

Aus der Klinik für Klinik für Pädiatrie  
mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Synergistische Wirksamkeit von Bortezomib und  
Histondeacetylase-Inhibitoren in präklinischen Modellen  
der Akuten Lymphoblastischen Leukämie.“

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lorenz Bastian

aus Weimar

Datum der Promotion: 05. Dezember 2014

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	Seite 01
Abstrakt in Deutsch und Englisch	Seite 02
Eidesstattliche Versicherung einschließlich Anteilserklärung	Seite 06
Auszug aus der Journal Summary List	Seite 09
Publikation	Seite 10
Lebenslauf	Seite 24
Publikationsliste	Seite 25
Danksagung	Seite 26

## Abstrakt

**Einleitung:** Die Therapie von Kindern mit Rezidiven stellt die größte Herausforderung für die Heilung der B-Zellvorläufer akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter (BCP-ALL) dar. Eine weitere Intensivierung der konventionellen Chemotherapie ist durch die kumulative Toxizität und eine zunehmende Therapieresistenz limitiert. Zielgerichteter angreifende Substanzen wie Proteasom- oder Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) haben sich als gut verträglich erwiesen. Ihre Wirksamkeit als Einzelsubstanz ist jedoch begrenzt. Ziel dieser Dissertation war es zu untersuchen, inwiefern die Kombination solcher neuer Therapieansätze zu einer gesteigerten Wirksamkeit bei ALL-Rezidiven führt und welche molekularen Mechanismen daran beteiligt sind. Darüber hinaus ging es darum zu prüfen, wie solche Kombinationen in etablierte Chemotherapie-Regime integriert werden könnten.

**Methodik:** Die anti-proliferative und pro-apoptotische Wirksamkeit der Kombinationsbehandlung mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib (BTZ) und HDACi wurde in BCP-ALL-Zelllinien und in primären Leukämiezellen von Kindern mit ALL-Rezidiv in Mono- und Ko-Kulturen mit mesenchymalen Stromazellen von ALL-Patienten sowie Xenograft Mausmodellen untersucht. Mittels Genexpressions-Profilen und Validierung auf Protein-Ebene wurden Signalwege identifiziert, die wesentlich am Zustandekommen der Kombinationseffekte beteiligt sind.

**Ergebnisse:** Die kombinierte Behandlung mit BTZ und HDACi induzierte klar synergistische anti-proliferative und pro-apoptotische Effekte in BCP-ALL Mono- und Ko-Kulturen mit mesenchymalen Stromazellen. Der synergistische Effekt erforderte die gleichzeitige Applikation beider Substanzen. In Gegenwart etablierter Chemotherapie-Substanzen blieb der synergistische Effekt erhalten. Die Behandlung mit BTZ und HDACi begrenzte in Xenograft Mausmodellen der BCP-ALL ein Fortschreiten der Leukämie durch eine verminderte Infiltration von lymphatischen und extralymphatischen Geweben sowie die Induktion von Apoptose in Leukämiezellen. Die Analyse der zugrundeliegenden Signalwege ergab eine differenzielle Regulation von Genen im Zellzyklus-, JUN/MAPK-, PI3K/AKT-, p53-, ubiquitin-proteasom- und NF- $\kappa$ B Signalweg. Die Einzelbehandlung mit BTZ aktivierte das NF- $\kappa$ B signaling, während nur nach BTZ/HDACi Kombinationsbehandlung eine Induktion von Apoptose-relevanten NF- $\kappa$ B-Zielgenen zu beobachten war. Auf eine mögliche Apoptose-vermittelnde Rolle von NF- $\kappa$ B in diesem Kontext verwies auch die Beobachtung, dass BCP-ALL-Zellen von Patienten, die während der Chemotherapie ein Rezidiv erlitten, eine geringere Genexpression von NF- $\kappa$ B Untereinheiten zeigten, als von solchen, deren Erkrankung nach Abschluss der Therapie rezidierte.

**Schlussfolgerung:** Die synergistische Steigerung der therapeutischen Wirksamkeit ohne Zunahme der Toxizität sowie günstige Interaktionen mit ausgewählten Chemotherapie-Substanzen stellen die Grundlagen für eine Integration von BTZ und HDACi in gegenwärtige Therapieprotokolle der BCP-ALL zur Verfügung. Besondere Aufmerksamkeit erfordert dabei die Planung der Medikamenten-Gabe, da nur bei gleichzeitiger Applikation von BTZ und HDACi ein synergistischer Effekt zustande kam, während die Interaktion mit einzelnen Chemotherapeutika durch die Reihenfolge der Applikation bestimmt wurde.

