

Aus dem Otto – Heubner – Centrum für Kinder und Jugendmedizin
Kliniken und Polikliniken für Kinderheilkunde und Kinderchirurgie
Klinik für Pädiatrie m. S. Onkologie / Hämatologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Histon-Deacetylase Inhibitoren (HDACi) als apoptoseinduzierende
und proliferationsinhibierende Substanzen im Zellkulturmodell der
akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) im Kindesalter**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lars Kawan aus Crivitz

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. K. Seeger

2. Prof. Dr. med. U. Kontny

3. Prof. Dr. med. J. F. Beck

Datum der Promotion: 30.11.2012

1	Einleitung	4
1.1	ALL im Kindesalter	4
1.2	Nukleosomen, Chromatin und Histone	4
1.3	Zelluläre Balance von Histon-Acetyltransferasen (HAT) und Histon-Deacetylasen (HDAC)	5
1.4	Pathologische Veränderungen in der HAT/HDAC-Balance bei Neoplasien	7
1.5	Histon-Deacetylase Inhibitoren (HDACi)	8
1.6	Wirkungsmechanismus, <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Aktivität von HDACi	8
1.6.1	Aktivierung des extrinsischen Apoptose-Signalwegs	9
1.6.2	Aktivierung des intrinsischen Apoptose-Signalwegs	9
1.6.3	Aktivierung von Tumor-Suppressorgenen	9
1.6.4	Weitere Effekte von HDACi	10
1.6.5	<i>in vivo</i> -Aktivität	10
1.7	HDACi in klinischen Studien	11
1.8	HDACi bei Leukämien	13
1.9	HDACi bei ALL im Kindesalter	15
2	Aufgabenstellung	16
2.1	Induzieren HDACi an ALL Zelllinien Histonhyperacetylierung?	16
2.2	Induzieren HDACi an ALL Zelllinien Apoptose?	16
2.2	Induzieren HDACi an ALL Zelllinien Proliferationsinhibition?	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Material	18
3.1.1	BCP-ALL Zelllinien	18
3.1.2	HDACi	18
3.1.3	Zellkultur	18
3.1.4	Proliferationsassay	18
3.1.5	Apoptoseassay	19
3.1.6	Western Blot	19
3.1.7	Chemikalien	22
3.1.8	Geräte	23

3.2	Methoden	25
3.2.1	Zellkultur	25
3.2.2	Western Blot	25
3.2.3	Durchflusszytometrie	27
3.2.4	Proliferationsmessung	28
3.2.5	Vorversuche mit Etablierung eines standardisierten Versuchsaufbaus	30
4	Ergebnisse	34
4.1	HDACi induzieren Histon H4-Hyperacetylierung an ALL Zelllinien	34
4.1.1	Histon H4-Hyperacetylierung ist zeit- und konzentrationsabhängig	34
4.1.2	Semiquantitative Auswertung der Histon H4-Western Blots	35
4.2	HDACi induzieren Apoptose an ALL Zelllinien	39
4.2.1	Apoptoseinduktion ist zeit- und konzentrationsabhängig	40
4.2.2	HDACi haben unterschiedliches apoptotisches Potential	42
4.2.3	Apoptosekinetik der verschiedenen ALL Zelllinien ist vergleichbar	44
4.2.4	IC 50 der verwendeten HDACi zur Stunde 96	45
4.3	HDACi induzieren Proliferationsinhibition an ALL Zelllinien	47
4.3.1	Proliferationsinhibition ist zeit- und konzentrationsabhängig	48
4.3.2	HDACi haben unterschiedliches proliferationsinhibitorisches Potential	49
4.3.3	Proliferationsinhibition der verschiedenen ALL Zelllinien ist vergleichbar	50
4.3.4	Reduktion der absoluten Zellzahl als Zeichen der Proliferationsinhibition	51
5	Diskussion	53
5.1	HDACi induzieren Histonhyperacetylierung an ALL Zelllinien	54
5.1.1	Nach 6 Stunden nachweisbare Histon H4-Hyperacetylierung	54
5.1.2	Histon H4-Hyperacetylierung ist zeit- und konzentrationsabhängig	54
5.1.3	Reduktion der Histon H4-Hyperacetylierung nach 24 Stunden	55
5.1.4	Histon H4-Hyperacetylierung ist HDACi-Substanzabhängig	56
5.1.5	Histon H4-Hyperacetylierung ist ALL Zelllinienunabhängig	56
5.2	HDACi induzieren Apoptose an ALL Zelllinien	57
5.2.1	Apoptoseinduktion ist zeit- und konzentrationsabhängig	57
5.2.2	Apoptoseinduktion ist HDACi-Substanzabhängig	58
5.2.3	Apoptoseinduktion ist ALL Zelllinienunabhängig	60

5.3	HDACi induzieren Proliferationsinhibition an ALL Zelllinien	61
5.3.1	Proliferationsinhibition ist zeit- und konzentrationsabhängig	61
5.3.2	MTT Assay statt Annexin V/Propidiumjodid FACS-Analyse	62
6	Zusammenfassung	63
7	Literatur	65
8	Anhang	71
8.1	Danksagung	71
8.2	Lebenslauf	72
8.3	Publikationsliste	73
8.4	Erklärung	74

1 Einleitung

1.1 ALL im Kindesalter

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. Trotz der guten Behandlungserfolge, die mit den gegenwärtigen Therapieprotokollen erzielt werden, erleiden circa 20 % der circa 500 jährlich in Deutschland neu diagnostizierten Kinder mit ALL ein Rezidiv. Die Ergebnisse der internationalen Studien zur Behandlung von Kindern mit Rezidiv einer ALL, ALL-REZ BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) zeigen, dass in diesem Falle eine risikoadaptierte, alleinige Chemotherapie trotz Intensivierung schlechter wirksam ist. Die Heilungschancen liegen bei nur 35-40%.¹ Aus diesem Grund ist die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze notwendig, die Erkenntnisse über die zugrundeliegenden Veränderungen in Leukämiezellen berücksichtigen.

1.2 Nukleosomen, Chromatin und Histone

Die doppelsträngige DNA lagert sich im Zellkern von Eukaryoten um basische Proteine, den sog. Histonen, zu einer übergeordneten Struktur zusammen, welche als Nukleosom bezeichnet wird. Ein Nukleosom besteht aus 146 bp DNA, die sich um ein Histonoktamer anordnen. Dieses Oktamer besteht aus zwei identischen Kopien der Histone (H) H2a, H2b, H3 und H4. Diese Histonproteine sind Grundbausteine der evolutionären Entwicklung und in zahlreichen Organismen stark konserviert.² Alle diese Histone besitzen an ihrem N-Terminus lysinreiche Aminosäure-Ketten. Die N-terminalen Enden der Histone umgeben die DNA-Doppelhelix und verändern durch Modifikation in Form von Acetylierung und Deacetylierung die Sekundär- und Tertiärstruktur der DNA durch direkte Wechselwirkung (z.B. Ladungsverteilung).³ Damit wird die Interaktion der DNA mit anderen transkriptionsregulierenden Proteinen beeinflusst, aus der gleichermaßen eine Modifikation der Translation resultiert. Prinzipiell geht man davon aus, dass eine Acetylierung die stark kondensierte Chromatinstruktur auflockert und dadurch die Transkription von vorher inaktivierten Teilen des Genoms ermöglicht.⁴ Schon vor über 40 Jahren⁵ wurde dieser Zusammenhang zwischen Histon-Acetylierung und gesteigerter Transkription festgestellt, aber erst in den letzten Jahren auf molekularer Ebene untersucht. Dabei wurde besonders die Wirkung von zwei Enzymklassen auf die Acetylierung und somit auf die Genexpression entdeckt.

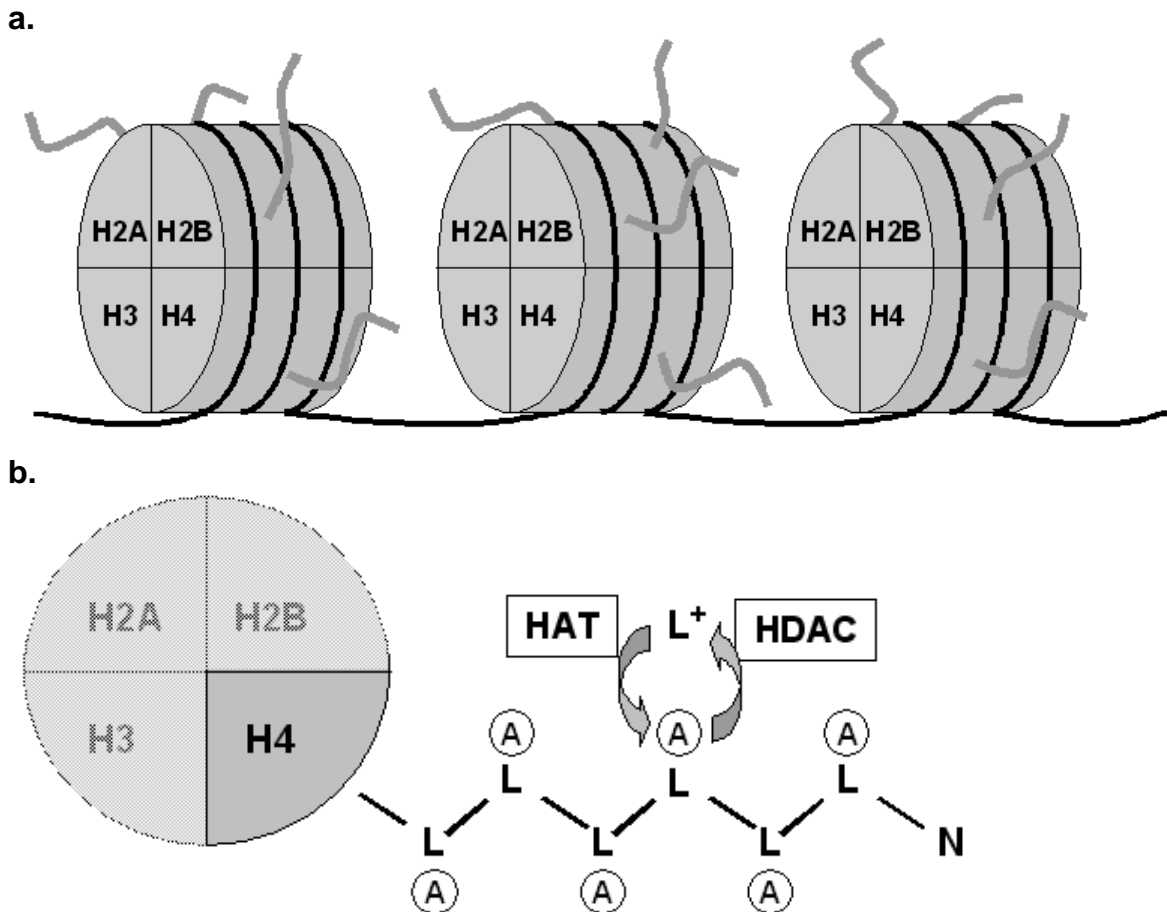


Abbildung 1: **a.** Schematische Struktur der Histonoktamere, bestehend aus H2A, H2B, H3 und H4 mit jeweils identischer Kopie, angelagerte DNA (schwarz), Lysinseitenketten (grau). **b.** Am Lysin (L) der N- terminalen Histonseitenketten findet die Acetylierung bzw. Deacetylierung statt. Durch die resultierende Ladungsverteilung ändert sich die Sekundär- und Tertiär-Struktur der DNA. (A) Acetylgruppe; (N) Aminoterminus

1.3 Zelluläre Balance von Histon-Acetyltransferasen (HAT) und Histon-Deacetylase (HDAC)

In eukarioten Zellen besteht eine feinregulierte Balance zwischen transkriptioneller Aktivierung durch HAT und Repression durch HDAC.^{6,7}

Die HAT können in mehrere Proteinfamilien eingeteilt werden. Dazu gehören die Gruppen GNAT, MYST, MOZ, YBF2/SAS3, SAS2, TIP60 und p300/CPB. HAT binden nicht direkt an die DNA, sondern als Teil eines Transkriptionsfaktor-Komplexes an eine Promoter-Region. Auch nicht histonspezifische, transkriptionsmodifizierende Enzyme können aktiviert werden, z.B. E2F, p53 und GATA1. Acetylierungen an diesen Faktoren ändern jeweils die Bindungseigenschaft der HAT an der jeweiligen DNA.⁸

HDAC sind unter anderem durch die Deacetylierung des Lysins am N-terminalen Histon für die Repression der Transkription verantwortlich. Dadurch wird eine positive Ladung

erzeugt, welche zu einer stärkeren Kondensierung des Chromatins führt.⁹ Vier verschiedene Klassen von HDAC sind bis jetzt identifiziert worden. Die sogenannte Klasse 1 HDAC, bestehend aus HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8 und HDAC11, diejenigen der Klasse 2: HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 und HDAC10.^{10,11} Beide Klassen wirken an verschiedenen Chromatinstellen und kommen nur im Zellkern (Klasse 1) oder sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma (Klasse 2) vor.¹² Die dritte Klasse der HDAC, welche unter anderem bei Mensch, Ratte und Maus identifiziert wurde, ist abhängig von Nikotinamid (NAD⁺).¹³ Zur 4. Klasse der HDAC zählt die erst vor wenigen Jahren entdeckte HDAC 11.¹⁴

Die Enzyme der Klasse 1, 2 und 4 HDAC besitzen eine homologe, 390 Aminosäure große, katalytische Region. Dieser Teil liegt in eukaryotischen Zellen konserviert vor und findet sich auch in Bakterien und Prokaryonten. Diese katalytische Domäne besteht aus einer tubulären Region mit einer hydrophoben Oberfläche und einer Zink²⁺ Basis. Durch Bindung der acetylierten Lysinseitenketten an das Zink-Kation kommt es mit Hilfe eines Wassermoleküls zur Hydrolyse und daraus folgend zur Deacetylierung. Dabei binden HDAC nicht direkt an Chromatin, sondern über Proteine und Proteinkomplexe (z.B. Sin3, NuRD, MEF2).¹⁵

Im Weiteren gibt es Hinweise dafür, dass bestimmte HDAC eine spezifische genregulative Rolle besitzen. So inhibieren zwar HDAC4 und HDAC5, nicht aber HDAC1 oder HDAC2, die Myogenese im Zusammenspiel mit MEF2 (myocyte enhancer factor 2) durch das Unterdrücken von MYOD- (myogenic differentiation) Aktivität.¹⁶ Andere Versuche mit Ratten deuten darauf hin, dass bestimmte HDAC der Klassen 1, 2 und 3 unterschiedliche, spezifische Funktionen im Zellzyklus, in der Biosynthese der Aminosäuren und im Carboanhydrase-Transport haben.¹⁷ In Kombination mit HDAC modellieren auch andere Typen von Proteinen oder Proteinkomplexen die Chromatinstruktur, wie z.B. das Methyl-CpG-binding protein und der ATP-dependent chromatin-remodelling complex.^{4,8} Eine weitere transkriptionsregulierende Eigenschaft der HDAC und HAT wird über die Deacetylierung von beispielsweise p53, E2F, GATA1, TFIIE und TFIIF vermittelt, was zu einer Regulation der Genexpression an anderer Stelle des Chromatins führt.^{10,11,18} Außerdem sind HDAC in Proteinkomplexen gefunden worden, welche in die Regulation des Zellzyklus und der Apoptose involviert sind. Dazu gehören Glucokortikoid Rezeptoren, DNA-Methyltransferase 1 und COUP-TF.¹⁹⁻²¹

1.4 Pathologische Veränderungen in der HAT/HDAC-Balance bei Neoplasien

Es existiert ein Zusammenhang zwischen der malignen Zellentartung und Veränderung in der HAT- bzw. HDAC-Aktivität. Gene, welche für HAT-Enzyme kodieren, sind bei verschiedenen hämatologischen und epithelialen Tumoren transloziert, überexprimiert, amplifiziert oder mutiert gefunden worden.²² Bei den zwei eng verwandten HAT, CBP und p300, sind in einigen Tumoren Veränderungen entweder durch Mutationen oder durch Translokationen aufgetreten. So wurde in kolorektalen, gastrischen und anderen epithelialen Neoplasien *p300* in mutierter und trunkierter Form nachgewiesen, wobei in diesen Fällen gehäuft das zweite Allel fehlte.²³ Ein Verlust der Heterozygotie von *CBP* führte gehäuft zu hepatozellulären Karzinomen.²⁴

In verschiedenen hämatologischen Neoplasien sind außerdem Fusionsgene, resultierend aus Translokationen von *CBP* und *p300*, identifiziert worden. Bei der Translokation *t(8;16)(p11;13)*, die häufig bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) Subtyp FAB M4/M5 vorliegt, kommt es durch die Translokation zu einer Fusion von CBP und MOZ (monozytic leukemia zinc finger protein), was zu einer veränderten Histonacetylierung beiträgt.²⁵ Eine weitere Form der Dysregulation von Histonacetylierung findet sich bei der akuten Promyelozyten-Leukämie (APL), wo das Fusionstranskript der Translokation *t(15;17)* (*PML-RAR α*) transkriptionshemmend wirkt, indem es einen Korepressor-komplex (mit u.a. HDAC3 und CBP/300) an die Ziel-DNA rekrutiert.^{26,27} Bei der AML FAB M2 findet man häufig eine chromosomale Translokation *t(8;21)*, die ein AML1-ETO Fusionsprotein erzeugt, ein potenter Transkriptionsrepressor, welcher mit HDAC 1 interagiert und wie bei einer TEL-AML1 Fusion die transkriptionsaktivierende Funktion von AML1 unterbindet.^{28,29} Schließlich kodiert in B-Zell Lymphomen das Onkogen *BCL6* für das Phosphorprotein BTB/POZ, welches HDAC benötigt, um als Transkriptionsrepressor zu wirken. Gleichzeitig führt eine Acetylierung durch p300 HAT zu einer *BCL6* Inaktivierung.³⁰

Obige Forschungsergebnisse legen daher nahe, die Aktivität von HDAC in Leukämiezellen zu inhibieren, um dadurch die gestörte Balance in der Histonacetylierung zu deblockieren und somit mögliche Effekte auf dem Gebiet der defekten Zellzykluskontrolle, der Differenzierung und der Apoptose zu erzielen.

1.5 Histon-Deacetylase Inhibitoren (HDACi)

Die ersten Substanzen, bei der eine Inhibition der Histon-Deacetylasen beobachtet wurde war, war Trichostatin A (TSA).³¹ Aufgrund von Toxizität und fehlender Spezifität von TSA wurden nachfolgend gezielt verschiedene neue Derivate synthetisiert und auf ihre Aktivität in Bezug auf Zellzyklusarrest, Differenzierung und Apoptose an Zelllinien getestet.

Bis auf wenige Ausnahmen können die aktuell bekannten HDACi in fünf Klassen eingeteilt werden.

1. kurzkettige Fettsäuren (z.B. Valproat, 4-Phenylbutyrate)
2. Hydroxaminsäuren (z.B. TSA, Suberoylanilide hydroxamic acid [SAHA], m-Carboxy cinnamic acid bishydroxamic acid [CBHA], Pyroxamid)
3. zyklische Tetrapeptide (z.B. FK228, Trapoxin B Derivate)
4. Benzamide (z.B. MS-275, CI-994).
5. elektrophile Ketone (Trifluormethylketon)

Die für eine effektive Inhibition erforderliche Konzentration der HDACi ist bei den einzelnen Substanzen unterschiedlich. Hydroxaminsäuren, zyklische Tetrapeptide und elektrophile Ketone haben schon in nanomolaren Mengen Einfluss auf die Aktivität der HDAC, Benzamide wirken erst in mikromolaren Konzentrationen und kurzkettige Fettsäuren wie Valproat erst in millimolaren Dosen.³²

1.6 Wirkungsmechanismus, *in vitro*- und *in vivo*-Aktivität von HDACi

Auf welche Art und Weise HDACi die Histon-Deacetylasen blockieren ist noch nicht abschließend geklärt. Die meisten HDACi scheinen allerdings durch reversible oder irreversible Hemmung den Substratzugang am Zink Ion zu blockieren und damit eine Histondeacetylierung zu verhindern.¹⁵ Relativ ausführlich wurde in diesem Zusammenhang die Wirkung von Hydroxaminsäuren auf die katalytischen Domänen von HDAC`s untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Hydroxaminsäuren am Boden der tubulären Region mit ihrer NHOH Gruppe am Zink Ion binden und durch ihren Ringkomplex die katalytische Region wie mit einer Kappe verschließen.³³

Ältere Versuche mit TSA- behandelten lymphoiden Zelllinien haben gezeigt, dass nur 2% von 360 untersuchten Genen differentiell exprimiert werden.³⁴ Neuere Studien belegen, dass circa 7 bis 10 % der Gene nach Behandlung unterschiedlicher Zelllinien mit

HDACi differentiell exprimiert werden.^{35,36} Dabei kommt es nach Behandlung von gesunden und neoplastischen Zellen mit HDACi bei beiden Zelltypen zwar zu einer Acetylierung der Histone. Eine Apoptose und Wachstumsinhibition tritt jedoch nur bei transformierten Zellen auf.^{37,38}

Das HDACi Apoptose und Zellzyklusarrest an neoplastischen Zelllinien induzieren, ist schon seit mehreren Jahren bekannt. Doch erst in den letzten Jahren ist es gelungen, unterschiedliche Signalwege zu differenzieren.

1.6.1 Aktivierung des extrinsischen Apoptose-Signalwegs

Mehrere Studien haben gezeigt, dass HDACi in transformierten Zellen die Expression von Mitgliedern der TNF- (Tumornekrosefaktor) Rezeptor-Familie induzieren, wie z.B. *FAS* und Todesliganden wie z.B. *TRAIL* (TNF-related apoptosis-inducing ligand) ein proapoptotisch wirkendes Protein und verantwortlich für einen G1-Phase Arrest. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung der extrinsischen Apoptosesignalwege somit zur Apoptose.^{39,40}

1.6.2 Aktivierung des intrinsischen Apoptose-Signalwegs

Andere Studien konnten die HDACi abhängige mitochondrial vermittelte Apoptose bei Tumorzellen zeigen. Eine Überexpression von *BCL 2* und *BCL-X_L* in Tumorzellen, verantwortlich für einen Block der zelleigenen Apoptosefähigkeit, kann durch HDACi aufgehoben werden. Gleichzeitig fand unter anderem eine Überexpression proapoptotischer Gene wie *Bim*, *Bax* und *Bak* bzw. Caspase 9 statt.^{41,42} Des Weiteren sind „BH3-only“-Proteine, verantwortlich für die Interaktion von proapoptotischen und nicht-apoptotischen Proteinen wie *Bid* und *Bmf*, in Tumorzellen nach HDACi Behandlung vermehrt aktiviert.^{43,44} Außerdem erhöhen HDACi die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies, welche das mitochondriale Membranpotential verändern und somit zu einer vermehrten Apoptose in Tumorzellen führen.⁴⁵

1.6.3 Aktivierung von Tumor-Suppressorgenen

Die HDACi Butyrat, TSA, Oxamflatin und SAHA reexprimieren das *CDKN1A*- (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) Gen in transformierten Zellen, welches für die Bildung von WAF1 (p21) verantwortlich ist. WAF1 inhibiert den Zellzyklus durch einen Arrest in

der G1/S-Phase. Sowohl TSA als auch SAHA induzieren eine Histonacetylierung mit Hilfe eines Transkriptionsfaktor-Komplexes über eine SP1-Bindungsstelle im Promoterbereich von *CDKN1A* und erhöhen dadurch die Transkriptionsrate.^{46,47} Außer einer Aktivierung von *CDKN1A* konnte in transformierten Zellen nach HDACi Inkubation auch eine Induktion von *CDKN2A*, verantwortlich für die Bildung des wichtigen G1-Phase Tumorsuppressorproteins p16, nachgewiesen werden. Diesen Genen ist eine regulative Funktion in der Zellzykluskontrolle gemeinsam.

