pro-apoptotischen bzw. anti-proliferativen Molekülen positiv beeinflussen kann.

Die Vorgänge, die tatsächlich in der Zelle stattfinden sind sehr komplex und äußerst dynamisch. Nach Bindung des nukleären Rezeptors an die DNA-Erkennungsstelle rekrutiert dieser einen Koregulatorkomplex. Hat der Rezeptor einen agonistischen Liganden gebunden, so ist dies meist ein Koaktivatorkomplex mit HAT-Aktivität. Die Acetylierung von spezifischen Lysinen, in den exponierten N-terminalen Seitenketten der Histone in bestimmten Promotor-Nukleosomen, führt zu einer Auflockerung der Bindung zwischen Core-Histon und DNA. ATP-abhängige chromatinmodifizierende Komplexe (CRC) wie SWI/SNF können diese Bindung daraufhin ganz aufheben und die betroffenen Nukleosome derart verschieben, dass die DNA für den basalen Transkriptionsapparat (z. B. Bindung an TATA-Box) zugänglich ist [217]. In Gegenwart seines Antagonisten rekrutiert der nukleäre Rezeptor in der Regel einen Korepressorkomplex, der abhängig von seiner Zusammensetzung diverse HDACs gebunden hat. Die Deacetylierung von Histonen trägt dann dazu bei, dass das Chromatin in einer repressiven Form gehalten und die Transkription unterdrückt wird.

Wie ein Koregulatorkomplex zusammengesetzt ist, beziehungsweise welcher Komplex rekrutiert wird, kann neueren Erkenntnissen nach auch über kovalente Modifizierungen von Histonen (Histon-Code) und weiteren relevanten Proteinen reguliert werden [218]. Metivier *et al.* konnten vor kurzem am Beispiel des Östrogenrezeptors und dem pS2-Promotor zeigen,

dass der Koregulator-Austausch und die Bindung des Rezeptors an die DNA unabhängig von der Gegenwart des Liganden (Östrogen) in festgelegten Zyklen stattfinden [219]. Bei Ligandenbindung sind diese Zyklen allerdings produktiv (Transkription findet statt) und dauern zudem etwa doppelt solange an. Diese Zyklen dienen sehr wahrscheinlich dazu, immer wieder einen Grundzustand herzustellen aus dem heraus die Regulation der Transkription entsprechend der zellulären Bedürfnisse möglich ist [220]. Daraus ergibt sich, dass auch die epigenetischen Modifikationen, wie Acetylierung und Deacetylierung von Histonen, im Zuge dieser Zyklen alternierend auftreten. Die Inhibierung von HDACs verschiebt dieses dynamische Gleichgewicht und in der Folge dominieren Acetylierung und transkriptionelle Aktivität. Dies ist natürlich besonders dann relevant, wenn der entsprechende Agonist vorliegt.



**Abbildung 5.1: HDACi-vermittelter Einfluss auf die Genexpression in Tumorzellen**

HDACi wie VPA oder TSA bewirken die Hyperacetylierung durch Histonacetyltransferasen (HAT). Dies führt zur Reduktion der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den basischen Histonen und der DNA. Daraus resultiert die Auflockerung der repressiven Chromatinstruktur. Akkumulierung von acetylierten Histonen in der Promotorregion mit darauf folgender Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren führt zur verstärkten Transkription des betroffenen Gens. In transformierten Zellen führt dies häufig zu Zellzyklusstopp, Differenzierung und/oder Apoptose. Ac=Acetylgruppe, TFC=Transkriptionsfaktorkomplex

Maligne Zellen weisen im Vergleich zu gesundem Gewebe 20-60 % weniger genomisches methyl-CpG auf [103]. Da die DNA-Methylierung eine dominante Form der Genrepression darstellt, welche nicht durch Hyperacetylierung aufgehoben werden kann, könnte das

hypomethylierte Genom von Tumorzellen eine Ursache für die erhöhte Sensibilität gegenüber dem transkriptionellen Einfluss von HDACi darstellen.

Die Acetylierung von nicht-Histon-Proteinen, besonders die von Transkriptionsfaktoren, hat einen starken Einfluss auf deren Aktivität und führt zu weiteren Veränderungen in der Genregulation (Abb. 1.7). Diese Komplexität erklärt die interessante Beobachtung, dass HDACi oftmals ebenso viele Gene reprimieren wie induzieren [62]. Bei den hier durchgeführten Genexpressionsanalysen wurden nach VPA-Behandlung etwa dreimal so viele Gene hoch- wie herunterreguliert.

An einer Vielzahl von malignen Zellen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit HDACi zur Hochregulation von pro-apoptotischen und proliferationshemmenden Proteinen sowie zur Herunterregulierung von Zellzyklus-antreibenden Molekülen führt (zusammengestellt in Kap. 1.6.2). Unter dem Strich wird dadurch das Gleichgewicht von pro-Survival zu pro-Apoptose-Signalen innerhalb der Zelle in Richtung Wachstumsstopp und Zelltod verschoben. Somit ergab sich die interessante Frage, ob HDAC-Inhibitoren die GC-induzierte Apoptose auf genregulatorischer Ebene beeinflussen und welche Gene davon gegebenenfalls betroffen sind.

Die Ergebnisse der hier durchgeführten, vergleichenden Genexpressionsanalysen stützen die Vermutung, dass VPA die Dexamethason-vermittelte Apoptose in Nalm-6 Zellen über den Einfluss auf die Genregulation verstärkt. Die Tabelle 5.1 fasst die wichtigsten Ergebnisse zweier, unabhängig voneinander durchgeführter Mikrochip-Analysen zusammen (Kap. 4.7). Viele weitere interessante Gene, die nach Behandlung abweichend reguliert wurden im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte Zellen), sind in den Tabellen 4.6 und 4.7 im Ergebnisteil zusammengestellt. Diese Tabellen enthalten zudem die absoluten Werte zur jeweiligen Stärke der Genregulation.

Wie erwartet, resultierte die Behandlung der Nalm-6 Zellen zum einen in der Herunterregulation von diversen Genen, die für Proteine mit wachstumsfördernden Eigenschaften kodieren. Die Gene *cpr2* (*cell cycle pogression restoration protein 2*) und *gspt1* (*G1 to S phase transition 1*) wurden dabei interessanterweise ausschließlich durch die Wirkstoffkombination reprimiert. Das Protein CPR2 kann als Transkriptionsfaktor den Zellzyklus und die Proliferation positiv beeinflussen [184]. Für das Hefehomolog des humanen GSPT1 Proteins konnte eine bedeutende Rolle beim Übergang von der G1 Phase in die darauf folgende S Phase des Zellzyklus gezeigt werden [191].

Zwei weitere Gene, *aven* und *igll1* (*immunoglobulin lambda-like polypeptide 1*), waren nach kombinierter Behandlung mit Dexamethason und VPA besonders stark reprimiert. Dabei wurden weder *aven* noch *igll1* durch die Behandlung mit Dexamethason als Einzelwirkstoff beeinflusst. Das Protein Aven besitzt eine anti-apoptotische Wirkung [188]. Der Einfluss der

Behandlung auf die Proteinmenge an Aven in der Zelle und die möglichen Konsequenzen daraus werden später noch ausführlicher diskutiert. Bei IGLL1 handelt es sich um einen B-Zellrezeptor, der mittels Signaltransduktion die Proliferation positiv beeinflussen kann [195]. Es ist denkbar, dass die Herunterregulation von IGLL1 zur Hemmung der Proliferation in den behandelten Zellen beiträgt.

Prozess / Protein	VPA+DEX /K	VPA/K	DEX/K	TSA/K
<i>Anti-Apoptose bzw. Proliferation:</i>				
CPR2	↓			
Aven	↓↓	↓		↓
GSPT1	↓			
MDS032	↓	↓		
IGLL1	↓↓	↓		↓
<i>Zellzyklusstopp bzw. Apoptose:</i>				
GILZ	↑↑		↑	
Galektin-1	↑	↑↑		↑↑
Kinase Hemmer p57	↑	↑		
RGS1	↑↑	↑	↑	↑↑
Gelsolin	↑↑	↑	(↑)	
Caspase 2	↑	↑		
RAIDD	↑			↑
Granzyme A	↑			↑
TAIP-2	↑	↑		↑
PTH	↑			
Bim			↑	

**Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse**

In der linken Spalte der Tabelle sind Proteine aufgelistet, die in einem Zusammenhang mit dem aufzuklärenden apoptotischen Prozess stehen könnten. Sie wurden unterteilt in zwei generelle Gruppen: Proteine, die eine Rolle spielen bei wachstumsfördernden Prozessen und solche, die Zellzyklusstopp und Apoptose unterstützen. Die Änderung der Expression der entsprechenden Gene im Vergleich zur Kontrolle nach Behandlung mit VPA und Dexamethason (VPA+DEX/K), VPA (VPA/K), Dexamethason (DEX/K) bzw. TSA (TSA/K) ist durch Pfeile dargestellt. Ein Pfeil nach oben kennzeichnet eine Hochregulation. Umgekehrtes gilt für die Herunterregulation. Doppelpfeile kennzeichnen eine besonders starke Regulation des entsprechenden Gens. Es sind ausschließlich Kandidaten aufgelistet, die signifikant beeinflusst wurden.

Andererseits waren etliche Gene induziert, die für pro-apoptotische bzw. Zellzyklusstopp-induzierende Proteine kodieren. Auch in diesen Fällen lieferte die Wirkstoffkombination die meisten abweichend regulierten Kandidaten bzw. die jeweils stärkste Hochregulation der betroffenen Gene (Tab. 5.1). Einige dieser Kandidaten wurden durch Dexamethason ebenfalls beeinflusst, allerdings deutlich weniger ausgeprägt. Nach kombinierter Behandlung

mit VPA und Dexamethason besonders stark induziert waren die Gene *gilz* (*glucocorticoid leucin zipper*), *rgs1* (*regulator of G-protein signalling*) und *gelsolin*. Der durch Glucocorticoide induzierbare Transkriptionsfaktor GILZ ist vor allem in Zellen mit lymphatischem Ursprung nachzuweisen. Neueste Erkenntnisse deuten daraufhin, dass das Protein GILZ möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Dexamethason-vermittelten Apoptose in T-Zellen spielt [185]. Es ist denkbar, dass dieser Transkriptionsfaktor, der durch die Wirkstoffkombination deutlich stärker hochreguliert wird als nach reiner Dexamethason-Gabe, auch in Nalm-6 Zellen zur Apoptose-Induktion beitragen könnte. Das Protein RGS1 wird vorwiegend in reiferen B-Zellen nachgewiesen. Man geht davon aus, dass RGS1 negativ auf die  $G\alpha_{(i)}$ -vermittelte Signaltransduktion durch Chemokine wirkt und somit die Proliferation hemmt [193,194]. Gelsolin wurde bisher vor allem mit Prozessen wie Differenzierung und Zellbewegung in Verbindung gebracht, da es die  $Ca^{2+}$ -abhängige Bildung sowie Auflösung von Aktin-Filamenten reguliert. Gelsolin übernimmt aber zudem wichtige Aufgaben bei der Kontrolle und der Abwicklung des apoptotischen Zelltods. [196,197]. Ob die Hochregulation von Gelsolin zur Verstärkung des apoptotischen Prozesses führt oder ob dieses Protein ausschließlich eine exekutive Rolle in diesem Zusammenhang übernimmt, das wäre eine interessante Frage für zukünftige Untersuchungen.

Bim ist das einzige pro-apoptische Protein, welches in den hier durchgeführten Microarray-Studien allein durch Dexamethason-Behandlung induziert wurde. Dass das zur Bcl-2 Familie gehörende Bim bei der GC-vermittelten Apoptose eine bedeutende Rolle spielt, wurde bereits mehrfach publiziert. Es handelt sich hierbei um einen der wenigen Kandidaten, die in mehreren unabhängig von einander durchgeführten Genexpressionsanalysen, zur Untersuchung des GC-vermittelten Zelltods, gefunden wurden [156]. Untersuchungen von Abrams *et al.* haben gezeigt, dass die GC-Sensitivität von prä-B-Zellen (Nalm-6, 697, KOPN-8 und Kasumi-2) mit der Induktion von Bim in direkter Relation steht. Die Autoren reduzierten mit Hilfe von siRNA drastisch die Proteinmenge an BIM in der besonders GC-sensitiven Zelllinie 697, was in den entsprechenden Zellen zu einer erhöhten Überlebensrate nach GC-Behandlung führte. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass alle drei Spleißvarianten ( $Bim_{EL}$ ,  $Bim_L$  und  $Bim_S$ ) zum Zelltod beitragen [221].

Auf Grund der wichtigen Bedeutung von Bim für die GC-induzierte Apoptose wurde der Einfluss der Behandlung mit HDACi und Dexamethason auf die Proteinmenge von  $Bim_{EL}$ ,  $Bim_L$  und  $Bim_S$  in mehreren prä-B-Zellen mittels Westernblot-Analyse untersucht (Abb. 4.24). Wie erwartet und im Einklang mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalysen, führte die Dexamethason-Behandlung in Nalm-6 Zellen auf Proteinebene zu einem Anstieg bei allen drei Spleißvarianten. Auch für die Wirkstoffkombination, die im Microarray nicht zur Induktion von Bim geführt hatte, konnte nach 24-stündiger Behandlungsdauer eine leichte Hochregulation der drei Varianten von Bim festgestellt werden. Der Effekt war allerdings

weniger ausgeprägt, als es nach reiner Dexamethason-Gabe der Fall war. Nach 36-stündiger Behandlung wurde für Dexamethason und für die Kombination von Dexamethason mit VPA eine vergleichbar starke Hochregulation von Bim festgestellt. Offenbar wird die Hochregulation von Bim in Nalm-6 Zellen nach Dexamethason-Behandlung durch die Kombination mit dem HDACi nicht vollständig unterdrückt, aber immerhin verlangsamt. Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass der zum späteren Zeitpunkt beobachtete Anstieg der Proteinmenge von Bim durch die Wirkstoffkombination auf einem sekundären Effekt im Zuge der voranschreitenden Apoptose in Nalm-6 Zellen beruht. In den Zelllinien BV-173 und Sup-B15 hingegen führte die 24-stündige Behandlung mit Dexamethason als Einzelsubstanz sowie in Kombination mit VPA zu einer vergleichbar starken Hochregulation der drei Bim-Varianten. Dass die zusätzliche Verabreichung von VPA generell einen negativen Einfluss hat, auf die Dexamethason-vermittelte Induktion von *bim* in ALL-Zellen, kann somit zunächst einmal ausgeschlossen werden.