## Abstract

**Purpose:** Relapse of disease remains the major challenge towards the cure of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). A further intensification of mostly genotoxic conventional therapy regimens is limited through cumulative toxicity and emerging resistance. More targeted therapeutic approaches such as proteasome or histone deacetylase inhibitors (HDACi) have shown a good tolerability with only limited activity as single agents. The aim of this thesis was to test the efficacy of combined treatment with such targeted drugs and to analyze the underlying mechanisms involved in the combined activity. Furthermore, the focus of my work was to determine how these combinations could be integrated into established chemotherapy regimens.

**Experimental Design:** The anti-proliferative and pro-apoptotic efficacy of combined treatment with the proteasome inhibitor bortezomib (BTZ) and HDACi was assessed using BCP-ALL cells from cell lines and primary patient samples in mono- and cocultures with mesenchymal stroma cells from ALL patients, as well as xenograft mouse models. Gene expression signatures with protein validation were performed to identify the pathways involved in the efficacy of combined treatment.

**Results:** Combined treatment with BTZ and HDACi induced anti-proliferative and pro-apoptotic effects in a clearly synergistic manner in BCP-ALL mono- and cocultures with stroma cells. The synergistic effect required concomitant application of both drugs and was still observed in the presence of conventional ALL chemotherapeutics. In xenograft mouse models of BCP-ALL, combined BTZ/HDACi treatment limited the expansion of leukemic disease through a reduced infiltration of lymphatic and extra-lymphatic tissues and induction of leukemia cell apoptosis. Analysis of the underlying mechanisms revealed the regulation of genes involved in cell cycle, JUN/MAPK-, PI3K/AKT-, p53-, ubiquitin-proteasome and NF- $\kappa$ B pathways. BTZ single treatment induced an activation of NF- $\kappa$ B signaling, whereas only after combined BTZ/HDACi treatment also an induction of apoptosis-related NF- $\kappa$ B target genes was observed, suggesting a possible role of NF- $\kappa$ B as pro-apoptotic mediator in this context. This might be further supported by the observation that ALL cells from patients who developed a relapse during the frontline chemotherapy showed lower NF- $\kappa$ B subunits gene expression as compared to relapses after chemotherapeutic treatment.

**Conclusion:** An increase of efficacy, which was achieved without an increase of toxic effects, and favorable interactions with selected chemotherapeutics provide the basis for an incorporation

of BTZ and HDACi into current BCP-ALL treatment regimens. However, scheduling of drug application warrants attention, since only concomitant application of BTZ and HDACi induced synergistic effects and interactions with certain chemotherapeutics depended on the sequence of drug exposure.

# Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lorenz Bastian, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Synergistische Wirksamkeit von Bortezomib und Histondeacetylase-Inhibitoren in präklinischen Modellen der Akuten Lymphoblastischen Leukämie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

## Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

**Publikation:** Bastian L, Hof J, Pfau M, Fichtner I, Eckert C, Henze G, Prada J, von Stackelberg A, Seeger K, Shalpour S, Synergistic activity of bortezomib and HDACi in preclinical models of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia via modulation of p53, PI3K/AKT, and NF- $\kappa$ B, *Clinical Cancer Research*, 2013; 19(6):1445-57

Beitrag im Einzelnen (bitte **ausführlich** ausführen):

Konzeption der Arbeit

\_\_\_\_\_  
An der Konzeption der Arbeit durch Dr. S. Shalpour und Prof. Dr. Dr. K. Seeger war ich in allen Stadien der Entwicklung beteiligt.