1.6.4 Weitere Effekte von HDACi

Weiterhin haben HDACi auch antiangiogentische, antimetastatische und immunmodulatorische Eigenschaften an Tumorzellen. So führen HDACi zu einer „Down“regulation von VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor) und eNOS (endothelial nitric oxide synthase).⁴⁸ Desweiteren zeigt eine Studie, dass z.B. Butyrat bei Hepatozellulären Karzinomen die Metastasierung hemmt.⁴⁹ Und HDACi können die Immunogenität von Tumorzellen, unter anderem durch die vermehrte Expression von MHC (major histocompatibility complex) Klasse 1 und Klasse 2 Proteinen erhöhen.⁵⁰

1.6.5 *in vivo*-Aktivität

Bei vielen HDACi konnte bereits gezeigt werden, dass sie das Tumorwachstum bei Tieren, vorwiegend im Mausmodell, bremsen bzw. aufhalten können. Schon 1990 wurde erste Ergebnisse eines durch TSA induzierten Tumorwachstums-inhibierenden Effektes *in vivo* veröffentlicht.³¹ Im Nacktmausmodell als Inhibitor eines transplantierten androgenabhängigen Prostatatumors konnte SAHA das Tumorwachstum zu mehr als 97 % supprimieren. Schon nach 6 Stunden konnte eine Acetylierung von Histon H4 und H3 in den Tumorzellen nachgewiesen werden.⁵¹ Pyroxamid hatte im gleichen Versuchskontext den selben Effekt. Für CBHA konnte ähnliches im Nacktmausmodell, subkutan inokuliert mit Neuroblastomzellen, gemessen werden.⁵² Bei diesen Versuchen wurde sowohl für SAHA und Pyroxamid als auch für CBHA nur eine geringe oder gar keine Toxizität (Bestimmt anhand von Parametern wie Gewichtsveränderung, Allgemeinzustand und Blutbild.) beobachtet.

Die vielversprechenden Resultate in zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen legen die Notwendigkeit klinischer Studien nahe, um die antineoplastischen Eigenschaften der HDACi auch am Menschen zu überprüfen.

1.7 HDACi in klinischen Studien

Auch hier war Phenylbutyrat eine der ersten HDACi, die am Patienten angewendet wurden. Allerdings war das therapeutische Potential durch die bei hohen, klinisch notwendigen Dosierungen auftretende Toxizität stark limitiert.⁵³ Schon vor über zehn Jahren wurde bei einer 13-jährigen Patientin mit rezidivierender, therapieresistenter APL nach kombinierter Gabe von all-trans Retinsäure und Phenylbutyrat temporär eine kompletten Remission erreicht.⁵⁴ Zum jetzigen Zeitpunkt sind mindestens zwölf verschiedenen HDACi in über 100 klinischen Studien und Versuchen an Patienten mit soliden und hämatologischen Neoplasien in Erprobung, sowohl in Monotherapie als auch in Kombination mit z.B. Retinsäure, Bestrahlung, Paclitaxel und Gemcitabine. Eine Übersicht der aktuell in klinischen Studien verwendeten HDACi und ihren untersuchten Effekten an neoplastischen Zellen bietet die folgende Tabelle 1.

Substanzklasse	Substanz	bekannte Effekte an neoplastischen Zellen	Entwicklungsstadium
Hydroxaminsäuren	SAHA (Zolinza [®] , [Vorinostat])	D; PI; AI; AE; RSR; Autophagozytose; Mitosefehler; Seneszenz; Poliploidie	zugelassen bei kutanem T-Zell Lymphom (Merck)
	CBHA	PI; A; AI; AE	Phase 1
	LAQ- 824	PI; A; AI	Phase 1
	PDX- 101	PI; A	Phase 2
	LBH- 589	PI; A; RSR	Phase 1
	ITF2357	PI; A; AI	Phase 1
	PCI- 24781		Phase 1
zyklische Tetrapeptide	FK- 228	D; PI; A; AI; AE; RSR	Phase 2b Erprobung bei kutanem und peripherem T-Zell Lymphom (Gloucester)
kurzkettige Fettsäuren	Valproat	D; PI; A	Phase 2
	Phenylbutyrat	D; PI; A; AI; AE	Phase 2
	Butyrat	D; PI; A; AI; AE	Phase 2
	AN- 9	D; PI; A	Phase 2
Benzamide	MS- 275	D; PI; A; AI; AE; RSR	Phase 2
	MGCD0103	D; PI; A	Phase 2

Tabelle 1: Aktuell vorhandene Klinische Studien.(Stand 08/2010) ^{56,81}

Abkürzungen: D, Differenzierung; PI, Proliferationsinhibition; A, Apoptose, AI, Apoptose über intrinsischen Signalweg; AE Apoptose über extrinsischem Signalweg; RSR, Reaktivierung von Sauerstoffradikalen

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach ersten Auswertungen der oben genannten Studien Tumorwachstums-inhibierende Eigenschaften der unterschiedlichen HDACi in Substanzkonzentrationen nachweisbar sind, die keine bzw. tolerierbare Toxizitäten

für die Patienten induzieren.⁵⁶ Die am häufigsten beobachteten Nebenwirkungen sind Anämie, Thrombozytopenie, Müdigkeit, Übelkeit und Erbrechen.⁵⁷

1.8 HDACi bei Leukämien

Das bis vor wenigen Jahren noch grundlegende Modell für die Wirkung von HDACi bei der Leukämie ging von einer Aufhebung transkriptioneller Repression durch HDACi aus und resultierte aus intensiver Forschung an der AML M3 (APL). Bei der APL treten charakteristische Fusionsproteine auf, PML/RAR α (ProMyelocytic Leukemia gene / Retinoic Acid Receptor α) und PLZF (Promyelozytic Zinc Finger) /RAR α . Während bei PML/RAR α -positiver APL eine Therapie mit All-trans Retinsäuren (ATRA) die leukämischen Blasten ausdifferenzieren lässt, ist dies bei PLZF/RAR α -positiver APL nicht der Fall, weil hier auch der PLZF-Anteil des Fusionsproteins HDAC rekrutiert und so eine verstärkte Transkriptionssinhibition bewirkt. Diese kann aber durch HDACi in Kombination mit ATRA aufgehoben werden.²⁶

Die Tatsache, dass HDACi in vielen Leukämien und Lymphomen (AML, chronische myeloische Leukämie, myelodysplastisches Syndrom [MDS], MM, M. Hodgkin [HD], non-Hodgkin Lymphome [NHL]) auch ohne Expression aberranter Fusionstranskripte eine dosisabhängige Wachstumsinhibition und Apoptose induziert und die Kenntnis der unterschiedlichen Apoptose Signalwege (siehe Kapitel 1.6.) sind allerdings ein deutlicher Hinweis, dass dieser HDACi-Effekt nicht an das Vorhandensein aberranter Fusionstranskripte gekoppelt ist.⁵⁸⁻⁶⁰

Dennoch ist die Wirkung von HDACi an AML Zellen bisher am ausführlichsten untersucht worden. Sowohl in *in vitro*-Versuchen mit Zelllinien und kultivierten Patientenzellen als auch am *in vivo*-Mausmodell konnten unterschiedliche Tumorstillwachstumshemmende Effekte gezeigt werden. So führt beispielsweise SAHA als Monosubstanz an AML Zellen nur zur Apoptose, in Kombination mit ATRA zur Differenzierung der Blasten.⁶¹ Aufgrund vielversprechender Ergebnisse im Mausmodell mit zum Teil kompletter Remission nach Behandlung mit ATRA und HDACi⁶² begannen 2003 erste klinische Studien mit VPA als Monotherapie oder in Kombination mit ATRA bei AML und MDS. Auch hier zeigten sich vielversprechende Ergebnisse, so dass weitere Studien folgten und weiterhin folgen. (siehe Tabelle 2)⁶³

Bei der chronisch myeloischen Leukämie ist bekannt, dass die Aktivität der BCR-ABL Tyrosinkinase einige Mechanismen aktiviert, die für die Inhibition der Apoptose verantwortlich sind. Es konnte gezeigt werden, dass SAHA in CML-Zellen die Proteinexpression von BCR-ABL, c-Myc und HDAC3 reduziert, sowie im folgenden Apoptose induziert.⁶⁴

An kultivierten CLL-Patientenzellen, behandelt mit VPA, konnte eine Apoptoseinduktion beobachtet werden, welche sowohl über den extrinsischen als auch über den intrinsischen Signalweg vermittelt war. Dabei wurde unter anderem eine Hyperacetylierung des Histons H4 und eine Aktivierung der Caspase 8 und Caspase 9 beobachtet.⁶⁵ Des Weiteren sind unterschiedliche HDACi (VPA, FK228, Butyrat, etc.) als antineoplastische Substanzen bei Patienten mit CLL in Phase 1 und Phase 2 Studien in Erprobung. (siehe Tabelle 2)

Substanz	Kombinations-therapie	Neoplasie	Klinische Studie	Beginn
VPA p.o.	5-Azacytidin Retinsäure	High-Risk-MDS, AML	Phase 2	07/2006
VPA p.o.	Fludarabin	CLL	Phase 2	01/2008
SAHA p.o. (Vorinostat)		High-Risk-Lymphome nach autologer HSCT	Phase 1	11/2007
MS-275 p.o.		Lymphome	Phase 1	03/2001
MS-275 p.o.	Azacitidin	MDS, CML, AML	Phase 2	08/2006
MS-275 p.o.	GM-CSF (Sargramostim)	MDS, rezidivierende u/o refraktäre AML	Phase 2	04/2007
Pivaloyloxymethyl Butyrat i.v.		rezidivierende u/o refraktäre CLL	Phase 2	05/2004
LBH589 p.o.		rezidivierende u/o refraktäre Lymphome und Leukämien	Phase 1/2	02/2008

Tabelle 2: Zum Teil noch in Durchführung befindliche Klinische Studien (Stand 2009) nach www.clinicaltrials.gov (U.S. National Institutes of Health)

Abkürzungen: MDS, Myelodysplastisches Syndrom; AML, akute myeloische Leukämie; CML, chronische myeloische Leukämie; CLL, chronische lymphatische Leukämie; HSCT, hämatopoetische Stammzell- Transplantation

1.9 HDACi bei ALL im Kindesalter

Im Gegensatz zu den oben erwähnten, im Erwachsenenalter wesentlich häufigeren myeloischen bzw. chronischen Leukämieformen, sind HDACi bei den vorwiegend akuten lymphoblastischen Leukämien des Kindesalters bisher nur vereinzelt untersucht worden. Dabei wurde in einer Untersuchung die antiproliferative Wirkung von SAHA und VPA an 5 unterschiedlichen B- und T-ALL Zelllinien untersucht.⁶⁶ Eine weitere Arbeitsgruppe untersuchte die Effekte des Hydroxaminsäurederivates LAQ824 auf unterschiedliche B-cell precursor (BCP-) ALL Zelllinien hinsichtlich Apoptose und Histonacetylierung. Dabei war eine Überexpression von *p21*, in Folge ein G0/G1- Zellzyklusarrest und eine Zunahme der Caspase 9 und 3 Aktivierung auffällig.⁶⁷ Eine Arbeitsgruppe aus den Niederlanden konnte zeigen, dass eine TEL-AML1 Translokation in kultivierten ALL-Patientenzellen keinen Einfluss auf die zytotoxische Wirkung des HDACi FK228 hat.⁶⁰ Die Apoptoseinduktion der beiden HDACi MS275 und SAHA an B- und T-ALL Zelllinien sowie an kultivierten Patientenblasten wurde von einer anderen Arbeitsgruppe untersucht, welche weiterhin beschreibt, dass in Glukokortikoid-sensiblen und Glukokortikoid-unsensiblen T-ALL Zelllinien HDACi unterschiedliche Apoptose-Signalwege induzieren.⁶⁸

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass bisher noch keine umfangreichen Untersuchungen bezüglich Apoptoseinduktion, Proliferationsinhibition und Histonhyperacetylierung an BCP-ALL Zelllinien nach Behandlung mit unterschiedlichen HDACi vorliegen. *In vivo*-Daten am Mausmodell liegen, aufbauend auf die Resultate der hier vorgelegten Dissertation bisher nur als Ergebnis unserer Arbeitsgruppe vor.⁶⁹

2 Aufgabenstellung

Der Einfluss von HDACi ist bereits bei vielen verschiedenen Neoplasien untersucht und analysiert worden. Bisher haben sich erst wenige Arbeitsgruppen mit dem Effekt von HDACi auf ALL Zellen befasst. Der Zellzyklus-regulierende Effekt sowie die apoptoseinduzierende Wirkung von HDACi auf neoplastische Zellen könnte ein neuer, rationaler therapeutischer Ansatzpunkt in der Behandlung der ALL sein. Es soll daher an ALL Zelllinien geklärt werden, ob HDACi auch bei diesen Zellen eine Histonhyperacetylierung induzieren und sie apoptoseinduzierendes und proliferationshemmendes Potential besitzen. Daraus ergeben sich folgende konkrete Fragen:

2.1 Induzieren HDACi an ALL Zelllinien Histonhyperacetylierung?

- Zu welchem Zeitpunkt und bei welcher HDACi Konzentration findet erstmals eine wahrnehmbare Verstärkung der Histonacetylierung statt?
- Mit welcher Zeitkinetik verläuft der Effekt der Histonhyperacetylierung?
- In welchen Konzentrationen induzieren die verwendeten HDACi Histonhyperacetylierung?
- Erfolgt nach einmaliger Behandlung mit HDACi und folgender Histonhyperacetylierung wieder eine Abnahme der Histonacetylierung?
- Sind Unterschiede in der Histonacetylierung induziert durch verschiedene HDACi messbar?
- Haben die jeweiligen Zelllinienbesonderheiten (z.B. TEL/AML1 Translokation, Hyperdiploidie) Einfluss auf die Histonacetylierung?

2.2 Induzieren HDACi an ALL Zelllinien Apoptose?

- Mit welcher Zeitkinetik verläuft dieser Effekt (Apoptosekinetik)?
- In welchen Konzentrationen induzieren die verwendeten HDACi Apoptose?
- Haben die verwendeten HDACi unterschiedliches apoptoseinduzierendes Potential?
- Haben die jeweiligen Zelllinienbesonderheiten (z.B. TEL/AML1 Translokation, Hyperdiploidie) Einfluss auf die Apoptoseinduktion?
- Welche IC 50 weisen die Substanzen zur Stunde 96 auf?

2.2 Induzieren HDACi an ALL Zelllinien Proliferationsinhibition?

- Mit welcher Zeitkinetik verläuft dieser Effekt?
- In welchen Konzentrationen induzieren die verwendeten HDACi Proliferationsinhibition?
- Haben die verwendeten HDACi unterschiedliches proliferationshemmendes Potential?
- Haben die jeweiligen Zelllinienbesonderheiten (z.B. TEL/AML1 Translokation, Hyperdiploidie) Einfluss auf die Proliferationsinhibition?
- Ist ein Vergleich mit den Daten der Apoptosemessung möglich?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 BCP-ALL Zelllinien

Name	Besonderheiten	Spezies	Firma
Reh	t(12,21); TEL/AML1-positiv	Mensch/15 J.; weib	DSMZ
Z33	t(9;21); mBCR/ABL-positiv	Mensch/unbekannt	*)
MHH-CALL 2	Hyperdiploid	Mensch/15 J.; weibl	DSMZ
Nalm 6	Keine	Mensch/19 J.; männl.	DSMZ

DSMZ: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

*) : Diese BCP-ALL Zelllinie wurde uns von der Arbeitsgruppe S. Wellmann, Charite Berlin zur Verfügung gestellt.

3.1.2 HDACi

Hydroxaminsäuren:	SAHA **)
	CBHA **)
	Pyroxamid **)
kurzkettige Fettsäure:	Valproinsäure (VPA)

**) : Diese Substanzen wurden uns von Aton Pharma, Inc. im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt.

3.1.3 Zellkultur

PBS-Dulbecco	Biochrom AG Seromed®, Berlin, D.
RPMI, 20 mM HEPES, 0,532 g/L stable glutamin	Biochrom AG Seromed®, Berlin, D.
Fötale Bovines Serum (FBS)	Biochrom AG Seromed®, Berlin, D.
Penicillin (10.000 U/ml)	Biochrom AG Seromed®, Berlin, D.
Streptomycin (10.000 U/ml)	

3.1.4 Proliferationsassay

CellTiter 96™ AQ_{ueous} Non-radioactive Cell Proliferation Assay Promega, Madison, WI, USA

3.1.5 Apoptoseassay

Phosphatidyl Serine Detection Kit IQP-116F (including Annexin V FITC) IQ-Products, Groningen, Niederlande

3.1.6 Western Blot

Antikörper, Enzyme

Anti- acetyl Histone H4, Chip Grade (rabbit polyclonal antiserum) Upstate Biotech
Full-Range Rainbow™, Molecular Weight Markers (10000- 250000) RPN800 Amersham Biosciences
Betaactin Antikörper, rabbit Amersham Biosciences
2. Antikörper Antirabbit New England Biolabs
ECL-Kit RPN 2109 Amersham Biosciences

Verbrauchsmaterialien

PVDF Membran, Hybond-P Amersham Biosciences
Whatmann Filterpapier, Protean xi sice Bio-Rad
(extra thick blot paper)
Hyperfilm™ ECL Amersham Biosciense

NP-40 Lysispuffer

Tris-HCL 25 mM
NP-40 (IPEGAL) 1 %
NaCl 150 mM
EDTA 1 mM
DTT 1 mM
Pefablock SC 100 mM
Na₃VO₄ 100 mM
(Proteaseinhibitor- Cocktail Complete in 50 ml Puffer)

Sample Puffer (Lämmli)

Tris-HCL pH 6,8 62,5 mM
SDS 2 %

Glycerol	20 %
β-Mercaptoethanol	5 %
Bromphenolblau	0,5 %

Laufpuffer pH 8,3

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 %

Transferpuffer

Tris	20 mM
Glycin	150 mM
SDS	0,037 %
H ₂ O	auf 800 ml auffüllen
Methanol 100 %	20 %

Sammelgel 4 %

3 ml

Acrylamid 300	350 µl
Tris 0,5 M (pH 6,8)	315 µl
SDS 10 %	25 µl
H ₂ O	2,37 ml
APS 10 %	50 µl
Temed	2,5 µl

Trenngel 15 %

12 ml

Acrylamid 300	5,5 ml
Tris 1,5 M (pH 8,8)	2,75 ml
SDS 10 %	0,11 ml
H ₂ O	2,53 ml
APS 10 %	50 µl
Temed	5 µl

TBS (Tris-buffer-Saline) pH 7,6

Tris	20 mM
NaCl	137 mM
HCl	1 M
H ₂ O	auf 2 l auffüllen

Milch-TBS 3 %

TBS plus 1,8 g Milchpulver auf 60 ml

TBS-T 0,05 %

50 µl Tween auf 100 ml TBS

Coomassie Fbg

	500 ml
Coomasie R250 (0,05 %)	250 mg
Isopropanol (25 %)	125 ml
Essigsäure (10 %)	52 ml
H ₂ O	auf 500 ml auffüllen

3.1.7 Chemikalien

Tris	Biotech
NP-40 (IPEGAL)	Sigma
Pefablock SC	Biomol
EDTA	Sigma
DTT	Amersham
Na ₃ VO ₄	Flukan
Protease Inhibitor	Roche
Glycin	Roth
SDS	Roth
DMSO	Sigma
Ethanol 100 %	Merck
Salzsäure (HCL)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Betamercaptoethanol	Sigma
Amoniumpersulfat	Sigma
30 % Acrylamid/Bis Solution, 29:1 (3,3 % C)	Bio-Rad
APS	Sigma
Temed	Sigma
Non fat dry milk	Bio-Rad
Tween 20	Bio-Rad
Isopropanol	Merck
Essigsäure	Merck
Coomassie Brilliant Blue R-250	Bio-Rad
Methanol	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
H ₂ O, Molecular Biology Grade	Eppendorf
HEPES	Sigma
Kalziumchlorid	Sigma
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad
Trypan Blue	Biochrom
Pouceau S	Serva
Bicoll Separating Solution	Biochrom

3.1.8 Geräte

Brutschrank

Cytoperm 2 Heraeus Instruments, Berlin, D

Western Blot Zubehör

Elektrophoresekammer; Kämme usw., Bio-Rad

Mini-PROTEAN 3Cell

SemiDry Westernblot, TRANS-BLOT Bio-Rad

Magnetrührer, MR 3001 Heidolph

Schwenktisch, Rocking Platform Biometra

Apopotoseassay Zubehör

Fluoreszenzzytometer BD Becton and Dickinson

Zählkammern

Neubauer Labor Optik

Schiling/Kreutzer Assistent

pH-Meter

pH 330 WTW, Weilheim, D.

Multiwell-Plattenspektrometer

Multiskan Ascent Thermo Electron Corporation

Power Supply

Power PAC 1000 Bio-Rad, Göttingen, D.

Sterilbank

Safe 2010 Holten, Allerød, Dänemark

Mikroskope

473011-9901 Zeiss, Oberkochen, D.

Telaval 31 Zeiss, Oberkochen, D.

Vortexer

VF2

Janke & Kunkel GmbH & Co. KG,
Staufen, D.

Waage

444-33

Kern, Balingen, D.

Zentrifugen

Mikro 22R

Hettich, Tuttlingen, D.

Rotanta/R

Hettich, Tuttlingen, D.

Kühlgeräte

- 160°C Stickstofftank, ESPACE 330

AIR LIQUIDE

- 80°C Schränke, U725

New Brunswick Scientific

- 20°C Schränke

LIEBHERR

+ 4°C Schränke

LIEBHERR

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die Auswahl der von uns verwendeten ALL Zelllinien erfolgte aus mehreren Gründen. So sind ungefähr 85 % aller ALL im Kindesalter B-Vorläuferzell-ALL (BCP-ALL). Hier von sind wiederum circa 25 % TEL/AML1-positiv, circa 25 % hyperdiploid, circa 4 % mBCR/ABL positiv und circa 25 % ohne weitere, bisher bekannte, zytogenetische Besonderheit. Daher war es uns möglich mit nur vier Zelllinien einen Großteil pädiatrischer ALL darzustellen und zu untersuchen. Weiterhin wiesen die vier verwendeten Zelllinien vergleichbare Wachstumsgeschwindigkeiten bei äquivalenten Kulturbedingungen auf. Das ermöglichte sowohl die Rationalisierung von Arbeitsschritten als auch die bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

Alle Zelllinien wurden in RPMI 1640 mit Glutamin unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Sämtliche Zelllinien wurden alle 3 Tage neu passagiert. Dabei wurde das verbrauchte Medium durch Zentrifugation von den Zellen getrennt, die Zellzahl per Zählkammer und Trypanblau bestimmt und der neue Zellanatz auf $3 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Eine regelmäßige Kontrolle auf Mycoplasmenkontamination sowie eine regelmäßige Spontanapoptosemessung wurden durchgeführt.