In SD-1 Zellen war Bim nicht detektierbar. Dies steht im Einklang mit dem von Abrams *et al.* gefundenen Zusammenhang zwischen GC-Sensitivität und der Induktion von Bim, da sich die SD-1 Zelllinie ausgesprochen resistent gegenüber Dexamethason-Behandlung verhält. SD-1 Zellen hatten aber auf die Wirkstoffkombination von Dexamethason und VPA mit starker Apoptose-Induktion reagiert. Bim ist somit zwar ein wichtiger Auslöser der Dexamethason-vermittelten Apoptose, aber nicht unbedingt essentiell für einen apoptotischen Prozess in den untersuchten prä-B-Zelllinien.

Die starke Repression der Transkription von *aven*, ein Gen das für ein anti-apoptisches Protein kodiert, könnte eine Ursache für den gefundenen Synergismus zwischen VPA und Dexamethason in Nalm-6 Zellen sein. Durch Bindung des Proteins Aven an Apaf-1 wird dessen Selbstassoziation und dadurch auch die Bildung des Apoptosoms verhindert. Die Aktivierung von Caspase 9 über den intrinsischen Signalweg kann in diesem Fall nicht mehr stattfinden [188]. Beide Mikroarrays zeigten eine starke Herunterregulation von *aven* nach Behandlung mit der Wirkstoffkombination. VPA als Einzelsubstanz bewirkte ebenfalls die Repression von *aven*, der Effekt war hierbei allerdings nicht so stark. Die reine Dexamethason-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Expression von *aven*. Da TSA, als HDACi mit völlig abweichender Struktur, die Expression von *aven* ebenfalls stark reprimiert (Abb. 4.7), ist es sehr wahrscheinlich, dass die beobachtete Repression auf der HDAC-inhibierenden Eigenschaft der Valproinsäure beruht. Die Untersuchungen zur entsprechenden Regulation von Aven in Nalm-6 Zellen auf Proteinebene bestätigten die zuvor diskutierten Ergebnisse der Chip-Analysen (Abb. 4.22). Nach 36-stündiger Behandlung mit der Wirkstoffkombination aus Dexamethason und VPA war Aven im Westernblot nicht mehr nachweisbar. Der zeitliche Verlauf der Herunterregulation von Aven entspricht

interessanterweise auch den ansteigenden Apoptoseraten, die nach 36-stündigem Behandeln mit der Wirkstoffkombination drastisch in die Höhe gehen.

Im folgenden wird einmal eine Möglichkeit besprochen, wie es (unter anderem) zur synergistischen Apoptose-Induktion in Nalm-6 Zellen durch VPA und Dexamethason kommen könnte. Der entscheidende Schritt für den intrinsischen Apoptose-Signalweg ist die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Die Integrität dieser Membran wird in erster Linie durch das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie kontrolliert, die sich zum großen Teil gegenseitig binden und dadurch hemmen. Bcl-2-Homology3-only (BH3-only) Proteine wie z.B. Bim und Bid bewirken Konformationsänderungen und Oligomerisierungen bei pro-apoptotischen Bcl-2-Homologen wie Bak und Bax, die in der Mitochondrien-Membran lokalisiert sind. Dadurch entstehen Poren, durch die Cytochrom C und weitere Todessignale ins Zytoplasma freigesetzt werden. Die Dexamethason-Behandlung von Nalm-6 Zellen führt zur Induktion von pro-apoptotischem Bim, wodurch das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie gestört wird. Das freigesetzte Cytochrom C bildet mit Apaf1 und Procaspase 9 das Apoptosom. Es kommt zur Spaltung und Aktivierung dieser Initiator-Caspase. Nun kann aber Aven an Apaf1 binden und darüber die Bildung des Apoptosoms stören. Wird also zusätzlich zum Dexamethason auch VPA verabreicht, so kommt es zur Herunterregulation von Aven, wodurch die apoptotische Signalkaskade verstärkt bzw. einen weiteren entscheidenden Schritt durchlaufen werden kann.

Die Herunterregulation von Aven spielt zwar in Nalm-6 Zellen möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Verschiebung des inneren Gleichgewichts der Zelle in Richtung Apoptose. In den anderen untersuchten prä-B-Zelllinien scheint dieser Effekt jedoch nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, denn die Westernblot-Analysen zur Regulation von Aven in den Zelllinien BV-173, SD-1 und SUP-B15 ergaben keine eindeutigen Ergebnisse. Die Herunterregulation von Aven nach Behandlung mit Dexamethason und VPA war in SD-1 Zellen nur sehr schwach und in den anderen beiden Zelllinien kaum detektierbar (Abb. 4.23). Ob die Herunterregulation von Aven in Nalm-6 Zellen für den beobachteten apoptotischen Effekt essentiell ist, kann man mittels Überexpression von Aven bzw. mit entsprechenden siRNA Experimenten feststellen. Allerdings lassen sich Nalm-6 Zellen, wie alle anderen Lymphozyten auch, nur sehr schlecht mit herkömmlichen Techniken transfizieren. Dies wurde im Rahmen einer Diplomarbeit eingehend untersucht [180]. Die Amaxa-Elektroporation wies, mit Werten von etwa 15 %, die höchste erreichbare Transfektionseffizienz auf, was jedoch für die erforderlichen Untersuchungen nicht ausreichend war. Eine Alternative wäre eine virale Transduktion. Da die abweichende Regulation von Aven nur in Nalm-6 Zellen und nicht in weiteren Zelllinien beobachtet wurde, habe ich an dieser Stelle auf diese Experimente verzichtet, deren Durchführung zudem nur in

Kollaboration mit einer anderen Arbeitsgruppe möglich gewesen wäre. Das Ergebnis hätte zunächst keine weiteren Erkenntnisse über die allgemeine Wirkung von Dexamethason und VPA auf leukämische prä-B-Zellen geliefert.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie an 91 pädiatrischen ALL-Patienten hat gezeigt, dass eine hohe Expression des *aven*-Gens mit einer ungünstigen Prognose einhergeht [222]. Zudem war bei rezidivierenden Standardrisiko-Patienten ebenfalls eine Überexpression von *aven* festgestellt worden. Diese interessanten Daten lagen während der Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit noch nicht vor. Es wäre daher sehr interessant den Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Regulation von *Aven* im Rahmen einer größeren Auswahl an ALL-Zelllinien wie auch an weiteren Krebsarten zu untersuchen.

Ähnlich wie bei der Suche nach den Ursachen für die apoptotische Wirkung von Glucocorticoiden auf proliferierende lymphatische Zellen, findet sich auch für den Synergismus zwischen VPA und Dexamethason kein grundlegender, generell gültiger molekularer Mechanismus, der für verschiedene Zellen gilt. Es ist sehr viel wahrscheinlicher, dass es sich um einen äußerst komplexen Vorgang handelt, bei dem über den Einfluss auf die Genregulation mehrere Prozesse gleichzeitig verstärkt bzw. in Gang gebracht werden, die sich dann zudem noch gegenseitig beeinflussen können. Wenn nun durch die Kombinationsbehandlung Gene reguliert werden, die einen besonders starken Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Wachstumsstopp bzw. Apoptose haben, so könnte man in diesen Fällen möglicherweise von einer Hauptursache sprechen. Die Herunterregulierung des anti-apoptischen Proteins *Aven* könnte in Nalm-6 Zellen eine solche Rolle spielen.

Für die Genexpressionsanalysen wurden Mikrochips von Affymetrix verwendet, die etwa 14500 humane Gene abdecken. Für den allgemeinen Einfluss auf die Genexpression, durch die Behandlung, wurden für die beiden, unabhängig voneinander durchgeführten Analysen, erstaunlich ähnliche Werte gefunden (Tab. 4.5). Für die Wirkstoffkombination ergab sich bei 452 bzw. 465 Genen eine mehr als 2,5-fache Abweichung von der Kontrolle. Nach VPA-Behandlung waren 423 bzw. 394 Gene betroffen. 90 bzw. 85 Gene wurden durch Dexamethason-Behandlung beeinflusst. Im zweiten Mikroarray wurde nach Behandlung mit TSA bei 447 Genen eine signifikante Beeinflussung beobachtet. Dabei waren generell etwa dreimal so viele Gene hoch- wie herunterreguliert, was sowohl für HDACi als auch für Dexamethason nachvollziehbar ist. Die Transkriptionsaktivierung nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren wie VPA und TSA ist, wie zuvor ausführlich beschrieben, auf Grund der aufgelockerten Chromatinstruktur durch die Hyperacetylierung von Histonen zu erwarten (Abb. 5.1 und 4.19). Die beobachtete Herunterregulation von Genen kann, wie bereits



erwähnt daran liegen, dass außer Histonen noch weitere Proteine wie Transkriptionsfaktoren acetyliert und darüber funktionell beeinflusst werden. Diese könnten in der Folge repressive Effekte ausüben. Denkbar wäre z.B. die Induktion eines HDACi-insensitiven Repressors. Aber auch die Acetylierung von Signalproteinen kann eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung von Genen spielen. Acetyliertes Stat1, beispielsweise, bindet die p65 Untereinheit von NF $\kappa$ B und verhindert so dessen nukleäre Lokalisation und DNA-Bindung sowie die Expression von NF $\kappa$ B Zielgenen [46]. Basierend auf den zahlreich durchgeführten Genexpressionsanalysen, zur Untersuchung von GC-vermittelter Apoptose, hat Schmidt et al. in einem Review eine Liste von GC-regulierten Genen zusammengestellt, die in drei oder mehr Systemen bzw. Publikationen gleichzeitig gefunden wurden [156]. Nach dieser Liste sind etwa dreimal so viele Kandidaten hoch- wie herunterreguliert, was den hier gefundenen Daten entspricht. Die Wirkstoffkombination von Dexamethason und VPA hat nicht dazu geführt, dass sich das Verhältnis von hoch- zu herunterregulierten Genen verändert hat. Es wurden nach Kombinationsbehandlung im Durchschnitt etwa 50 Gene mehr beeinflusst, als es durch reine VPA-Gabe der Fall war.

Die durchgeführten Genexpressionsanalysen waren sehr gut dazu geeignet einen Einblick zu erhalten wie Dexamethason, VPA und die Kombination der beiden Substanzen auf die Genregulation Einfluss nehmen. Man darf aber nicht vergessen, dass es sich hierbei nur um einen Schnappschuss handelt, der zeigt wie das mRNA-Expressionmuster genau 13h nach dem Behandlungsbeginn in Nalm-6 Zellen aussieht. Sehr interessant wäre es, die Untersuchungen auf weitere Zelllinien auszudehnen bzw. weitere Behandlungszeiten zu wählen. Auf Grund der noch recht hohen Kosten dieser Mikrochip-Untersuchungen von etwa 1000 Euro pro Hybridisierung ist dies derzeit nur begrenzt möglich.

## **5.5 Therapeutischer Nutzen der Kombination von VPA und Dexamethason**

Im Jahr 1989 haben Kamel-Reid *et al.* zum ersten Mal von einem Mausmodell für ALL berichtet, das auf dem Einbringen von humanen leukämischen Zellen in immundefiziente SCID Mäuse beruht [223]. Die Autoren hatten die akute lymphatische Leukämiezelllinie A-1, die sie als prä-B-Zellen charakterisierten, per Injektion in die Schwanzvene der Mäuse eingebracht. Die Tiere waren unmittelbar vor der Injektion von  $1 \times 10^7$  A-1 Zellen mit  $\gamma$ -Strahlung aus einer Cäsiumquelle behandelt worden, um die hämatopoetischen Stammzellen der Tiere zu reduzieren. Das Fortschreiten des Organbefalls in den SCID Mäusen durch die humanen Blasten wurde durchflusszytometrisch über den Oberflächenmarker CD44 verfolgt. Die Ansiedelung der Leukämiezellen fand zunächst im

Knochenmark der Mäuse statt. Als nächstes Organ war die Milz betroffen. Im Blut konnten die Blasten erst im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit nach etwa 10 Wochen beobachtet werden. Zwei Wochen später waren auch Organe wie Niere, Leber, Gehirn und Lunge von A1 Zellen infiltriert.

Der Verlauf der Krankheit in den Mäusen ähnelt stark dem Fortschreiten der ALL Erkrankung bei Patienten. Aus diesem Grund wurde diese Art des Mausmodells für zahlreiche Untersuchungen zur Entwicklung von neuen Behandlungsstrategien gegen ALL sowie zur Bestimmung von prognostischen Markern eingesetzt [224-231]. Neben den SCID Mäusen, denen funktionierende B- sowie T-Zellen fehlen, gibt es mittlerweile die weiterentwickelten NOD/SCID Mäuse, die zusätzlich eine sehr geringe Zahl an NK- (Natürliche Killer-) Zellen aufweisen. NOD/SCID Mäuse sind vor allem bei der Transplantation von primären Leukämiezellen aus Patienten besser geeignet als die herkömmlichen SCID Mäuse [225].

Über das Einbringen von Nalm-6 Zellen in SCID Mäuse wurde 1993 von Shah *et al.* berichtet [232]. Die Forscher hatten die Zellen ohne vorherige Bestrahlung der Tiere in die Schwanzvene injiziert. Die pro Tier eingebrachte Zellzahl wurde von  $4 \times 10^3$  bis  $4 \times 10^6$  variiert. Dementsprechend wurden 50%-Überlebenszeiten von 38 bis 25 Tagen beobachtet. An SCID Mäusen, die  $4 \times 10^6$  Zellen erhielten, wurde das Immuntoxin Ricin getestet. Die Behandlung mit dem Immuntoxin führte zu einer statistisch relevanten Verlängerung der Überlebenszeit.