Synergistische Interaktion von BTZ und HDACi in ALL Zellen

\_\_\_\_\_  
In einer Analyse von Wirkstoffkombinationen aus HDACi mit etablierten chemotherapeutischen und neuen molekular zielgerichteten Substanzen habe ich die Kombination von HDACi mit Bor-

tezomib als am stärksten synergistisch wirksam identifiziert. Unter der Betreuung durch Dr. S. Shalpour habe ich diese Beobachtung in ALL-Zellen und gesunden hämatopoetischen Zellen untersucht (Zelllinien, Primärkulturen von Leukämiezellen, Murine Milz- und Knochenmarkzellen) und hinsichtlich der Wirkstoffinteraktionen mittels Combination Index und Fractional Product of Webb charakterisiert. Außerdem habe ich in diesem Zusammenhang die Bedeutung der sequenziellen Behandlung analysiert. Unter der Betreuung durch Dr. S. Shalpour habe ich die Behandlungseffekte in Ko-Kulturversuchen mit primären Leukämiezellen und Mesenchymalen Stroma Zellen ausgewertet. Die Versuche zur Wirksamkeit von BTZ/HDACi im Kontext etablierter Chemotherapeutika habe ich unter ihrer Betreuung geplant und ausgewertet. Die Durchführung erfolgte gemeinsam mit M. Pfau.

In Absprache mit Dr. I. Fichtner und unter der Betreuung durch Dr. S. Shalpour und Prof. Dr. K. Seeger habe ich die Behandlungsprotokolle für die Xenograft-Mausversuche erstellt. Die Daten hinsichtlich Wirksamkeit und Toxizität in den Xenograft-Versuchen (Tumorzellen- / Körpergewichtsentwicklung, Hämatotoxizität, Mortalität) habe ich statistisch ausgewertet. Unter der Betreuung von Dr. S. Shalpour habe ich im Xenograftmodell die Leukämiezell-Infiltration in Knochenmark und Milz mittels FACS analysiert. Die Leukämiezell-Infiltration in ZNS und Testes habe ich gemeinsam mit M. Pfau mittels QRT-PCR gemessen.

#### Analyse der zugrundeliegenden Signalwege

---

Gemeinsam mit Dr. S. Shalpour habe ich mittels Pathway-Analyse die am Zustandekommen des synergistischen Effekts beteiligten Signalwege identifiziert. Unter ihrer Betreuung habe ich einen Teil der funktionellen Validierungen durchgeführt und ausgewertet (Zellzyklusverteilung, FACS-Analyse der Expression von cl. Casp-3 und NF- $\kappa$ B-Phosphorylierung, NF- $\kappa$ B – ELISA). Einen weiteren Teil der funktionellen Validierungen habe ich gemeinsam mit M. Pfau durchgeführt und unter der Betreuung von Dr. S. Shalpour ausgewertet (IHC-Analyse der Xenograft-Tumoren hinsichtlich Apoptose und Mikrovaskularisierung) oder ausschließlich ausgewertet (Quantifizierung der Expression von p53, MDM2, Ubiquitin, NF- $\kappa$ B, ER-TR7 in der IHC).

#### Erstellung des Manuskripts und Veröffentlichung

---

Die Rohversion des Manuskripts sowie sämtliche Abbildungen habe ich erstellt. Unter der Betreuung durch Dr. J. Prada und Dr. S. Shalpour war ich an der weiteren Bearbeitung bis zur abschließenden Revision durch Prof. Dr. K. Seeger wesentlich beteiligt. Ebenfalls wesentlich betei-

ligt war ich an der Erstellung der weiteren Überarbeitungen im Rahmen des Review-Verfahrens sowie der zugehörigen Argumentationen (point-by-point replies).

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschul-  
lehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

---

# Auszug aus der Journal Summary List

ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>

Journal Citation Reports<sup>®</sup>

WELCOME ? HELP

2012 JCR Science Edition

Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)

Journals from: **subject categories ONCOLOGY** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by: **Impact Factor** SORT AGAIN

Journals 1 - 20 (of 196)