3.2.2 Western Blot

3.2.2.1 *Prinzip des Western Blot*

Beim Western Blot werden Proteingemische, denaturiert durch SDS, auf einer Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert. Hierbei werden die Proteine aufgrund ihrer Größe nach dem Prinzip getrennt, dass größere Proteine weniger schnell wandern als kleine. (*Lämmli et al., 1970*) Danach werden sie auf eine Membran (PVDF-Membran) transferiert, das sogenannte „western blotting“. Für den elektrophoretischen Transfer sind zwei unterschiedliche Systeme im Einsatz, ein Semidry-Blot-System und ein Tank-Blot-System. Bei dem Transfer bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten und das an den Proteinen angelagerte SDS wird ausgewaschen. Daher können die Proteine renaturieren und wieder ihre Sekundär- und Tertiärstruktur einnehmen. Das ermöglicht die Bindung von Antikörpern. Zuvor müssen die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden, da sich

sonst die Antikörper an diese Bindungsstellen heften und einen spezifischen Nachweis von Antigenen unmöglich machen würden. Das Blockieren der freien Bindungsstellen erfolgt mit einem für die Antikörper nicht erkennbaren Protein. Dafür eignet sich z.B. Milchpulver. Um die spezifische Bindung der Antikörper an die Epitope des Antigens nachzuweisen, wird ein spezie-spezifischer sekundärer Antikörper verwendet. Dieser sekundäre Antikörper ist mit einem Enzym versehen. Dieses katalysiert nach Zugabe von Substraten, die bei einer enzymatischen Reaktion unter Lichtentwicklung zerfallen eine Chemolumineszenzreaktion. Das führt zu lokalisierten Belichtungen eines Röntgenfilms. Abhängig von der Menge an vorhandenem Protein kann die Stärke der Belichtung quantifiziert werden.

3.2.2.2 *Western Blot gegen acetyliertes Histon H4*

Für die acetylierten Histone H4, H3, H2A und H2B wurden spezifische Antikörper entwickelt, die einen Nachweis acetylierter Histone mit dem Verfahren des Western Blots möglich machen. Für diese Arbeit wurde in unserem Labor ein Western Blot gegen acetyliertes Histon H4 etabliert, da in unterschiedlichen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass die Detection des acetylierten Histon H4 mit einer hohen Sensitivität an acetyliertem Histon einhergeht.⁷⁰ Für den Transfer wird in diesem Versuchsaufbau ein sogenanntes Semidry-Blot-System verwendet, da sich dieses besonders gut für den Nachweis kleinerer Proteine eignet und die Größe der zu untersuchenden Histone bei 10-15 kDa lag

Um jeweils gleiche Proteinmengen der aufgetragenen Zellysate zu gewährleisten, wurde sowohl vor Beginn der Elektrophorese das Lysat mit Hilfe eines Proteinassays quantifiziert, als auch nach erfolgtem Transfer die Membran parallel zum Antikörper gegen acetyliertes Histon H4 zur Kontrolle mit einem Betaactin Antikörper inkubiert.

3.2.2.3 *Quantitative Proteinbestimmung*

Die Proteinbestimmung der Proben erfolgte mit einem Farbreagenz (Protein Assay, BioRad) basierend auf der Methode von Bradford (1976). Zur Messung des Proteingehaltes wurden 1 µl Probe mit 200 µl Farbstofflösung in einer 96-well Platte gemischt und 5 min bei Raumtemperatur bis zur Ausbildung stabiler Farbstoff-Protein-Komplexe inkubiert. Die Extinktion wurde im ELISA-Reader bei 595 nm gegen einen Leerwert gemessen und die Werte gegen eine BSA-Eichreihe kalibriert.

3.2.3 Durchflusszytometrie

3.2.3.1 *Prinzip der Durchflusszytometrie*

Eine etablierte Methode der Detektion von präapoptotischen, apoptotischen und nekrotischen Zellen ist die durchflusszytometrische Messung mittels eines *fluorescence activated cell sorters* (FACS).

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Untersuchung von Zellen in wässriger Suspension. Dabei werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom wie an einer Kette aufgereiht durch eine Messkammer geleitet. Die Messung erfolgt im Kreuzungspunkt zweier Laserstrahlen. Das dadurch entstehende Streulicht wird in verschiedenen Winkeln ausgewertet. Das Streulicht, welches im Engwinkel gemessen wird, ist ein Maß für die Zellgröße, während das seitwärts im rechten Winkel gemessene Licht ein Maß für die Zellgranularität ist. Diese beiden Parameter werden auch *forward-* und *side scatter* genannt. Außerdem ist es möglich, fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen Antigene auf der Zelloberfläche zu detektieren. Die Fluoreszenzfarbstoffe müssen ihr Absorptionsmaximum im Bereich der Wellenlänge des Lasers haben, das Emissionsspektrum hängt von der Art des eingesetzten Farbstoffes ab. Es können auch mehrere Farbstoffe simultan mit unterschiedlichen Emissionsspektren eingesetzt werden.

3.2.3.2 *Durchflusszytometrische Detektion apoptotischer Zellen mit Annexin V-FITC und Propidiumjodid*

Die Zellen werden mit Propidiumjodid und fluoreszenzmarkiertem Annexin V markiert. Propidiumjodid ist als Kernfarbstoff nur detektierbar, wenn durch Nekrose schon Teile der Zellwand zerstört sind. Annexin V hingegen bindet an Phosphatidylserin, ein Protein, welches schon in einer frühen Phase der Apoptose von der Innenwand der Zellmembran nach außen externalisiert wird. Somit ist eine genaue Bestimmung der Populationen an präapoptotischen [Annexin V pos./ Propidiumjodid neg.], apoptotischen [Annexin V pos./ Propidiumjodid pos.] und nekrotischen [Annexin V neg./ Propidiumjodid pos.] Zellen möglich.

Die in der Zählkammer gemessene Ablenkung des Laserstrahls durch die fluoreszenzmarkierten Zellen wird an einem Rechner ausgewertet und graphisch dargestellt. Dabei wird nach Messung der Zellsuspension jede einzelne fluoreszenzmarkierte Zelle in einem Diagramm mit logarithmisch skalierten x- (Annexin V) und y- (Propidiumjodid) Achse abgebildet.

Aufgrund einer auch in unbehandelten Zellen vorkommenden unspezifischen Markierung mit den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffen erfolgt zur quantitativen Analyse der Zellen eine Unterteilung des Diagramms in Quadranten. Hierbei wird nach Messung einer nur mit Annexin V gefärbten unbehandelten Nullkontrolle eine horizontale Grade in das Diagramm eingebracht. Zwischen dieser Grade und der x-Achse befinden sich mindestens 95 % der detektierten Zellen. Nach Messung einer nur mit Propidiumjodid angefärbten, unbehandelten Nullkontrolle wird gleichfalls eine vertikale Grade in das Diagramm eingebracht. Zwischen dieser Grade und der y-Achse befinden sich wiederum mindestens 95 % der dann detektierten Zellen. Die jeweilige Festlegung der Graden bzw. Quadranten muss aufgrund individueller Schwankungen der Fluoreszenzmarkierung unterschiedlicher Zellentitäten vor jeder unabhängigen Messung neu festgelegt werden.

Im Folgenden kann daher der Anteil der vitalen Zellen, welche weder mit Annexin V noch mit Propidiumjodid gefärbt, sind im linken unteren Quadranten dargestellt werden. Frühapoptotische Zellen werden im rechten unteren Quadranten abgebildet. Spätapoptotische und beginnend nekrotische Zellen finden sich im rechten oberen Quadranten und rein nekrotische Zellen im linken oberen Quadranten.

3.2.4 Proliferationsmessung

3.2.4.1 Prinzip des MTS Assay

Der „CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay“ ist ein quantitativer kolorimetrischer Assay zur Detektion der Zellviabilität und Proliferation. Es werden nur vitale Zellen detektiert, und das Signal ist abhängig vom Grad der Zellaktivierung.

Das Prinzip dieses Assays beruht auf dem Umsatz einer Tetrazolium-Verbindung (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, MTS) in ein wasserlösliches Formazan. Dabei wird MTS durch Zugabe von PMS (Phenazin-Methosulfat) als Elektronendonator durch die mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen zu dem wasserlöslichen Formazan reduziert. Dieses Formazan kann durch Absorption bei 490 nm nachgewiesen werden und dessen Konzentration ist dabei direkt der Menge an Dehydrogenasen und somit der Zellzahl proportional.

3.2.4.2 *MTS Assay mit ALL Zellen*

Für die mit dem MTS Assay durchgeführten Untersuchungen wurde zu jedem Messzeitpunkt eine Vierfachbestimmung vorgenommen und diese Messung in einem zweiten, unabhängigen Versuch wiederholt. Dazu wurden aus jedem Well jeweils 4 mal 100 µl entnommen und in eine 96 well Platte übertragen. Zu diesen 100 µl wurden dann jeweils 20 µl MTS Reagenz gegeben und danach die Mikrotiterplatte im Brutschrank bei 37°C für 2 bis 3 Stunden inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Absorption bei 492 nm am Multiwell-Plattenspektrometer.

Um aus den gemessenen Extinktionswerten die spezifische Zellzahl zu ermitteln, wurde in Vorversuchen für jede Zelllinie eine Verdünnungsreihe erstellt. Diese Werte wurden in Graphen aufgetragen und mithilfe von Microsoft Excel® eine Ausgleichsgrade und eine Gradengleichung errechnet. Anhand dieser Gleichung war es möglich einen Zellzahl/Extinktions Quotienten zu bestimmen, aus dem sich in der Folge die jeweiligen, absoluten Zellzahlen ermitteln ließen.

3.2.5 Vorversuche mit Etablierung eines standardisierten Versuchsaufbaus

In den von uns durchgeführten Vorversuchen konnten wir für die vier unterschiedlichen HDACi und vier BCP-ALL Zelllinien einen standardisierten Versuchsaufbau entwickeln. Damit war es möglich, die Zellkulturbedingungen zu optimieren und eine gleichzeitige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

3.2.5.1 *Kulturbedingungen*

Um für die ALL Zelllinien Kulturbedingungen mit einer Spontanapoptoserate von weniger als 10 % zu erreichen, stellte sich in den Vorversuchen ein Volumen von 20 ml Zellsuspension je 75 cm² Kulturflasche mit einer Ausgangskonzentration von 3×10^5 Zellen/ml als optimal heraus. Weiterhin zeigte sich, dass alle Zelllinien unabhängig von ihrer Entität einen Zeitraum der Anpassung benötigten, nachdem sie aus 75 cm² Kulturflaschen in 12-well Platten ausplattiert wurden. Durch die veränderten Kulturbedingungen (weniger Zellen, weniger Volumen) reagierten die Zellen für kurze Zeit sensibler auf äußere Manipulationen. Um diesen systematischen Fehler auszuschließen und um eine Reproduzierbarkeit der Versuche zu erreichen, wurden alle 4 verwendeten Zelllinien jeweils 3 Tage vor Zugabe der HDACi in 12-well Platten ausplattiert.

Vor dem Ausplattieren wurde die Zellsuspension den Kulturflaschen entnommen und in 50 ml FalconTubes bei 1500 U/min^{-1} zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert und frisches RPMI Medium mit FKS 10 % und Pen/Strep 1% in der Menge zugegeben, so dass die Zellsuspension eine Zellkonzentration von 2×10^5 Zellen pro ml besaß. In jedes Well einer 12 Wellplatte wurden 2 ml Zellsuspension, also 4×10^5 Zellen gegeben. Abhängig von der Zelllinie waren zum Zeitpunkt der HDACi Zugabe ca. $0,5-1,2 \times 10^6$ Zellen pro Well vorhanden.

3.2.5.2 *Zeitpunkte*

Um reproduzierbare Aussagen hinsichtlich der HDACi induzierten Apoptosewirkung und Proliferationshemmung zu treffen, stellte sich in den Vorversuchen ein Zeitabstand zwischen den jeweiligen Messpunkten von mindestens 24 Stunden als sinnvoll heraus. Bei früheren bzw. enger zusammenliegenden Zeitpunkten zeigten sich entweder keine oder nur geringe, unspezifische Veränderungen des Wachstums behandelter Zellen.

Zum Nachweis der Hyperacetylierung des Histons H4 wurden schon nach 6 Stunden Proben analysiert, da sich in den Vorversuchen schon zu diesem Zeitpunkt erste Änderungen in der Histonacetylierung zeigten.

Letzter Zeitpunkt für die Analyse der Zellkulturen war für die Apoptose- und Proliferationsmessung 96 Stunden nach Zugabe der HDACi, da zu späteren Zeitpunkten die erhöhte Spontanapoptose aufgrund des Nährstoffmangels reproduzierbare Aussagen zur Wirkung der HDACi nur eingeschränkt möglich machte. Für die Western Blot Analyse wurde der letzte Messzeitpunkt nach 48 Stunden gewählt, da zu späteren Zeitpunkten aufgrund der zunehmenden Nekrose nicht mehr genügend Zellprotein zur Verfügung stand.

3.2.5.3 Konzentrationenbereiche der HDACi

In mehrere Vorversuchen konnten wir außerdem zeigen, dass die Hydroxaminsäuren SAHA, CBHA und Pyroxamid im mikromolaren und die kurzkettige Fettsäure Valproat (VPA) im millimolaren Konzentrationsbereich eine apoptotische bzw. antiproliferative Wirkung an ALL Zelllinien induzieren. Daher wurden für die systematischen Untersuchungen die Hydroxaminsäuren in den Konzentrationen 1 μ M bis 10 μ M und VPA in den Konzentrationen 0,5 mM bis 2 mM verwendet (siehe Tabelle 3).

SAHA	1 μ M	2 μ M	4 μ M	8 μ M	10 μ M
CBHA	1 μ M	2 μ M	4 μ M	8 μ M	10 μ M
Pyroxamid	1 μ M	2 μ M	4 μ M	8 μ M	10 μ M
VPA	0,5 mM	1 mM	2 mM		

Tabelle 3: Verwendete Konzentrationen der HDACi.

3.2.5.4 Trägerlösung

Die Hydroxaminsäuren wurden uns von Aton Pharma, Inc. im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt und mussten für die Zellkulturversuche in Dimethyl Sulfoxide (DMSO) gelöst werden. Um eine mögliche Beeinflussung von DMSO als zytotoxische Substanz auf die Ergebnisse der Untersuchungen ausschließen zu können, wurde eine Analyse der Zytotoxizität durchgeführt. In diesen Vorversuchen konnten wir zeigen, dass eine Konzentration von DMSO zu Zellmedium im Verhältnis von 1 zu 1000 keine messbare Vitalitätsabnahme verursacht. Trotzdem wurde in den Versuchen mit den oben genannten Hydroxaminsäuren DMSO als Negativkontrolle verwendet, um eine

mögliche Beeinflussung der unterschiedlichen Messmethoden durch DMSO nicht als Effekt der HDACi zu verkennen.

VPA ist als kurzkettige Fettsäure wasserlöslich. Die Negativkontrollen waren somit jeweils unbehandelte Zellen.

3.2.5.5 *Versuchsaufbau*

Aufgrund der oben genannten Vorversuche zur Optimierung der Kulturbedingungen, Zeitpunkte, Konzentrationsbereiche und Trägerlösungen war es möglich einen standardisierten Versuchsaufbau zu erstellen. Dieser Versuchsaufbau machte es möglich trotz der Vielzahl an Einflussfaktoren eine Reproduzierbarkeit der Versuche und Ergebnisse zu gewährleisten. In der folgenden Abbildung 2 ist dieser Versuchsaufbau schematisch dargestellt.

Versuchsaufbau

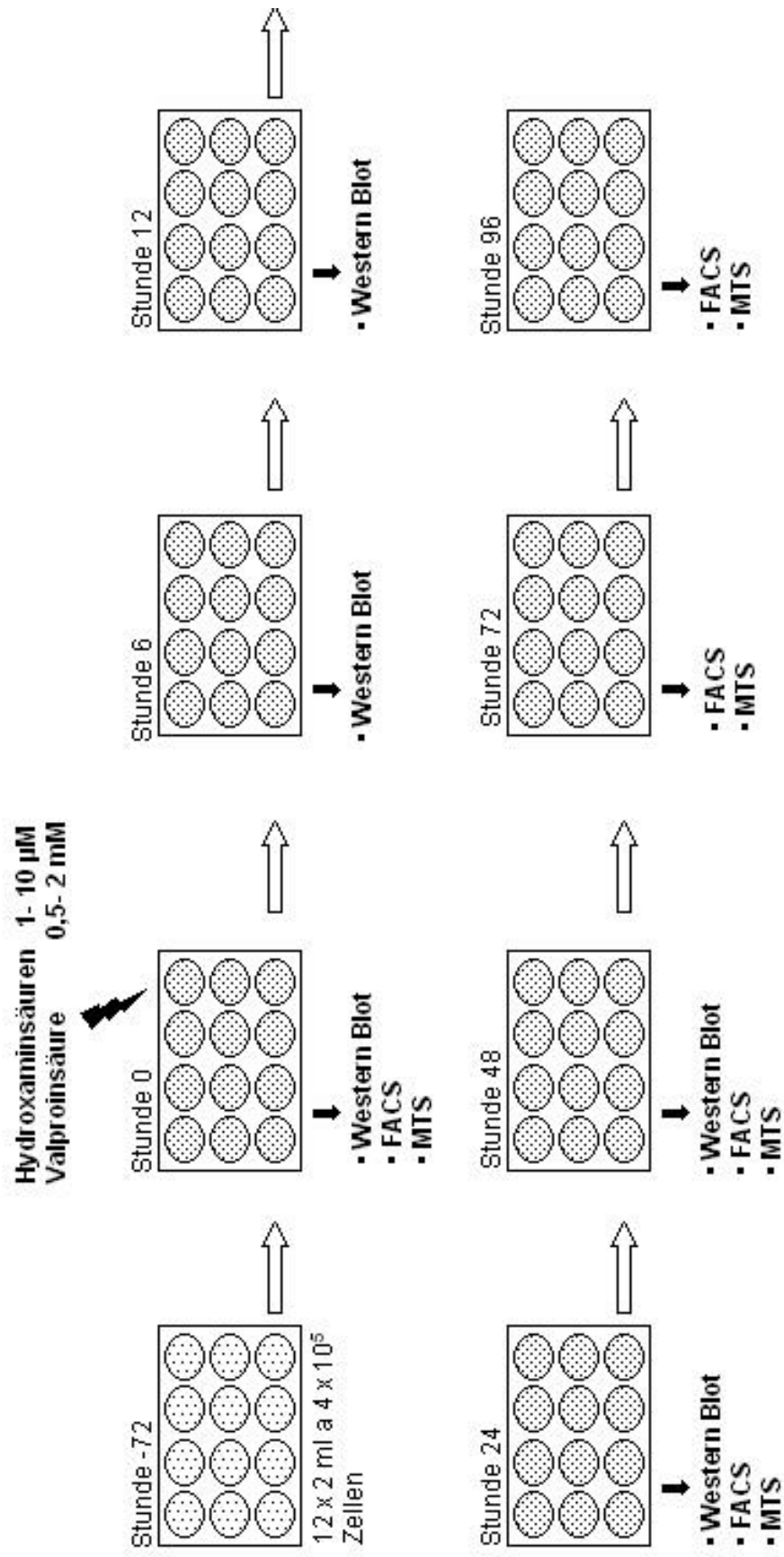


Abbildung 2: Grafische Darstellung des standardisierten Versuchsaufbaus. (siehe Kapitel 4.1.)

4 Ergebnisse

4.1 HDACi induzieren Histon H4-Hyperacetylierung an ALL Zelllinien

Nach Behandlung der Zelllinien mit den HDACi wurden die Zellen zu den Zeitpunkten 0, 6, 12, 24, 48 Stunden lysiert, die Proteine extrahiert, elektrophoretisch aufgetrennt und ein Western Blot mit einem Antikörper gegen acetyliertes Histon H4 durchgeführt.

Unsere Vorversuche zeigten, dass die Hydroxaminsäuren bei 1 μM und VPA bei 0,5 mM auch nach 96 Stunden nur eine geringgradige Apoptose an allen verwendeten Zelllinien induzierten (Reduktion der vitalen Zellen auf 80 %, siehe Abbildungen 9). Die Konzentration von 4 μM bei den Hydroxaminsäuren bzw. 1 mM bei VPA induzierten hingegen eine deutliche Apoptose. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Histon H4-Hyperacetylierung und Apoptose zu untersuchen wurden die systematischen Versuche daher mit den genannten Konzentrationen durchgeführt.

Alle HDACi induzieren an den vier verwendeten BCP-ALL Zelllinien eine Histon H4-Hyperacetylierung, die im Folgenden ausführlich erläutert wird.

4.1.1 Histon H4-Hyperacetylierung ist zeit- und konzentrationsabhängig

HDACi induzieren eine zeit- und konzentrationsabhängige Histon H4-Hyperacetylierung. Die folgende Abbildung 3 zeigt einen repräsentativen Versuch mit der Zelllinie Nalm 6 und der Hydroxaminsäure CBHA.

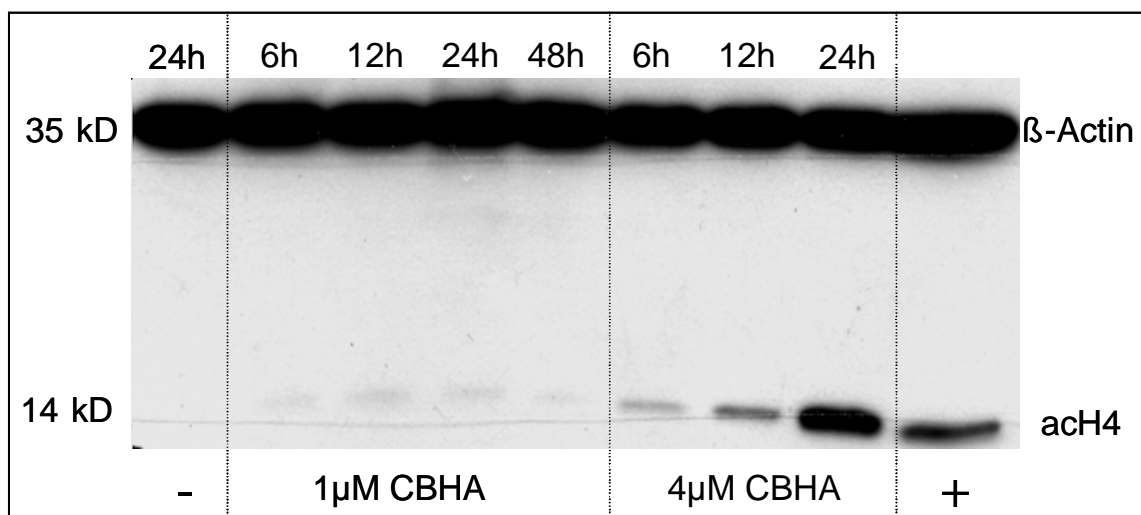


Abbildung 3: Histon H4-Hyperacetylierung an der Zelllinie Nalm 6 nach Behandlung mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (1 μM und 4 μM) CBHA über den Zeitraum von 24 bzw. 48 Stunden.