Um die zuvor beobachtete synergistische Verstärkung des anti-leukämischen Effekts von Dexamethason durch VPA auch *in vivo* zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Dissertation ein solches Nalm-6 Mausmodell in unserer Arbeitsgruppe eingeführt. Immundefizienten SCID Mäusen wurden je nach Experiment zwischen  $5 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  Nalm-6 Zellen in die Schwanzvene injiziert. Während des Experiments wurden die Tiere täglich beobachtet und gewogen. Die Ansiedelung der Nalm-6 Zellen in den Tieren verlief analog zu den oben beschriebenen Beobachtungen von Kamel-Reid *et al.* [223]. Vier Wochen nach dem Einbringen der Zellen wurden bei den ersten Mäusen Bewegungseinschränkungen an den Hinterbeinen festgestellt, was auf eine Infiltration des zentralen Nervensystems durch die humanen Blasten hindeutete. In der Regel resultierte daraus nach wenigen Tagen die Lähmung beider Hinterbeine. Starke Lähmungserscheinungen sowie ein Gewichtsverlust von 20 % stellten die Abbruchkriterien für das Experiment dar. Tiere, die eins dieser Kriterien erreicht hatten, wurden sofort getötet. Bei den getöteten Tieren mit stark vorangeschrittener Knochenmarksinfiltration, wurde zumeist auch ein Befall der Milz durch Nalm-6 Zellen festgestellt (Abb. 4.10 und 4.12). Im Blut und in weiteren Organen konnten keine Leukämiezellen detektiert werden, da das Spätstadium der Krankheit in den Mäusen auf Grund der Abbruchkriterien nicht erreicht wurde.

Um den therapeutischen Nutzen einer Kombinationstherapie mit Dexamethason und VPA zu ermitteln, wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet. Zum einen wurde der Einfluss

der Behandlung auf die Überlebenszeit der ALL-Mäuse ermittelt (Kap. 4.5.4) und zum anderen wurde mit zwei unabhängigen Studien die Infiltration von Knochenmark und Milz durch humane Blasten, in zeitgleich getöteten Tieren, untersucht (Kap. 4.5.2 und 4.5.3). Alle durchgeführten Studien, einschließlich der Vorversuche (Kap. 4.5.1), belegen die Wirksamkeit der Kombinationsbehandlung mit Dexamethason und VPA in dem hier verwendeten Mausmodell für ALL.

Nach Erfahrungswerten und mit Hilfe von Vorversuchen wurden der Therapieplan erstellt und die zu verwendenden Wirkstoffkonzentrationen ermittelt. Mit der Behandlung wurde immer erst einige Tage nach der Nalm-6 Injektion begonnen, damit sich die Blasten ansiedeln konnten. Die Behandlung erfolgte stets nach dem Schema: 5 Tage Therapie - 9 Tage Behandlungspause – 5 Tage Therapie. Dieses Konzept hatte sich bereits bei vorangegangenen Mausexperimenten in unserer Arbeitsgruppe bewährt. Der in Abbildung 4.11 dargestellte Gewichtsverlauf zeigt, dass die SCID Mäuse während der ersten Behandlungsphase mit VPA und Dexamethason stark an Gewicht verloren hatten. Während der anschließenden Behandlungspause nahmen die Tiere dann sehr schnell wieder zu. In der zweiten Behandlungswoche war der beobachtete Gewichtsverlust geringer. Die Hauptursache für den Gewichtsverlust könnte darin liegen, dass die mit Dexamethason und VPA behandelten Mäuse außergewöhnlich viel schliefen und daher möglicherweise weniger Nahrung zu sich genommen haben. Schläfrigkeit und Gewichtsabnahme nach VPA Behandlung waren auch bei Mausexperimenten kooperierender Arbeitsgruppen beobachtet worden [183].

Die tägliche VPA Dosis von 700 mg/kg Körpergewicht wurde auf zwei Gaben (morgens und abends) verteilt, um zweimal täglich hohe Serumkonzentrationen zu erreichen. Im Gegensatz zu den langen Serumhalbwerten von 9-16 h für VPA in Patienten [233,234], reduziert sich die VPA Menge im Blut von Mäusen erheblich schneller. In Mäusen wurde eine nahezu vollständige Eliminierung von VPA nach 8 Stunden festgestellt [183]. Im menschlichen Blut liegt ein sehr großer Anteil an VPA gebunden an Serum-Proteine vor, dies könnte die längeren Serumhalbwerten erklären.

Die durchgeführten Vorversuche mit täglicher Beobachtung und Gewichtskontrolle der Tiere ergaben, dass 1-3 mg Dexamethason pro Tag und kg Körpergewicht gut vertragen wurde. Für die Hauptversuche wurde die höchste Dosis eingesetzt. Den Kontrolltieren wurde entsprechend dem Behandlungsschema PBS-Puffer gespritzt.

Zur Bestimmung der Überlebenswahrscheinlichkeit wurden 24 SCID Mäusen jeweils  $5 \times 10^5$  Nalm-6 Zellen injiziert. Wenn bei einem Tier eines der Abbruchkriterien auftrat, wurde es getötet und die entsprechende Überlebenszeit in eine Kaplan-Meier-Analyse aufgenommen (Abb. 4.15). Am Tag 46 nach der Nalm-6 Injektion, 10 Tage nach dem die letzte Kontrollmaus getötet werden musste, wurden die letzten beiden Mäuse, die mit der

Kombination von Dexamethason und VPA behandelt worden waren, eingeschläfert. Es ergab sich für diese Gruppe eine signifikant erhöhte Überlebenswahrscheinlichkeit ( $p = 0,027$ ) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Ein  $p$ -Wert  $< 0.05$  kennzeichnet eine signifikante Abweichung. Die Behandlung mit Dexamethason als Einzelwirkstoff führte hingegen nicht zu einer statistisch relevanten Verlängerung des Überlebens der Nalm-6 Mäuse ( $p = 0.124$ ). Auf eine reine VPA Gruppe wurde, wegen des mäßigen apoptotischen Effekts von VPA auf Nalm-6 Zellen in der Zellkultur, verzichtet.

Um den Einfluss der Kombinationsbehandlung auf das Fortschreiten der Krankheit quantitativ zu erfassen, wurden zwei Studien durchgeführt, bei denen jeweils alle Versuchstiere getötet wurden, nachdem die ersten ALL-Mäuse Abbruchkriterien aufzeigten. Mit einem spezifischen Antikörper gegen humanes CD10, welches sich in großen Mengen auf der Oberfläche der Nalm-6 Zellen befindet, konnten die humanen Blasten markiert und das Ausmaß der Infiltration des Mausgewebes durchflusszytometrisch bestimmt werden.

In der ersten Studie (Kap. 4.5.2) befanden sich die Mäuse zum Zeitpunkt des Abbruchs in einem recht frühen Krankheitsstadium. Aus diesem Grund ließen sich in den wenigsten Tieren Nalm-6 Zellen in der Milz nachweisen. Es wurde aber ein signifikant reduzierter Anteil an Nalm-6 Zellen im Knochenmark der mit VPA und Dexamethason behandelten Mäuse (28,1 %), verglichen mit den Kontrolltieren (38,9 %), gefunden. Bei der zweiten Studie wurde für den direkten Vergleich eine reine Dexamethason Gruppe mitgeführt (Kap. 4.5.3). Dieser Versuch wurde erst beendet, als die Tiere ein etwas fortgeschrittenes Krankheitsstadium erreicht hatten. Zur Einhaltung der Abbruchkriterien mussten dazu allerdings drei Tiere der Kontrollgruppe sowie eines der Dexamethasongruppe vorzeitig getötet werden. Bei diesem Versuch hatten sich nach 35 Tagen im Knochenmark der Kontrolltiere durchschnittlich 81,1 % Nalm-6 Zellen angesiedelt. Dexamethason Behandlung führte lediglich zu einer schwachen Reduzierung des Wertes auf 78,6 %. Die Kombinationstherapie der Mäuse mit Dexamethason und VPA bewirkte immerhin einen Rückgang der Knochenmarksinfiltration auf 60,1 %. Besonders der Vergleich der Infiltration der Milzen durch die Nalm-6 Zellen zeigte, dass die kombinierte Therapie (3,6 %) deutlich effektiver war als die reine Dexamethason-Behandlung (23,8 %). Der für die Kontrolltiere gefundene Anteil lag bei 34,4 %. Dementsprechend wiesen die Milzen, der mit der Wirkstoffkombination behandelten Tiere, ein übliches Durchschnittsgewicht von 40 mg auf. Die Milzen der Dexamethason-behandelten Mäuse waren im Vergleich dazu mehr als zweifach, die der Kontrolltiere sogar vierfach vergrößert.

Die beobachteten Lähmungen der Hinterbeine standen ebenfalls im Einklang mit den gemessenen Infiltrationsraten der Knochenmarksproben. Nur bei einem der zehn Versuchstiere mit Kombinationsbehandlung wurde eine Lähmung beobachtet. Dahingegen

waren bereits 70 % der Dexamethason-behandelten Mäuse bei Versuchsende gelähmt. Die Tiere der Kontrollgruppen waren allesamt stark gelähmt.

Unter Verwendung eines Mausmodells für ALL konnte mit zwei unabhängigen Methoden gezeigt werden, dass der Zusatz von VPA zur Dexamethason-Behandlung zu einer deutlichen und statistisch signifikanten Verbesserung des Therapieerfolges führt.

## **5.6 VPA in Kombination mit weiteren Chemotherapeutika und der mögliche Einsatz in der Therapie gegen ALL**

Die beiden Zytostatika Vincristin und L-Asparaginase stellen, neben den Glucocorticoiden, zwei weitere wichtige Säulen der Induktionstherapie bei ALL im Kindesalter dar [168]. Vincristin, ein pflanzliches Alkaloid, bindet an Tubulin und hemmt die Tubulinpolymerisation zu Mitosespindeln. Die Zellteilung der Blasten wird auf diese Weise durch Vincristin sehr effektiv inhibiert. Das Enzym L-Asparaginase katalysiert die Hydrolyse von L-Asparagin zu L-Asparaginsäure und wirkt daher zytotoxisch auf Zellen, in denen ein Mangel an L-Asparagin-Synthetase vorliegt, was auf die meisten ALL-Zellen zutrifft (Kap. 1.9.2).

Für die Therapie von Hochrisikopatienten werden häufig auch Anthrazyklinderivate, wie Doxo- oder Daunorubicin eingesetzt [168]. Diese Substanzen hemmen das für die Replikation benötigte Enzym Topoisomerase, interkalieren in die DNA und bewirken zudem radikalische DNA-Strangbrüche. Anthrazykline sind sehr effektive Chemotherapeutika. Die Aggressivität dieser Substanzen führt aber auch zu starken Nebenwirkungen, einschließlich des Risikos zur Bildung von sekundären Tumoren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass VPA die anti-leukämische Wirkung von Dexamethason *in vitro* wie *in vivo* deutlich verstärkt und sich somit für den Einsatz in der Therapie gegen ALL eignen könnte. Um ein mögliches Auftreten von kontraproduktiven Effekten zwischen VPA und den anderen wichtigen Substanzen der Induktionstherapie wie Vincristin, L-Asparaginase und Anthrazyklinderivaten festzustellen, wurden Nalm-6 Zellen mit den entsprechenden Wirkstoffkombinationen behandelt und die resultierenden Apoptoseraten bestimmt. Die Untersuchungen zeigten, dass VPA auch auf die Zytotoxizität dieser Chemotherapeutika verstärkend wirkt. Mit der Calcosyn Software durchgeführte „Dosis-Effekt“-Analysen ergaben für die Wirkstoffkombination aus Vincristin und VPA stark synergistische Wechselwirkungen bezüglich der Apoptose-Induktion in Nalm-6 Zellen (Abb. 4.16). Für die Wechselwirkung von VPA mit L-Asparaginase ergab die Analyse ebenfalls einen Synergismus, der vor allem bei höheren Konzentrationen stark ausgeprägt war. Meines Wissens nach wurde bislang noch keine Studie veröffentlicht, die Daten zur Wechselwirkung zwischen HDAC-Inhibitoren und Vincristin bzw. L-Asparaginase enthält.

Im Rahmen der Induktionstherapie von pädiatrischen Standardrisikopatienten mit ALL werden die drei Wirkstoffe Dexamethason (Prednisolon), Vincristin und L-Asparaginase kombiniert. Aus diesem Grund wurde hier der Einfluss von VPA auf die zytotoxische Wirkung dieser dreifachen Wirkstoffkombination auf Nalm-6 Zellen untersucht. Die Behandlung der Nalm-6 Zellen mit der Kombination aus Dexamethason, Vincristin und L-Asparaginase führte nach 18h zu einer Apoptoserate von 44 %. Die zusätzliche Verabreichung von VPA zur Wirkstoffkombination bewirkte eine Erhöhung der Apoptoserate auf 78 %, was fast einer Verdopplung des vorherigen Wertes entspricht (Abb. 4.17).

Auch die ohnehin schon sehr starke Zytotoxizität von Daunorubicin konnte durch VPA weiter erhöht werden. Die „Dosis-Effekt“-Analyse der Kombination von VPA und Daunorubicin ergab Werte, die sich von schwach antagonistisch bei niedrigen Konzentrationen bis stark synergistisch bei höheren Konzentrationen der beiden Substanzen erstreckten (Abb. 4.18). Ein positives Zusammenwirken zwischen VPA und Daunorubicin steht im Einklang mit publizierten Daten. Über die Verstärkung der anti-neoplastischen Wirkung der Anthrazykline Doxorubicin und Idarubicin, durch HDAC-Inhibitoren, wurde schon mehrfach berichtet [104,204,235]. Auch in diesen Studien wurde beobachtet, dass höhere Konzentrationen zu stärkeren Wechselwirkungen führten. Eine mögliche Ursache für den gefundenen Synergismus könnte sein, dass die Auflockerung des Chromatins, auf Grund der Hyperacetylierung, die Zugänglichkeit der Anthrazykline zur DNA erhöht [104]. Dafür spricht, dass vor allem die Vorbehandlung der Zellen mit HDACi zur effektiven Verstärkung der Zytotoxizität der untersuchten Anthrazykline führt. Ganz ähnlich dazu führt die Behandlung mit HDACi in vielen Zellen auch zu einer Erhöhung der Radiosensitivität, was ebenfalls auf eine geöffnete Chromatinstruktur zurückgeführt werden könnte [236-238].

Um mit einer Kombinationsbehandlung einen maximalen therapeutischen Effekt zu erreichen ist es sinnvoll, mindestens drei Wirkstoffe zu kombinieren und dabei die höchstmöglichen Dosen einzusetzen. Frei *et al.* konnten dies mit ihrem Konzept der „Summation Dose Intensity“ vielfach belegen [239]. Für ihre Berechnungen benutzten sie klinische Daten aus zahlreichen Studien an verschiedenen Krebserkrankungen, darunter auch pädiatrische ALL. Die höchstmögliche Dosis eines Wirkstoffes für die Chemotherapie ist die Konzentration, bei der gerade noch akzeptable bzw. reversible Nebenwirkungen auftreten. Bei der Kombination von verschiedenen Wirkstoffen ist zu beachten, dass sich die so genannten dosis-limitierenden Toxizitäten addieren können. In diesem Fall müssen dann entsprechend niedrigere Konzentrationen eingesetzt werden.