Page 1 of 10

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i>	ISSN	JCR Data <sup>j</sup>						Eigenfactor <sup>®</sup> Metrics <sup>j</sup>	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>®</sup> Score	Article Influence <sup>®</sup> Score
<input type="checkbox"/>	1	<a href="#">CA-CANCER J CLIN</a>	0007-9235	13722	153.459	88.550	27.040	25	3.3	0.05170	29.478
<input type="checkbox"/>	2	<a href="#">NAT REV CANCER</a>	1474-175X	32628	35.000	39.361	6.333	69	6.3	0.11405	17.530
<input type="checkbox"/>	3	<a href="#">LANCET ONCOL</a>	1470-2045	17005	25.117	21.856	6.536	153	3.7	0.07814	8.536
<input type="checkbox"/>	4	<a href="#">CANCER CELL</a>	1535-6108	22200	24.755	27.059	4.465	114	5.4	0.10904	14.067
<input type="checkbox"/>	5	<a href="#">J CLIN ONCOL</a>	0732-183X	128679	18.038	17.255	4.836	597	5.5	0.40051	5.909
<input type="checkbox"/>	6	<a href="#">NAT REV CLIN ONCOL</a>	1759-4774	2768	15.031	14.931	2.600	60	2.2	0.01839	6.027
<input type="checkbox"/>	7	<a href="#">JNCI-J NATL CANCER I</a>	0027-8874	37424	14.336	14.794	3.677	124	9.8	0.07738	6.441
<input type="checkbox"/>	8	<a href="#">LEUKEMIA</a>	0887-6924	18259	10.164	8.692	2.401	242	5.6	0.06028	3.212
<input type="checkbox"/>	9	<a href="#">CANCER DISCOV</a>	2159-8274	639	10.143	10.143	2.972	71	1.3	0.00456	6.196
<input type="checkbox"/>	10	<a href="#">BBA-REV CANCER</a>	0304-419X	3334	9.033	10.118	1.750	60	5.1	0.01141	3.478
<input type="checkbox"/>	11	<a href="#">CANCER RES</a>	0008-5472	143522	8.650	8.576	1.539	625	8.0	0.30487	3.084
<input type="checkbox"/>	12	<a href="#">CLIN CANCER RES</a>	1078-0432	65704	7.837	7.827	1.814	665	5.8	0.20006	2.687
<input type="checkbox"/>	13	<a href="#">CANCER METAST REV</a>	0167-7659	5016	7.787	10.088	0.853	68	5.9	0.01510	3.458
<input type="checkbox"/>	14	<a href="#">STEM CELLS</a>	1066-5099	18253	7.701	8.368	1.297	269	5.0	0.06791	2.744
<input type="checkbox"/>	15	<a href="#">J PATHOL</a>	0022-3417	14468	7.585	6.928	2.376	173	7.4	0.03474	2.427
<input type="checkbox"/>	16	<a href="#">J MAMMARY GLAND BIOL</a>	1083-3021	2120	7.524	5.838	1.200	25	7.3	0.00530	1.962
<input type="checkbox"/>	17	<a href="#">SEMIN CANCER BIOL</a>	1044-579X	4299	7.436	7.107	2.226	53	6.7	0.01096	2.584
<input type="checkbox"/>	18	<a href="#">ANN ONCOL</a>	0923-7534	22805	7.384	6.473	1.214	541	5.0	0.07238	2.092
<input type="checkbox"/>	19	<a href="#">ONCOGENE</a>	0950-9232	60526	7.357	7.180	2.218	458	7.7	0.14511	2.767
<input type="checkbox"/>	20	<a href="#">MOL ONCOL</a>	1574-7891	1193	6.701	6.379	0.917	60	2.9	0.00735	2.369



MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Journals 1 - 20 (of 196)

Page 1 of 10

[Acceptable Use Policy](#)  
Copyright © 2013 Thomson Reuters.

THOMSON REUTERS  
*Published by Thomson Reuters*

Unter 196 Journalen im Bereich Onkologie ist Clinical Cancer Research in der Sortierung nach dem Impact Factor an 12. Stelle mit einem Impact Factor von 7.837 und einem Eigenfaktor von 0.20006 gelistet.

(Stand: 2012 JCR Science Edition; <http://admin-apps.webofknowledge.com/JCR/JCR>).

## **Publikation**

Bastian L, Hof J, Pfau M, Fichtner I, Eckert C, Henze G, Prada J, von Stackelberg A, Seeger K, Shalapour S.

**Synergistic activity of bortezomib and HDACi in preclinical models  
of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia  
via modulation of p53, PI3K/AKT, and NF- $\kappa$ B.**

Clinical Cancer Research. 2013 Mar15;19(6):1445-57

<http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1511>

Ein Supplement zum Artikel ist online verfügbar.

<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/19/6/1445/suppl/DC1>

# **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

# Publikationsliste

## Artikel

**Bastian L**, Einsiedel HG, Henze G, Seeger K, Shalapour S. The sequence of application of methotrexate and histone deacetylase inhibitors determines either a synergistic or an antagonistic response in childhood acute lymphoblastic leukemia cells. **Leukemia**. 2011 Feb;25(2):359-61.