(-) Negativkontrolle: Protein unbehandelter Zellen zur Stunde 24. (+) Positivkontrolle: HELA Zellen behandelt mit Butyrat (5 mM für 24h). Gezeigt ist ein Versuch von jeweils zwei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Es zeigt sich, dass 6 Stunden nach Behandlung der Zellen mit HDACi eine schwache Bande bei 14 KD mit dem acH4-AK für beide Substanzkonzentrationen nachweisbar ist. Bei der niedrigeren Konzentration von 1 μ M CBHA bleibt diese schwache Bande über 48 Stunden konstant. Dies entspricht einer geringeren Menge an acetyliertem Histon-H4.

Die höhere Konzentration von 4 μ M CBHA induziert hingegen schon nach 12 Stunden eine sichtbar stärkere Bande und nach 24 Stunden ist für 4 μ M CBHA eine deutliche Bande detectierbar. Dies entspricht einer hohen Menge an acetyliertem Histon H4.

Weiterhin ist zu beobachten, dass für die verwendeten höheren Konzentrationen die deutlichste Zunahme der Histon H4-Acetylierung zwischen dem Zeitpunkt 12 und 24 Stunden liegt, wie die Abbildung 4 zeigt.

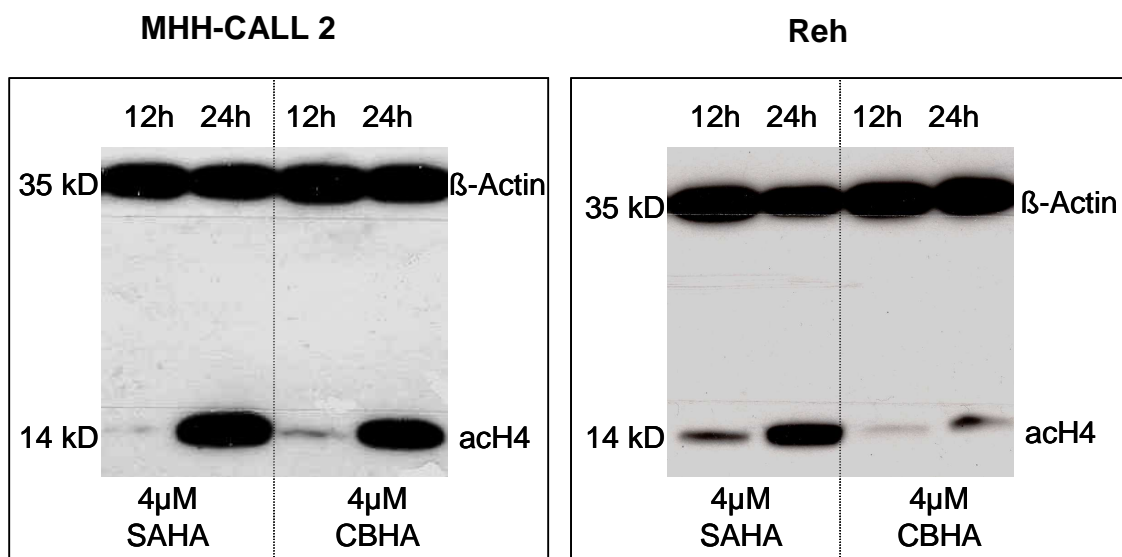


Abbildung 4: Histon H4-Hyperacetylierung an den Zelllinie MHH-CALL 2 (links) und Reh (rechts) nach Behandlung mit jeweils 4 μ M CBHA und 4 μ M SAHA im Zeitraum von 12 und 24 Stunden. Auf die Darstellung der Negativ- und Positivkontrolle wurde in dieser Abbildung verzichtet. Gezeigt ist ein Versuch von jeweils zwei unabhängig durchgeführten Versuchen.

4.1.2 Semiquantitative Auswertung der Histon H4-Western Blots

Um eine bessere Vergleichbarkeit und Übersichtlichkeit der vorhandenen Western Blot Resultate zu erreichen, wurde neben der rein deskriptiven eine semiquantitative Auswertung der Histon H4-Western Blots durchgeführt.

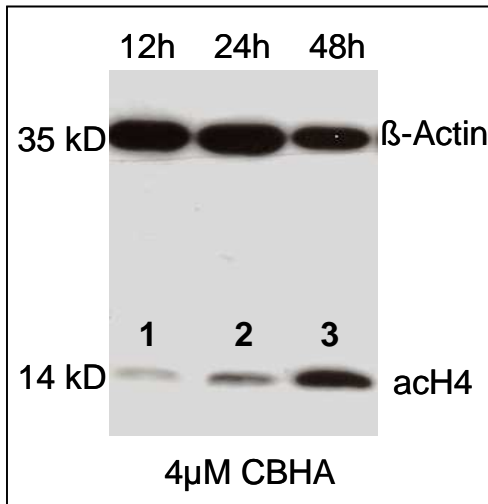


Abbildung 5: Histon H4-Hyperacetylierung an der Zelllinie Z33 nach Behandlung mit 4 μ M CBHA im Zeitraum von 12 bis 48 Stunden.

Wie in der Abbildung 5 zu sehen, wurde die Intensität der 14 kD-Bande in 4 Abstufungen kategorisiert. Dabei entspricht **1** einer *schwachen*, **2** einer *mittelgradigen* und **3** einer *stark* sichtbaren Bande. Die Ziffer **0** kennzeichnet keine sichtbare Histon H4-Acetylierung. Die unterschiedliche Intensitäten der 14 kD Banden wurden für jeden Versuch einzeln nach dem genannten Prinzip kategorisiert und die Werte in Tabellen übertragen.

In der folgenden Abbildung ist beispielhaft eine tabellarische Aufstellung der Histon H4-Acetylierungswerte für die Zelllinie Nalm 6 und die Substanz SAHA.

Versuch	Konzentration	Zeit			
		6h	12h	24h	48h
1. Versuch	1 μ M	1	2	3	2
	4 μ M	1	3	3	3
	Negativkontrolle				1
2. Versuch	1 μ M	1	1	1	2
	4 μ M	1	2	3	2
	Negativkontrolle				0

Tabelle 4: Semiquantitative Auswertung der Histon H4-Acetylierung an den Zelllinien Nalm 6 nach Behandlung mit 1 μ M und 4 μ M SAHA. Es sind Werte aus zwei unabhängigen Versuchen. Die zur Stunde 48 analysierten Negativkontrollen zeigen in manchen Western Blots eine schwache Bande.

Diese semiquantitative Darstellung ermöglicht die Ermittlung eines Acetylierungsgrades, der den Mittelwert aus den zwei unabhängigen Versuchen darstellt. Weiterhin ist es möglich einen Mittelwert aus unterschiedlichen Versuchen (z.B. eine Substanzkonzentration und vier Zelllinien) zu berechnen und als Acetylierungsgrad grafisch darzustellen, wie im Folgenden gezeigt.

In der Abbildung 6 ist zusammenfassend dargestellt, dass die drei Hydroxaminsäuren SAHA, CBHA, Pyroxamid und die kurzkettige Fettsäure VPA an ALL Zelllinien eine zeit- und konzentrationsabhängige Histon H4-Hyperacetylierung induzieren.

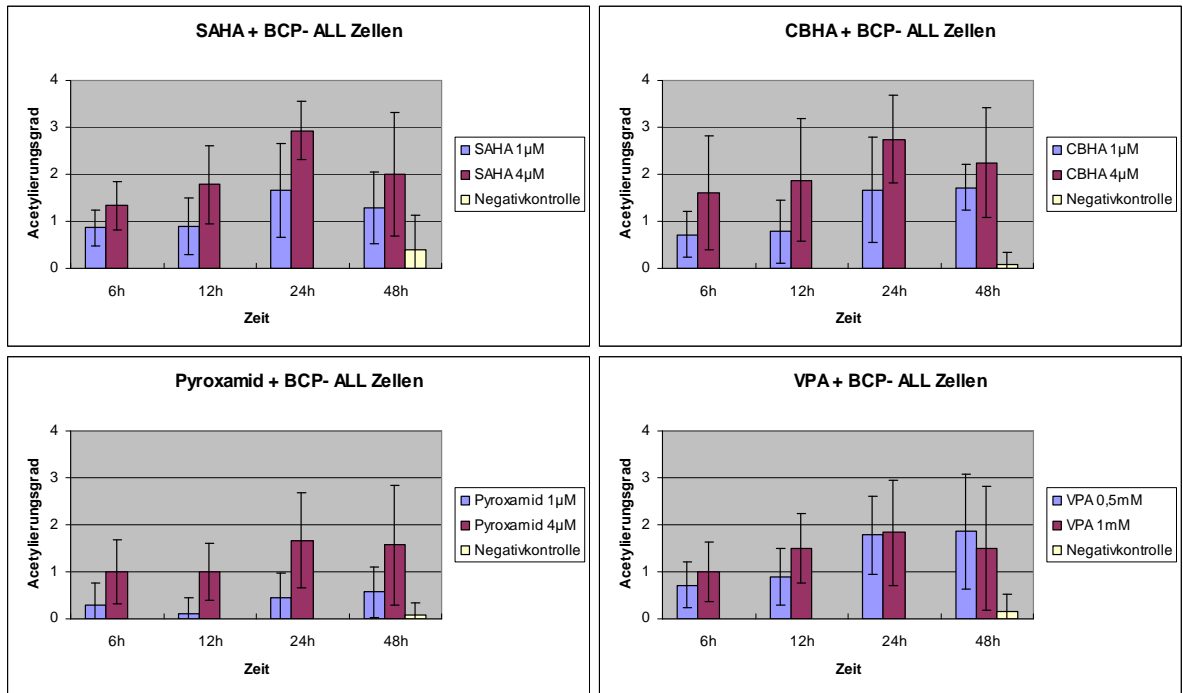


Abbildung 6: Semiquantitative Auswertung der Histon H4-Hyperacetylierung an den Zelllinien: Reh, Nalm 6, Z33, MHH-CALL 2 nach Behandlung mit SAHA, CBHA, Pyroxamid und VPA. Jeder Wert (Acetylierungsgrad) ist Mittelwert aus jeweils zwei unabhängigen Versuchen an vier verschiedenen Zelllinien. Die zur Stunde 48 analysierten Negativkontrollen zeigen in manchen Western Blots eine schwache Bande. Die Mittelwerte der Negativkontrollen sind in die Grafiken eingefügt.

Im Einzelnen lassen sich aus der Abbildung 6 folgende Aussagen ableiten:

1. Die Intensität der Hyperacetylierung ist abhängig von der Substanzkonzentration.

Die niedrige Substanzkonzentration von 1 µM zeigt bei den Hydroxaminsäuren SAHA, CBHA und Pyroxamid einen geringeren Acetylierungsgrad als die Substanzkonzentration von 4 µM. Für die kurzkettige Fettsäure VPA ist dieser Unterschied für die zwei gewählten Konzentrationen von 0,5 mM und 1 mM nur zu den beiden ersten Messzeitpunkten erkennbar.

2. Die Stärke der Hyperacetylierung ist abhängig vom Zeitraum der Behandlung.

Nach dem ersten Messzeitpunkt von 6 Stunden steigt die Menge an hyperacetyliertem Histon H4 über 12 und 24 Stunden in jedem der durchgeführten Versuche an. Besonders bei der jeweils höheren Substanzkonzentration ist die Zunahme der Acetylierung sichtbar. Auffällig ist die fehlende Zunahme der Histonacetylierung bei jeweils niedrigeren Konzentration von 1 µM bzw. 0,5 mM nach 12 Stunden. Hier ist ein Anstieg erst nach 24 Stunden zu beobachten.

3. Nach 48 Stunden ist die Histon H4-Hyperacetylierung nach Behandlung mit der jeweils höheren Hydroxaminsäurekonzentration rückläufig.

Die Hydroxaminsäurekonzentrationen von 1 μM führen nach 24 bzw. 48 Stunden zu einem konstanten Acetylierungsgrad. In den jeweils höheren Konzentrationen kommt es nach 48 Stunden dagegen zu einer Abnahme der Histon H4-Hyperacetylierung.

4. Die unterschiedlichen HDACi induzieren eine unterschiedlich starke Histon H4-Hyperacetylierung

SAHA und CBHA zeigen die stärkste Histon H4-Hyperacetylierung zur Stunde 24, sowie in der Folge einen Rückgang der Acetylierung zur Stunde 48. Pyroxamid als weitere Hydroxaminsäure ist hinsichtlich der hyperacetylierenden Wirkung schwächer und zeigt in den ersten 12 Stunden auch in der höheren Konzentration nur einen Acetylierungsgrad von 1.

Die Grafik der Histonacetylierenden Wirkung von VPA zeigt, dass Valproat als kurzkettige Fettsäure in den gewählten Konzentrationen ein schwächeres Potential bezüglich der Histonacetylierung besitzt. Zur Stunde 48 wird auch in der höheren Konzentration nur ein Acetylierungsgrad von 1 bis 2 erreicht.

Auf eine alleinige Darstellung der vier ALL Zelllinien hinsichtlich einer möglichen differentiellen Histon H4-Hyperacetylierung ist in dieser Abbildung verzichtet worden, da keine zelllinienspezifischen Unterschiede detektierbar waren.

4.2 HDACi induzieren Apoptose an ALL Zelllinien

Wir untersuchten die apoptoseinduzierende Wirkung der HDACi an BCP-ALL Zelllinien mittels eines durchflusszytometrischen (FACS, fluorescence activated cell sorters) Annexin V/Propidiumjodid-Assay.

Ein beispielhaftes Ergebnis einer durchflusszytometrischen Analyse zeigt die Abbildung 7.

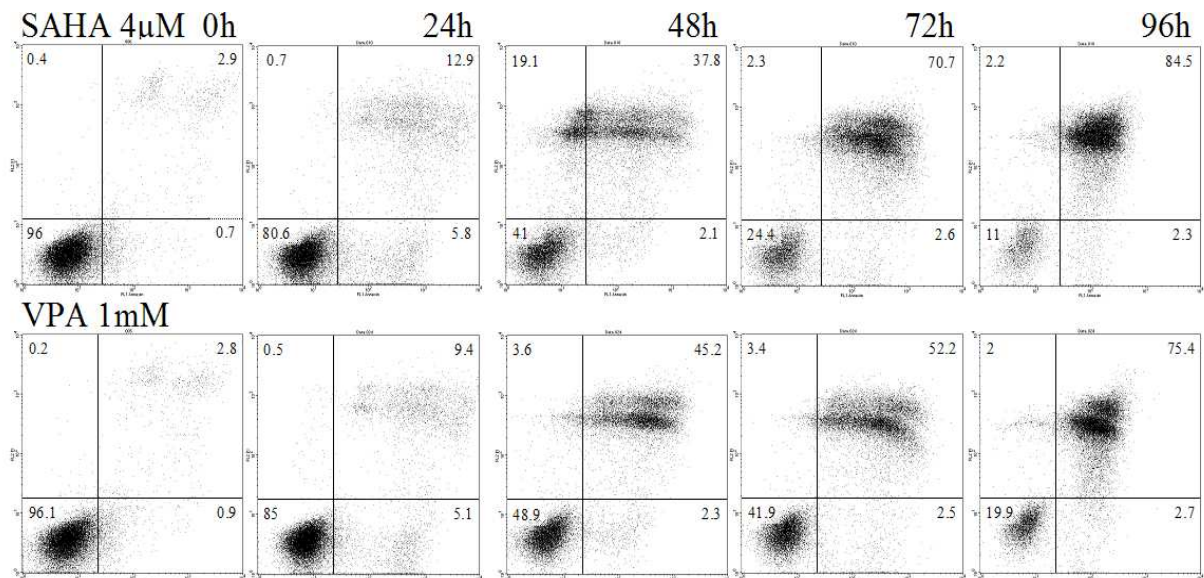


Abbildung 7: Grafische Darstellung einer fluoreszenzzytometrischen Analyse der Zelllinie Reh behandelt mit den HDACi SAHA und VPA. x-Achse (log): Annexin V, y-Achse (log): Propidiumjodid. Zahlen: prozentualer Anteil der Zellen im jeweiligen Quadrant. Alle untersuchten Zellen sind dargestellt. Ein Gating wurde nicht durchgeführt.

Die Grafik zeigt eine zeitabhängige Zunahme an Annexin V und Propidiumjodid positiven ALL Zellen nach HDACi Behandlung. Zu Beginn beträgt der Anteil der vitalen Zellen im linken unteren Quadranten mindestens 95 Prozent aller detektierten Zellen. Nach Inkubation mit HDACi ist im Verlauf eine Zunahme der apoptotischen und beginnend nekrotischen Zellen im rechten oberen Quadranten sowie parallel dazu eine Abnahme der vitalen Zellen im linken unteren Quadranten zu beobachten.

In der Abbildung 7 ist eine zunehmende Spontanapoptose der Negativkontrolle nicht berücksichtigt. Durch die physiologische Zellaktivität kommt es auch in der unbehandelten Kontrollgruppe nach einiger Zeit ohne Mediumwechsel zu einer Abnahme von circa 5 bis 10 Prozent des Anteils an vitalen Zellen. In den folgenden Graphen ist daher der Anteil der vitalen Zellen im Verhältnis zur jeweiligen Negativkontrolle des Messzeitpunktes dargestellt.

Um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen der fluoreszenzzytometrischen Analyse und den Ergebnissen der Proliferationsmessungen (Kapitel 4.3) zu er-

möglichen, wird in den folgenden Grafiken jeweils nur der Anteil vitaler Zellen aus dem linken unteren Quadranten dargestellt.

Die in Abbildung 7 sichtbare Abnahme vitaler Zellen der Zelllinie Reh nach Behandlung mit 4 μM SAHA und 1mM VPA zeigt sich analog bei allen vier verwendeten Zelllinie und vier verwendeten HDACi. Die unterschiedlichen HDACi induzieren Apoptose jedoch in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen. Unterschiede zwischen den differenten ALL Zelllinien waren nicht nachweisbar. Im Folgenden werden die Daten jeweils an Beispielen näher erläutert.

4.2.1 Apoptoseinduktion ist zeit- und konzentrationsabhängig

Die Ergebnisse eines repräsentativen Versuches mit der Zelllinie Nalm 6 und der Substanz VPA zeigt die Abbildung 8.

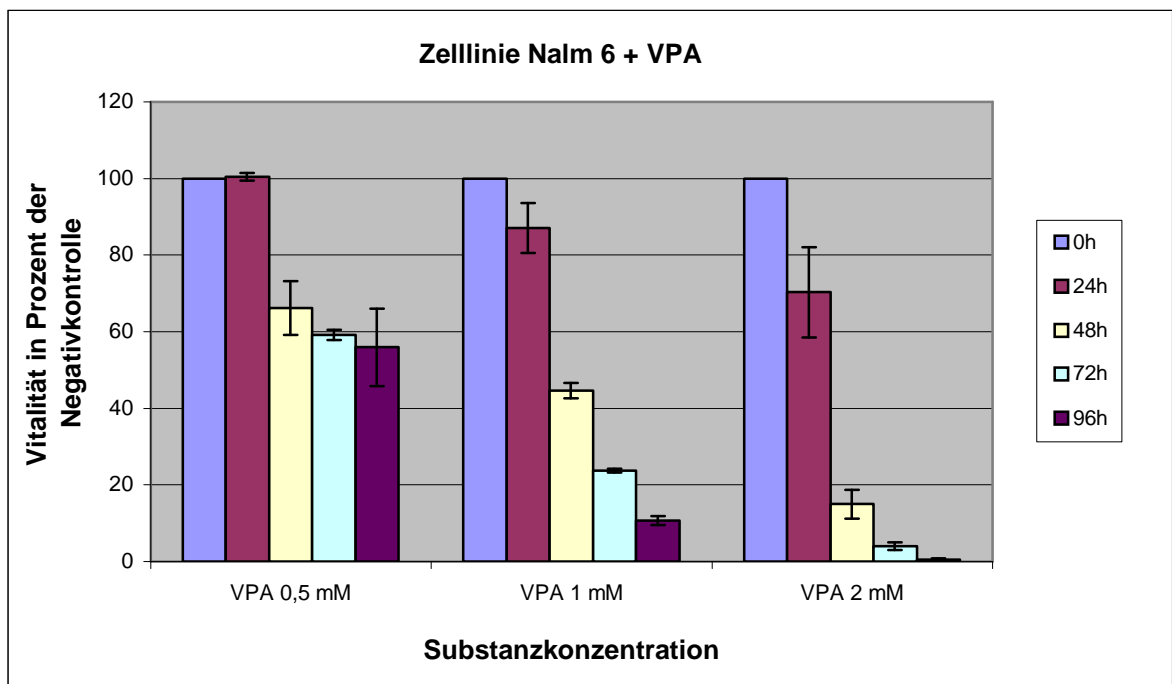


Abbildung 8: Vitale Zellen (in Prozent der Negativkontrolle) der Zelllinie Nalm 6 nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen an VPA über einen Zeitraum von 96 Stunden. Die dargestellten Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen.

Die Grafik zeigt eine zeit- und substanzkonzentrationsabhängige Vitalitätsabnahme der ALL Zelllinie Nalm 6 nach Behandlung mit VPA. Es ist zu beobachten, dass es schon nach Behandlung mit der geringsten verwendeten Substanzkonzentration von 0,5 mM VPA nach 48 Stunden zu einer sichtbaren Induktion von Apoptose kommt. Nach 72 und 96 Stunden zeigt sich bei dieser Substanzkonzentration kein weiterer Anstieg apoptoti-

scher Zellen. Eine Apoptoseinduktion durch VPA-Konzentrationen von 1 mM bzw. 2 mM ist schon nach 24 Stunden erkennbar. Hier nimmt der Anteil vitaler Zellen zu jedem folgenden Zeitpunkt weiter ab. Gleichzeitig ist bei höherer VPA-Konzentration eine stärkere Abnahme der vitalen Zellen sichtbar.

Eine vergleichbare Apoptosekinetik im micromolaren Konzentrationsbereich zeigte sich auch bei den Hydroxaminsäuren wie die folgenden Abbildung 9 zeigt.