Bei VPA handelt es sich um ein relativ gut verträgliches Medikament. VPA hätte beim Einsatz an pädiatrischen Patienten den Vorteil, dass das Risiko für die Entstehung von Sekundärtumoren im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika sehr gering ist. Vor kurzem

wurde zum ersten Mal davon berichtet, dass eine langjährige VPA-Behandlung mit der Entstehung von sekundären Leukämien in Zusammenhang stehen könnte [240]. Coyle *et al.* räumten jedoch selbst schon ein, dass der Zusammenhang zwar plausibel aber nicht nachgewiesen sei. Eine langjährige VPA Behandlung führe zu einer ständig aufgelockerten Chromatinstruktur, die DNA wäre somit anfälliger für Schäden durch Strahlung, Chemikalien oder auch oxidativen Stress. Die Autoren gaben außerdem zu bedenken, dass es sich bei den drei beobachteten Krankheitsfällen sehr wahrscheinlich um Einzelfälle handelt, da trotz des jahrzehntelangen und sehr breiten Einsatzes der Valproinsäure bislang nichts über einen Zusammenhang mit Leukämieentstehung berichtet wurde. Bei einer möglichen Anwendung im Rahmen einer Chemotherapie wäre die VPA-Behandlung zeitlich stark begrenzt. Das potentielle Risiko für ein späteres Auftreten von sekundären Leukämien minimiert sich dadurch noch einmal drastisch.

Valproinsäure besitzt ein teratogenes Potential, das zu einem zehnfach erhöhten Risiko zur Bildung von Neuralrohrdefekten führt [241,242]. Diese Eigenschaft von VPA ist aber nur für die Behandlung von Frauen im ersten Drittel ihrer Schwangerschaft relevant.

VPA weist aber auch einige Nebenwirkungen auf, die für die Kombination mit diversen Chemotherapeutika problematisch werden könnten. Eine Behandlung mit VPA führt häufig zu einer Blutbildveränderung. Die Leukopenie (Verminderung der Anzahl an Leukozyten) ist hier in diesem Zusammenhang besonders relevant. Das Immunsystem kann dadurch geschwächt werden. Vincristin hat ebenfalls ein geringes Potential Leukopenie auszulösen. Die Nebenwirkungen könnten sich bei einer Kombination der Substanzen addieren. Mit Wachstumsfaktoren und Stammzelltransfusionen kann man der Leukopenie entgegenwirken [239]. Interessanterweise wurde vor kurzem bekannt, dass VPA die Proliferation sowie die Selbsterneuerung von normalen hämatopoetischen Stammzellen verstärkt obwohl gleichzeitig die Hämatopoese von malignen AML Zellen unterdrückt wird [243]. Die Wirkungsvielfalt von VPA ist derart komplex, dass auf jeden Fall klinische Studien notwendig sind, um den Nutzen von VPA für die Therapie von ALL Patienten vollständig zu erfassen.

Die Elimination von VPA erfolgt über die Leber. Als kritischste Nebenwirkung für den möglichen Einsatz in der Chemotherapie ist die Hepatotoxizität von VPA anzusehen. Klinische Studien haben ergeben, dass die Behandlung mit VPA in Einzelfällen zu einer reversiblen Lebertoxizität führt, die nicht dosisabhängig ist und deren Ursache derzeit noch nicht verstanden wird (Martin Göttlicher, mündliche Mitteilung). Die Hepatotoxizität von VPA könnte vor allem bei der Kombination mit L-Asparaginase zu einem Problem werden. Patienten mit Leberschäden sollten nicht mit VPA behandelt werden.

VPA und Vincristin beeinflussen das zentrale Nervensystem. Hohe Dosen an VPA haben teilweise zu Gangunsicherheit und Verwirrtheit bei den Patienten geführt. Neurologische

Reaktionen müssten bei einer Kombinationstherapie von VPA und Vincristin kritisch beobachtet werden.

Für die Kombination von VPA mit Dexamethason ist kaum mit additiven Toxizitäten zu rechnen. Die Verträglichkeit der Kombinationstherapie wurde hier bereits am Mausmodell gezeigt. Das Immunsystem könnte möglicherweise durch die Kombination von VPA mit Dexamethason geschwächt werden. Theoretisch könnte auch die Metabolisierung von Dexamethason in der Leber durch VPA Behandlung verlangsamt werden. Die endgültige Ausscheidung von Dexamethason erfolgt aber, anders als bei VPA, über die Nieren.

Erfolg versprechend und mit geringen Nebenwirkungen belastet wäre möglicherweise eine einwöchige Vorbehandlung der ALL-Patienten mit Dexamethason und VPA, in Anlehnung an die vorausgehende GC-Monotherapie nach dem BFM-Protokoll [212].

Der aktuelle Behandlungserfolg bei pädiatrischer ALL ist vor allem auf eine äußerst aggressive Chemotherapie zurückzuführen [171]. Auf Grund der hohen Heilungsraten muss nun dringend das Problem der Langzeit-Nebenwirkungen der Therapie, darunter auch das hohe Risiko zur Bildung von Sekundärtumoren, angegangen werden [163,172,173]. VPA könnte hier eine potentielle Alternative für äußerst risikobehaftete Wirkstoffe, wie z.B. die Anthrazykline, darstellen. Auch bei Unverträglichkeit von Vincristin oder L-Asparaginase wäre ein entsprechender Ersatz durch VPA denkbar.

VPA ist ein preiswertes, weltweit vielseitig eingesetztes Medikament gegen Epilepsie, Migräne und psychische Störungen (Manien). Auf Grund seiner HDAC-inhibierenden Wirkung löst VPA in vielen verschiedenen entarteten Zellen Wachstumsstopp, Apoptose und teilweise Differenzierung aus. Die für die HDAC-inhibierende Wirkung notwendigen Konzentrationen, können auch im Serum der Patienten erreicht werden. Die zu erwartenden Nebenwirkungen sind bekannt und in der Regel auch handhabbar. Mit der vorliegenden Arbeit konnte die Wirksamkeit sowie die Verträglichkeit einer Kombinationstherapie von VPA und Dexamethason am Mausmodell für Akute Lymphatische Leukämie nachgewiesen werden. Das synergistische Zusammenwirken von VPA und Dexamethason wurde bei allen untersuchten prä-B-Zelllinien festgestellt. Zudem verfügt VPA über das Potenzial, die anti-leukämische Wirkung von Vincristin, L-Asparaginase und Daunorubicin auf Nalm-6 Zellen stark zu erhöhen. Die Ergebnisse der Dissertation liefern die Grundlage für viele denkbare Varianten, wie man VPA erfolgreich für die Therapie gegen ALL nutzen könnte.



## 6 Zusammenfassung

Die reversible Acetylierung von Core-Histonen und Transkriptionsfaktoren stellt einen bedeutenden Parameter für die Genregulation in Eukaryoten dar. Die Hyperacetylierung der Core-Histone H3 und H4 durch Histonacetyltransferasen (HATs) führt zu einer aufgelockerten und transkriptionell aktiven Chromatinstruktur. Im Gegenzug bewirken Histondeacetylasen (HDACs) die Bildung von repressivem Chromatin. Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) stehen im Mittelpunkt zahlreicher Forschungsinteressen, seit gezeigt werden konnte, dass sie Onkoprotein-vermittelte Genrepression, von bedeutenden Differenzierungsgenen in Leukämiezellen, aufheben können. Dabei hat sich herausgestellt, dass HDACi in einer Vielzahl von Tumorzellen Proliferationsstopp und Apoptose sowie teilweise auch Differenzierung induzieren. Interessanterweise ist gesundes Gewebe von diesen Auswirkungen so gut wie nicht betroffen. Viele strukturell verschiedene HDACi, darunter auch die auf Grund ihrer anti-epileptischen Wirkung weltweit eingesetzte Valproinsäure (VPA), werden gegenwärtig in klinischen Studien getestet. Der therapeutische Nutzen dieser Inhibitoren scheint besonders hoch zu sein, wenn man sie mit weiteren Chemotherapeutika bzw. mit Strahlentherapie kombiniert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass VPA den anti-leukämischen Effekt von Dexamethason *in vitro* und *in vivo* synergistisch verstärkt. Glucocorticoide (GCs) werden seit Jahrzehnten für die Therapie von Krebserkrankungen mit lymphatischem Ursprung eingesetzt. Die Glucocorticoide Prednisolon bzw. Dexamethason spielen eine Schlüsselrolle bei der Induktionstherapie gegen Akute Lymphatische Leukämie (ALL), denn das Ansprechen auf die GC-Behandlung ist einer der wichtigsten prognostischen Faktoren für den weiteren Verlauf der Krankheit.

Die meisten Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden an Nalm-6 Zellen durchgeführt, einer schnell und zuverlässig proliferierenden prä-B-Zelllinie, ursprünglich etabliert aus dem Blut eines jungen Mannes mit rezidivierender ALL. An Nalm-6 Zellen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit VPA, Dexamethason und der Kombination der beiden Wirkstoffe zum programmierten Zelltod führt. Unter dem Mikroskop wurden für Apoptose typische morphologische Veränderungen festgestellt. Daneben wurde internukleosomale DNA-Fragmentierung beobachtet. Die Beobachtungen aus diesen Untersuchungen sowie die durchflusszytometrischen Messungen der Zelltodraten wiesen darauf, dass VPA und Dexamethason bezüglich der Apoptose-Induktion positiv zusammenwirken. Mit Hilfe der Calcsyn Software konnte aus den gemessenen Apoptoseraten die Stärke der Wechselwirkung zwischen den zwei Wirkstoffen berechnet werden. Die Analyse ergab einen stark synergistischen Effekt, für die kombinierte

Behandlung von Nalm-6 Zellen mit VPA und Dexamethason, über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich. Die eingesetzten VPA-Konzentrationen deckten dabei den Bereich ab, der erfahrungsgemäß im Serum von Patienten erreicht werden kann.

Auch in vier weiteren prä-B-Zelllinien führte die Behandlung mit VPA und Dexamethason zur synergistischen Apoptose-Induktion. SUP-B15 und BV-173 Zellen reagierten dabei, wie Nalm-6 Zellen, sehr sensitiv auf Dexamethason-Behandlung. Die Zelllinien SD-1 und SEM zeigten eine deutlich ausgeprägte Resistenz gegenüber dem Glucocorticoid, reagierten aber sehr stark auf VPA- und Kombinationsbehandlung.

Trotz intensiver Untersuchungen ist über den molekularen Mechanismus der GC-vermittelten Apoptose nur wenig bekannt. Das ausreichende Vorhandensein eines funktionierenden Glucocorticoidrezeptors (GR) wird aber als essentiell, für das Ansprechen der Zelle auf GC-Behandlung, angesehen. Da der GR ein Transkriptionsfaktor ist, werden die Ursachen für den GC-induzierten Zelltod vornehmlich in einer veränderten Genexpression gesucht. Da HDACi ebenfalls großen Einfluss auf die Genregulation ausüben, wurden im Rahmen dieser Arbeit Genexpressionsanalysen an den behandelten Nalm-6 Zellen durchgeführt, um die Ursachen für den gefundenen Synergismus zwischen VPA und Dexamethason aufzuklären. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten eine verstärkte Hochregulation von Proteinen, die Zellzyklusstopp und Apoptose bewirken sowie eine verstärkte Repression von Faktoren, die anti-apoptotisch bzw. wachstumsfördernd wirken, in Folge der Kombinationsbehandlung. Die starke Herunterregulierung des pro-apoptotischen Proteins Aven, durch die Wirkstoffkombination, konnte in Nalm-6 Zellen auch mittels Westernblot-Analyse auf Proteinebene nachgewiesen werden.

Der potentielle Nutzen einer Kombinationstherapie mit VPA und Dexamethason konnte an einem Tiermodell für ALL überprüft werden. Das Tiermodell wurde über das Einbringen von Nalm-6 Zellen in immundefiziente SCID Mäuse generiert. Die Behandlung mit der Wirkstoffkombination führte zu einer signifikant reduzierten Infiltration von Knochenmark und Milz durch die humanen Blasten, im Vergleich zur Behandlung mit Dexamethason oder PBS als Kontrolle. Weiterhin wurde für die Tiere, die mit der Wirkstoffkombination behandelt wurden, eine signifikante Erhöhung der Überlebenswahrscheinlichkeit beobachtet.

Auch für Vincristin, L-Asparaginase und Daunorubicin, weitere Wirkstoffe der Induktionstherapie bei pädiatrischer ALL, konnte ein synergistisches Zusammenwirken mit VPA bezüglich der Apoptose-Induktion in Nalm-6 Zellen gezeigt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass VPA die Effektivität der Polychemotherapie gegen ALL erhöhen könnte. Auf Grund des stark synergistischen Zusammenwirkens mit Dexamethason könnte VPA möglicherweise auch eine potentielle Alternative für schlecht verträgliche bzw. risikobehaftete Chemotherapeutika darstellen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Clark, D.J. & Kimura, T. Electrostatic mechanism of chromatin folding. *J Mol Biol* **211**, 883-96 (1990).
2. Khorasanizadeh, S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* **116**, 259-72 (2004).
3. Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E. & Moudrianakis, E.N. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10148-52 (1991).
4. Noll, M. & Kornberg, R.D. Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1. *J Mol Biol* **109**, 393-404 (1977).
5. Hayes, J.J., Clark, D.J. & Wolffe, A.P. Histone contributions to the structure of DNA in the nucleosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6829-33 (1991).
6. Garcia-Ramirez, M., Dong, F. & Ausio, J. Role of the histone "tails" in the folding of oligonucleosomes depleted of histone H1. *J Biol Chem* **267**, 19587-95 (1992).
7. Garcia-Ramirez, M., Rocchini, C. & Ausio, J. Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *J Biol Chem* **270**, 17923-8 (1995).
8. Pruss, D. & Wolffe, A.P. Histone-DNA contacts in a nucleosome core containing a *Xenopus* 5S rRNA gene. *Biochemistry* **32**, 6810-4 (1993).
9. Lee, K.M. & Hayes, J.J. The N-terminal tail of histone H2A binds to two distinct sites within the nucleosome core. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8959-64 (1997).
10. Felsenfeld, G. & Groudine, M. Controlling the double helix. *Nature* **421**, 448-53 (2003).
11. Oudet, P., Gross-Bellard, M. & Chambon, P. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* **4**, 281-300 (1975).
12. Knezetic, J.A. & Luse, D.S. The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase II in vitro. *Cell* **45**, 95-104 (1986).
13. Lorch, Y., LaPointe, J.W. & Kornberg, R.D. Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell* **49**, 203-10 (1987).
14. Collingwood, T.N., Urnov, F.D. & Wolffe, A.P. Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J Mol Endocrinol* **23**, 255-75 (1999).
15. Patterson, H.G. & Simpson, R.T. Nucleosomal location of the STE6 TATA box and Mat alpha 2p-mediated repression. *Mol Cell Biol* **14**, 4002-10 (1994).
16. Deroo, B.J. & Archer, T.K. Glucocorticoid receptor activation of the I kappa B alpha promoter within chromatin. *Mol Biol Cell* **12**, 3365-74 (2001).
17. Lenfant, F., Mann, R.K., Thomsen, B., Ling, X. & Grunstein, M. All four core histone N-termini contain sequences required for the repression of basal transcription in yeast. *Embo J* **15**, 3974-85 (1996).
18. Zhang, W., Bone, J.R., Edmondson, D.G., Turner, B.M. & Roth, S.Y. Essential and redundant functions of histone acetylation revealed by mutation of target lysines and loss of the Gcn5p acetyltransferase. *Embo J* **17**, 3155-67 (1998).
19. Workman, J.L. & Kingston, R.E. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* **67**, 545-79 (1998).
20. Cosgrove, M.S., Boeke, J.D. & Wolberger, C. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1037-43 (2004).
21. Narlikar, G.J., Fan, H.Y. & Kingston, R.E. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**, 475-87 (2002).
22. Cairns, B.R. Chromatin remodeling complexes: strength in diversity, precision through specialization. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 185-90 (2005).