Shalapour S, Hof J, Kirschner-Schwabe R, **Bastian L**, Eckert C, Prada J, Henze G, Stackelberg A, Seeger K. High VLA-4 expression is associated with adverse outcome and distinct gene expression changes in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia at first relapse. **Haematologica**. 2011 Nov;96(11):1627-35.

**Bastian L**, Hof J, Pfau M, Fichtner I, Eckert C, Henze G, Prada J, von Stackelberg A, Seeger K, Shalapour S. Synergistic activity of bortezomib and HDACi in preclinical models of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia via modulation of p53, PI3K/AKT, and NF- $\kappa$ B. **Clinical Cancer Research**. 2013 Mar 15;19(6):1445-57.

## Kongressbeiträge

**Bastian L** et al. Antileukemia Activity of Histone Deacetylase Inhibitors Combined with Other Antineoplastic Agents in Cell Lines of B-cell Precursor Childhood ALL. *Monatsschr Kinderheilkd* (2006) 154:1037

**Bastian L** et al. Preclinical evaluation of histone deacetylase inhibitors (HDACi) as possible partners for combination therapy of acute childhood lymphoblastic leukemia. *Eur J Pediatr* (2007) 166:286

**Bastian L** et al. Synergistic interaction of bortezomib and histone deacetylase inhibitors in childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Ann Hematol*. 2011 Feb;90(Suppl1): S23.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Shabnam Shalpour für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung der Arbeit. Sie hat mich in schwierigen Phasen immer unterstützt und die Diskussionen an langen Laborabenden waren nicht nur für die Arbeit eine Bereicherung. Ihrer unermüdlichen Bereitschaft, aus Problemen ganz neue Auswege zu finden und diese hartnäckig bis zu einer erfolgreichen Lösung zu verfolgen, verdanke ich viel.

Prof. Dr. Dr. Karl Seeger danke ich für die Überlassung des Themas und die grundlegende Konzeption des Projekts. Prof. Dr. Günter Henze und Prof. Dr. Dr. Karl Seeger haben mir die Durchführung der Arbeit ermöglicht und mich durch ihr stets uneingeschränktes Vertrauen ermutigt. Darüber hinaus verdanke ich ihnen meine ersten Schritte in der Klinik.

Dr. Cornelia Eckert hat die gesamte Arbeit aufmerksam begleitet. Ihr gilt mein Dank für die stete Hilfsbereitschaft in wissenschaftlichen und praktischen Problemlagen sowie die anregenden Gespräche von Schreibtisch zu Schreibtisch.

Dr. Javier Prada möchte ich für die vielen hilfreichen wissenschaftlichen Anregungen und die geduldige Unterstützung bei der Darstellung von Ergebnissen, insbesondere bei der Abfassung des Manuskripts danken.

Für die kenntnisreiche technische Unterstützung bei der Umsetzung vieler Versuche gilt mein Dank Madlen Pfau. Besonders für die immunhistochemischen Analysen und Zellkulturversuche habe ich viel von ihr gelernt.

Für die Analysen der Genexpressionsprofile, die eine Voraussetzung für weitere Schritte meiner Arbeit waren, möchte ich Jana Hof danken, sowie für die Durchsicht des Manuskripts. Darüber hinaus gilt mein Dank allen Kollegen aus Forschungslabor und Klinik für ihre wissenschaftliche und praktische Unterstützung, insbesondere Dr. Arend von Stackelberg, Dr. Renate Kirschner-Schwabe, Dr. Hagen Graf Einsiedel und Wilhelmine Keune. Marzena Sosnowski bin ich für die technische Unterstützung in der ersten Projektphase und besonders für die Hilfe bei den ersten Schritten im Labor dankbar.

Dr. Iduna Fichtner möchte ich für die Durchführung der Mausversuche danken. Für die hilfreiche Durchsicht des Manuskripts gilt mein Dank Dr. Thomas Kammertöns und Maja Schreiber.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Eltern. Mit ihrem unbedingten Vertrauen haben sie mir die Freiheit geschenkt, eigene Interessen zu entdecken und zu verfolgen. In allen Phasen der Arbeit haben sie mich selbstlos unterstützt.

Danken möchte ich auch meinen Freunden, die mir während der Arbeit mit viel Geduld zur Seite standen. Mein besonderer Dank gilt Tatiana Kluger. Sie hat die Last schwieriger Zeiten wieder und wieder mit geschultert und mein Leben reicher gemacht.