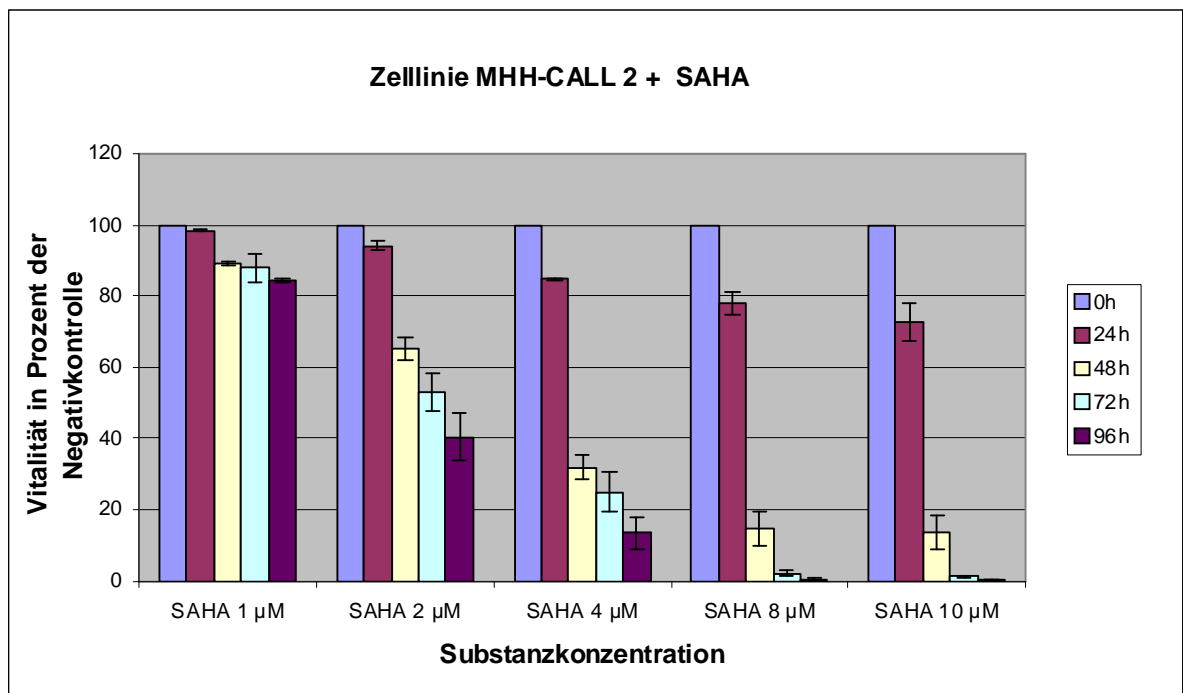


Abbildung 9: Vitale Zellen (in Prozent der Negativkontrolle) der Zelllinie MHH-CALL 2 nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen an SAHA über einen Zeitraum von 96 Stunden. Die dargestellten Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen.

Die Grafik stellt die zeit- und substanzkonzentrationsabhängige Vitalitätsabnahme der ALL Zelllinie MHH-CALL 2 nach Behandlung mit SAHA dar. Nach Behandlung mit der geringsten verwendeten Substanzkonzentration von 1 µM SAHA kommt es auch nach 96 Stunden nur zu einer Abnahme der vitalen Zellen auf 85 %. Schon die nächsthöhere Substanzkonzentration induziert nach 48 Stunden einer Abnahme der vitalen Zellen auf 66 % und nach 96 Stunden einer Abnahme der vitalen Zellen auf 40 %. Diese zeit- und substanzkonzentrationsabhängige Vitalitätsabnahme zeigt sich analog auch bei den weiteren SAHA Konzentrationen von 4, 8 und 10 µM.

Die zeit- und konzentrationsabhängige Vitalitätsabnahme behandelter ALL Zelllinien lässt sich bei allen gewählten Substanzen und Zelllinien nachweisen.

4.2.2 HDACi haben unterschiedliches apoptotisches Potential

Die Ergebnisse eines repräsentativen Versuches mit der Zelllinie Nalm 6 und drei Hydroxaminsäuren zeigt die Abbildung 10.

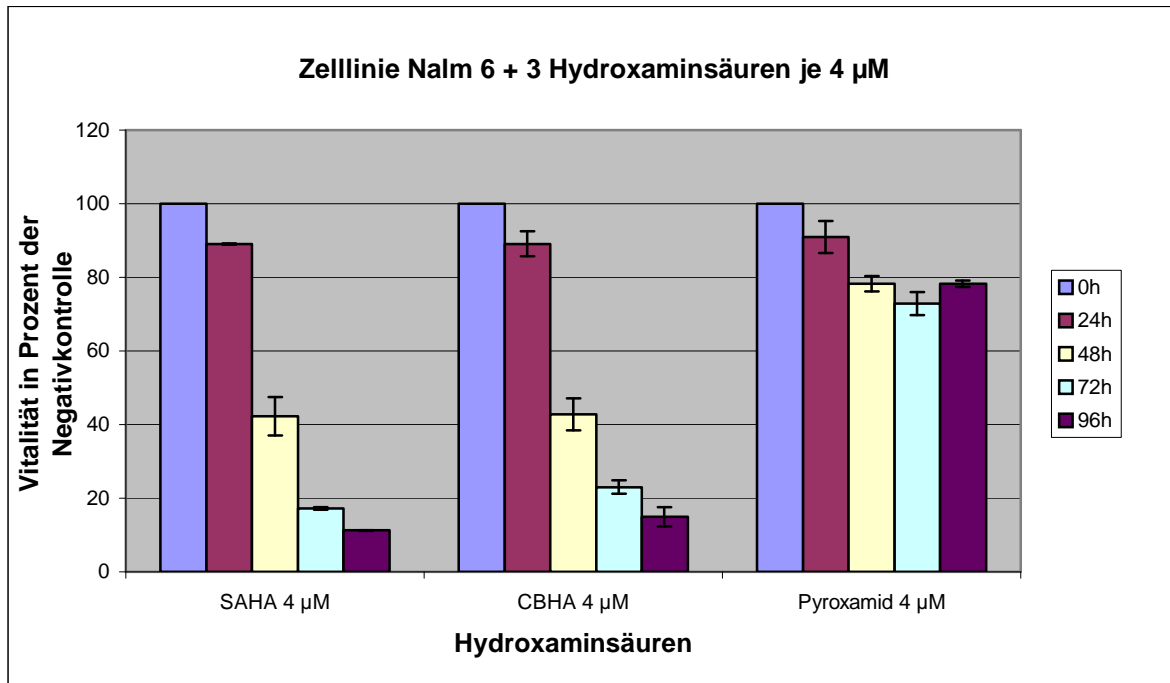


Abbildung 10: Vitale Zellen (in Prozent der Negativkontrolle) der Zelllinie Nalm 6 nach Behandlung mit den 3 verwendeten Hydroxaminsäuren in Konzentrationen von jeweils 4 µM über einen Zeitraum von 96 Stunden. Die dargestellten Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen.

Wie in der Abbildung 10 zu sehen, ist nach 24 Stunden bei allen Hydroxaminsäuren einer Abnahme der vitalen Zellen um circa 10 % zu verzeichnen. Zu den nachfolgenden Zeitpunkten ist nur für SAHA und CBHA eine deutliche Apoptoseinduktion zu beobachten. Pyroxamid bewirkt in diesem Konzentrationsbereich nach 48, 72 und 96 Stunden keinen weiteren Anstieg apoptotischer Zellen.

Für die mittlere Substanzkonzentration von 1 mM VPA zeigt sich eine ähnliche Apoptoseinduktion über 96 Stunden wie für die Hydroxaminsäuren SAHA 4 µM und CBHA 4 µM. Eine zusammenfassende Darstellung der Hydroxaminsäuren und der kurzkettigen Fettsäure ist aufgrund der unterschiedlichen Substanzklassen und Konzentrationsbereiche nicht sinnvoll möglich.

Das unterschiedliche apoptotische Potential der Hydroxaminsäure Pyroxamid im Vergleich zu den Hydroxaminsäuren SAHA und CBHA lässt sich bei allen gewählten Substanzkonzentrationen und Zelllinien nachweisen, wie folgende Abbildungen beispielhaft darstellen.

Die Ergebnisse eines repräsentativen Versuches mit der Zelllinie Reh und den drei Hydroxaminsäuren zeigt die Abbildung 11.

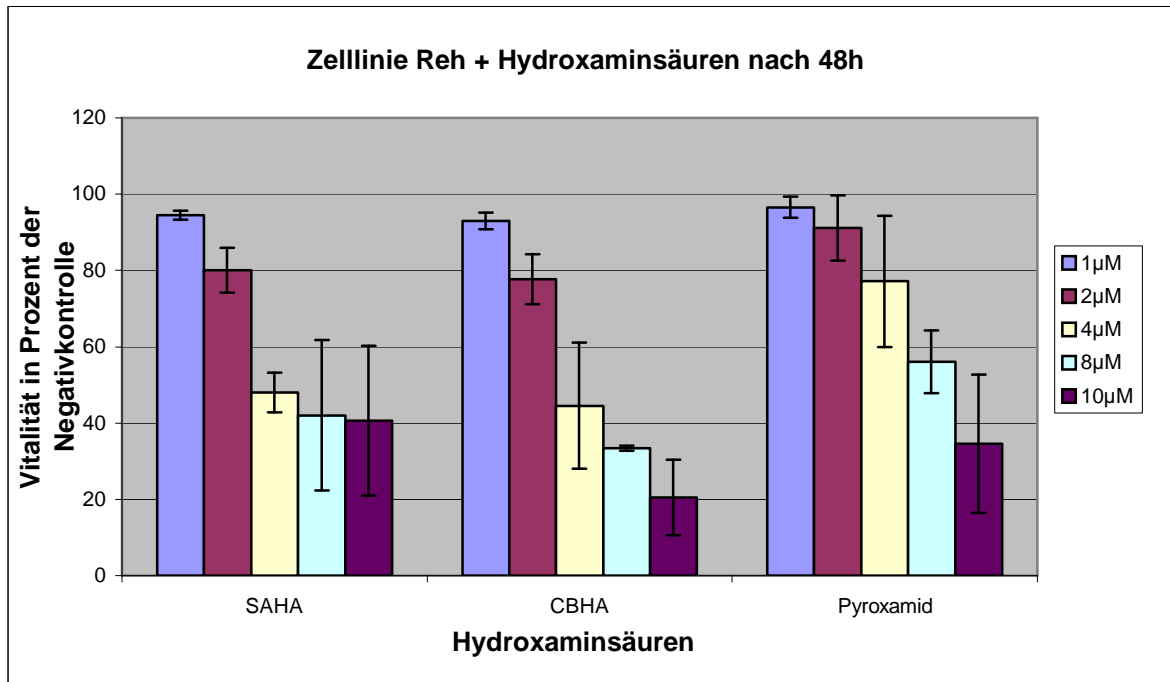


Abbildung 11: Vitale Zellen (in Prozent der Negativkontrolle) der Zelllinie Reh nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen an Hydroxaminsäuren nach 48 Stunden. Die dargestellten Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen.

Diese Abbildung zeigt die Apoptoseinduktion abhängig von der Substanzkonzentration der drei verwendeten Hydroxaminsäuren. Analog zur Abbildung 10 lässt sich auch hier das ähnliche apoptoseinduzierende Potential der Hydroxaminsäuren SAHA und CBHA erkennen. Im Gegensatz dazu induziert Pyroxamid über den gesamten Konzentrationsbereich eine weniger starke Vitalitätsabnahme. So induzieren die Hydroxaminsäuren SAHA, CBHA mit der Konzentration von 2 µM eine Abnahme der Vitalität auf ca. 80 %, 2 µM Pyroxamid induzieren hingegen nur eine Abnahme der Vitalität auf 91 %. Noch deutlicher lässt sich der Unterschied des apoptotischen Potentials bei der Konzentration von 4 µM erkennen. SAHA induziert eine Abnahme auf 48 %, CBHA auf 45 % und Pyroxamid auf 77 % vitaler Zellen. Die höheren Konzentrationen von 8 und 10 µM zeigen vergleichbare Resultate.

4.2.3 Apoptosekinetik der verschiedenen ALL Zelllinien ist vergleichbar

Die Ergebnisse eines repräsentativen Versuches mit den ALL Zelllinien und der Hydroxaminsäure CBHA 4 μM zeigt die Abbildung 12.

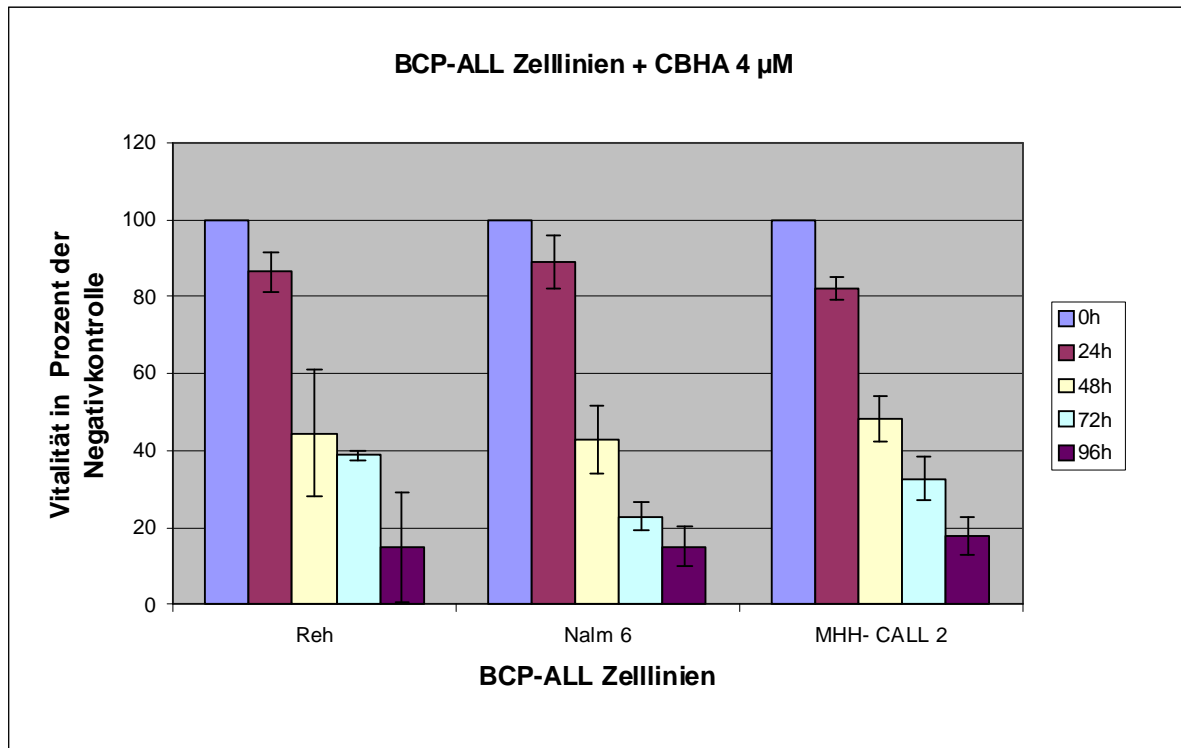


Abbildung 12: Vitale Zellen (in Prozent der Negativkontrolle) der ALL- Zelllinien nach Behandlung mit 4 μM CBHA über einen Zeitraum von 96 Stunden. Die dargestellten Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen.

In dieser Grafik ist die apoptoseinduzierende Wirkung der Hydroxaminsäure CBHA in auf die unterschiedlichen ALL Zelllinien dargestellt. Es zeigt sich eine fast analoge Dynamik der Vitalitätsabnahme der Zellen im Zeitraum von 96 Stunden.

Nach 24 Stunden zeigen alle behandelten ALL Zelllinien eine Vitalitätsabnahme auf Werte zwischen 89 % (Nalm 6) und 82 % (MHH-CALL 2). Die größte Reduktion an vitalen Zellen findet zwischen den Messzeitpunkten 24 und 48 Stunden statt. Nach 96 Stunden liegt der Anteil vitaler Zellen bei allen Zelllinien unter 20 %.

Diese übereinstimmende Dynamik der Vitalitätsabnahme behandelter ALL Zelllinien lässt sich bei allen gewählten Substanzen und Substanzkonzentrationen nachweisen. Das zeigen auch die Ergebnisse eines repräsentativen Versuches mit den ALL Zelllinien und der Hydroxaminsäure Pyroxamid in der Abbildung 13.

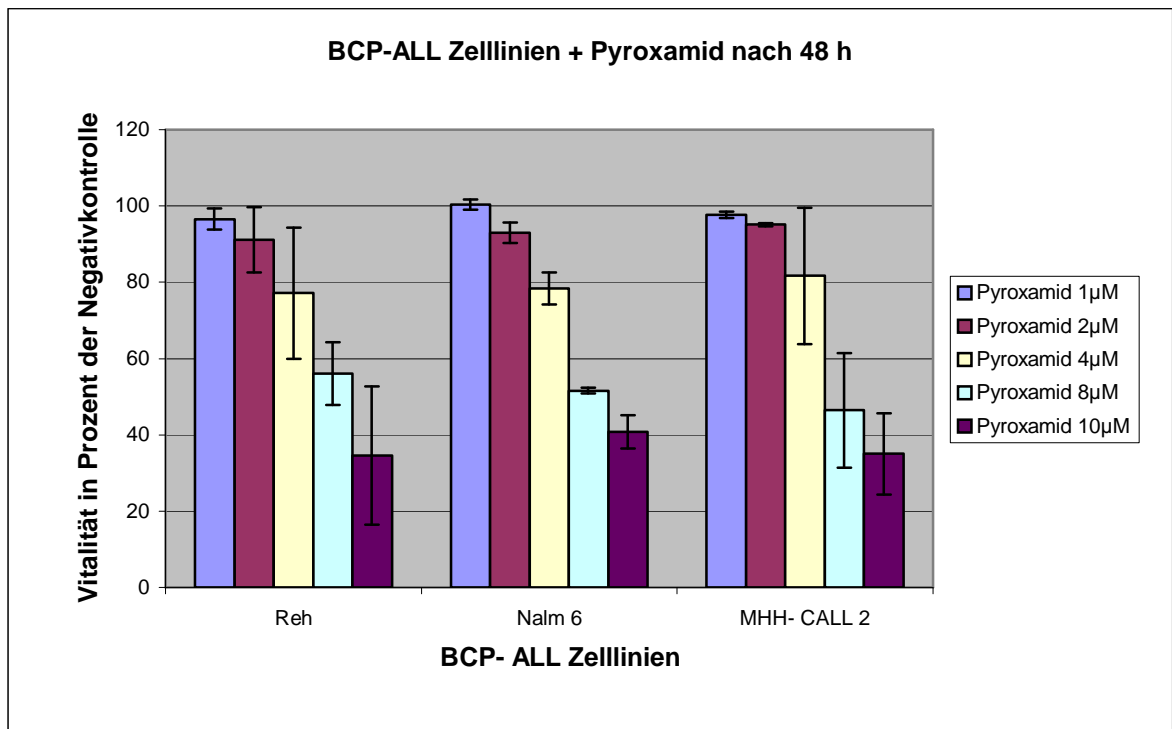


Abbildung 13: Vitale Zellen (in Prozent der Negativkontrolle) der BCP-ALL Zelllinien nach Behandlung mit Pyroxamid in aufsteigender Konzentration nach 48 Stunden. Die dargestellten Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen.

Diese Grafik zeigt eine Abnahme der Vitalität der verwendeten ALL Zelllinien nach Behandlung mit Pyroxamid in aufsteigender Konzentration. Auch hier ist die Induktion von Apoptose an den verwendeten ALL Zelllinien vergleichbar.

4.2.4 IC 50 der verwendeten HDACi zur Stunde 96

Um die apoptoseinduzierende Wirkung von HDACi an ALL Zelllinie zusammenfassend und vergleichbar darzustellen, ist zum Zeitpunkt 96 h die IC 50 der verwendeten HDACi bestimmt worden. Diese $IC_{50/96h}$ bezeichnet die errechnete Konzentration an HDACi bei der nach 96 Stunden 50 % der Zellen Annexin/ Propidiumjodid positiv sind. Dafür wurden die verwendeten Konzentrationen an HDACi gegen die Vitalität im Verhältnis zur Negativkontrolle aufgetragen und grafisch dargestellt. Durch die sich ergebenden Punkte wurde mithilfe von Microsoft Excel® eine logarithmische Ausgleichskurve gelegt und die jeweilige Kurvengleichung erstellt, anhand derer sich die $IC_{50/96h}$ bestimmen lässt. Beispielhaft sei hier der Graph und die ermittelte Gleichung für die Zelllinie MHH-CALL 2 und CBHA gezeigt.

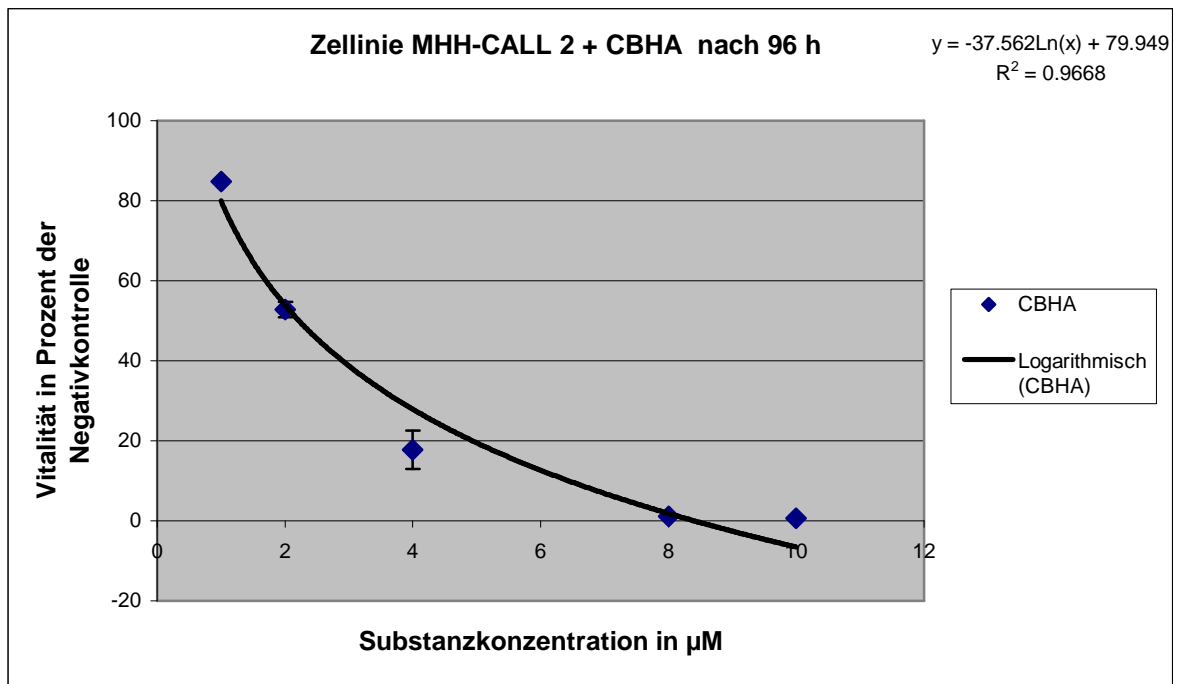


Abbildung 14: Vitale Zellen (in Prozent der Negativkontrolle) der Zelllinie MHH-CALL 2 nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen an CBHA zum Zeitpunkt 96 h. Die Ausgleichskurve sowie Kurvengleichung wurde mit Microsoft Excel® ermittelt. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen.

Aus der substanz- und zelllinienspezifischen logarithmischen Ausgleichskurve ergibt sich in der Abbildung 14 beispielhaft die Kurvengleichung $y = -37.562\ln(x) + 79.949$. Zur Berechnung des IC50 Wertes erfolgt die Umstellung nach $x = e^{(-50+79.949)/37.562}$. e steht für die Eulersche Zahl und ist mit einem Wert von 2.718281828459 angegeben. Für das oben genannte Beispiel ergibt sich also ein gerundeter x-Wert von 2,22.

Zusammenfassend zeigt die folgende Tabelle 5 die IC_{50/96h} zweier unabhängiger Versuche. Diese liegt für SAHA, CBHA und Pyroxamid im Bereich von 2,7 bis 4,7 µM und für Valproat im Bereich von 0,7 mM.