23. Allfrey, V.G. Structural modifications of histones and their possible role in the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proc Can Cancer Conf* **6**, 313-35 (1966).
24. Luger, K. & Richmond, T.J. The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 140-6 (1998).
25. Jacobson, R.H., Ladurner, A.G., King, D.S. & Tjian, R. Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* **288**, 1422-5 (2000).
26. Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C. & Kouzarides, T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**, 120-4 (2001).
27. Strahl, B.D. & Allis, C.D. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-5 (2000).
28. Schübeler, D., MacAlpine, D.M., Scalzo, D., Wirbelauer, C., Kooperberg, C., van Leeuwen, F., Gottschling, D.E., O'Neill, L.P., Turner, B.M., Delrow, J., Bell, S.P. & Groudine, M. The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev* **18**, 1263-71 (2004).
29. Braunstein, M., Sobel, R.E., Allis, C.D., Turner, B.M. & Broach, J.R. Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Mol Cell Biol* **16**, 4349-56 (1996).
30. Clements, A., Poux, A.N., Lo, W.S., Pillus, L., Berger, S.L. & Marmorstein, R. Structural basis for histone and phosphohistone binding by the GCN5 histone acetyltransferase. *Mol Cell* **12**, 461-73 (2003).
31. Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J.R., Cole, P.A. & Casero, R.A. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**, 941-53 (2004).
32. Yamane, K., Toumazou, C., Tsukada, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J. & Zhang, Y. JHDM2A, a JmJc-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* **125**, 483-95 (2006).
33. Lachner, M., O'Sullivan, R.J. & Jenuwein, T. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci* **116**, 2117-24 (2003).
34. Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. & Jenuwein, T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**, 116-20 (2001).
35. Fischle, W., Wang, Y. & Allis, C.D. Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* **425**, 475-9 (2003).
36. Wang, H., Huang, Z.Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B.D., Briggs, S.D., Allis, C.D., Wong, J., Tempst, P. & Zhang, Y. Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* **293**, 853-7 (2001).
37. Min, J., Feng, Q., Li, Z., Zhang, Y. & Xu, R.M. Structure of the catalytic domain of human DOT1L, a non-SET domain nucleosomal histone methyltransferase. *Cell* **112**, 711-23 (2003).
38. Feinberg, A.P. & Tycko, B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* **4**, 143-53 (2004).
39. Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y. & Allis, C.D. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84**, 843-51 (1996).
40. Taunton, J., Hassig, C.A. & Schreiber, S.L. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* **272**, 408-11 (1996).
41. Brown, C.E., Lechner, T., Howe, L. & Workman, J.L. The many HATs of transcription coactivators. *Trends Biochem Sci* **25**, 15-9 (2000).
42. Berger, S.L. Gene activation by histone and factor acetyltransferases. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 336-41 (1999).
43. Barlev, N.A., Liu, L., Chehab, N.H., Mansfield, K., Harris, K.G., Halazonetis, T.D. & Berger, S.L. Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* **8**, 1243-54 (2001).

44. Roth, S.Y., Denu, J.M. & Allis, C.D. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**, 81-120 (2001).
45. Shankaranarayanan, P., Chaitidis, P., Kuhn, H. & Nigam, S. Acetylation by histone acetyltransferase CREB-binding protein/p300 of STAT6 is required for transcriptional activation of the 15-lipoxygenase-1 gene. *J Biol Chem* **276**, 42753-60 (2001).
46. Kramer, O.H., Baus, D., Knauer, S.K., Stein, S., Jager, E., Stauber, R.H., Grez, M., Pfitzner, E. & Heinzl, T. Acetylation of Stat1 modulates NF-kappaB activity. *Genes Dev* **20**, 473-85 (2006).
47. Wade, P.A., Geggion, A., Jones, P.L., Ballestar, E., Aubry, F. & Wolffe, A.P. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* **23**, 62-6 (1999).
48. Wade, P.A. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays* **23**, 1131-7 (2001).
49. Chen, L.F., Mu, Y. & Greene, W.C. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *Embo J* **21**, 6539-48 (2002).
50. Kao, G.D., McKenna, W.G., Guenther, M.G., Muschel, R.J., Lazar, M.A. & Yen, T.J. Histone deacetylase 4 interacts with 53BP1 to mediate the DNA damage response. *J Cell Biol* **160**, 1017-27 (2003).
51. Vogelauer, M., Rubbi, L., Lucas, I., Brewer, B.J. & Grunstein, M. Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Mol Cell* **10**, 1223-33 (2002).
52. Wang, A., Kurdistani, S.K. & Grunstein, M. Requirement of Hos2 histone deacetylase for gene activity in yeast. *Science* **298**, 1412-4 (2002).
53. Gu, W. & Roeder, R.G. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**, 595-606 (1997).
54. Martinez-Balbas, M.A., Bauer, U.M., Nielsen, S.J., Brehm, A. & Kouzarides, T. Regulation of E2F1 activity by acetylation. *Embo J* **19**, 662-71 (2000).
55. Chan, H.M., Krstic-Demonacos, M., Smith, L., Demonacos, C. & La Thangue, N.B. Acetylation control of the retinoblastoma tumour-suppressor protein. *Nat Cell Biol* **3**, 667-74 (2001).
56. Kouzarides, T. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *Embo J* **19**, 1176-9 (2000).
57. de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S. & van Kuilenburg, A.B. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **370**, 737-49 (2003).
58. Marks, P.A., Miller, T. & Richon, V.M. Histone deacetylases. *Curr Opin Pharmacol* **3**, 344-51 (2003).
59. Gray, S.G. & Ekstrom, T.J. The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res* **262**, 75-83 (2001).
60. Zhou, X., Marks, P.A., Rifkind, R.A. & Richon, V.M. Cloning and characterization of a histone deacetylase, HDAC9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10572-7 (2001).
61. Fischle, W., Kiermer, V., Dequiedt, F. & Verdin, E. The emerging role of class II histone deacetylases. *Biochem Cell Biol* **79**, 337-48 (2001).
62. Bhalla, K.N. Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies. *J Clin Oncol* **23**, 3971-93 (2005).
63. Haggarty, S.J., Koeller, K.M., Kau, T.R., Silver, P.A., Roberge, M. & Schreiber, S.L. Small molecule modulation of the human chromatid decatenation checkpoint. *Chem Biol* **10**, 1267-79 (2003).
64. Bali, P., Pranpat, M., Bradner, J., Balasis, M., Fiskus, W., Guo, F., Rocha, K., Kumaraswamy, S., Boyapalle, S., Atadja, P., Seto, E. & Bhalla, K. Inhibition of Histone Deacetylase 6 Acetylates and Disrupts the Chaperone Function of Heat Shock Protein 90: A NOVEL BASIS FOR ANTILEUKEMIA ACTIVITY OF HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS. *J Biol Chem* **280**, 26729-34 (2005).

65. Frye, R.A. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **260**, 273-9 (1999).
66. North, B.J., Marshall, B.L., Borra, M.T., Denu, J.M. & Verdin, E. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* **11**, 437-44 (2003).
67. Heinzl, T., Lavinsky, R.M., Mullen, T.M., Soderstrom, M., Laherty, C.D., Torchia, J., Yang, W.M., Brard, G., Ngo, S.D., Davie, J.R., Seto, E., Eisenman, R.N., Rose, D.W., Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G. A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* **387**, 43-8 (1997).
68. Ito, K., Barnes, P.J. & Adcock, I.M. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* **20**, 6891-903 (2000).
69. Nagy, L., Kao, H.Y., Chakravarti, D., Lin, R.J., Hassig, C.A., Ayer, D.E., Schreiber, S.L. & Evans, R.M. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* **89**, 373-80 (1997).
70. Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* **14**, 121-41. (2000).
71. Yang, X.J. The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Res* **32**, 959-76 (2004).
72. Blobel, G.A. CREB-binding protein and p300: molecular integrators of hematopoietic transcription. *Blood* **95**, 745-55 (2000).
73. Gayther, S.A., Batley, S.J., Linger, L., Bannister, A., Thorpe, K., Chin, S.F., Daigo, Y., Russell, P., Wilson, A., Sowter, H.M., Delhanty, J.D., Ponder, B.A., Kouzarides, T. & Caldas, C. Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nat Genet* **24**, 300-3 (2000).
74. Di Croce, L. Chromatin modifying activity of leukaemia associated fusion proteins. *Hum Mol Genet* **14 Spec No 1**, R77-84 (2005).
75. He, L.Z., Guidez, F., Tribioli, C., Peruzzi, D., Ruthardt, M., Zelent, A. & Pandolfi, P.P. Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with co-repressors determine differential responses to RA in APL. *Nat Genet* **18**, 126-35 (1998).
76. Maurer, A.B., Wichmann, C., Gross, A., Kunkel, H., Heinzl, T., Ruthardt, M., Groner, B. & Grez, M. The Stat5-RARalpha fusion protein represses transcription and differentiation through interaction with a corepressor complex. *Blood* **99**, 2647-52 (2002).
77. Lin, R.J., Nagy, L., Inoue, S., Shao, W., Miller, W.H., Jr. & Evans, R.M. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* **391**, 811-4 (1998).
78. Warrell, R.P., Jr., He, L.Z., Richon, V., Calleja, E. & Pandolfi, P.P. Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. *J Natl Cancer Inst* **90**, 1621-5 (1998).
79. Wang, J., Hoshino, T., Redner, R.L., Kajigaya, S. & Liu, J.M. ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10860-5 (1998).
80. Hildebrand, D., Tiefenbach, J., Heinzl, T., Grez, M. & Maurer, A.B. Multiple regions of ETO cooperate in transcriptional repression. *J Biol Chem* **276**, 9889-95 (2001).
81. Pui, C.H., Relling, M.V. & Downing, J.R. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* **350**, 1535-48 (2004).
82. Dhordain, P., Lin, R.J., Quief, S., Lantoine, D., Kerckaert, J.P., Evans, R.M. & Albagli, O. The LAZ3(BCL-6) oncoprotein recruits a SMRT/mSIN3A/histone deacetylase containing complex to mediate transcriptional repression. *Nucleic Acids Res* **26**, 4645-51 (1998).
83. Polo, J.M., Dell'Oso, T., Ranuncolo, S.M., Cerchietti, L., Beck, D., Da Silva, G.F., Prive, G.G., Licht, J.D. & Melnick, A. Specific peptide interference reveals BCL6 transcriptional and oncogenic mechanisms in B-cell lymphoma cells. *Nat Med* **10**, 1329-35 (2004).
84. Lindemann, R.K., Gabrielli, B. & Johnstone, R.W. Histone-deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Cell Cycle* **3**, 779-88 (2004).

85. Marks, P.A., Richon, V.M., Miller, T. & Kelly, W.K. Histone deacetylase inhibitors. *Adv Cancer Res* **91**, 137-68 (2004).
86. Haggarty, S.J., Koeller, K.M., Wong, J.C., Grozinger, C.M. & Schreiber, S.L. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4389-94 (2003).
87. Finnin, M.S., Donigian, J.R., Cohen, A., Richon, V.M., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Breslow, R. & Pavletich, N.P. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* **401**, 188-93 (1999).
88. Kijima, M., Yoshida, M., Sugita, K., Horinouchi, S. & Beppu, T. Trapoxin, an antitumor cyclic tetrapeptide, is an irreversible inhibitor of mammalian histone deacetylase. *J Biol Chem* **268**, 22429-35 (1993).
89. Kwon, H.J., Owa, T., Hassig, C.A., Shimada, J. & Schreiber, S.L. Depudecin induces morphological reversion of transformed fibroblasts via the inhibition of histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3356-61 (1998).
90. Göttlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Krämer, O.H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J.P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P.G. & Heinzl, T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo J* **20**, 6969-78 (2001).
91. Krämer, O.H., Zhu, P., Ostendorff, H.P., Golebiewski, M., Tiefenbach, J., Peters, M.A., Brill, B., Groner, B., Bach, I., Heinzl, T. & Göttlicher, M. The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *Embo J* **22**, 3411-20. (2003).
92. Sandor, V., Senderowicz, A., Mertins, S., Sackett, D., Sausville, E., Blagosklonny, M.V. & Bates, S.E. P21-dependent G1 arrest with downregulation of cyclin D1 and upregulation of cyclin E by the histone deacetylase inhibitor FR901228. *Br J Cancer* **83**, 817-25 (2000).
93. Burgess, A.J., Pavey, S., Warren, R., Hunter, L.J., Piva, T.J., Musgrove, E.A., Saunders, N., Parsons, P.G. & Gabrielli, B.G. Up-regulation of p21(WAF1/CIP1) by histone deacetylase inhibitors reduces their cytotoxicity. *Mol Pharmacol* **60**, 828-37 (2001).
94. Gui, C.Y., Ngo, L., Xu, W.S., Richon, V.M. & Marks, P.A. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1241-6 (2004).
95. Archer, S.Y., Meng, S., Shei, A. & Hodin, R.A. p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6791-6 (1998).
96. Henderson, C. & Brancolini, C. Apoptotic pathways activated by histone deacetylase inhibitors: implications for the drug-resistant phenotype. *Drug Resist Updat* **6**, 247-56 (2003).
97. Peart, M.J., Tainton, K.M., Ruefli, A.A., Dear, A.E., Sedelies, K.A., O'Reilly, L.A., Waterhouse, N.J., Trapani, J.A. & Johnstone, R.W. Novel mechanisms of apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res* **63**, 4460-71 (2003).
98. Glick, R.D., Swendeman, S.L., Coffey, D.C., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Richon, V.M. & La Quaglia, M.P. Hybrid polar histone deacetylase inhibitor induces apoptosis and CD95/CD95 ligand expression in human neuroblastoma. *Cancer Res* **59**, 4392-9 (1999).
99. Maecker, H.L., Yun, Z., Maecker, H.T. & Giaccia, A.J. Epigenetic changes in tumor Fas levels determine immune escape and response to therapy. *Cancer Cell* **2**, 139-48 (2002).
100. Cohen, H.Y., Lavu, S., Bitterman, K.J., Hekking, B., Imahiyerobo, T.A., Miller, C., Frye, R., Ploegh, H., Kessler, B.M. & Sinclair, D.A. Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell* **13**, 627-38 (2004).
101. George, P., Bali, P., Annavarapu, S., Scuto, A., Fiskus, W., Guo, F., Sigua, C., Sondarva, G., Moscinski, L., Atadja, P. & Bhalla, K. Combination of the histone deacetylase inhibitor LBH589 and the hsp90 inhibitor 17-AAG is highly active against human CML-BC cells and AML cells with activating mutation of FLT-3. *Blood* **105**, 1768-76 (2005).
102. Taddei, A., Maison, C., Roche, D. & Almouzni, G. Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat Cell Biol* **3**, 114-20 (2001).
103. Esteller, M. Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg. *Clin Immunol* **109**, 80-8 (2003).

104. Kim, M.S., Blake, M., Baek, J.H., Kohlhagen, G., Pommier, Y. & Carrier, F. Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Res* **63**, 7291-300 (2003).
105. Marchion, D.C., Bicaku, E., Daud, A.I., Sullivan, D.M. & Munster, P.N. Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res* **65**, 3815-22 (2005).
106. Camphausen, K., Burgan, W., Cerra, M., Oswald, K.A., Trepel, J.B., Lee, M.J. & Tofilon, P.J. Enhanced radiation-induced cell killing and prolongation of gammaH2AX foci expression by the histone deacetylase inhibitor MS-275. *Cancer Res* **64**, 316-21 (2004).
107. Blaheta, R.A., Michaelis, M., Driever, P.H. & Cinatl, J., Jr. Evolving anticancer drug valproic acid: Insights into the mechanism and clinical studies. *Med Res Rev* **25**, 383-97 (2005).
108. Kuendgen, A., Strupp, C., Aivado, M., Bernhardt, A., Hildebrandt, B., Haas, R., Germing, U. & Gattermann, N. Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. *Blood* **104**, 1266-9 (2004).
109. Piekarz, R. & Bates, S. A review of depsipeptide and other histone deacetylase inhibitors in clinical trials. *Curr Pharm Des* **10**, 2289-98 (2004).
110. Piekarz, R.L., Robey, R.W., Zhan, Z., Kayastha, G., Sayah, A., Abdeldaim, A.H., Torrico, S. & Bates, S.E. T-cell lymphoma as a model for the use of histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: impact of depsipeptide on molecular markers, therapeutic targets, and mechanisms of resistance. *Blood* **103**, 4636-43 (2004).
111. Kelly, W.K., Richon, V.M., O'Connor, O., Curley, T., MacGregor-Curtelli, B., Tong, W., Klang, M., Schwartz, L., Richardson, S., Rosa, E., Drobnjak, M., Cordon-Cordo, C., Chiao, J.H., Rifkind, R., Marks, P.A. & Scher, H. Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously. *Clin Cancer Res* **9**, 3578-88 (2003).
112. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57 (1972).
113. Ellis, R.E., Yuan, J.Y. & Horvitz, H.R. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* **7**, 663-98 (1991).
114. Jacobson, M.D., Weil, M. & Raff, M.C. Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-54 (1997).
115. Schmitt, C.A., Fridman, J.S., Yang, M., Baranov, E., Hoffman, R.M. & Lowe, S.W. Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell* **1**, 289-98 (2002).
116. Ghobrial, I.M., Witzig, T.E. & Adjei, A.A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* **55**, 178-94 (2005).
117. Andersen, M.H., Becker, J.C. & Straten, P. Regulators of apoptosis: suitable targets for immune therapy of cancer. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 399-409 (2005).
118. Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* **91**, 443-6 (1997).
119. Savill, J. & Fadok, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**, 784-8 (2000).
120. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. & Wang, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 269-90 (1999).
121. Oehme, I. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe Universität (2004).
122. Kuwana, T. & Newmeyer, D.D. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 691-9 (2003).
123. Cory, S. & Adams, J.M. Killing cancer cells by flipping the Bcl-2/Bax switch. *Cancer Cell* **8**, 5-6 (2005).
124. Cory, S. & Adams, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**, 647-56 (2002).
125. Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I. & Green, D.R. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* **2**, 156-62 (2000).



126. Rupprecht, R., Reul, J.M., van Steensel, B., Spengler, D., Soder, M., Berning, B., Holsboer, F. & Damm, K. Pharmacological and functional characterization of human mineralocorticoid and glucocorticoid receptor ligands. *Eur J Pharmacol* **247**, 145-54 (1993).
127. Brattsand, R., Thalen, A., Roempke, K., Kallstrom, L. & Gruvstad, E. Development of new glucocorticosteroids with a very high ratio between topical and systemic activities. *Eur J Respir Dis Suppl* **122**, 62-73 (1982).
128. Dahlberg, E., Thalen, A., Brattsand, R., Gustafsson, J.A., Johansson, U., Roempke, K. & Saartok, T. Correlation between chemical structure, receptor binding, and biological activity of some novel, highly active, 16 alpha, 17 alpha-acetal-substituted glucocorticoids. *Mol Pharmacol* **25**, 70-8 (1984).
129. Beato, M., Herrlich, P. & Schutz, G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* **83**, 851-7 (1995).
130. Dieken, E.S., Meese, E.U. & Miesfeld, R.L. nti glucocorticoid receptor transcripts lack sequences encoding the amino-terminal transcriptional modulatory domain. *Mol Cell Biol* **10**, 4574-81 (1990).
131. Miesfeld, R.L. Molecular genetics of corticosteroid action. *Am Rev Respir Dis* **141**, S11-7 (1990).
132. Hollenberg, S.M. & Evans, R.M. Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* **55**, 899-906 (1988).
133. Bledsoe, R.K., Montana, V.G., Stanley, T.B., Delves, C.J., Apolito, C.J., McKee, D.D., Consler, T.G., Parks, D.J., Stewart, E.L., Willson, T.M., Lambert, M.H., Moore, J.T., Pearce, K.H. & Xu, H.E. Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* **110**, 93-105 (2002).
134. Danielian, P.S., White, R., Lees, J.A. & Parker, M.G. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *Embo J* **11**, 1025-33 (1992).
135. Durand, B., Saunders, M., Gaudon, C., Roy, B., Losson, R. & Chambon, P. Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *Embo J* **13**, 5370-82 (1994).
136. Novac, N. & Heinzl, T. Nuclear receptors: overview and classification. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **3**, 335-46 (2004).
137. Baulieu, E.E., Binart, N., Cadepond, F., Catelli, M.G., Chambraud, B., Garnier, J., Gasc, J.M., Groyer-Schweizer, G., Rafestin-Oblin, M.E., Radanyi, C. & et al. Are receptor-associated nuclear proteins associated with the earliest effects of steroid hormones? *Rev Esp Fisiol* **46**, 17-29 (1990).
138. Pratt, W.B. The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**, 297-326 (1997).
139. DeFranco, D.B. Navigating steroid hormone receptors through the nuclear compartment. *Mol Endocrinol* **16**, 1449-55 (2002).
140. Pratt, W.B., Silverstein, A.M. & Galigniana, M.D. A model for the cytoplasmic trafficking of signalling proteins involving the hsp90-binding immunophilins and p50cdc37. *Cell Signal* **11**, 839-51 (1999).
141. Drouin, J., Sun, Y.L., Tremblay, S., Lavender, P., Schmidt, T.J., de Lean, A. & Nemer, M. Homodimer formation is rate-limiting for high affinity DNA binding by glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* **6**, 1299-309 (1992).
142. Pei, L. Identification of a negative glucocorticoid response element in the rat type 1 vasoactive intestinal polypeptide receptor gene. *J Biol Chem* **271**, 20879-84 (1996).
143. Schaaf, M.J. & Cidlowski, J.A. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol* **83**, 37-48 (2002).
144. Leung, D.Y. & Bloom, J.W. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* **111**, 3-22; quiz 23 (2003).

145. Gaynon, P.S. & Carrel, A.L. Glucocorticosteroid therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Adv Exp Med Biol* **457**, 593-605 (1999).
146. Moalli, P.A. & Rosen, S.T. Glucocorticoid receptors and resistance to glucocorticoids in hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma* **15**, 363-74 (1994).
147. Alexanian, R. & Dimopoulos, M. The treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* **330**, 484-9 (1994).
148. Amsterdam, A. & Sasson, R. The anti-inflammatory action of glucocorticoids is mediated by cell type specific regulation of apoptosis. *Mol Cell Endocrinol* **189**, 1-9 (2002).
149. Reichardt, H.M., Kaestner, K.H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P. & Schutz, G. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* **93**, 531-41 (1998).
150. Hala, M., Hartmann, B.L., Bock, G., Geley, S. & Kofler, R. Glucocorticoid-receptor-gene defects and resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in human leukemic cell lines. *Int J Cancer* **68**, 663-8 (1996).
151. Geley, S., Hartmann, B.L., Hala, M., Strasser-Wozak, E.M., Kapelari, K. & Kofler, R. Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in human T-cell acute lymphoblastic leukemia CEM-C1 cells is due to insufficient glucocorticoid receptor expression. *Cancer Res* **56**, 5033-8 (1996).
152. Helmberg, A., Auphan, N., Caelles, C. & Karin, M. Glucocorticoid-induced apoptosis of human leukemic cells is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor. *Embo J* **14**, 452-60 (1995).
153. Thompson, E.B., Nazareth, L.V., Thulasi, R., Ashraf, J., Harbour, D. & Johnson, B.H. Glucocorticoids in malignant lymphoid cells: gene regulation and the minimum receptor fragment for lysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* **41**, 273-82 (1992).
154. Herrlich, P. Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1. *Oncogene* **20**, 2465-75 (2001).
155. Ravi, R. & Bedi, A. NF-kappaB in cancer--a friend turned foe. *Drug Resist Updat* **7**, 53-67 (2004).
156. Schmidt, S., Rainer, J., Ploner, C., Presul, E., Riml, S. & Kofler, R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ* **11 Suppl 1**, S45-55 (2004).
157. Greenstein, S., Ghias, K., Krett, N.L. & Rosen, S.T. Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. *Clin Cancer Res* **8**, 1681-94 (2002).
158. Larkin, J.E., Frank, B.C., Gavras, H., Sultana, R. & Quackenbush, J. Independence and reproducibility across microarray platforms. *Nat Methods* **2**, 337-44 (2005).
159. Jones, L.K. & Saha, V. Chromatin modification, leukaemia and implications for therapy. *Br J Haematol* **118**, 714-27 (2002).
160. Holleman, A., Cheok, M.H., den Boer, M.L., Yang, W., Veerman, A.J., Kazemier, K.M., Pei, D., Cheng, C., Pui, C.H., Relling, M.V., Janka-Schaub, G.E., Pieters, R. & Evans, W.E. Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med* **351**, 533-42 (2004).
161. Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R.P. & Canaani, E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* **315**, 550-4 (1985).
162. Wilbanks, A.M., Mahajan, S., Frank, D.A., Druker, B.J., Gilliland, D.G. & Carroll, M. TEL/PDGFBetaR fusion protein activates STAT1 and STAT5: a common mechanism for transformation by tyrosine kinase fusion proteins. *Exp Hematol* **28**, 584-93 (2000).
163. Deutsches Kinderkrebsregister, M., Jahresbericht 2004.
164. Pui, C.H., Schrappe, M., Ribeiro, R.C. & Niemeyer, C.M. Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 118-45 (2004).

165. Bostrom, B.C., Sensel, M.R., Sather, H.N., Gaynon, P.S., La, M.K., Johnston, K., Erdmann, G.R., Gold, S., Heerema, N.A., Hutchinson, R.J., Provisor, A.J. & Trigg, M.E. Dexamethasone versus prednisone and daily oral versus weekly intravenous mercaptopurine for patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Blood* **101**, 3809-17 (2003).
166. Silverman, L.B., Gelber, R.D., Dalton, V.K., Asselin, B.L., Barr, R.D., Clavell, L.A., Hurwitz, C.A., Moghrabi, A., Samson, Y., Schorin, M.A., Arkin, S., Declerck, L., Cohen, H.J. & Sallan, S.E. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood* **97**, 1211-8 (2001).
167. Schwartz, C.L., Thompson, E.B., Gelber, R.D., Young, M.L., Chilton, D., Cohen, H.J. & Sallan, S.E. Improved response with higher corticosteroid dose in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* **19**, 1040-6 (2001).
168. Ronghe, M., Burke, G.A., Lowis, S.P. & Estlin, E.J. Remission induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia: clinical and cellular pharmacology of vincristine, corticosteroids, L-asparaginase and anthracyclines. *Cancer Treat Rev* **27**, 327-37 (2001).
169. Frank, B.H., Pekar, A.H., Veros, A.J. & Ho, P.P. Crystalline L-asparaginase from *Escherichia coli* B. II. Physical properties, subunits, and reconstitution behavior. *J Biol Chem* **245**, 3716-24 (1970).
170. Ueno, T., Ohtawa, K., Mitsui, K., Kodera, Y., Hiroto, M., Matsushima, A., Inada, Y. & Nishimura, H. Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase. *Leukemia* **11**, 1858-61 (1997).
171. Silverman, L.B. & Sallan, S.E. Newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors and treatment. *Curr Opin Hematol* **10**, 290-6 (2003).
172. Pui, C.H., Pei, D., Sandlund, J.T., Campana, D., Ribeiro, R.C., Razzouk, B.I., Rubnitz, J.E., Howard, S.C., Hijiyama, N., Jeha, S., Cheng, C., Downing, J.R., Evans, W.E., Relling, M.V. & Hudson, M. Risk of adverse events after completion of therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* **23**, 7936-41 (2005).
173. Schrappe, M., Reiter, A., Ludwig, W.D., Harbott, J., Zimmermann, M., Hiddemann, W., Niemeyer, C., Henze, G., Feldges, A., Zintl, F., Kornhuber, B., Ritter, J., Welte, K., Gadner, H. & Riehm, H. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood* **95**, 3310-22 (2000).
174. Pegoraro, L., Matera, L., Ritz, J., Levis, A., Palumbo, A. & Biagini, G. Establishment of a Ph1-positive human cell line (BV173). *J Natl Cancer Inst* **70**, 447-53 (1983).
175. Schneider, U., Schwenk, H.U. & Bornkamm, G. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* **19**, 621-6 (1977).
176. Hurwitz, R., Hozier, J., LeBien, T., Minowada, J., Gajl-Peczalska, K., Kubonishi, I. & Kersey, J. Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. *Int J Cancer* **23**, 174-80 (1979).
177. Dhut, S., Gibbons, B., Chaplin, T. & Young, B.D. Establishment of a lymphoblastoid cell line, SD-1, expressing the p190 bcr-abl chimaeric protein. *Leukemia* **5**, 49-55 (1991).
178. Naumovski, L., Morgan, R., Hecht, F., Link, M.P., Glader, B.E. & Smith, S.D. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cell lines without classical breakpoint cluster region rearrangement. *Cancer Res* **48**, 2876-9 (1988).
179. Chou, T.C. & Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* **22**, 27-55 (1984).
180. Buchwald, M. Diplomarbeit, (2004).
181. Bernhard, D., Löffler, M., Hartmann, B.L., Yoshida, M., Kofler, R. & Csordas, A. Interaction between dexamethasone and butyrate in apoptosis induction: non-additive in thymocytes and synergistic in a T cell-derived leukemia cell line. *Cell Death Differ* **6**, 609-17 (1999).
182. Riml, S., Schmidt, S., Ausserlechner, M.J., Geley, S. & Kofler, R. Glucocorticoid receptor heterozygosity combined with lack of receptor auto-induction causes glucocorticoid resistance in Jurkat acute lymphoblastic leukemia cells. *Cell Death Differ* **11 Suppl 1**, S65-72 (2004).

183. Brill, B. Tierarzt am Georg-Speyer-Haus, Persönliche Mitteilung. (2002).
184. Edwards, M.C., Liegeois, N., Horecka, J., DePinho, R.A., Sprague, G.F., Jr., Tyers, M. & Elledge, S.J. Human CPR (cell cycle progression restoration) genes impart a Far- phenotype on yeast cells. *Genetics* **147**, 1063-76 (1997).
185. Delfino, D.V., Agostini, M., Spinicelli, S., Vito, P. & Riccardi, C. Decrease of Bcl-xL and augmentation of thymocyte apoptosis in GILZ overexpressing transgenic mice. *Blood* **104**, 4134-41 (2004).
186. Chen, H.L., Demiralp, B., Schneider, A., Koh, A.J., Silve, C., Wang, C.Y. & McCauley, L.K. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein exert both pro- and anti-apoptotic effects in mesenchymal cells. *J Biol Chem* **277**, 19374-81 (2002).
187. Yu, X., Siegel, R. & Roeder, R.G. Interaction of the B cell-specific transcriptional coactivator OCA-B and galectin-1 and a possible role in regulating BCR-mediated B cell proliferation. *J Biol Chem* (2006).
188. Chau, B.N., Cheng, E.H., Kerr, D.A. & Hardwick, J.M. Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds Bcl-xL and Apaf-1. *Mol Cell* **6**, 31-40 (2000).
189. Lee, M.H. & Yang, H.Y. Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancers. *Cell Mol Life Sci* **58**, 1907-22 (2001).
190. Umemoto, T., Yamato, M., Nishida, K., Yang, J., Tano, Y. & Okano, T. p57Kip2 is expressed in quiescent mouse bone marrow side population cells. *Biochem Biophys Res Commun* **337**, 14-21 (2005).
191. Hoshino, S., Imai, M., Mizutani, M., Kikuchi, Y., Hanaoka, F., Ui, M. & Katada, T. Molecular cloning of a novel member of the eukaryotic polypeptide chain-releasing factors (eRF). Its identification as eRF3 interacting with eRF1. *J Biol Chem* **273**, 22254-9 (1998).
192. Matsuda, A., Suzuki, Y., Honda, G., Muramatsu, S., Matsuzaki, O., Nagano, Y., Doi, T., Shimotohno, K., Harada, T., Nishida, E., Hayashi, H. & Sugano, S. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* **22**, 3307-18 (2003).
193. Moratz, C., Hayman, J.R., Gu, H. & Kehrl, J.H. Abnormal B-cell responses to chemokines, disturbed plasma cell localization, and distorted immune tissue architecture in Rgs1<sup>-/-</sup> mice. *Mol Cell Biol* **24**, 5767-75 (2004).
194. Moratz, C., Kang, V.H., Druet, K.M., Shi, C.S., Scheschonka, A., Murphy, P.M., Kozasa, T. & Kehrl, J.H. Regulator of G protein signaling 1 (RGS1) markedly impairs Gi alpha signaling responses of B lymphocytes. *J Immunol* **164**, 1829-38 (2000).
195. Donohoe, M.E., Beck-Engeser, G.B., Lonberg, N., Karasuyama, H., Riley, R.L., Jack, H.M. & Blomberg, B.B. Transgenic human lambda 5 rescues the murine lambda 5 nullizygous phenotype. *J Immunol* **164**, 5269-76 (2000).
196. Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J. & Williams, L.T. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* **278**, 294-8 (1997).
197. Burtnick, L.D., Urosov, D., Irobi, E., Narayan, K. & Robinson, R.C. Structure of the N-terminal half of gelsolin bound to actin: roles in severing, apoptosis and FAF. *Embo J* **23**, 2713-22 (2004).
198. Bustin, M., Catez, F. & Lim, J.H. The dynamics of histone H1 function in chromatin. *Mol Cell* **17**, 617-20 (2005).
199. Wang, Z., Malone, M.H., He, H., McColl, K.S. & Distelhorst, C.W. Microarray analysis uncovers the induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 23861-7 (2003).
200. Leonard, G.D., Fojo, T. & Bates, S.E. The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist* **8**, 411-24 (2003).
201. Schnipper, L. Clinical implications of tumor-cell heterogeneity. *N Engl J Med* **314**, 1423-31 (1986).
202. Szakacs, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C. & Gottesman, M.M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 219-34 (2006).

203. Esteller, M. CpG island methylation and histone modifications: biology and clinical significance. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 115-26 (2006).
204. Yang, H., Hoshino, K., Sanchez-Gonzalez, B., Kantarjian, H. & Garcia-Manero, G. Antileukemia activity of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid. *Leuk Res* **29**, 739-48 (2005).
205. Witzig, T.E., Timm, M., Stenson, M., Svingen, P.A. & Kaufmann, S.H. Induction of apoptosis in malignant B cells by phenylbutyrate or phenylacetate in combination with chemotherapeutic agents. *Clin Cancer Res* **6**, 681-92 (2000).
206. Morotti, A., Cilloni, D., Messa, F., Arruga, F., Defilippi, I., Carturan, S., Catalano, R., Rosso, V., Chiarenza, A., Pilatino, C., Guerrasio, A., Taulli, R., Bracco, E., Pautasso, M., Baraban, D., Gottardi, E. & Saglio, G. Valproate enhances imatinib-induced growth arrest and apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. *Cancer* **106**, 1188-96 (2006).
207. Bernhard, D., Ausserlechner, M.J., Tonko, M., Löffler, M., Hartmann, B.L., Csordas, A. & Kofler, R. Apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in human leukemic lymphoblasts. *Faseb J* **13**, 1991-2001 (1999).
208. Kovacs, J.J., Murphy, P.J., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.T., Nicchitta, C.V., Yoshida, M., Toft, D.O., Pratt, W.B. & Yao, T.P. HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell* **18**, 601-7 (2005).
209. Murphy, P.J., Morishima, Y., Kovacs, J.J., Yao, T.P. & Pratt, W.B. Regulation of the dynamics of hsp90 action on the glucocorticoid receptor by acetylation/deacetylation of the chaperone. *J Biol Chem* (2005).
210. Brady, H.J. Apoptosis and leukaemia. *Br J Haematol* **123**, 577-85 (2003).
211. Dartsch, D.C., Schaefer, A., Boldt, S., Kolch, W. & Marquardt, H. Comparison of anthracycline-induced death of human leukemia cells: programmed cell death versus necrosis. *Apoptosis* **7**, 537-48 (2002).
212. Pui, C.H., Relling, M.V., Campana, D. & Evans, W.E. Childhood acute lymphoblastic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* **6**, 161-80; discussion 200-2 (2002).
213. Ormerod, M.G. Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. *J Immunol Methods* **265**, 73-80 (2002).
214. Blaheta, R.A. & Cinatl, J., Jr. Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. *Med Res Rev* **22**, 492-511 (2002).
215. Sakajiri, S., Kumagai, T., Kawamata, N., Saitoh, T., Said, J.W. & Koeffler, H.P. Histone deacetylase inhibitors profoundly decrease proliferation of human lymphoid cancer cell lines. *Exp Hematol* **33**, 53-61 (2005).
216. Ploner, C., Schmidt, S., Presul, E., Renner, K., Schrocksnadel, K., Rainer, J., Riml, S. & Kofler, R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia. *J Steroid Biochem Mol Biol* **93**, 153-60 (2005).
217. Mellor, J. The dynamics of chromatin remodeling at promoters. *Mol Cell* **19**, 147-57 (2005).
218. Rosenfeld, M.G., Lunyak, V.V. & Glass, C.K. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev* **20**, 1405-28 (2006).
219. Metivier, R., Penot, G., Hubner, M.R., Reid, G., Brand, H., Kos, M. & Gannon, F. Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* **115**, 751-63 (2003).
220. Perissi, V. & Rosenfeld, M.G. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 542-54 (2005).
221. Abrams, M.T., Robertson, N.M., Yoon, K. & Wickstrom, E. Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by targeting the major splice variants of BIM mRNA with small interfering RNA and short hairpin RNA. *J Biol Chem* **279**, 55809-17 (2004).
222. Choi, J., Hwang, Y.K., Sung, K.W., Kim, D.H., Yoo, K.H., Jung, H.L. & Koo, H.H. Aven overexpression: association with poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* **30**, 1019-25 (2006).

223. Kamel-Reid, S., Letarte, M., Sirard, C., Doedens, M., Grunberger, T., Fulop, G., Freedman, M.H., Phillips, R.A. & Dick, J.E. A model of human acute lymphoblastic leukemia in immune-deficient SCID mice. *Science* **246**, 1597-600 (1989).
224. Liem, N.L., Papa, R.A., Milross, C.G., Schmid, M.A., Tajbakhsh, M., Choi, S., Ramirez, C.D., Rice, A.M., Haber, M., Norris, M.D., MacKenzie, K.L. & Lock, R.B. Characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia xenograft models for the preclinical evaluation of new therapies. *Blood* **103**, 3905-14 (2004).
225. Lock, R.B., Liem, N., Farnsworth, M.L., Milross, C.G., Xue, C., Tajbakhsh, M., Haber, M., Norris, M.D., Marshall, G.M. & Rice, A.M. The nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mouse model of childhood acute lymphoblastic leukemia reveals intrinsic differences in biologic characteristics at diagnosis and relapse. *Blood* **99**, 4100-8 (2002).
226. Uckun, F.M., Manivel, C., Arthur, D., Chelstrom, L.M., Finnegan, D., Tuel-Ahlgren, L., Irvin, J.D., Myers, D.E. & Gunther, R. In vivo efficacy of B43 (anti-CD19)-pokeweed antiviral protein immunotoxin against human pre-B cell acute lymphoblastic leukemia in mice with severe combined immunodeficiency. *Blood* **79**, 2201-14 (1992).
227. Uckun, F.M., Sather, H., Reaman, G., Shuster, J., Land, V., Trigg, M., Gunther, R., Chelstrom, L., Bleyer, A., Gaynon, P. & et al. Leukemic cell growth in SCID mice as a predictor of relapse in high-risk B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **85**, 873-8 (1995).
228. Messinger, Y., Reaman, G.H., Ek, O. & Uckun, F.M. Evaluation of temozolomide in a SCID mouse model of human B-cell precursor leukemia. *Leuk Lymphoma* **33**, 289-93 (1999).
229. Uckun, F.M., Waurzyniak, B.J., Sather, H.N., Sensel, M.G., Chelstrom, L., Nachman, J., Gaynon, P.S., Bostrom, B., Ek, O., Sarquis, M., Steinherz, P.G. & Reaman, G.H. Prognostic significance of T-lineage leukemic cell growth in SCID mice: a Children's Cancer Group study. *Leuk Lymphoma* **32**, 475-87 (1999).
230. Ek, O., Gaynon, P., Zeren, T., Chelstrom, L.M., Myers, D.E. & Uckun, F.M. Treatment of human B-cell precursor leukemia in SCID mice by using a combination of the anti-CD19 immunotoxin B43-PAP with the standard chemotherapeutic drugs vincristine, methylprednisolone, and L-asparaginase. *Leuk Lymphoma* **31**, 143-9 (1998).
231. Ek, O., Reaman, G.H., Crankshaw, D.L., Chelstrom, L.M., Myers, D.E. & Uckun, F.M. Combined therapeutic efficacy of the thymidylate synthase inhibitor ZD1694 (Tomudex) and the immunotoxin B43(anti-CD19)-PAP in a SCID mouse model of human B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* **28**, 509-14 (1998).
232. Shah, S.A., Halloran, P.M., Ferris, C.A., Levine, B.A., Bourret, L.A., Goldmacher, V.S. & Blattler, W.A. Anti-B4-blocked ricin immunotoxin shows therapeutic efficacy in four different SCID mouse tumor models. *Cancer Res* **53**, 1360-7 (1993).
233. Redenbaugh, J.E., Sato, S., Penry, J.K., Dreifuss, F.E. & Kupferberg, H.J. Sodium valproate: pharmacokinetics and effectiveness in treating intractable seizures. *Neurology* **30**, 1-6 (1980).
234. Vasudev, K., Das, S., Goswami, U. & Tayal, G. Pharmacokinetics of valproic acid in patients with bipolar disorder. *J Psychopharmacol* **15**, 187-90 (2001).
235. Louis, M., Rosato, R.R., Battaglia, E., Neguesque, A., Lapotre, A., Grant, S. & Bagrel, D. Modulation of sensitivity to doxorubicin by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in breast cancer cells. *Int J Oncol* **26**, 1569-74 (2005).
236. Karagiannis, T.C., Harikrishnan, K.N. & El-Osta, A. The histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, enhances radiation sensitivity and accumulation of gammaH2A.X. *Cancer Biol Ther* **4**, 787-93 (2005).
237. Karagiannis, T.C., Smith, A.J. & El' Osta, A. Radio- and chemo-sensitization of human erythroleukemic K562 cells by the histone deacetylase inhibitor Trichostatin A. *Hell J Nucl Med* **7**, 184-91 (2004).
238. Camphausen, K., Scott, T., Sproull, M. & Tofilon, P.J. Enhancement of xenograft tumor radiosensitivity by the histone deacetylase inhibitor MS-275 and correlation with histone hyperacetylation. *Clin Cancer Res* **10**, 6066-71 (2004).
239. Frei, E., 3rd, Elias, A., Wheeler, C., Richardson, P. & Hryniuk, W. The relationship between high-dose treatment and combination chemotherapy: the concept of summation dose intensity. *Clin Cancer Res* **4**, 2027-37 (1998).

240. Coyle, T.E., Bair, A.K., Stein, C., Vajpayee, N., Mehdi, S. & Wright, J. Acute leukemia associated with valproic acid treatment: a novel mechanism for leukemogenesis? *Am J Hematol* **78**, 256-60 (2005).
241. DiLiberti, J.H., Farndon, P.A., Dennis, N.R. & Curry, C.J. The fetal valproate syndrome. *Am J Med Genet* **19**, 473-81 (1984).
242. Nau, H., Hauck, R.S. & Ehlers, K. Valproic acid-induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug development, pharmacokinetics and possible mechanisms. *Pharmacol Toxicol* **69**, 310-21 (1991).
243. Bug, G., Gul, H., Schwarz, K., Pfeifer, H., Kampmann, M., Zheng, X., Beisert, T., Bohrer, S., Hoelzer, D., Ottmann, O.G. & Ruthardt, M. Valproic acid stimulates proliferation and self-renewal of hematopoietic stem cells. *Cancer Res* **65**, 2537-41 (2005).

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Das Nukleosom als Grundbaustein des Chromatins.....	1
Abbildung 1.2: Verpackungsstufen der DNA.....	2
Abbildung 1.3: Posttranslationale Modifikationen der Histonschwänze.....	5
Abbildung 1.4: Zusammenwirken von Chromatin- und DNA-modifizierenden Komplexen.....	7
Abbildung 1.5: Strukturformeln ausgewählter Histondeacetylase-Inhibitoren .....	12
Abbildung 1.6: Bindung von SAHA an ein HDAC-homologes Protein.....	13
Abbildung 1.7: HDACi induzieren Zellzyklusarrest, Differenzierung sowie Apoptose.....	14
Abbildung 1.8: Signalübertragungswege der Apoptose.....	18
Abbildung 1.9: Strukturformeln einiger Glucocorticoide.....	20
Abbildung 1.10: Struktur des Glucocorticoid-Rezeptors.....	21
Abbildung 1.11: Mögliche Mechanismen der GC-vermittelten Apoptose.....	23
Abbildung 1.12: Normale Hämatopoese.....	25
Abbildung 1.13: Strukturformeln von Daunorubicin und Vincristin.....	28
Abbildung 3.1: Integrität der RNA für die Genexpressionsanalyse.....	43
Abbildung 3.2: Probenvorbereitung und Hybridisierung des Affymetrix-Chips.....	44
Abbildung 3.3: Zellzyklusverteilung - ein Histogramm mit SubG1-Fraktion.....	46
Abbildung 3.4: Bestimmung von Apoptose mittels Annexin V / PI Färbung.....	48
Abbildung 3.5: Detektion von PE-konjugiertem anti-humanes CD10 Antikörper .....	50
Abbildung 4.1: Pilotversuche zur Behandlung mit Dexamethason, VPA und Butyrat.....	55
Abbildung 4.2: DNA-Leiter als Nachweis für Apoptose-Induktion in Nalm-6 Zellen.....	56
Abbildung 4.3: Bestimmung der zytotoxischen Wirkung von Dexamethason und VPA.....	57
Abbildung 4.4: Synergistische Apoptose-Induktion durch Dexamethason und VPA.....	58
Abbildung 4.5: Wechselwirkung zwischen Dexamethason und TSA.....	60
Abbildung 4.6: Dexamethason kombiniert mit TSA bei höheren Konzentrationen.....	60
Abbildung 4.7: VPA verstärkt die Zytotoxizität von Dexamethason in ALL-Zelllinien.....	61
Abbildung 4.8: Zusammenwirken von VPA und Dexamethason in SEM Zellen.....	62
Abbildung 4.9: Jurkat Zellen sind resistent gegenüber Dexamethason und Kombination mit HDACi...63	
Abbildung 4.10: Nachweis von Nalm-6 Zellen in der Milz von SCID Mäusen.....	64
Abbildung 4.11: Gewichtsverlauf des Infiltrationsexperiments mit Nalm-6 Mäusen.....	68
Abbildung 4.12: Gefrierschnitte der Milz zeigen massive Nalm-6 Infiltration.....	69
Abbildung 4.13: Durchflusszytometrische Detektion von Nalm-6 Zellen im Mausgewebe.....	70
Abbildung 4.14: VPA führt zur signifikanten Erhöhung der Wirkung von Dexamethason.....	73
Abbildung 4.15: Erhöhung der Überlebenswahrscheinlichkeit in Nalm-6 Mäusen.....	75
Abbildung 4.16: Synergistisches Zusammenwirken von VPA mit Vincristin bzw. L-Asparaginase.....	77
Abbildung 4.17: VPA verstärkt Zytotoxizität von Dexamethason, Vincristin und L-Asparaginase.....	78
Abbildung 4.18: VPA erhöht die Toxizität von Daunorubicin.....	79
Abbildung 4.19: Nachweis der Hyperacetylierung in Nalm-6 Zellen nach HDACi Behandlung.....	86



Abbildung 4.20: Nachweis von Caspase-Aktivierung in Nalm-6 Zellen nach Behandlung.....87

Abbildung 4.21: Aktivierung von Caspase 8 in weiteren leukämischen B-Zelllinien..... 88

Abbildung 4.22: Herunterregulation von Aven auf Proteinebene in Nalm-6 Zellen..... 88

Abbildung 4.23: Regulation von Aven in weiteren leukämischen B-Zelllinien.....89

Abbildung 4.24: Hochregulation von Bim auf Proteinebene in Nalm-6 Zellen.....90

Abbildung 5.1: HDACi-vermittelter Einfluss auf die Genexpression in Tumorzellen.....99

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Nalm-6 Infiltration von mauseigenem Knochenmark .....	66
Tabelle 4.2: Knochenmark- und Milz-Infiltration in den Kontroll-Gruppen.....	71
Tabelle 4.3: Knochenmark- und Milz-Infiltration in den Dexamethason-Gruppen.....	71
Tabelle 4.4: Knochenmark- und Milz-Infiltration in den Gruppen mit Wirkstoffkombination .....	72
Tabelle 4.5: Einfluss von HDACi und Dexamethason auf die Genexpression in Nalm-6 .....	81
Tabelle 4.6: Ergebnisse der 1. Genexpressionsanalyse .....	82
Tabelle 4.7: Ergebnisse der 2. Genexpressionsanalyse .....	83
Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse.....	101

## Anhang

- Lebenslauf
- Veröffentlichungen
- Danksagung
- Selbständigkeitserklärung
- Abkürzungsverzeichnis

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Alexandra Groß	geboren am 18. September 1973 in Dernbach
Friedhofstr. 3	ledig, ein Sohn (3 Jahre)
64683 Einhausen	

### Schulbildung

---

1980 bis 1984	Grundschule
1984 bis 1990	Realschule Montabaur

### Berufsausbildung und Berufspraxis

---

09/1990 bis 02/1993	Ausbildung zur Chemielaborantin, Hoechst AG in Frankfurt a.M.
02/1993 bis 08/1993	Methodenentwicklung in der Pharma-Qualitätskontrolle, Hoechst AG in Frankfurt a.M.

### Weiterbildung und Studium

---

09/1993 bis 06/1994	Fachoberschule Neuwied mit Abschluss Fachhochschulreife
09/1994 bis 11/1996	Chemie-Grundstudium und Diplom-Vorprüfung an der Universität/Gesamthochschule Siegen
11/1996 bis 09/1997	Beginn des Hauptstudiums der Chemie in Siegen

10/1997 bis 03/2001

Abschluss des Hauptstudiums mit Schwerpunkt  
Biochemie an der Universität Kaiserslautern

Titel der Diplomarbeit bei Prof. Dr. W. Trommer:  
„Entwicklung eines Selektionsverfahrens zur Unter-  
suchung neuer DNA-Bindungsprotein-Varianten“

04/2001 bis 09/2006

Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Heinzel  
am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main

## Veröffentlichungen

### Publikationen

Maurer, A. B., Wichmann, C., Gross, A., Kunkel, H., Heinzl, T., Ruthardt, M., Groner, B., and Grez, M. The Stat5-RARalpha fusion protein represses transcription and differentiation through interaction with a corepressor complex. *Blood* **99**, 2647-2652 (2002).

Groß, A., Bartsch, I., Buchwald, M., Heinzl, T. Synergistic induction of apoptosis in acute lymphatic leukemia (ALL) through VPA and Dexamethasone. *Forum DGK Sonderheft* **1**, 43 (2005).

### Posterpräsentation

1. Posterpreis beim 13. internationalen AEK/AIO Krebskongress der Deutschen Krebsgesellschaft in Würzburg (13.-16. März 2005):

Groß, A., Bartsch, I., Buchwald, M., Heinzl, T. Synergistic induction of apoptosis in acute lymphatic leukemia (ALL) through VPA and Dexamethasone.

## Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Thorsten Heinzl bedanken für das interessante Thema, die großzügige Bereitstellung von Material und Arbeitsplatz, die ausgesprochen freundliche Betreuung sowie für die gute Unterstützung bei der Umsetzung von eigenen Ideen.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Trommer, in dessen Arbeitskreis ich bereits meine Diplomarbeit durchführen durfte, möchte ich sehr dafür danken, dass er freundlicherweise nun auch noch die Betreuung meiner Dissertation durch die Technische Universität Kaiserslautern übernommen hat.

Ich möchte meiner Arbeitsgruppe und den Mitarbeitern des Georg-Speyer-Hauses für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Ingrid Bartsch, mit der ich einerseits Tränen gelacht und andererseits hoch motiviert zusammen gearbeitet habe. Für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Planung und der Durchführung der Studien am Mausmodell bin ich sehr dankbar. Bei meinem ehemaligen Diplomanden Marc Buchwald möchte ich mich bedanken, dass er sich so engagiert eingesetzt hat. Hervorheben möchte ich weiterhin Miryam Ducasse, die mir immer mal wieder weitergeholfen hat - im Labor wie in privaten Dingen. Maresa Eck und Dr. Boris Brill möchte ich für die technische Unterstützung bei den Tierversuchen danken. Bei Annemarie Schimpf bedanke ich mich, dass sie meine Zellen versorgt hat, wenn ich mal nicht da war.

Vor allem aber möchte ich meiner Familie danken. Meiner Mutter, die mich bereits während meines Studiums ganz wunderbar unterstützt hat und mich immer wieder motiviert und aufbaut, wenn es mal nicht so gut läuft. Meinem Vater, der immer da ist, wenn man ihn braucht. Meinen Eltern möchte ich auch dafür danken, dass sie mir tatkräftig dabei geholfen haben Promotion und Kind unter einen Hut zu bringen. Bei Sven möchte ich mich für seine unendliche Geduld und den liebevollen Zuspruch in schwierigen Phasen bedanken. Meinem dreijährigen Sohn Jan danke ich, dass er so ein aufgeschlossenes und humorvolles Kind ist und tapfer zur Tagesmutter gegangen ist, obwohl er viel lieber bei seiner Mama geblieben wäre.

Außerdem möchte ich meiner lieben Freundin Michaela danken, die mich während des Schreibens moralisch unterstützt hat und auch immer mal wieder als Tagesmutter für Jan eingesprungen ist.

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thorsten Heinzel am Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus selbständig durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Frankfurt, den



AF	Aktivierungsfunktion
AML	Akute Myeloische Leukämie
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
Butyrat	Natriumbutytrat
CBP	CREB-binding protein
cDNA	Komplementär-DNA
K	Kontrolle
Dex	Dexamethason
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	DNA, doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemilumescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fötale Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gravität, Gramm
GC	Glucocorticoid
GR	Glucocorticoidrezeptor
GRE	Glucocorticoidrezeptor "response element"
°C	Grad Celsius
h	Stunde
H3, H4	Histon H3, H4
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase

HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor
HMT	Histonmethyltransferase
HRP	Merretichperoxidase (horse raddish peroxidase)
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Kg, mg, µg	Kilogramm, Milligramm, Mikrogramm
K	Lysin
mM, µM, nM	millimolar, mikromolar, nanomolar
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NCoR	Nukleärer Corepressor
OD <sub>260/280</sub>	Optische Dichte bei 260 bzw. 280 nm Wellenlänge
PBS	phosphate buffered saline
R	Arginin
RAR	Retinsäurerezeptor
RPMI	Roosevelt park memorial institute medium
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid
SDS- PAGE	Sodiumdodecylsulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SMRT	Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Hormone receptor
Ser	Serin (Aminosäure)
Stat	Signal transducer and aktivator of transcription
Tab.	Tabelle
TAF <sub>II</sub> 250	TBP assoziierter Faktor 250
TBP	TATA-Box Binding Protein
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TSA	Trichostatin A
UV	Ultraviolettes Licht (100-400nm)
VPA	Valproinsäure