Zelllinie / HDACi	SAHA[µM]	CBHA[µM]	Pyroxamid[µM]	VPA[mM]
Reh	3,06	1,93	4,01	0,95
MHH	1,96	2,22	4,25	0,72
Nalm6	2,97	2,32	4,63	0,50
Mittelwert	2.66	2.16	4.30	0.72
SD	0.61	0.20	0.31	0.22

Tabelle 5: IC_{50/96h} für die verwendeten ALL Zelllinien und HDACi. Ermittelt aus Sigmoidalfunktion $f(x) = -m\ln(x) + c$, der jeweiligen Ausgleichskurven zur Stunde 96. R2 lag im Mittel bei $0.95 \pm 0.04[1SD]$. Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängig durchgeführten Versuchen.

4.3 HDACi induzieren Proliferationsinhibition an ALL Zelllinien

Um den Einfluss von HDACi auf die Proliferation der von uns verwendeten BCP-ALL Zelllinien zu testen, wurde ein MTS Assay verwendet. Die Versuchsanordnung mit den verwendeten ALL Zelllinien und vier HDACi sowie die Messzeitpunkte waren identisch zu der in Kapitel 4.2. beschriebenen fluoreszenzzytometrischen Analyse (siehe Abbildung 2). So war es möglich, die von uns mit der FACS Analyse erhobenen Daten durch ein zweites Verfahren zu überprüfen. Außerdem bietet der MTS Assay, im Gegensatz zum durchflusszytometrischen Annexin/Propidiumjodid-Assay, die Möglichkeit, absolute Zellzahlen zu bestimmen, sowie gegebenenfalls eine Proliferationshemmung im Bereich von niedrigen noch nicht apoptotisch wirksamen HDACi-Konzentrationen darzustellen

Analog zu den im Kapitel 4.2. gezeigten Ergebnissen zeigt sich auch in der MTS-Messung eine zeitabhängige Abnahme vitaler ALL Zellen nach Behandlung mit HDACi. Die unterschiedlichen HDACi induzieren Proliferationsinhibition in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen. Unterschiede zwischen den differenten BCP-ALL Zelllinien sind nicht nachweisbar.

Im Folgenden soll anhand von repräsentativen Grafiken die Analogie der mit der fluoreszenzzytometrischen Analyse und der mit dem MTS Assay erhobenen Daten dargestellt werden. Weiterhin soll die proliferationsinhibitorische Wirkung der HDACi in Bezug auf die absolute Zellzahlveränderung gezeigt werden.

4.3.1 Proliferationsinhibition ist zeit- und konzentrationsabhängig

Für die bessere Vergleichbarkeit beider Methoden ist in den folgenden Abbildungen die Abnahme der vitalen Zellen im Verhältnis zur Negativkontrolle dargestellt. Die Ergebnisse eines repräsentativen Versuches mit der Zelllinie MHH-CALL 2 und der Hydroxaminsäure SAHA zeigt die Abbildung 15.

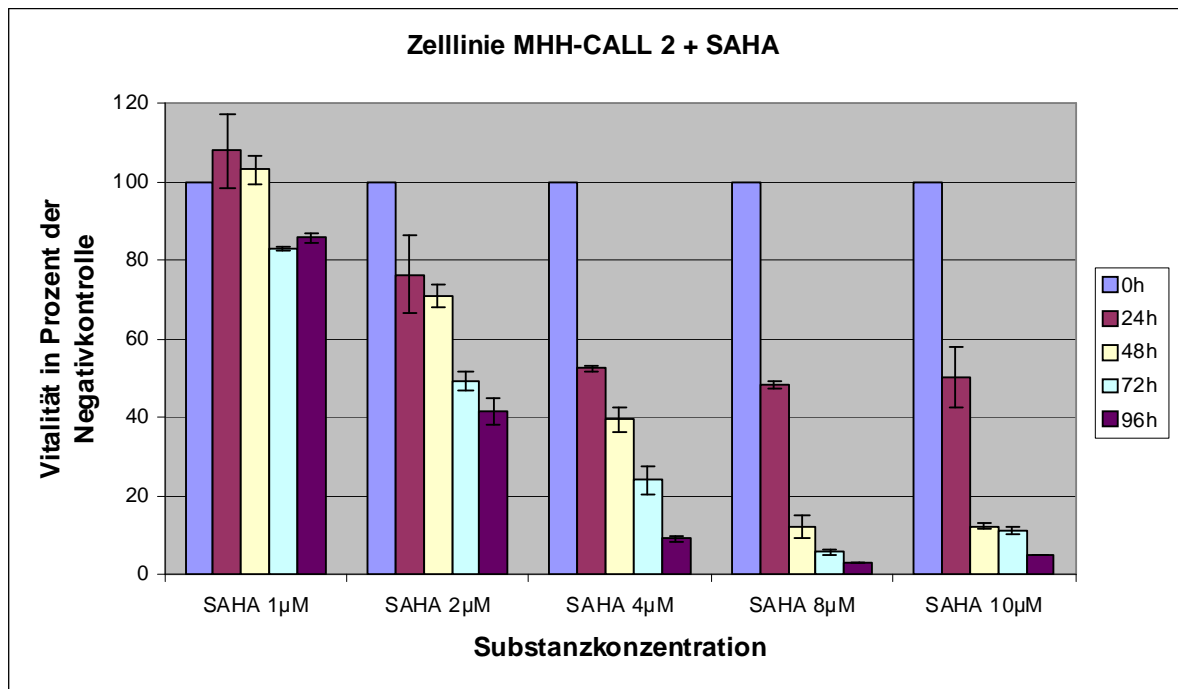


Abbildung 15: Vitale Zellen (in Prozent der Negativkontrolle) der Zelllinie MHH-CALL 2 nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen an SAHA über einen Zeitraum von 96 Stunden. Die dargestellten Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen.

Analog zur Abbildung 9, Kapitel 4.2.1 zeigt diese Abbildung die zeit- und substanzkonzentrationsabhängige Vitalitätsabnahme der Zelllinie Nalm 6 nach Behandlung mit SAHA.

Es ist zu beobachten, dass es schon nach Behandlung mit der geringsten verwendeten Substanzkonzentration von 1 μM SAHA nach 72 Stunden zu einer sichtbaren Vitalitätsabnahme kommt. Nach 96 Stunden zeigt sich bei dieser Substanzkonzentration keine weitere Abnahme vitaler Zellen. Eine Proliferationsinhibition durch jede höhere SAHA-Konzentration ist schon nach 24 Stunden erkennbar. Hier nimmt der Anteil vitaler Zellen zu jedem folgenden Zeitpunkt weiter ab. Gleichzeitig ist bei höherer SAHA-Konzentration eine stärkere Abnahme der vitalen Zellen sichtbar.

Eine vergleichbare Apoptosekinetik findet sich für VPA im millimolaren Konzentrationsbereich

4.3.2 HDACi haben unterschiedliches proliferationsinhibitorisches Potential

Die folgende Abbildung 16 zeigt die mit dem MTS Assay gemessenen Werte vergleichbar mit der fluoreszenzzytometrischen Analyse in Abbildung 10, Kapitel 4.2.2 als Ergebnisse eines repräsentativen Versuches mit der Zelllinie Nalm 6 und drei Hydroxaminsäuren.

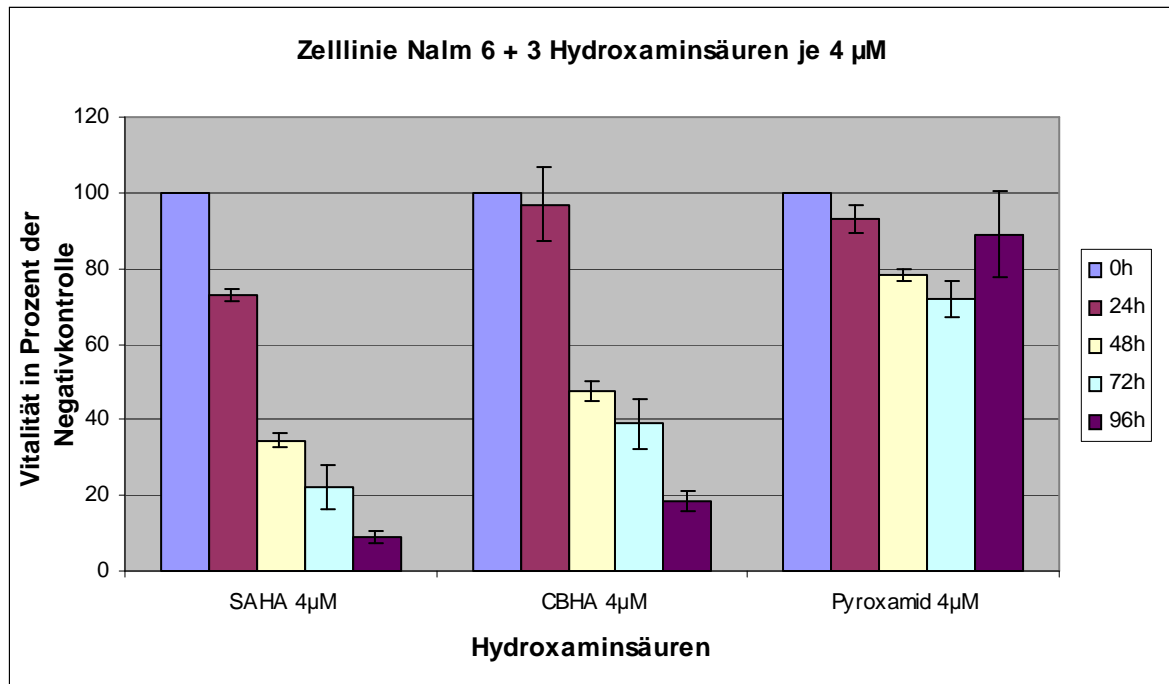


Abbildung 16: Vitale Zellen (in Prozent der Negativkontrolle) der Zelllinie Nalm 6 nach Behandlung mit den 3 verwendeten Hydroxaminsäuren in Konzentrationen von jeweils 4 µM über einen Zeitraum von 96 Stunden. Die dargestellten Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen.

Wie in der Abbildung 16 zu sehen, ist nach 24 Stunden (SAHA) bzw. 48 Stunden (CBHA, Pyroxamid) bei allen Hydroxaminsäuren eine deutliche Abnahme der vitalen Zellen zu verzeichnen. Zu den nachfolgenden Zeitpunkten ist nur für SAHA und CBHA eine weitere Proliferationsinhibition zu beobachten. Pyroxamid zeigt in diesem Konzentrationsbereich nach 48, 72 und 96 Stunden keine weitere Abnahme vitaler Zellen.

Für die mittlere Substanzkonzentration von 1 mM VPA zeigt sich eine ähnliche Apoptoseinduktion über 96 Stunden wie für die Hydroxaminsäuren SAHA 4 µM und CBHA 4 µM.

4.3.3 Proliferationsinhibition der verschiedenen ALL Zelllinien ist vergleichbar

Die Ergebnisse eines repräsentativen Versuches der ALL Zelllinien und der Hydroxaminsäure CBHA 4 μM zeigt die Abbildung 17.

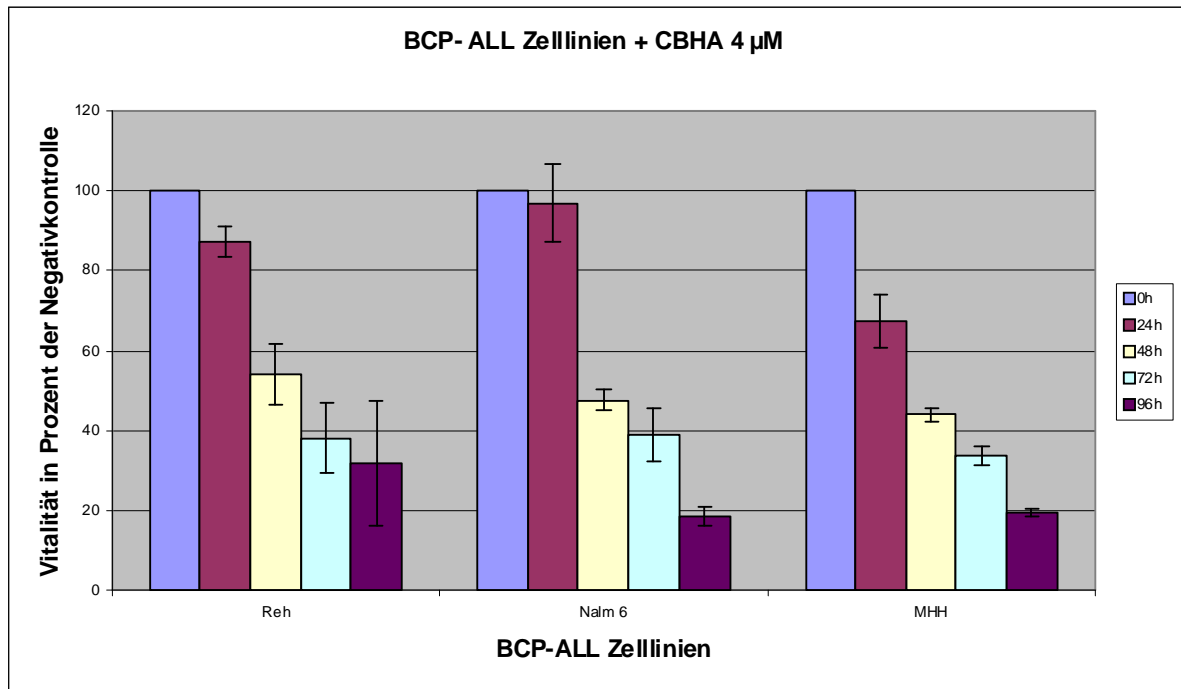


Abbildung 17: Vitale Zellen (in Prozent der Negativkontrolle) der BCP- ALL- Zelllinien nach Behandlung mit 4 μM CBHA über einen Zeitraum von 96 Stunden. Die dargestellten Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen.

In dieser Grafik ist die proliferationsinhibierende Wirkung der Hydroxaminsäure CBHA auf die unterschiedlichen ALL Zelllinien dargestellt. Es zeigt sich eine fast analoge Dynamik der Vitalitätsabnahme der Zellen im Zeitraum von 96 Stunden.

Nach 24 bis 48 Stunden zeige alle behandelten ALL Zelllinien eine deutliche Vitalitätsabnahme. Die größte Reduktion an vitalen Zellen findet zwischen den Messzeitpunkten 24 und 48 Stunden statt. Nach 96 Stunden liegt der Anteil vitaler Zellen bei allen Zelllinien unter 30 %.

Diese übereinstimmende Dynamik der Vitalitätsabnahme behandelter ALL Zelllinien lässt sich bei allen gewählten Substanzen und Substanzkonzentrationen nachweisen.

4.3.4 Reduktion der absoluten Zellzahl als Zeichen der Proliferationsinhibition

Die folgende Abbildung 18 zeigt einen repräsentativen Versuch mit der Zelllinie MHH-CALL 2 und der Hydroxaminsäure SAHA.

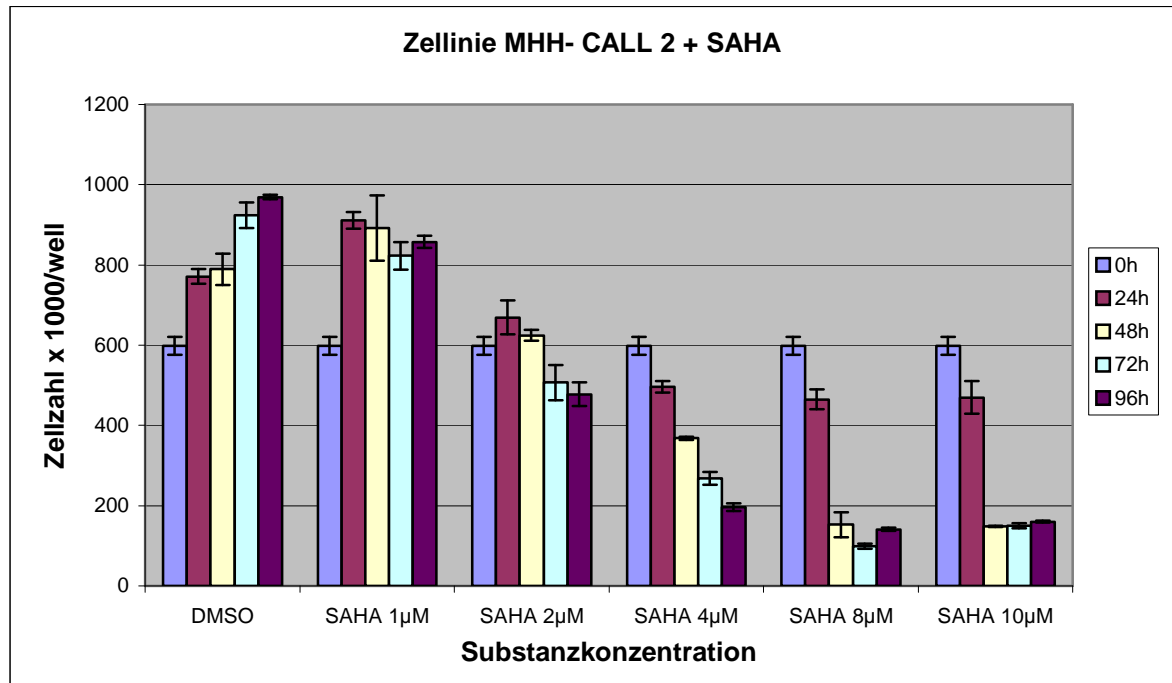


Abbildung 18: Absolute Zellzahl/ml der Zelllinie MHH-CALL-2 nach Behandlung mit fünf unterschiedlichen Konzentrationen an SAHA über einen Zeitraum von 96 Stunden. Negativ Kontrolle: DMSO. Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Die nur mit DMSO behandelten ALL Zellen zeigen innerhalb des Zeitraums von 96 Stunden eine deutlich sichtbare Proliferation der Zellzahl. Die niedrigste verwendete Substanzkonzentration von 1 µM SAHA führt nach 48 bis 72 Stunden zu einer Inhibition des Zellwachstums. 2 µM SAHA führen nach 24 bis 48 Stunden zu einer Stagnation der Zellproliferation und nach 72 Stunden zu einer Reduktion der am Anfang vorhandenen Zellzahl. Die folgenden höheren Substanzkonzentrationen führen schon nach 24 Stunden zu einem Untergang an vitalen Zellen. Eine vergleichbare Kinetik im micromolaren Konzentrationsbereich zeigte sich auch bei der Hydroxaminsäure CBHA. Die Hydroxaminsäure Pyroxamid führt erst im Konzentrationsbereich von 2 µM zu einer Proliferationsinhibition und in den folgenden höheren Konzentrationen zu einer weniger starken Vitalitätsabnahme als SAHA und CBHA.

Einen repräsentativen Versuch mit der Zelllinie Reh und der kurzkettigen Fettsäure VPA zeigt die Abbildung 19.

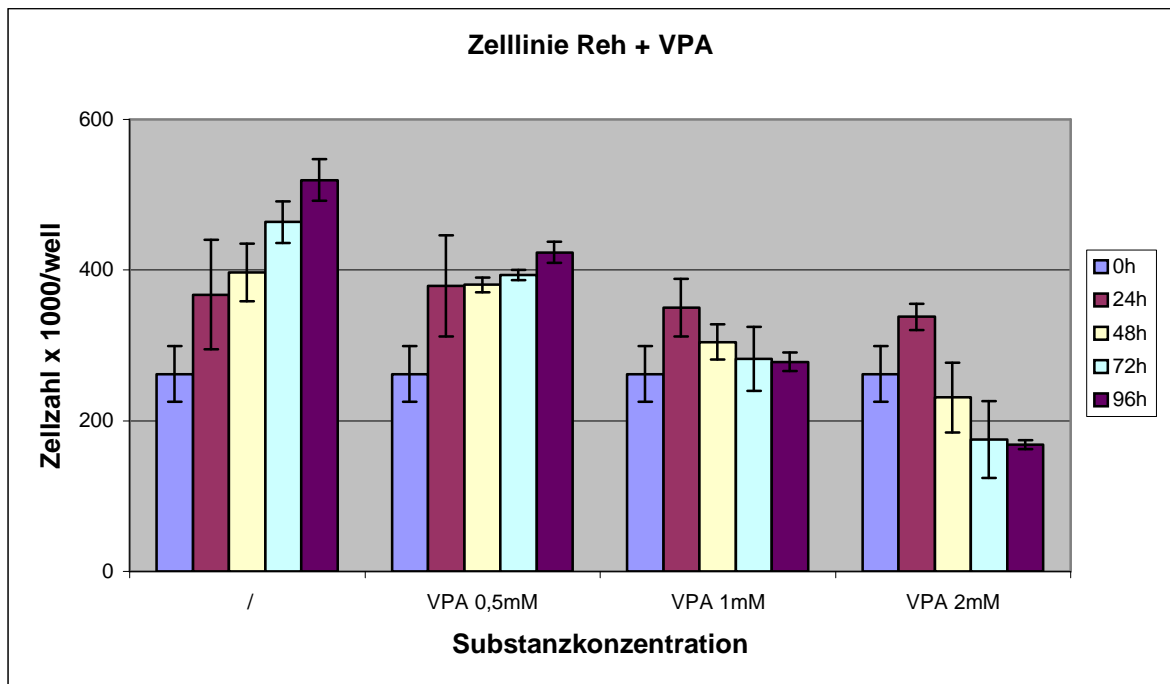


Abbildung 19: Absolute Zellzahl/ml der Zelllinie Reh nach Behandlung mit drei unterschiedlichen Konzentrationen an VPA über einen Zeitraum von 96 Stunden. Negativkontrolle: H₂O. Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Diese Abbildung zeigt die zeit- und substanzkonzentrationsabhängige Proliferationsinhibition der kurzkettigen Fettsäure VPA. Während sich die unbehandelten Zellen im Zeitraum von 96 Stunden mehr als verdoppeln, hemmt schon die kleinste eingesetzte Substanzkonzentration von 0,5 mM VPA das Zellwachstum nach 72 Stunden. Die nächsthöhere Substanzkonzentration induziert über 96 Stunden einen Stop der Zellproliferation. In der höchsten verwendeten Substanzkonzentration von 2 mM VPA zeigt sich ein Stop der Zellproliferation und Abnahme der Zellzahl unter den Ausgangswert.

5 Diskussion

Akute lymphoblastische Leukämien entstehen nach derzeitigem Kenntnisstand aufgrund von Transformation und klonaler Expansion pluripotenter Stammzellen oder unreifen Vorläuferzellen der lymphatischen Zellreihe im Knochenmark oder Thymus. Die Störung des Gleichgewichtes an Zellerneuerung, Zellwachstum und Zelldifferenzierung eines Klonen der transformierten Zellreihe führt zu dessen Expansion und Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark. Daraus resultieren Anämie, Thrombozytopenie und Immunsuppression infolge einer Leukozytopenie.

In Deutschland, Österreich und in einigen Schweizer Zentren werden seit Beginn der siebziger Jahre etwa 2/3 der Kinder mit ALL nach Therapieprotokollen der multizentrischen Berlin-Frankfurt-Münster- (BFM) Gruppe behandelt. Die Prinzipien der BFM-Studien wurden in der Folge weltweit aufgegriffen und legten den Grundstein für den rasanten Fortschritt der Leukämietherapie in den letzten 30 Jahren. Zu den wichtigsten Zielen der ALL-REZ BFM Therapiestudie gehört neben der Ermittlung unbekannter Faktoren, aufgrund welcher die Ersttherapie versagt, sowie der Ermittlung prognostischer relevanter Faktoren zur Risikostratifizierung des Rezidives vorrangig die Therapieoptimierung. Aufgrund der nach einem ALL Rezidiv nur eingeschränkt wirksamen risikoadaptierte Therapie und einer Heilungsrate von nur 35-40 % ist die Erprobung neuer Medikamente am *in vitro*- und *in vivo*-Modell der ALL ein weiterer notwendiger Ansatz.

Das wachsende Verständnis der molekularen Mechanismen der Onkogenese und die bekannten Zusammenhänge zwischen transkriptioneller Dysregulation, veränderter Genexpression und maligner Transformation machen HDAC Proteine zu vielversprechenden Angriffspunkten einer epigenetisch wirksamen Tumorthherapie. Mit HDACi kann eine Modulation des epigenetischen Codes durch Hyperacetylierung von DNA-assoziierten Histonproteinen und somit eine Änderung des Genexpressionsmusters erreicht werden. In Folge kommt es zu einer Reaktivierung von Zellzyklusarrest, Apoptoseinduktion und Proliferationsinhibition in neoplastischen Zellen. Diese Tumor- inhibierenden Effekte zeigen HDACi an unterschiedlichsten Neoplasien am *in vitro*- und *in vivo*-Modell und zunehmende auch in größeren klinischen Studien. Bei geringer Toxizität, besonders neu synthetisierter Derivate, sind HDACi gut tolerabel und zeigen in Kombination mit

hergebrachten Zytostatika (z.B. Doxorubicin, Vincristin, Etoposid) additive und/oder synergistische Effekte.⁵⁹

Diese Arbeit konnte zeigen, dass unsere Daten zur Wirkung von HDACi an BCP-ALL Zelllinien bezüglich Histonacetylierung, Apoptose und Proliferation in den Kontext der Literaturergebnisse, wie sie für andere Zellentitäten und HDACi berichtet wurden, passen.

5.1 HDACi induzieren Histonhyperacetylierung an ALL Zelllinien

Um den Effekt von HDACi in der Zelle bzw. am Histon zu untersuchen, ist ein Western Blot gegen acetyliertes Histon H3 oder acetyliertes Histon H4 eine etablierte Methode. In dieser Arbeit wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit und Vergleichbarkeit nur die Histon H4- Detektion gewählt, da eine Hyperacetylierung durch HDACi sowohl an Histon H4 und als auch Histon H3 in gleichem Maße induziert wird.^{70,71}

5.1.1 Nach 6 Stunden nachweisbare Histon H4-Hyperacetylierung

In der hier vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass zumindest in der höheren der beiden gewählten Konzentrationen (Hydroxaminsäuren 4 μ M und Valproat 2 μ M) eine deutlich sichtbare Hyperacetylierung nach 6 Stunden nachweisbar ist. (siehe Abbildung 6, Kapitel 4.1.2) Diese frühe Hyperacetylierung ließ sich durch alle vier verwendeten HDACi an allen vier BCP- ALL Zelllinien induzieren.

Mehrere Arbeitsgruppen, welche die Histonhyperacetylierung an neoplastischen Zelllinien nach Behandlung mit HDACi untersuchten, beschreiben, dass schon wenige Stunden nach HDACi- Behandlung erste Veränderungen am Acetylierungsstatus der Histone erkennbar sind. So beschreiben z.B. Romanski *et al.* eine Histon H4-Hyperacetylierung durch TSA und LAQ824 an unterschiedlichen ALL Zelllinien schon nach vier Stunden.⁶⁷ Ebenso induzieren TSA und VPA an AML Zellen schon nach 4 Stunden eine sichtbare Histon H4-Hyperacetylierung.⁷¹

5.1.2 Histon H4-Hyperacetylierung ist zeit- und konzentrationsabhängig

Wie in Abbildung 3 und 4 (Kapitel 4.1.1) dargestellt, ist eine deutliche Zunahme der Histonacetylierung über die Zeit messbar. Diese tritt im Gegensatz zur Apoptoseinduk-

tion und Proliferationsinhibition schon im Zeitfenster von 6 bis 24 Stunden nach Behandlung mit den jeweiligen HDACi auf. Auch diese Beobachtung ist mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen kongruent. So zeigen Sakajiri *et al.*, dass SAHA an Lymphomzelllinien eine zeitabhängige Histon H4-Acetylierung induziert.⁶⁶

Die Stärke der Histonhyperacetylierung ist dabei auch abhängig von der Dosis an HDACi mit der die transformierten Zellen behandelt werden. Das ist sowohl in Abbildung 3 (Kapitel 4.1.1) als auch in Abbildung 6 (Kapitel 4.1.2) erkennbar. Diese Resultate sind Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen entsprechend. So zeigen Bokelmann *et al.*, das VPA in unterschiedlicher Konzentration an CLL Zellen eine dosisabhängige Histon H4-Acetylierung induziert.⁶⁵ Auch an ALL und AML Zelllinien konnte eine dosisabhängigen H4-Acetylierung durch LAQ824 gezeigt werden.^{67,72}

Die vorliegenden Resultate belegen weiterhin, dass die Histonhyperacetylierung zeitlich vor Beginn der Apoptose induziert wird. Dieses legt einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der Histonhyperacetylierung und der in Folge auftretenden Proliferationsinhibition und Apoptoseinduktion auch bei der Behandlung von BCP-ALL Zelllinien mit HDACi nahe.

5.1.3 Reduktion der Histon H4-Hyperacetylierung nach 24 Stunden

Wir konnten beobachten, dass die über den Zeitraum von 6 bis 24 Stunden zunehmende Histonacetylierung der ALL Zellen nach einmaliger Inkubation mit 4 μ M SAHA, 4 μ M CBHA und 1 mM VPA zur Stunde 48 eine sichtbare Abnahme des Acetylierungsgrades aufweisen.(siehe Abbildung 6, Kapitel 4.1.2) Für die jeweils niedrigeren Substanzkonzentrationen der drei oben genannten HDACi sowie für beide gewählten Konzentrationen der Hydroxaminsäure Pyroxamid war dieser Effekt nicht evident.

Diese Ergebnisse decken sich mit Resultaten anderer Arbeitsgruppen, welche zeigen konnten, dass nach einmaliger Behandlung von neoplastischen Zelllinien mit HDACi die Histonhyperacetylierung über die Zeit ein Maximum erreicht und nachfolgend eine Abnahme der Acetylierung nachweisbar ist. So induziert 1 mM VPA an AML Zelllinien eine Histon H4-Acetylierung nach 4 Stunden Diese erreicht nach 12 bis 16 Stunden ein Maximum und zeigt nach 24 Stunden eine Reduktion des Acetylierungsgrades.⁷¹

Diese Ergebnisse legen die Möglichkeit nahe, dass HDACi auch an BCP- ALL Zelllinien eine reversible Inhibition der Histondeacetylasen bewirken. Aufgrund der suffizienten Apoptoseinduktion in den von uns durchgeführten *in vitro*-Versuchen war eine wiederholte Gabe der Substanzen nicht indiziert. In möglichen *in vivo*-Versuchen wäre eine wiederholte Behandlung mit HDACi aufgrund oben gezeigter Ergebnisse allerdings möglicherweise sinnvoll.

5.1.4 Histon H4-Hyperacetylierung ist HDACi-Substanzabhängig

Um eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen, wurden alle vorhandenen Westernblot- Folien mit Hilfe der in Kapitel 4.1.2 erläuterten Ordinalskala semiquantitativ ausgewertet und beispielhaft in Abbildung 6 zusammengefasst und graphisch dargestellt. In Arbeiten anderer Arbeitsgruppen sind ähnlich ausführliche Westernblotuntersuchungen nicht dargestellt, so dass ein diesbezüglicher Vergleich nicht möglich ist. Verglichen mit den hier dargestellten Daten der Apoptose- und Proliferationsmessung (Kapitel 4.2 und Kapitel 4.3) besteht auch bei der Histonacetylierung ein Unterschied in der Potenz der jeweiligen HDACi. So ist die Induktion der Histonacetylierung durch SAHA und CBHA fast gleich stark, wohingegen das Acetylierungspotential von Pyroxamid deutlich schwächer ausgeprägt ist. VPA ist als kurzkettige Fettsäure aufgrund der anderen Substanzklasse und des differenten Konzentrationsbereichs mit den Hydroxaminsäuren nur eingeschränkt zu vergleichen. Allerdings scheint VPA ein ähnliches Potential bezüglich der Histon H4-Acetylierung zu besitzen.

5.1.5 Histon H4-Hyperacetylierung ist ALL Zelllinienunabhängig

Auf eine graphische Darstellung der unterschiedlichen Histonacetylierung in Bezug auf die gewählten Zelllinien wurde im Kapitel 4.1.2 verzichtet. Genau wie in den Untersuchungen zur Apoptoseinduktion bzw. Proliferationsinhibition zeigen sich auch bei der Induktion der Histon H4-Acetylierung keine Unterschiede im Vergleich der gewählten Zellentitäten. Das Vorhandensein von chromosomalen Abberationen oder Hyperdiploidie scheint bei BCP-ALL Zellen nach Behandlung mit HDACi somit kein Einfluss auf den Effekt der Histonacetylierung zu haben.

5.2 HDACi induzieren Apoptose an ALL Zelllinien

Anhand der Ergebnisse, die im Kapitel 4.2. dargestellt sind, konnten wir zeigen, dass die von uns gewählten Hydroxaminsäuren SAHA, CBHA, und Pyroxamid sowie die kurzkettige Fettsäure VPA auch an BCP-ALL Zelllinien einen apoptoseinduzierenden Effekt besitzen. Dieser Effekt, dass konnten wir schon in Vorversuchen beobachten, lag für die Hydroxaminsäuren im mikromolaren und für VPA im millimolaren Konzentrationsbereich.

Die ermittelte Substanzkonzentration für VPA ist analog zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen^{65,68,73} die an ALL-, CLL-, oder AML-Zelllinien zeigen konnten, dass VPA im Bereich von 0,1 bis 10 mM Apoptose induziert. Für die Hydroxaminsäuren liegen ausführliche Resultate vor allem für SAHA vor. Die von Tsapis *et al.* gezeigten Ergebnisse resultieren aus Behandlung von B-ALL Zelllinien mit SAHA in Substanzkonzentrationen im Bereich von 0,1 bis 10 μ M. Diese Resultate sind mit unseren Ergebnissen durchaus vergleichbar.⁶⁸ Die an einigen Stellen beschriebene⁵⁵, schon im nanomolaren Bereich wirksame Induktion der Apoptose durch Hydroxaminsäuren konnte selbige Arbeitsgruppe an T-ALL Zelllinien zeigen. Für CBHA und Pyroxamid liegen insgesamt weniger Daten vor, doch auch diese zeigen eine Apoptoseinduktion im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 20 μ M bei *in vitro*-Versuchen mit Neuroblastom-, Balsenzellkarzinom-, Prostatakarzinom- und Endometriumkarzinom Zelllinien^{74,75} Die Wirkung von CBHA und Pyroxamid an Leukämiezellen ist bisher noch nicht untersucht worden.

5.2.1 Apoptoseinduktion ist zeit- und konzentrationsabhängig

Anhand der Ergebnisse aus Kapitel 4.2 lässt sich sowohl eine zeit- als auch eine substanzkonzentrationsabhängige Apoptoseinduktion postulieren. Dieses trifft ohne Ausnahme auf alle verwendeten Substanzen und ALL Zelllinien zu. Unterschiede im jeweiligen Potential der Apoptoseinduktion sowie mögliche Zelllinien spezifische Unterschiede sollen im Folgenden erörtert werden.

Wie sich anhand der Abbildung 8 und 9 (Kapitel 4.2.1) feststellen lässt, ist der Konzentrationsbereich der jeweiligen Substanz so gewählt worden, dass die kleinste Konzentration keine oder eine nur sehr mäßige Apoptoseinduktion über den Zeitraum von 96 Stunden bewirkt während bei der höchsten Substanzkonzentration schon nach 72 bis 96 Stunden eine fast vollständige Vitalitätsabnahme der behandelten Zellen erkennbar ist. Ebenso wird schon zum ersten Messzeitpunkt nach 24 Stunden Behandlung mit den

HDACi in den höheren bzw. höchsten Konzentrationsbereichen eine sichtbare Apoptose induziert. Auch diese Resultate treffen ohne Ausnahme auf alle verwendeten Substanzen und ALL Zelllinien zu.

Analog zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Tsapis *et al.*, die unter anderem die apoptotische Wirkung von VPA im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10 mM und SAHA im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10 μ M auf die ALL Zelllinie Reh untersuchten, zeigt sich eine deutliche verstärkte Apoptoseinduktion nach 48 und 72 Stunden in Abhängigkeit von Substanzkonzentration und Zeit.⁶⁸

Unterschiede fallen zum Teil im Vergleich der absoluten Zahlen auf. Induzieren 1 μ M SAHA in unseren Versuchen nach 48 bzw. 72 Stunden nur 5 bis 10 % Apoptose, beschreibt die Arbeitsgruppe aus Frankreich nach Behandlung mit 1 μ M SAHA nach 48 bzw. 72 Stunden schon 35 und 60 % Apoptose.

Die höhere Konzentration von 10 μ M SAHA ist nach 48 bzw. 72 Stunden mit circa 50 und 80 % Apoptose mit unseren Ergebnissen allerdings durchaus vergleichbar. Auch die Behandlung der ALL Zelllinie Reh mit VPA liefert vergleichbare Ergebnisse. Weiterhin zeigen die in dieser Arbeit veröffentlichten Ergebnisse der Apoptosemessung von uns nicht verwendeter B-ALL Zelllinien (RS-4;11 und TOM-1) nach Behandlung mit VPA und SAHA vergleichbare Apoptosekinetiken.

Auch andere Arbeitsgruppe, welche die Wirkung von B-ALL Zelllinien nach Behandlung mit anderen HDACi (TSA, LAQ824) untersucht haben bzw. Arbeitsgruppen, die Apoptoseinduktion durch HDACi an AML oder CLL Zellen untersuchen, beschreiben entsprechende Resultate der Apoptosekinetik.^{65,67}

5.2.2 Apoptoseinduktion ist HDACi-Substanzabhängig

Die zur Apoptoseinduktion notwendigen, unterschiedlichen Konzentrationsbereiche von Hydroxaminsäuren im Vergleich zu beispielsweise kurzkettigen Fettsäuren sind in anderen Arbeiten schon ausführlich beschrieben worden und konnten auch in unseren Versuchen bestätigt werden.⁷⁶ Vergleiche verschiedener Substanzklassen bezüglich ihrer apoptoseinduzierenden Wirkung sind verständlicherweise nur eingeschränkt möglich und sinnvoll. Abgesehen von diesen substanzklassenspezifischen Konzentrationen im milimolaren bzw. mikromolaren Bereich zeigen sich jedoch kaum Unterschiede in der durch VPA und Hydroxaminsäuren induzierten Apoptosekinetik. Welche chemischen, biologischen und molekulargenetischen Prozesse für die unterschiedliche Ausprägung

der HDAC Inhibition durch jeweils unterschiedliche HDACi verantwortlich sind, ist Gegenstand intensiver Forschung und noch nicht abschließend geklärt. Bekannt ist allerdings, dass sowohl die chemische Struktur der Substanzen, die zum Teil selektive Inhibition der HDAC Klassen 1, 2, 3 und 4 sowie die unterschiedliche neoplastische Zellentität Einfluss auf die Induktion der Apoptose hat.^{55,68}

In der vorliegenden Arbeit fiel abgesehen von den bekannten unterschiedlichen Konzentrationsbereichen zwischen VPA und Hydroxaminsäuren auf, dass Pyroxamid im Gegensatz zu CBHA und SAHA in gleicher Konzentration weniger apoptoseinduzierendes Potential besitzt. (siehe Abbildung 10 und 11, Kapitel 4.2.2) Ebenso war eine deutlich höhere $IC_{50/96h}$ für Pyroxamid auffällig wie Tabelle 4 (Kapitel 4.2.4) zeigt. Wie in der nachfolgenden Abbildung 20 zu erkennen, unterscheiden sich dabei die chemischen Strukturen der drei verwendeten Hydroxaminsäuren zum Teil nur marginal.

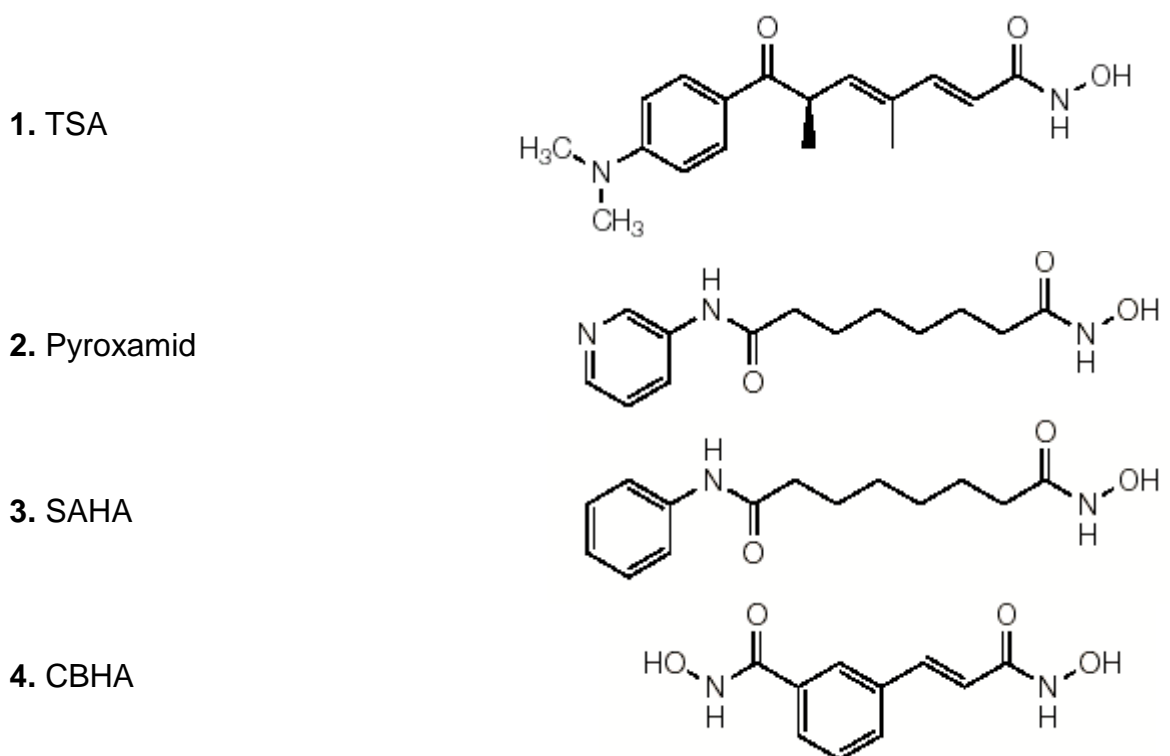


Abbildung 20: Strukturformeln der Hydroxaminsäure TSA (1.) und den später daraus synthetisierten Substanzen Pyroxamid (2.), SAHA (3.) und CBHA (4.).

Besonders SAHA und Pyroxamid unterscheiden sich nur durch den Austausch von einem Kohlenstoff- durch ein Stickstoffatom an einer Position.

Gerade an Hydroxaminsäuren ist allerdings die Inhibition der HDAC ausführlich untersucht worden. (siehe Kapitel 1.6)⁶ Diese Forschungsergebnisse zeigen unter anderem,

dass hauptsächlich die NHOH Gruppe der Hydroxaminsäuren durch eine Bindung am Zink Ion die HDAC Aktivität inhibieren. Allerdings ist auch bekannt, dass TSA Hyperacetylierung und Tumorstwachstumshinhibition schon im nanomolaren Konzentrationsbereich induziert.³¹ Diese Ergebnisse legen nahe, dass auch andere Strukturbereiche der Substanzen einen Einfluss auf die HDAC Inhibition haben und könnte die oben genannten Unterschiede in der Apoptoseinduktion von Pyroxamid bzw. SAHA und CBHA erklären. Aufgrund nur unzureichend vorliegender Daten anderer Arbeitsgruppen ist diesbezüglich keine Gegenüberstellung mit den von uns ermittelten Ergebnissen möglich.

5.2.3 Apoptoseinduktion ist ALL Zelllinienunabhängig

Die von uns gewählten vier BCP- ALL Zelllinien weisen jeweils zellspezifisch genetische Besonderheiten auf, welche in ihrer Gesamtheit auch bei einem hohen Prozentsatz kindlicher B-ALL Ersterkrankungen und Rezidiven gefunden werden. Von Interesse war in unserem Versuchsaufbau daher die auch in einigen Veröffentlichungen geäußerte These zu untersuchen, ob spezifische chromosomale Translokationen eine erhöhte Sensibilität der Zellen auf Apoptoseinduktion durch HDAC Inhibition induzieren.⁶¹

So ist bekannt das bei der AML FAB M3 das Fusionstranskript der Translokation t(15;17) (PML-RAR α) transkriptionsinhibierend wirkt, indem es einen Korepressor-komplex (mit u.a. HDAC3 und CBP/300) an die Ziel-DNA rekrutiert.^{26,27} Und bei der AML FAB M2 erzeugt die nicht seltene chromosomale Translokation t(8;21) ein AML1-ETO Fusionsprotein, welches mit HDAC 1 interagiert und genau wie bei einer TEL-AML1 Fusion die transkriptionsaktivierende Funktion von AML1 unterbindet.^{29,77} (siehe Kapitel 1.4)

In den Resultaten der vorliegenden Arbeit finden sind jedoch keine Zelllinien-spezifischen Unterschiede in der Apoptoseinduktion, wie Abbildung 13 und 14 (Kapitel 4.2.3) belegen. Diese Ergebnisse bestätigen die schon im Kapitel 1.8 beschriebene Tatsache, dass HDACi in unterschiedlichen Leukämien und Lymphomen auch ohne Expression aberranter Fusionstranskripte eine dosisabhängige Wachstumshinhibition und Apoptose bewirken.^{58,59} Für die TEL/AML1 positive bzw. negative ALL konnte eine Niederländischen Arbeitsgruppe anhand kultivierter Patientenzellen nach Behandlung mit dem zyklischen Tetrapeptid FK288 zeigen, dass der zytotoxische Effekt des verwendeten HDACi unabhängig vom genetischen Subtyp ist.⁶⁰

5.3 HDACi induzieren Proliferationsinhibition an ALL Zelllinien

Anhand der Ergebnisse, die in Kapitel 4.3 dargestellt sind, konnten wir zeigen, dass die von uns gewählten Hydroxaminsäuren SAHA, CBHA, und Pyroxamid sowie die kurzkettige Fettsäure VPA an BCP-ALL Zelllinien einen proliferationshemmenden Effekt besitzen.

Die in dieser Arbeit mit Hilfe des MTS Assays durchgeführten Analysen wurden zur Messung des inhibierten Wachstums der ALL Zelllinien nach Behandlung mit HDACi und zur Überprüfung und Evaluierung der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Apoptosemessung durchgeführt. Da das Prinzip dieses Assays auf einer Messung der Konzentration an mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen beruht und diese direkt proportional zur Zellzahl ist, kann daher sowohl eine reine Wachstumsinhibition als auch eine darüber hinaus gehende Vitalitätsabnahme durch z.B. Apoptose gemessen werden.

In vielen Arbeiten, die sich mit der HDACi vermittelten Vitalitätsabnahme an neoplastischen Zellen beschäftigen, wurde deshalb häufig entweder nur eine Apoptosemessung (z.B. mit Annexin V/PI FACS-Analyse oder TUNEL (deoxynucleotidyl-transferase-mediated UTP end labeling) oder eine Proliferationsmessung (z.B. mit MTT/MTS- oder BrDU-Assay) durchgeführt um die Veränderung der Vitalität zu untersuchen.^{78,65}

5.3.1 Proliferationsinhibition ist zeit- und konzentrationsabhängig

Der proliferationsinhibierende Effekt zahlreicher HDACi ist an unterschiedlichen neoplastischen Zellen *in vitro* und *in vivo* schon ausführlich untersucht worden.^{59,79} Dieser Effekt ist unter anderem abhängig von der Substanzkonzentration und von der Zeit in der die HDACi auf die Zellen wirken. (siehe Kapitel 4.2.3.1) Sakarjiri *et al.* haben diese Proliferationsinhibition an unterschiedlichen lymphoiden und lymphatischen Zelllinien nach Behandlung mit VPA und SAHA beschrieben.⁶⁶ Unter anderem wurden auch die ALL Zelllinien Reh und Nalm 6 nach 96 Stunden Behandlung mit 0,5 bis 5 μM SAHA und 0,1 bis 5 mM VPA mithilfe des MTT Assays analysiert. Dabei lag die $\text{ED}_{50/96\text{h}}$ der Proliferationsinhibition für VPA bei 0,9 bis 1,0 mM und für SAHA bei 1,2 bis 1,6 μM .

Diese Daten sind mit den von uns ermittelten Ergebnissen durchaus vergleichbar, wie Abbildung 18 und Abbildung 19, Kapitel 4.2.3.2 zeigen, auch wenn in unserem Fall auf eine Berechnung der spezifischen ED_{50} bezüglich der Proliferation verzichtet wurde. Interessanterweise teilt die oben genannte Arbeitsgruppe die verschiedenen lymphoi-

den und lymphatischen Zelllinien nach ihrer Sensitivität bezüglich der HDACi vermittelten Proliferationsinhibition ein. Demnach gehört z.B. Nalm 6 zu den Zelllinien mit höherer Sensitivität, Reh zu den mit geringerer Sensitivität. Aufgrund der von unserer Arbeitsgruppe gewählten HDACi-Konzentrationen von 1, 2, 4, 8 und 10 μM (SAHA, CBHA und Pyroxamid) und 0,5, 1 und 2 mM (VPA) lässt sich ein entsprechender Vergleich nur anhand weniger Messdaten durchführen. Allerdings könnten auch unserer Resultate auf einen tatsächlich bestehenden, dezenten Unterschied in der Sensitivität der durch VPA und SAHA vermittelten Proliferationsinhibition an den Zelllinien Reh bzw. Nalm 6 hinweisen.

5.3.2 MTT Assay statt Annexin V/Propidiumjodid FACS-Analyse

Das ein Vergleich von Ergebnissen aus Apoptosemessungen mit durch MTT Assay erhobenen Daten grundsätzlich möglich ist, konnten schon andere Arbeitsgruppen zeigen.⁸⁰ In der vorliegenden Arbeit wurden mithilfe zweier unterschiedlicher und unabhängiger Methoden die Vitalitätsabnahme von ALL Zelllinien nach Behandlung mit HDACi untersucht. Wir konnten zeigen, dass beide Methoden vergleichbaren Kinetiken bezüglich der zeit- und konzentrationsabhängigen Vitalitätsabnahme detektieren wie Abbildung 9 (Kapitel 4.2.1) und Abbildung 15 (Kapitel 4.3.1) beispielhaft darstellen.

Auch die in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Unterschiede von Pyroxamid und SAHA bzw. CBHA im Potential der Apoptoseinduktion sind in den Messergebnissen des MTT Assay gut erkennbar. (siehe Abbildung 16, Kapitel 4.3.2) Die im Kapitel 5.3.1 diskutierte, dezent unterschiedliche Sensitivität der Zelllinien Reh und Nalm 6 ist bei Behandlung der Zellen mit apoptotisch wirksamen Substanzkonzentrationen allerdings nicht auffällig.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist es möglich, in nachfolgenden *in vitro*-Versuchen mit ALL Zelllinien auf die deutlich aufwendigere Apoptosemessung mithilfe des Annexin V/Propidiumjodid FACS-Analyse zu Gunsten des MTT Assays zu verzichten.

6 Zusammenfassung

Die Therapie eines ALL-Rezidivs im Kindesalter stellt auch in der modernen Medizin eine große Herausforderung dar. Trotz beachtlicher Erfolge in der Therapie der ALL-Ersterkrankung kann beim ALL-Rezidiv mit der derzeitigen Therapie nur ein Langzeitüberleben von unter 40 % der Kinder erreicht werden. So ist neben der Ermittlung unbekannter Faktoren, aufgrund welcher die Ersttherapie versagt, sowie der Ermittlung prognostischer relevanter Faktoren zur Risikostratifizierung des Rezidivs die Therapieoptimierung mit Erprobung neuer Substanzen eine wichtige Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieansätze.

Acetylierungs- und Deacetylierungsprozesse von DNA-assoziierten Histonen durch die gegensätzlich arbeitenden Enzyme HAT und HDAC führen zu Modulierungen der zellulären Genexpression. In transformierten Zellen kann durch eine Inhibition der HDAC eine Histonhyperacetylierung erzielt werden, welche über eine Modifikation der Nukleosomenstruktur die Reaktivierung von Genen bewirkt. Durch diese Reaktivierung unterschiedlicher Gene die für Proliferationsinhibition, Apoptoseinduktion und Differenzierung kodieren kann die Progression der malignen Veränderung gebremst und verhindert werden.

In dieser Arbeit wurden daher unterschiedliche HDACi bezüglich ihrer histonacetylierenden und zytotoxischen Wirkung auf unterschiedliche BCP-ALL Zelllinien untersucht und charakterisiert. Durch die Auswahl der von uns verwendeten, unterschiedlichen BCP-ALL Zelllinienentitäten konnten wir einen Großteil pädiatrischer ALL darstellen. (siehe Kapitel 3.2.1) Die vier verwendeten HDACi zeigten schon in den von uns durchgeführten Vorversuchen vielversprechendes Potential, wobei besonders VPA als zugelassenes Medikament, sowie SAHA (erst nach Abschluss unserer Untersuchungen zugelassen) für die Behandlung maligner Erkrankungen in absehbarer Zeit als neue Therapieoptionen in Frage kommen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle von uns verwendeten HDACi an den ALL Zelllinien eine zeit- und konzentrationsabhängige Histon H4-Hyperacetylierung, Apoptose und Proliferationsinhibition induzieren.

Die vier von uns verwendeten BCP-ALL Zelllinien mit jeweils charakteristischen zytogenetischen Besonderheiten zeigten keine Unterschiede bezüglich Zytotoxizität und Histon H4-Hyperacetylierung.

Eine Reduktion des zytotoxischen Potentials und der Hyperacetylierung war bei den Hydroxaminsäuren ausschließlich für Pyroxamid im Gegensatz zu SAHA und CBHA zu erkennen. Dieser Effekt bestätigte sich in allen durchgeführten Untersuchungen.

Weiterhin zeigten unsere Untersuchungen, dass die Histonhyperacetylierung zeitlich vor Beginn der Apoptose induziert wird. Dieses legt einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der Histonhyperacetylierung und der in Folge auftretenden Proliferationsinhibition und Apoptoseinduktion auch bei der Behandlung von BCP-ALL Zelllinien mit HDACi nahe.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse erscheint es daher möglich, eine direkte Assoziation zwischen Histonacetylierung und Apoptoseinduktion bzw. Proliferationsinhibition zu postulieren. Die Stärke der Zellzahlabnahme an ALL Zellen nach Behandlung mit HDACi ist dabei direkt proportional zur Stärke der Histon H4-Acetylierung.

Gegenstand weiterer Forschung sollte es daher sein, den kausalen Zusammenhang zwischen der Histonhyperacetylierung und der in Folge auftretenden Apoptose zu klären sowie auch für ALL Zellen die spezifischen apoptoseinduzierenden Mechanismen und Signalwege zu differenzieren. Ebenso sollten die in dieser Arbeit vorgestellten *in vitro*-Experimente durch weitere *in vivo*-Untersuchungen am Mausmodell überprüft und evaluiert werden. Erste vielversprechende *in vivo*-Daten sind parallel zu den Arbeiten an dieser Dissertation durch unsere Arbeitsgruppe erstellt und veröffentlicht worden.⁶⁹

Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse dieser Arbeit das vielversprechende Wirkungsprinzip der HDACi. Durch die Selektivität ihres apoptoseinduzierenden Effektes und ihre gute Verträglichkeit eröffnen die Substanzen die Perspektive für eine mögliche neue und potente Behandlungsoption im Rahmen der ALL- und ALL-Rezidiv-Therapie.

7 Literatur

1. Einsiedel, H.G. *et al.* Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Munster Group 87. *J Clin Oncol.* **23**, 7942-50. (2005).
2. Kornberg, R.D. & Lorch, Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**, 285-94 (1999).
3. Gregory, P.D., Wagner, K. & Horz, W. Histone acetylation and chromatin remodeling. *Exp Cell Res* **265**, 195-202 (2001).
4. Strahl, B.D. & Allis, C.D. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-5 (2000).
5. 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).
6. Marks, P. *et al.* Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* **1**, 194-202. (2001).
7. Minucci, S. & Pelicci, P.G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer.* **6**, 38-51. (2006).
8. Roth, S.Y., Denu, J.M. & Allis, C.D. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**, 81-120 (2001).
9. Timmermann, S., Lehrmann, H., Poleskaya, A. & Harel-Bellan, A. Histone acetylation and disease. *Cell Mol Life Sci* **58**, 728-36 (2001).
10. Gray, S.G. & Ekstrom, T.J. The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res* **262**, 75-83 (2001).
11. Khochbin, S., Verdel, A., Lemerrier, C. & Seigneurin-Berny, D. Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 162-6 (2001).
12. Verdin, E., Dequiedt, F. & Kasler, H.G. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet.* **19**, 286-93. (2003).
13. Landry, J. *et al.* The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5807-11 (2000).
14. Gregoretta, I.V., Lee, Y.M. & Goodson, H.V. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol.* **338**, 17-31. (2004).
15. Villar-Garea, A. & Esteller, M. Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. *Int J Cancer* **112**, 171-8. (2004).
16. Lu, J., McKinsey, T.A., Zhang, C.L. & Olson, E.N. Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. *Mol Cell* **6**, 233-44 (2000).

17. Bernstein, B.E., Tong, J.K. & Schreiber, S.L. Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13708-13 (2000).
18. Deckert, J. & Struhl, K. Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors. *Mol Cell Biol* **21**, 2726-35 (2001).
19. Robertson, K.D. *et al.* DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* **25**, 338-42 (2000).
20. 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).
21. Smirnov, D.A., Hou, S. & Ricciardi, R.P. Association of histone deacetylase with COUP-TF in tumorigenic Ad12-transformed cells and its potential role in shut-off of MHC class I transcription. *Virology* **268**, 319-28 (2000).
22. Cress, W.D. & Seto, E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol* **184**, 1-16. (2000).
23. Gayther, S.A. *et al.* Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nat Genet* **24**, 300-3. (2000).
24. Sakai, K., Nagahara, H., Abe, K. & Obata, H. Loss of heterozygosity on chromosome 16 in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* **7**, 288-92. (1992).
25. Borrow, J. *et al.* The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat Genet* **14**, 33-41 (1996).
26. Pandolfi, P.P. Transcription therapy for cancer. *Oncogene* **20**, 3116-27 (2001).
27. Minucci, S., Nervi, C., Lo Coco, F. & Pelicci, P.G. Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias? *Oncogene*. **20**, 3110-5. (2001).
28. 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).
29. Wang, J., Sauntharajah, Y., Redner, R.L. & Liu, J.M. Inhibitors of histone deacetylase relieve ETO-mediated repression and induce differentiation of AML1-ETO leukemia cells. *Cancer Res* **59**, 2766-9. (1999).
30. Bereshchenko, O.R., Gu, W. & Dalla-Favera, R. Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. *Nat Genet*. **32**, 606-13. Epub 2002 Oct 28. (2002).
31. Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M. & Beppu, T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* **265**, 17174-9 (1990).
32. Miller, T.A., Witter, D.J. & Belvedere, S. Histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem*. **46**, 5097-116. (2003).

33. Finnin, M.S. *et al.* Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* **401**, 188-93 (1999).
34. Van Lint, C., Emiliani, S. & Verdin, E. The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr* **5**, 245-53 (1996).
35. Gray, S.G., Qian, C.N., Furge, K., Guo, X. & Teh, B.T. Microarray profiling of the effects of histone deacetylase inhibitors on gene expression in cancer cell lines. *Int J Oncol.* **24**, 773-95. (2004).
36. Lee, J.H. *et al.* Histone deacetylase inhibitor enhances 5-fluorouracil cytotoxicity by down-regulating thymidylate synthase in human cancer cells. *Mol Cancer Ther.* **5**, 3085-95. (2006).
37. Qiu, L. *et al.* Anti-tumour activity in vitro and in vivo of selective differentiating agents containing hydroxamate. *Br J Cancer.* **80**, 1252-8. (1999).
38. Ungerstedt, J.S. *et al.* Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 673-8. Epub 2005 Jan 6. (2005).
39. Nebbioso, A. *et al.* Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat Med* **11**, 77-84. Epub 2004 Dec 26. (2005).
40. Insinga, A. *et al.* Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med* **11**, 71-6. Epub 2004 Dec 26. (2005).
41. Zhang, X.D., Gillespie, S.K., Borrow, J.M. & Hersey, P. The histone deacetylase inhibitor suberic bishydroxamate regulates the expression of multiple apoptotic mediators and induces mitochondria-dependent apoptosis of melanoma cells. *Mol Cancer Ther.* **3**, 425-35. (2004).
42. Moore, P.S. *et al.* Gene expression profiling after treatment with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A reveals altered expression of both pro- and anti-apoptotic genes in pancreatic adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta.* **1693**, 167-76. (2004).
43. Zhang, Y., Adachi, M., Kawamura, R. & Imai, K. Bmf is a possible mediator in histone deacetylase inhibitors FK228 and CBHA-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* **13**, 129-40. (2006).
44. Ruefli, A.A. *et al.* The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 10833-8. Epub 2001 Sep 4. (2001).
45. Rosato, R.R., Almenara, J.A. & Grant, S. The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated

- by generation of reactive oxygen species and induction of p21^{CIP1/WAF1}. *Cancer Res.* **63**, 3637-45. (2003).
46. Richon, V.M. *et al.* A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3003-7 (1998).
 47. Xiao, H., Hasegawa, T. & Isobe, K. Both Sp1 and Sp3 are responsible for p21^{waf1} promoter activity induced by histone deacetylase inhibitor in NIH3T3 cells. *J Cell Biochem* **73**, 291-302 (1999).
 48. Michaelis, M. *et al.* Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Mol Pharmacol.* **65**, 520-7. (2004).
 49. Coradini, D. *et al.* Inhibition of hepatocellular carcinomas in vitro and hepatic metastases in vivo in mice by the histone deacetylase inhibitor HA-But. *Clin Cancer Res.* **10**, 4822-30. (2004).
 50. Magner, W.J. *et al.* Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors. *J Immunol.* **165**, 7017-24. (2000).
 51. Butler, L.M. *et al.* Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* **60**, 5165-70 (2000).
 52. Coffey, D.C. *et al.* The histone deacetylase inhibitor, CBHA, inhibits growth of human neuroblastoma xenografts in vivo, alone and synergistically with all-trans retinoic acid. *Cancer Res* **61**, 3591-4 (2001).
 53. Gore, S.D. & Carducci, M.A. Modifying histones to tame cancer: clinical development of sodium phenylbutyrate and other histone deacetylase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* **9**, 2923-34 (2000).
 54. 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).
 55. Dokmanovic, M., Clarke, C. & Marks, P.A. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res.* **5**, 981-9. (2007).
 56. Rasheed, W.K., Johnstone, R.W. & Prince, H.M. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs.* **16**, 659-78. (2007).
 57. Duvic, M. & Vu, J. Vorinostat in cutaneous T-cell lymphoma. *Drugs Today (Barc).* **43**, 585-99. (2007).
 58. Marks, P.A., Richon, V.M. & Rifkind, R.A. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1210-6 (2000).
 59. Bolden, J.E., Peart, M.J. & Johnstone, R.W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* **5**, 769-84. (2006).

60. Stams, W.A. *et al.* Effect of the histone deacetylase inhibitor depsipeptide on B-cell differentiation in both TEL-AML1-positive and negative childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. **90**, 1697-9. (2005).
61. Melnick, A. & Licht, J.D. Histone deacetylases as therapeutic targets in hematologic malignancies. *Curr Opin Hematol*. **9**, 322-32. (2002).
62. He, L.Z. *et al.* Histone deacetylase inhibitors induce remission in transgenic models of therapy-resistant acute promyelocytic leukemia. *J Clin Invest*. **108**, 1321-30. (2001).
63. Kuendgen, A. & Gattermann, N. Valproic acid for the treatment of myeloid malignancies. *Cancer*. **110**, 943-54. (2007).
64. Xu, Y., Voelter-Mahlknecht, S. & Mahlknecht, U. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid down-regulates expression levels of Bcr-abl, c-Myc and HDAC3 in chronic myeloid leukemia cell lines. *Int J Mol Med*. **15**, 169-72. (2005).
65. Bokelmann, I. & Mahlknecht, U. Valproic acid sensitizes chronic lymphocytic leukemia cells to apoptosis and restores the balance between pro- and antiapoptotic proteins. *Mol Med*. **14**, 20-7. (2008).
66. Sakajiri, S. *et al.* Histone deacetylase inhibitors profoundly decrease proliferation of human lymphoid cancer cell lines. *Exp Hematol*. **33**, 53-61. (2005).
67. Romanski, A. *et al.* Use of a novel histone deacetylase inhibitor to induce apoptosis in cell lines of acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. **89**, 419-26. (2004).
68. Tsapis, M. *et al.* HDAC inhibitors induce apoptosis in glucocorticoid-resistant acute lymphatic leukemia cells despite a switch from the extrinsic to the intrinsic death pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. **39**, 1500-9. Epub 2007 Mar 15. (2007).
69. Einsiedel, H.G. *et al.* Histone deacetylase inhibitors have antitumor activity in two NOD/SCID mouse models of B-cell precursor childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. **20**, 1435-6. Epub 2006 Jun 29. (2006).
70. Richon, V.M., Sandhoff, T.W., Rifkind, R.A. & Marks, P.A. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10014-9 (2000).
71. Gottlicher, M. *et al.* Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo J*. **20**, 6969-78. (2001).
72. Weisberg, E. *et al.* Histone deacetylase inhibitor NVP-LAQ824 has significant activity against myeloid leukemia cells in vitro and in vivo. *Leukemia*. **18**, 1951-63. (2004).
73. Kawagoe, R., Kawagoe, H. & Sano, K. Valproic acid induces apoptosis in human leukemia cells by stimulating both caspase-dependent and -independent apoptotic signaling pathways. *Leuk Res*. **26**, 495-502. (2002).

74. Butler, L.M. *et al.* Inhibition of transformed cell growth and induction of cellular differentiation by pyroxamide, an inhibitor of histone deacetylase. *Clin Cancer Res* **7**, 962-70 (2001).
75. Takai, N. *et al.* CBHA is a family of hybrid polar compounds that inhibit histone deacetylase, and induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cells. *Oncology*. **70**, 97-105. Epub 2006 Apr 4. (2006).
76. 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).
77. Wang, L.C. *et al.* The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev* **12**, 2392-402 (1998).
78. Peart, M.J. *et al.* Novel mechanisms of apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res*. **63**, 4460-71. (2003).
79. Xu, W.S., Parmigiani, R.B. & Marks, P.A. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*. **26**, 5541-52. (2007).
80. Feng, C.Q. *et al.* Detection of cell apoptosis by MTT assay. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*. **22**, 262-3. (2002).
81. Wagner, J.M. *et al.* Histone deacetylase (HDAC) inhibitors in recent clinical trials for cancer therapy. *Clin Epigenet* **1**, 117-36. (2010).

8 Anhang

8.1 Danksagung

Vordringlich gilt mein Dank meinem direkten Betreuer Dr. med. Hagen Graf von Einsiedel und meinem Doktorvater, Direktor der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie/Hämatologie und Leiters des molekularbiologischen Labors, Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Karl Seeger. Ihnen möchte ich nicht nur für die gute Betreuung, sondern besonders auch für die lehrreiche klinische Ausbildung danken, die ich von ihnen erfahren habe.

Weiterhin möchte ich mich bei der Kind- Philipp- Stiftung für die Gewährung eines Promotionsstipendiums bedanken, mit dem es mir möglich war auch über die vorliegende Arbeit hinaus die Wirkung von HDACi an in vitro- und in vivo- Modellen kindlicher Leukämien zu untersuchen.

Ich danke außerdem sehr herzlich Cornelia Eckert für die geduldige Hilfe, jederzeitige Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft bei labormethodischen und anderen Fragen.

Außerdem einen großen Dank allen MTA's des molekularbiologischen Labors für ihre Freundlichkeit und Nachsicht.

8.2 Lebenslauf

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

8.3 Publikationsliste

1. Clonal stability of initial leukemia in a child with central nervous system relapse 7.4 years after bone marrow relapse of common acute lymphoblastic leukemia.
Eckert C, Einsiedel HG, Hartmann R, von Stackelberg A, Völpel S, Guggemos A, Hanzsch N, Kawan L, Seeger K, Henze G
Haematologica, 2004
2. Histone deacetylase inhibitors have antitumor activity in two NOD/SCID mouse models of B-cell precursor childhood acute lymphoblastic leukemia.
Einsiedel HG, Kawan L, Eckert C, Witt O, Fichtner I, Henze G, Seeger K
Leukemia, 2006
3. Progressive multifocal leukoencephalopathy after allogeneic bone marrow transplantation
Kawan L, Kentouche K, Beck J F, Gruhn B
Poster, 4th International Congress "Sepsis and Multiorgan Dysfunction" 2009
4. Invasive zerebrale Aspergillose mit thalamischem Schmerzsyndrom nach allogener Stammzelltransplantation
Kawan L, Kentouche K, Beck J F, Mentzel H J, Gruhn B
Poster, STGKJM Jahrestagung 2011

8.4 Erklärung

„Ich, Lars Kawan, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Histon-Deacetylase Inhibitoren (HDACi) als apoptoseinduzierende und proliferationsinhibierende Substanzen im Zellkulturmodell der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) im Kindesalter“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift