

Aus dem Institut für Toxikologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Hemmung von Histon-Deacetylasen der Klasse I wirkt synergistisch mit
FMS-like Tyrosinkinase 3 (FLT3)-Hemmung in akuter myeloischer
Leukämie mit interner Tandemduplikation (ITD)**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin

der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Vanessa Maria Wachholz
aus Düsseldorf

Mainz, 2019

Wissenschaftlicher

Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 10. Dezember 2019

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Formelverzeichnis	X
Anhangsverzeichnis.....	XI
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion.....	3
2.1 Hämatopoese.....	3
2.2 Akute myeloische Leukämie	4
2.3 Behandlung der AML	5
2.4 Die Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3	7
2.5 Der FLT3-Inhibitor AC220	10
2.6 Histon-Deacetylasen und Histon-Acetyl-Transferasen.....	12
2.7 Histon-Deacetylase-Inhibitoren als Therapie von AML	13
2.8 Der Zellzyklus und die Regulation der Kontrollpunkte als Ansatzpunkt in der Behandlung der AML	17
2.9 DNA-Schäden und die Rolle von HDACs in der DNA-Reparatur	21
2.10 Apoptose.....	22
2.11 Die E2 Ubiquitin-Konjugase UBCH8	24
3 Material und Methoden	26
3.1 Material	26
3.1.1 Geräte.....	26
3.1.2 Labormaterialien	27
3.1.3 Chemikalien	27
3.1.4 Puffer- Lösungen und Färbungen	28
3.1.5 Acrylamidgele	30
3.1.6 Zelllinie	30
3.1.7 Medium und Mediumzusätze	30
3.1.8 Inhibitoren	31
3.1.9 Primäre Antikörper.....	31
3.1.10 Sekundäre Antikörper (Western-Blot-Analyse).....	32
3.1.11 Sekundäre Antikörper (Immunfluoreszenz-Analyse)	32
3.1.12 Software	32
3.2 Methoden	33

3.2.1 Zellkultur	33
3.2.1.1 Auftauen der Zellen.....	33
3.2.1.2 Erhaltungskultur	33
3.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Zellaussaat	33
3.2.3 Behandeln der Zellen mit Inhibitoren	34
3.2.4 Herstellung von Proteinlysaten	34
3.2.5 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)	34
3.2.6 SDS-Gelelektrophorese	35
3.2.7 Western-Blot	36
3.2.8 Durchflusszytometrische Analysen	36
3.2.8.1 Apoptose-Messung	37
3.2.8.2 Vitalitäts-Messung.....	38
3.2.8.3 Zellzyklus-Messung.....	38
3.2.8.4 Combeneft.....	39
3.2.9 Comet Assay	40
3.2.10 Immunfluoreszenz-Analyse	41
4 Ergebnisse.....	43
4.1 Ermittlung zellulärer Reaktionen auf die Behandlung mit AC220 und/ oder FK228 via Durchflusszytometrie nach 24 h.....	43
4.2 Zelluläre Effekte der Kombinationsbehandlungen auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analysen	50
4.2.1 Einzelbehandlung der MV4-11 Zellen mit AC220 und FK228 hemmt die Induktion von FLT3 und ERK.....	50
4.2.2 Synergistische Wirkungen gegenüber FLT3, STAT5 und ERK durch Kombinationsbehandlung der Zellen mit AC220 und FK228	53
4.2.3 Inhibition der an der Regulation des G2/M-Kontrollpunkts beteiligten Proteine durch kombinierte Behandlung von AC220 und FK228.....	54
4.2.4 p53 wird durch die Behandlung mit AC220 und FK228 in Kombination stabilisiert, p21 ^(Cip1/Waf1) dagegen wird reduziert.....	55
4.2.5 Induktion von γ H2AX ^(Ser139) und Reduktion von RAD51 deuten DNA-Schäden bei gemeinsamer Gabe von AC220 und FK228 an	58
4.2.6 Erhöhte Apoptoseinduktion durch die Kombination aus AC220 und FK228	59
4.3 Ermittlung des DNA-Schadens durch Comet Assays	61
4.4 Nachweis von Veränderungen in der S-Phase durch die Behandlung mit AC220 und/oder FK228 unter Zuhilfenahme von Immunfluoreszenz.....	64
4.5 Ermittlung zellulärer Reaktionen via Durchflusszytometrie durch Veränderungen im Zellzyklus nach 16 h Behandlung mit AC220 und/oder FK228	67

4.6	Ermittlung zellulärer Reaktionen auf die Behandlung mit AC220 und/oder RGFP966 via Durchflusszytometrie nach 24 h	70
4.7	Zelluläre Effekte der Kombinationsbehandlungen auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analysen	79
4.7.1	Kombinationsbehandlung der Zellen mit AC220 und RGFP966 zeigt synergistische Wirkung gegenüber FLT3 und ERK	79
4.7.2	Hemmung von WEE1 und CHK1 im Bezug zum G2/M-Kontrollpunkt durch kombinierte Behandlung in MV4-11 Zellen von AC220 und RGFP996.....	81
4.7.3	RGFP966 induziert p21 ^(Cip1/Waf1) , in Kombination mit AC220 ist kein Signal an p21 ^(Cip1/Waf1) detektierbar	82
4.7.4	Erhöhte Induktion von p-RPA ^(Thr21) und γH2AX ^(Ser139) bei gemeinsamer Gabe von AC220 und RGFP966	84
4.7.5	Erhöhtes aktivierte Caspase 3-Signal als Resultat der Kombination aus AC220 und RGFP966 in MV4-11 Zellen	84
5	Diskussion.....	86
5.1	Inhibition von HDACs der Klasse I wirkt synergistisch mit der Inhibition von FLT3 in FLT3-ITD-positiven Zellen	86
5.2	AC220, FK228 und RGFP966 induzieren unterschiedliche Anteile der Zellen in den Zellzyklusphasen G1, S und G2.....	91
5.3	Kombinationsbehandlungen aus AC220 und HDACi wirken in AML-Zellen synergistisch auf die Degradation/Reduzierung von Proteinen.....	95
5.4	Rolle von DNA-Schäden als Mechanismus der Apoptoseinduktion durch Kombinationsbehandlungen von FLT3i und HDACi.....	98
6	Zusammenfassung	104
	Literaturverzeichnis	XII
	Anhang.....	XXXVI
	Danksagung.....	XLVII
	Lebenslauf	XLVIII

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	CDC25	cell division cycle 25
°C	Grad Celsius	CDK	Cyclin-abhängige Kinase
A	Ampere	CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester
Abb.	Abbildung	CHK1	Checkpoint-Kinase 1
ac-	acetyliert	CHK2	Checkpoint-Kinase 2
AC220	Quizartinib	clvd.	cleaved; aktiviert
AKT	Proteinkinase B	CO₂	Kohlenstoffdioxid
AML	akute myeloische Leukämie	CREB	cAMP response element-binding protein
Apaf-1	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1	CRL	cullin ring-based E3 ubiquitin ligase
APS	Ammoniumperoxidsulfat	CTRL	control; Kontrolle
Aqua dest.	Aqua destillata; destilliertes Wasser	DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Ara-C	Cytosinarabinosid	DDR	DNA damage response
Asp	Asparaginsäure	dest.	destillata
ATF4	activating transcription factor 4	DMSO	Dimethylsulfoxid
ATM	ataxia telangiectasia mutated	DNA	Desoxyribonukleinsäure
ATP	Adenosintriphosphat	DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3 related	DSB	double-strand break; DNA-Doppelstrangbruch
BAD	BCL2-antagonist-of-cell-death	DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
BAX	BCL2-associated X protein	DTT	Dithiothreitol
BCL2	B-cell lymphoma 2	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
BCL-X_L	B-cell lymphoma-extra large	EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
BID	BH3-interacting domain death agonist	EGFR	epidermal growth factor receptor
BSA	Bovines Serumalbumin	ELN	European Leukemia Net
bspw.	beispielsweise	ERK	extracellular-signal regulated kinases
bzw.	beziehungsweise	et al.	und andere
ca.	circa	EtOH	Ethanol
CaCl₂	Calciumchlorid	FACS	fluorescence-activated cell sorting
Caspase	cysteinylnl aspartate-specific protease	FCS	fetal calf serum
CBP	CREB binding protein	FDA	Food and Drug Administration
CD	cluster of differentiation	FITC	fluorescein isothiocyanate

FK228	Romidepsin	Lys	Lysin
FLT3	FMS-like Tyrosinkinase 3	m	milli
FLT3i	FLT3-Inhibitor	M	Molar (mol/L)
FPG	formamidopyrimidine DNA glycosylase	M-Phase	Mitose-Phase
FSC	forward scatter	MAPK	mitogen-activated protein kinase
g	Gramm	max.	maximal
G	Gravitationskonstante	MCL1	induced myeloid leukemia cell differentiation protein
G1-Phase	Gap 1-phase	MDM2	murine double minute oncogene
G2-Phase	Gap 2-phase	MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	mg	Milligramm
h	Stunde	min	Minute
H	Histon	mL	Milliliter
HAT	Histon-Acetyl-Transferase	MLL	Histon Methyltransferase
HCl	Salzsäure	mm	Millimeter
HDAC	Histon-Deacetylase	mM	Millimolar
HDACi	Histon-Deacetylase-Inhibitor	n	Variable der Anzahl
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	NaAz	Natriumazid
HFS	hypotonic fluorochrome solution	NaCl	Natriumchlorid
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus	NAD⁺	Nicotinamidadeninucleotid
Hox	Homöobox	NaOH	Natriumhydroxid
HSA	highest single agent	nm	Nanometer
HSP90	heat shock protein 90	nM	Nanomolar
IAP	inhibitor of apoptosis protein	NP40	Nonidet® P-40
IC₅₀	half maximal inhibitory concentration	ns	nicht signifikant
IGF-1R	insulin-like growth factor 1 receptor	NuRD	nucleosome remodelling deacetylase complex
ITD	interne Tandemduplikation	p-	phosphoryliert
JAK	Januskinase	p21^(Cip1/Waf1)	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
Kap.	Kapitel	P53	Tumorsuppressorprotein 53
KCl	Kaliumchlorid	PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
kDa	Kilodalton	PBS	phosphate buffered saline
kg	Kilogramm	PCNA	proliferating cell nuclear antigen
L	Liter	pH	potentia hydrogenii
LBH589	Panobinostat	PI	Propidiumiodid

PI3K	phosphatidylinositol 3 kinase	t-BOOH	tert-Butylhydroperoxid
PLK1	polo-like kinase 1	TBS	Tris-buffered saline
PR130	Untereinheit der Protein Phosphatase 2	TBS-T	TBS mit 0,1% Tween
pulv.	Pulver	TEMED	Tetramethylethylendiamin
RAF	rat fibrosarcoma	Thr	Threonin
RAS	rat sarcoma	TIP60	60 kDa tat-interactive protein
Rb	Retinoblastom-Protein	TKD	Tyrosinkinase Domäne
RNA	Ribonukleinsäure	Tris	Tris(hydroxymethyl)-amino-methan
ROS	reactive oxygen species	Tween	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
RPA	Replikationsprotein A	Tyr	Tyrosin
rpm	rounds per minute; Umdrehungen pro Minute	u.	und
RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute	u.a.	unter anderem
RT	Raumtemperatur	UBC	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
RTKi	Rezeptor Tyrosinkinase Inhibitor	UBCH8/UBE2E2	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 E2
s.	siehe	UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
S.	Seite	v	Volumen
S-Phase	Synthese-Phase	v/v	Volumen pro Volumen
SAHA	suberoylanilide hydroxamic acid	V	Volt
SD	Standardabweichung	WEE1i	WEE1-Inhibitor
SDS	Natriumdodecylsulfat	WHO	World Health Organisation
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	w/v	Gewicht pro Volumen
Ser	Serin	z.B.	zum Beispiel
SIAH1	seven in absentia homolog 1	γ	phosphoryliert
SIRT	sirtuin like deacetylase	µg	Mikrogramm
SSB	single-strand break; DNA-Einzelstrangbruch	µL	Mikroliter
SSC	sideward scatter	µm	Mikrometer
STAT	signal transducer and activator of transcription	µM	Mikromolar
SUMO	small ubiquitin-related modifier		

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stammbaum der Hämatopoese.....	3
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des FLT3-Rezeptors.....	8
Abbildung 3: Signaltransduktionswege des FLT3-Rezeptors	8
Abbildung 4: Signalkaskade bei Einzelstrangbrüchen der DNA	18
Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines Western-Blots	36
Abbildung 6: Zelluläre Reaktionen auf kombinierte Behandlungen aus FLT3i AC220 mit Klasse I HDACi FK228 in MV4-11 Zellen nach 24 h	47
Abbildung 7: Western-Blot-Analyse von Schlüsselproteinen des FLT3-Signalweges in MV4-11 Zellen nach Behandlung mit AC220 und/oder FK228 für 24 h.....	53
Abbildung 8: Western-Blot-Analyse von Regulatorproteinen des G2/M-Kontrollpunkts des Zellzyklus in MV4-11 Zellen nach Behandlung mit AC220 und/oder FK228 für 24 h.....	55
Abbildung 9: Western-Blot-Analyse von Zellzyklus-Regulationsproteinen in MV4-11 Zellen nach Behandlung mit AC220 und/oder FK228 für 24 h.....	56
Abbildung 10: Western-Blot-Analyse von DNA-Schaden- und Reparaturmarkern in MV4-11 Zellen nach Behandlung mit AC220 und/oder FK228 für 24 h.....	58
Abbildung 11: Western-Blot-Analyse von Apoptose-, HDACi- und Proteasom-Marken in MV4-11 Zellen nach Behandlung mit AC220 und/oder FK228 für 24 h.....	60
Abbildung 12: Alkalischer Comet Assay zur Detektion von Einzelstrangbrüchen in MV4-11 Zellen nach 16 h.....	62
Abbildung 13: Neutraler Comet Assay zur Detektion von Doppelstrangbrüchen in MV4-11 Zellen nach 16 h.....	64
Abbildung 14: Repräsentative Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung mit EdU in MV4-11 Zellen nach 16 h Einzel- und Kombinationsbehandlung mit AC220 und FK228; n = 2	66
Abbildung 15: Zelluläre Reaktionen auf kombinierte Behandlungen aus FLT3i AC220 mit Klasse I HDACi FK228 in MV4-11 Zellen nach 16 h	68
Abbildung 16: Zelluläre Reaktionen auf kombinierte Behandlungen aus FLT3i AC220 und HDAC3i RGFP966 in MV4-11 Zellen nach 24 h	74
Abbildung 17: Western-Blot-Analyse von Schlüsselproteinen des FLT3-Signalwegs in MV4-11 Zellen nach Behandlung mit AC220 und/oder RGFP966 für 24 h.....	80
Abbildung 18: Western-Blot-Analyse von Regulatorproteinen des G2/M-Kontrollpunkts des Zellzyklus in MV4-11 Zellen nach Behandlung mit AC220 und/oder RGFP966 für 24 h.....	81
Abbildung 19: Western-Blot-Analyse von am Zellzyklus beteiligten Proteinen in MV4-11 Zellen nach Behandlung mit AC220 und/oder RGFP966 für 24 h ..	83

- Abbildung 20: Western-Blot-Analyse von Schlüsselproteinen der DDR in MV4-11
Zellen nach Behandlung mit AC220 und/oder RGFP966 für 24 h 84
- Abbildung 21: Western-Blot-Analyse von Apoptose- und HDACi-Markern in MV4-11
Zellen nach Behandlung mit AC220 und/oder RGFP966 für 24 h 85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	26
Tabelle 2: Labormaterialien.....	27
Tabelle 3: Chemikalien.....	27
Tabelle 4: Puffer, Lösungen und Färbungen.....	28
Tabelle 5: Acrylamidgele.....	30
Tabelle 6: Zelllinie.....	30
Tabelle 7: Medium und Mediumzusätze.....	30
Tabelle 8: Inhibitoren.....	31
Tabelle 9: Primäre Antikörper (Western-Blot- und Immunfluoreszenz-Analyse).....	31
Tabelle 10: Sekundäre Antikörper (Western-Blot-Analyse).....	32
Tabelle 11: Sekundäre Antikörper (Immunfluoreszenz Analyse).....	32
Tabelle 12: Software.....	32

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Zelldichte	33
Formel 2: Berechnung des benötigten Zellsuspensionsvolumens.....	34
Formel 3: Berechnung der % DNA im Schweif	40

Anhangsverzeichnis

Abb. A	XXXVI
Abb. B	XXXVI
Abb. C	XXXVII
Abb. D	XXXVIII
Abb. E	XXXVIII
Abb. F	XXXIX
Abb. G	XL
Abb. H	XLI
Abb. I	XLI
Abb. J	XLII
Abb. K	XLIII
Abb. L	XLIII
Abb. M	XLIV
Abb. N	XLV
Abb. O	XLVI
Abb. P	XLVI

1 Einleitung

Die American Cancer Society veröffentlicht jedes Jahr geschätzte Zahlen zu Neuerkrankungen und Todesfällen aufgrund von Krebs in den Vereinigten Staaten von Amerika. Nach Herzerkrankungen ist Krebs die zweithäufigste Todesursache. In der aktuellen „Cancer Statistics 2019“ werden für dieses Jahr 21.450 neue Fälle an akuter myeloischer Leukämie (AML) prognostiziert. Diese Zahl ist die Summe aus den geschätzten Neuerkrankungen bei 11.650 Männern und 9.800 Frauen. Verglichen mit anderen Leukämieformen ist die Anzahl der Neuerkrankungen an AML am höchsten. Die vermutliche Anzahl an Todesfällen im Jahr 2019 liegt bei 10.920 (Siegel et al., 2019), obwohl gerade für maligne hämatologische und lymphatische Erkrankungen große Fortschritte in der Behandlung seit Mitte der 1970er Jahre mit ansteigenden Überlebensraten erzielt wurden (Jemal et al., 2017).

Trotz Forschung und neuer Erkenntnisse hat sich die Behandlung der AML aber im Laufe der letzten 40 Jahre kaum verändert (Papaemmanuil et al., 2016). Die Behandlung mit Chemotherapie, mit oder ohne daraufhin folgender Stammzelltransplantation, weist nur eine Erfolgsquote von etwa 35 % auf (Döhner et al., 2015). Dies liegt mitunter an Nebenwirkungen und der Entwicklung von Resistenzen der Tumorzellen gegenüber neuen und bestehenden Medikamenten. So entwickeln bei der zunächst meist erfolgreichen Behandlung von AML-Fällen mit mutierter *FMS-like Tyrosinkinase 3* (FLT3) (Papaemmanuil et al., 2016) mit dem FLT3-Inhibitor (FLT3i) Quizartinib (AC220) viele Patienten sekundäre Mutationen (Smith et al., 2012). Diese führen zu Resistenzen gegenüber AC220, was gleichzeitig mit einem Rezidiv der Erkrankung einhergeht (Pratz und Levis, 2010). Ziel der Forschung sind neue Behandlungsmethoden bei AML mit mutiertem FLT3 zu entwickeln. Hierdurch soll erreicht werden, dass bei der Behandlung keine neuen Mutationen hervorgerufen werden. Neue Erkenntnisse in der AML-Forschung sind vor allem für Patienten, bei denen eine Chemotherapie nicht anspricht beziehungsweise (bzw.) die ungeeignet sind für eine Chemotherapie, ein wichtiger Fortschritt (Larrosa-Garcia und Baer, 2017). Diesen Fortschritt erhofft man sich zum Beispiel (z.B.) aus der Kombination von Inhibitoren gegen FLT3 und Histon-Deacetylasen (HDACs). Nach dem von Theophrastus Bombast von Hohenheim im 16. Jahrhundert verfassten Zitat „Die Dosis macht das Gift“ (Paracelsus, 2014) ist die Strategie dahinter, bereits in nicht-toxischen Dosen ein synergistisches Zusammenwirken

zu erzeugen, um Krebszellen abzutöten ohne gesundes Gewebe zu schädigen. Gerade die geringe Toxizität ist in Anbetracht des hohen durchschnittlichen Alters der AML-Patienten von etwa 70 Jahren und oftmals vorliegender Komorbidität ein wichtiger Faktor (Shiple und Butera, 2009). Viele bereits eingesetzte Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACis) wirken aber recht unspezifisch, da sie eine oder gleich mehrere Klassen an HDACs hemmen. Gerade die fehlende Spezifität führt zu einer unerwünschten Toxizität in Patienten (Wells et al., 2013). Im Idealfall werden durch rational identifizierte Kombinationsschemata die benötigten Dosen für eine effektive Behandlung auf einen nicht-toxischen Bereich der Inhibitoren auf gesunde Zellen minimiert (Pietschmann et al., 2012).

Ein synergistisches Zusammenwirken durch Kombinationsbehandlungen von FLT3i mit HDACi konnten Pietschmann et al. (2012) bereits nachweisen. Dabei wurde der FLT3i AC220 in Kombination mit dem pan-HDACi Panobinostat (LBH589) untersucht (Pietschmann et al., 2012). Diese Forschungsergebnisse liefern den Ausgangspunkt der in dieser Arbeit vorliegenden Versuche. Das Ziel dieser Dissertation ist es, die synergistische Wirkung der von Pietschmann et al. (2012) eingesetzten Inhibitoren zu spezifizieren und einen Wirkmechanismus auszuarbeiten. Die synergistische Wirkung soll dabei auf bestimmte HDACs reduziert und somit eingegrenzt werden. Dafür wurde die AML-Zelllinie MV4-11 genutzt und Versuche mit AC220 und dem HDACi Romidepsin (FK228) durchgeführt, welcher HDACs der Klasse I (Odenike et al., 2008) inhibiert. Des Weiteren wurden Versuche mit AC220 und RGFP966, einem Inhibitor gegen HDAC3 (Malvaez et al., 2013), durchgeführt. Dabei wurde AC220 in möglichst geringer Konzentration in Kombination mit dem jeweiligen HDACi eingesetzt. Um den Wirkmechanismus der Inhibitoren zu ergründen und zu charakterisieren, wurden verschiedene Techniken eingesetzt. Durchflusszytometrische Analysen wurden eingesetzt, um Veränderungen des Zellzyklus darzulegen sowie Aufschluss über die Induktion von Apoptose zu geben. Durch Western-Blot-Analysen sollten die Modifikationen von für FLT3 typischen Signalkaskadenproteinen sowie von Markern des Zellzyklus, von Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Schäden, Reparaturmechanismen, Apoptoseinduktion, HDACi und proteasomaler Aktivität nachgewiesen werden.

2 Literaturdiskussion

2.1 Hämatopoese

Stammzellen besitzen die Fähigkeit, sich in eine Mutter- und eine Tochterzelle zu teilen. So trägt die Mutterzelle zur Erhaltung der Stammzellen bei, während die Tochterzelle zur Ausdifferenzierung bestimmt ist. Stellt man sich den Weg der Ausdifferenzierung als Stammbaum vor, befindet sich ganz am Anfang die embryonale Stammzelle. Diese ist omnipotent, was bedeutet, dass sie sich in jeglichen Zelltyp ausdifferenzieren kann. Die embryonale Stammzelle differenziert als nächstes zur adulten Stammzelle aus. Die adulte Stammzelle ist multipotent. Diese Stammzelle kann sich nur noch in eine bestimmte Art an Gewebe entwickeln. Zu den adulten Stammzellen zählen z.B. mesenchymale Stammzellen, aus denen sich unter anderem (u.a.) Osteoblasten entwickeln, oder hämatopoetische Stammzellen, die für die Blutbildung entscheidend sind (Piper, 2006). Bei der hämatopoetischen Stammzelle (s. Abb. 1) wird zwischen der *long term* hämatopoetischen Stammzelle (LT-HSZ) und der *short term* hämatopoetischen Stammzelle (ST-HSZ) unterschieden. Die Erstgenannte besitzt die Fähigkeit der dauerhaften Selbsterneuerung und entwickelt sich zur ST-HSZ weiter, welche sich nur noch zeitlich limitiert erneuern kann. Aus adulten ST-HSZ wiederum differenzieren

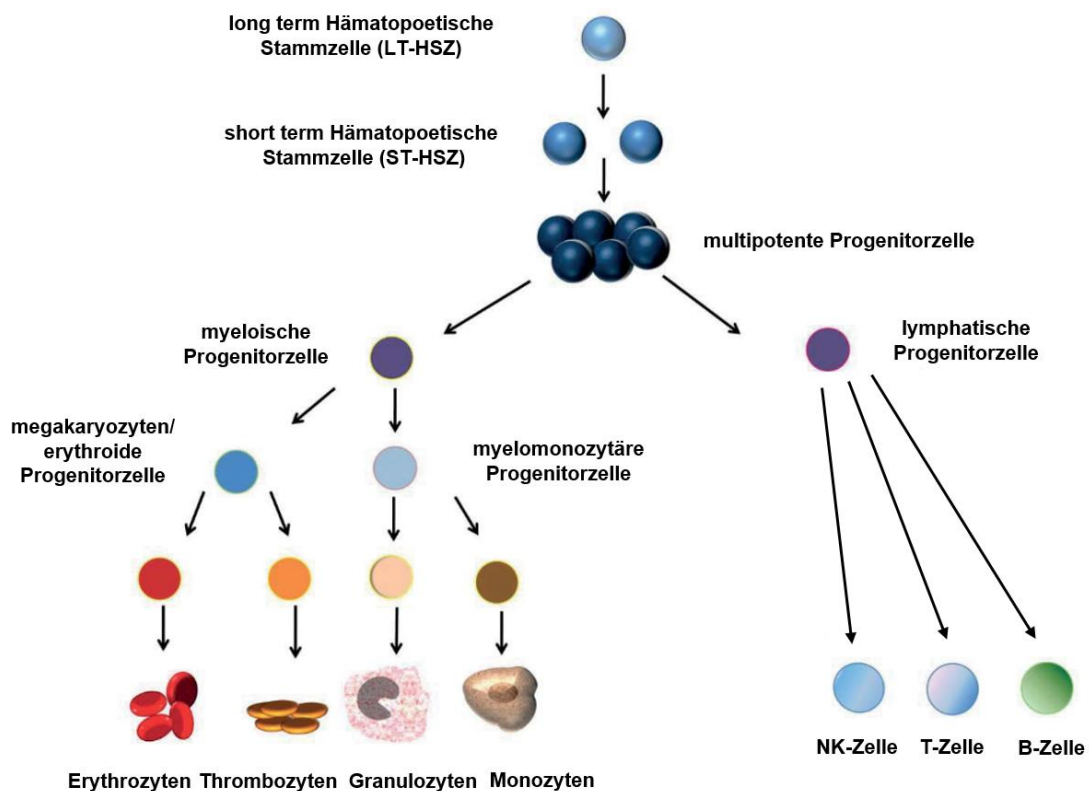


Abbildung 1: Stammbaum der Hämatopoese

Dargestellt ist die Ausdifferenzierung der verschiedenen Blutzellen in vereinfachter Form; modifiziert nach (Baunach, 2014).

multipotente Progenitorzellen aus. Diese multipotenten Vorläuferzellen sind nicht mehr fähig sich selbst zu erneuern. Sie teilen sich weiter und differenzieren sich entweder in myeloische oder lymphatische Vorläuferzellen aus, welche nur noch oligopotent sind. Aus lymphatischen Progenitorzellen können natürliche Killerzellen (NK-Zellen), T- und B-Lymphozyten ausdifferenzieren. Aus myeloischen Vorläuferzellen differenzieren myelomonozytäre Progenitorzellen, welche sich zu Monozyten oder Granulozyten entwickeln können, oder megakaryozyten/erythroide Progenitorzellen, welche zu Thrombozyten oder Erythrozyten werden. Die letzte Stufe der Vorläuferzellen ist nur noch unipotent. Folglich nimmt mit jeder Abstufung im Stammbaum die Differenzierungsfähigkeit ab (Piper, 2006, Baunach, 2014).

2.2 Akute myeloische Leukämie

Der Begriff „Leukämie“ wurde 1845 von Rudolf Virchow definiert (Virchow, 1856). Übersetzt aus dem Altgriechischen bedeutet das Wort so viel wie „Weißblütigkeit“ und verweist so auf Blutkrebs. Je nach betroffener Entwicklungsstufe in der Hämatopoese und nach Krankheitsverlauf, akut oder chronisch, werden vier Gruppen unterschieden. Die AML gehört laut *World Health Organisation*-(WHO)-Klassifikation den myeloischen Neoplasien an (Piper, 2006). Dabei handelt es sich um eine Störung der Proliferation und Differenzierung der hämatogenen Vorläuferzellen (Shiple und Butera, 2009). Das bedeutet, dass die myeloischen Stammzellen sich zwar vermehren, aber nicht ausdifferenzieren können und so in einer unreifen Entwicklungsstufe verbleiben (Piper, 2006). Nicht ausdifferenzierte Zellen werden als Blasten bezeichnet. Diese unreifen Myeloblasten gehen aus dem Knochenmark in das periphere Blut über und können andere Organe, wie z.B. die Lunge, infiltrieren, die aufgrund der Blasten funktionelle Beeinträchtigungen aufweisen. Dies kann bis zum kompletten Versagen der Organe führen (Glick et al., 1980). In Folge der fehlenden Ausdifferenzierung kommt es zum Mangel an Blutzellen. Durch die Thrombozytopenie kann es u.a. zu Zahnfleisch- oder Nasenblutungen kommen. Aufgrund der fehlenden Leukozyten kommt es zu einer sehr stark erhöhten Infektanfälligkeit. Das Fehlen der Erythrozyten zeigt sich in Form von allgemeiner Blässe, Schwäche und Müdigkeit (Piper, 2006). Die Diagnose AML kann u.a. gestellt werden wenn $\geq 20\%$ an Blasten im Knochenmark oder im peripheren Blut vorliegen (Glick et al., 1980, Röllig et al., 2018). Bei der Erstdiagnose werden die Patienten nach der *European Leukemia Net*-(ELN-) Klassifikation von 2016 in eine von drei Risikogruppen zugeteilt. Dabei wird zwischen einer günstigen, intermediären und

ungünstigen Risikogruppe unterschieden. Beispielsweise spielen hier der Lokus und die Art mutierter Gene eine Rolle (Döhner et al., 2017). Eine weitere gebräuchliche Einteilung ist die sogenannte *French-American-British*-(FAB-) Klassifikation. Dabei entscheidet die Morphologie der abnormalen Zellen über die Zuordnung zu einem FAB-Typen. Unterteilt werden die FAB-Typen von M0 bis M7. Entscheidend dabei ist der prozentuale Anteil an Blasten, an Peroxidase und Esterase, sowie das Vorkommen von Translokationen (Piper, 2006). Die Diagnose AML ist auf Grundlage von modernen Methoden und Untersuchungen wie Knochenmarkbiopsie, Blutbild und Zytogenetik recht eindeutig zu stellen. Trotzdem bestehen mögliche Differenzialdiagnosen wie akute lymphatische Leukämie, Virusinfektionen (z.B. HIV), Myelodysplastisches Syndrom oder Aplastische Anämie (Röllig et al., 2018). Risikofaktoren zur Erkrankung an AML sind u.a. Chromosomenaberrationen, hereditäre Prädisposition, Strahlenbelastung und Zigarettenkonsum (Piper, 2006). Aktives Rauchen steigert das Risiko an AML zu erkranken um 40 % (Fircanis et al., 2014). Trotz vorhandener Behandlungsmöglichkeiten sterben die meisten Patienten innerhalb von zwei Jahren, abhängig von Faktoren wie dem Alter, genetischen Mutationen und Begleiterkrankungen. Allgemein kann gesagt werden, dass die Prognose mit steigendem Alter schlechter wird (Shipley und Butera, 2009). Methoden zur Früherkennung oder zur Prophylaxe sind bisher nicht bekannt (Röllig et al., 2018).

2.3 Behandlung der AML

Die Behandlung der AML hängt individuell vom Patientenalter, Konditionen sowie genetischen Faktoren ab. Unbehandelt führt die Erkrankung schnell zum Tod. Bei jungen sowie älteren, aber körperlich leistungsfähigen Patienten, wird eine kurative Therapie angestrebt (Röllig et al., 2018). Die kurative Therapie lässt sich in zwei Phasen unterteilen. Bei der anfänglichen Induktionstherapie wird mit dem Bestreben auf komplette Remission hin behandelt. Die Postremissionstherapie zielt darauf ab, den erreichten Rückgang der Krankheit zu erhalten (Röllig et al., 2018). Die Wahrscheinlichkeit einer kompletten Remission liegt bei Patienten bis zu einem Alter von 50 Jahren bei etwa 75 %. Patienten, die älter als 75 Jahre alt sind, erreichen dagegen nur noch eine Wahrscheinlichkeit von etwa 35 % zu überleben (Southam et al., 1951). Vergleicht man bei der Behandlung der AML die Behandlungserfolge in Bezug auf die am häufigsten vorkommenden Mutationen, so wurde festgestellt, dass die Behandlungschancen der FLT3-Tyrosinkinase Domäne (FLT3-TKD) im Gegensatz zur FLT3-internen Tandem-

duplikation (FLT3-ITD) besser ausfallen (Qiu et al., 2018). Auf die beiden zuvor erwähnten FLT3-Mutationen wird im Kapitel 2.4 genauer eingegangen. Mittlerweile bestehen Überlebenschancen aufgrund effektiver Therapiemöglichkeiten. Die Chancen auf eine über 4 Jahre anhaltende vollständige Remission steigen vor allem durch ein junges Patientenalter (Crowther et al., 1970, Röllig et al., 2018). Im Vergleich zu anderen Blutkrebsarten weist die AML die schlechteste Überlebensrate auf (Chen et al., 2017). Bei der Betrachtung der 5-Jahres-Überlebensrate des alleinigen Patientenalters als Kriterium, beträgt diese bei < 30 Jahren 60 %, bei 30-54 Jahren 43 % und bei 55-64 Jahren nur noch 23 % (Juliussen et al., 2012). Wird neben einem Patientenalter von < 60 Jahren die ELN-Gruppe mit in die 5-Jahres-Überlebensrate einbezogen, liegt diese für die günstige Gruppe bei 52 %, für die intermediäre Gruppe bei 34,5 % und für die ungünstige Gruppe bei 14 % (Röllig et al., 2011).

Laut Leitlinie zur AML vom April 2018 sieht die Therapie der Wahl für Patienten unter 65 Jahren und für ältere Patienten mit guter körperlicher Verfassung in der Induktionsphase das Schema 3+7 vor. Dabei wird über drei Tage ein Anthrazyklin/Anthracendion und danach für sieben Tage Cytarabin gegeben. Sollte ein Patient auf die Induktionstherapie nicht ansprechen, wird dieser mittels erneuter Induktionstherapie und aufgrund der Unempfindlichkeit mit Ara-C in hoher Dosis als Zusatz behandelt. Die Therapie der Wahl ist bei diesen wenig ansprechenden Patienten eine Stammzelltransplantation. Patienten mit nachgewiesener FLT3-ITD oder FLT3-TKD erhalten nach der ersten Woche Induktionstherapie für die anschließenden zwei Wochen eine orale Verabreichung von 50 mg Midostaurin zwei Mal am Tag. Wurde aufgrund der Induktionsphase eine vollständige Remission erreicht, wird zur Vermeidung eines Rezidivs umgehend eine Konsolidierungstherapie eingeleitet. Diese beinhaltet entweder Cytarabin oder eine allogene Stammzelltransplantation. Eine palliative Behandlung der AML sollte dann vorgenommen werden, wenn Faktoren wie Patientenalter über 75 Jahre, Komorbidität wie z.B. Nieren- oder Lebererkrankung, schlechte soziale Verhältnisse oder das ausdrückliche Ablehnen einer Chemotherapie vorliegen. Kommt es zum Rezidiv, wird nochmals mit Induktionstherapie begonnen, allerdings erneut mit dem Zusatz von Ara-C. Rezidive treten meist in den ersten 18-24 Monaten nach erfolgreicher Therapie auf. Daher sollten die Patienten in den ersten zwei Jahren alle ein bis drei Monate zur Kontrolle des Blutbildes erscheinen (Röllig et al., 2018). Studien empfehlen deswegen direkt bei der ersten Remission eine Stammzelltransplantation durchzuführen, um das Risiko eines Rezidivs zu senken (Bornhäuser et al., 2007).

Des Weiteren gibt es moderne therapeutische Ansätze. Dazu zählen u.a. Tyrosinkinase-Inhibitoren, Monoklonale Antikörper, Zytostatika und weitere Substanzen wie Histon-Deacetylase-Inhibitoren (Vorinostat, Panobinostat, Pracinostat), BCL2-Inhibitoren und MDM2-Inhibitoren (Röllig et al., 2018). Auf spezifische und im Rahmen der Dissertation verwendeten Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren (RTKis) (s. Kap. 2.5) und Histon-Deacetylase-Inhibitoren (s. Kap. 2.7) wird zu einem späteren Zeitpunkt genauer eingegangen.

In der Literatur liegen bereits untersuchte Kombinationen aus einem RTKi bei gleichzeitiger Chemotherapie vor. Diese haben eine Verbesserung der symptomfreien 3-Jahres-Rate von 22 % auf 40 % erbracht (Röllig et al., 2015) bzw. eine Verlängerung der Überlebenszeit von 25 zu 75 Monaten (Stone et al., 2015). Der RTKi Midostaurin wurde 2017 in Kombination mit Chemo- und Erhaltungstherapie von der Europäischen Arzneimittel-Agentur zugelassen. Genehmigt wurde Midostaurin auf Grundlage der Ergebnisse einer Studie mit AML-Patienten, bei der Patienten bis zu einem Alter von 60 Jahren als Probanden akzeptiert wurden (Stone et al., 2017).

2.4 Die Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3

Der Aufbau des FLT3-Rezeptors ist in Abb. 2 dargestellt und näher beschrieben. In gesunden Zellen liegt der Rezeptor im inaktiven Zustand als Monomer vor. Durch die Bindung von FLT3-Liganden kommt es dann zur Dimerisierung (Heldin, 1995). So können durch die aktivierte Autophosphorylierung (Ullrich und Schlessinger, 1990) Tyrosinreste phosphoryliert und multiple Signaltransduktionswege initiiert werden. Diese sind in Abb. 3 dargestellt. Dazu gehören folgende Signalwege: JAK/STAT, RAS/RAF/MEK/ERK und PI3K/AKT. Der erstgenannte Weg bewirkt die Aktivierung von *signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5). Der zweitgenannte Signalweg wird auch als *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) bezeichnet. Dieser sorgt für die konstitutive Phosphorylierung von *extracellular-signal regulated kinase 1* (ERK1) und *extracellular-signal regulated kinase 2* (ERK2) (Small, 2006). Der FLT3-Rezeptor kommt als hyperglykosylierte Form mit circa (ca.) 160 kDa und als hypoglykosylierte Form mit 130-143 kDa vor. Die hyperglykosylierte Form kommt an der Zelloberfläche vor, welche aufgrund einer posttranslationalen Proteinmodifikation dorthin transportiert wird (Lyman et al., 1993).

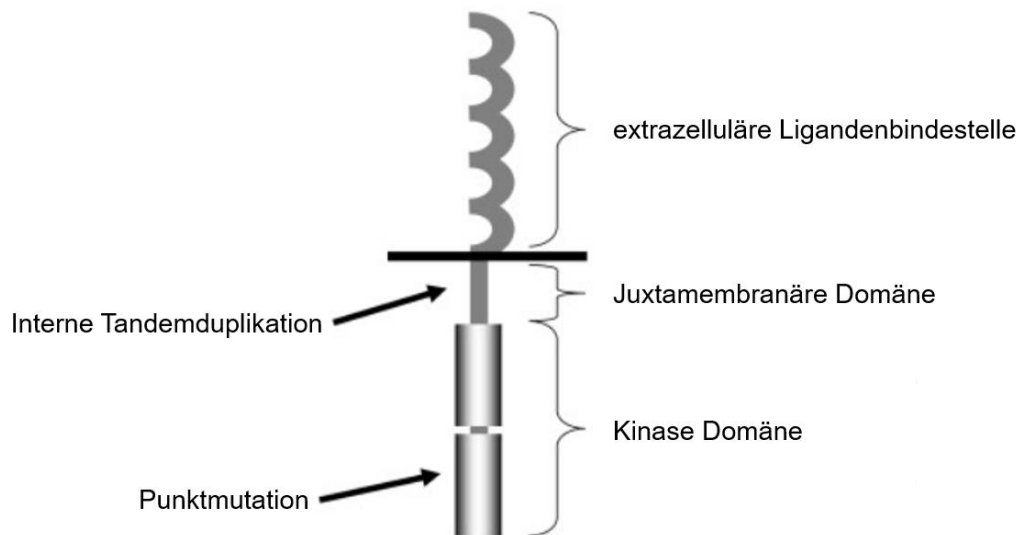


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des FLT3-Rezeptors

FLT3 ist eine Typ-III-Rezeptor-Tyrosinkinase. Extrazellulär befinden sich 5 Immunglobulin-ähnliche Domänen. Die räumliche Trennung zwischen dem extra- und intrazellulären Anteil bildet die Transmembrandomäne. Der erste intrazelluläre Abschnitt wird als Juxtamembran-Domäne bezeichnet. Es folgt eine Kinase Domäne, welche sich in zwei Anteile gliedert (Agnes et al., 1994); modifiziert nach (Takahashi, 2011).

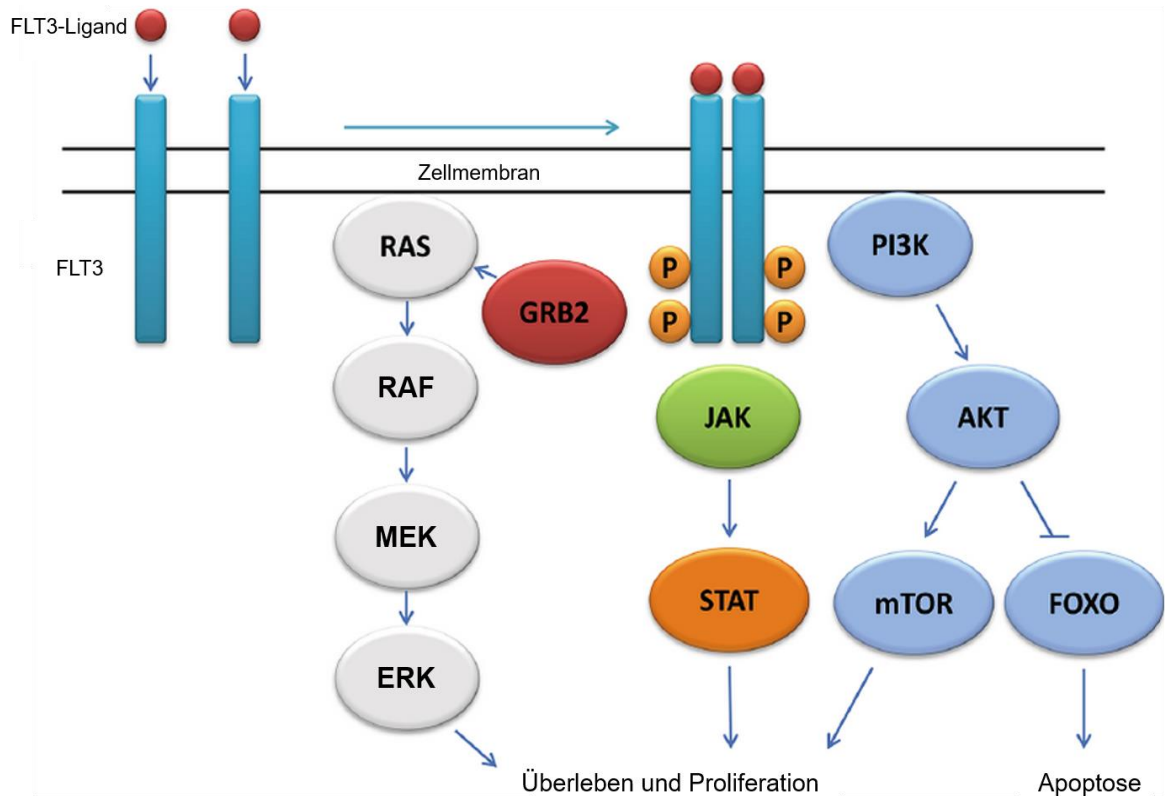


Abbildung 3: Signaltransduktionswege des FLT3-Rezeptors

Die Aktivierung durch Dimerisierung induziert erhöhte Zellproliferation, -differenzierung und erhöhtes – überleben. Die Apoptose dagegen wird unterdrückt (Chen et al., 2017); modifiziert nach (Chen et al., 2017).

Bei der AML sind Mutationen im *FLT3*-Gen zu finden (Papaemmanuil et al., 2016), welches sich auf Chromosom 13q12 befindet (Carow et al., 1995). Eine Mutation des FLT3-Rezeptors weisen etwa ein Drittel der AML-Patienten auf (Levis und Small, 2003). Bei einer Studie mit 1540 AML-Patienten wurden zu 80 % die Translokation t(6;9) und zu 35 % die Translokation t(15;17) als Chromosomenmutationen nachgewiesen (Papaemmanuil et al., 2016). Die erstgenannte Translokation wird der ungünstigen ELN-Risikogruppe zugeteilt (Döhner et al., 2017). Normalerweise tritt die Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3 nur in *cluster of differentiation* (CD)34-positiven Stammzellen auf (Chen et al., 2017) und wird im Laufe der Zellausdifferenzierung abgebaut (Rosnet et al., 1996). Dies ist bei der AML nicht der Fall, da FLT3 weiterhin exprimiert wird (Meierhoff et al., 1995).

Die am häufigsten auftretende Mutation bei der AML ist mit etwa 20 % die interne Tandemduplikation (FLT3-ITD) in der Juxtamembran-Domäne des Rezeptors (Thiede et al., 2002). Andere Arten an Mutationen sind z.B. Punktmutationen innerhalb der Kinase Domäne (FLT3-TKD) an Asp835 (ca. 7 %) (Thiede et al., 2002, Small, 2006). Die FLT3-ITD-Mutation der AML wurde bereits 1996 entdeckt (Nakao et al., 1996), die FLT3-TKD-Mutation 2001 (Abu-Duhier et al., 2001). Vor allem die FLT3-ITD-Mutation bedeutet für Patienten eine schlechte Prognose (Yokota et al., 1997, Small, 2006). Sie führt zu einem erhöhten Rezidivrisiko nach Behandlung, einem schnellen Fortschreiten der Erkrankung und geringer Überlebensrate (Levis und Small, 2003). Die interne Tandemduplikation induziert eine ligandenunabhängige Dimerisierung, Autophosphorylierung und Aktivierung des Rezeptors (Kiyoi et al., 2002). Liegt solch eine genetische Veränderung vor, hat dies zur Folge, dass der Rezeptor konstitutiv aktiv ist (Kiyoi et al., 2002). Durch die FLT3-ITD-Mutation entfällt die Aufgabe der Juxtamembran-Domäne in Form einer negativen Rückkopplung (Griffith et al., 2004). Diese verhindert in der Regel eine irreguläre Dimerisierung und damit die Aktivierung des FLT3-Rezeptors (Chen et al., 2017). Interessanterweise kommt der FLT3-ITD-Rezeptor meist im endoplasmatischen Retikulum vor, während der nicht-mutierte FLT3-Rezeptor sich in der Zellmembran befindet (Schmidt-Arras et al., 2005). Durch die Mutation in der Juxtamembran-Domäne wird der Transport des Rezeptors aus dem endoplasmatischen Retikulum an die Zelloberfläche verhindert (Choudhary et al., 2009). Die unterschiedlichen Lokalisationen des FLT3-Rezeptors zeichnen sich vor allem durch zwei Unterschiede aus. Während der FLT3-Rezeptor an der Zelloberfläche kaum STAT5 generiert, kommt es bei der im endoplasmatischen Retikulum befindlichen mutierten Form

zu einer erhöhten Induktion von STAT5. Des Weiteren korreliert die hypoglykosylierte Form mit etwa 130 kDa mit der Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum, da diese Form des FLT3-Rezeptors Kohlenhydrate in Form von Mannose enthält, welche typisch für unreife, im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Glykoproteine sind (Schmidt-Arras et al., 2009). Durch die konstitutive Aktivierung der FLT3-ITD-Mutation wird letztendlich das Überleben und die Proliferation der AML-Zellen gefördert (Drexler, 1996). Diese FLT3-Mutationen können daher als „aktivierende Mutationen der Signaltransduktion“ klassifiziert werden (Röllig et al., 2018). Die FLT3-TKD-Mutation dagegen ändert die Konformation des Rezeptors von inaktiv zu aktiv. Die katalytische Domäne zur Bindung von ATP ist bei nicht-mutierten FLT3-Rezeptoren im inaktiven „geschlossenen“ Zustand und verhindert damit eine Bindung von ATP. Der FLT3-TKD-Rezeptor aber verändert die Konformation der katalytischen Domäne in den „geöffneten“ und damit aktiven Zustand (Smith et al., 2012). Während der FLT3-ITD-Rezeptor alle drei genannten Signalwege aktiviert, stimuliert der FLT3-TKD-Rezeptor nur AKT und ERK. STAT5 hingegen wird kaum induziert (Choudhary et al., 2005), da der FLT3-TKD-Rezeptor an der Zelloberfläche lokalisiert ist (Schmidt-Arras et al., 2009). Nach Versuchen in Mausmodellen wurde festgestellt, dass eine der beiden genannten FLT3-Mutationen alleine nicht ausreicht, um eine AML hervorzurufen. Es wird lediglich eine myeloproliferative Erkrankung in Form einer Leukozytose hervorgerufen und kein Vollbild einer AML ausgebildet. Es muss immer noch eine weitere Veränderung vorliegen, beispielsweise die Koexistenz der FLT3-ITD-Mutation mit einer Translokation (Kelly et al., 2002, Reckzeh et al., 2012). Dieses Modell wird als „two-hit-hypothesis“ bzw. als „multiple hitting“ bezeichnet. Zur Ausbildung einer AML müssen also mehrere Mutationen ausgelöst werden (Nordling, 1953, Knudson, 1971, Chen et al., 2017).

2.5 Der FLT3-Inhibitor AC220

Die Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3 ist schon seit längerer Zeit als Zielstruktur der Behandlung von AML bekannt (Nakao et al., 1996). Alle FLT3is weisen die Gemeinsamkeit auf, dass sie an die ATP-Bindestelle der intrazellulär gelegenen FLT3-TKD binden. Damit verhindern sie die Autophosphorylierung des Rezeptors, indem sie die ATP-Bindung kompetitiv hemmen (Larrosa-Garcia und Baer, 2017). Diese kompetitive Hemmung kann als Grundprinzip fast aller RTKis angesehen werden, indem ATP und FLT3i um die Bindung an der FLT3-TKD konkurrieren (Leung et al., 2013).

Die Klassifikation der FLT3is gliedert sich in eine erste und eine zweite Generation, je nach Spezifität des Inhibitors gegenüber FLT3 und ist abhängig vom Entwicklungszeitpunkt des Inhibitors (Larrosa-Garcia und Baer, 2017). RTKis der ersten Generation eliminieren vornehmlich Blasten im peripheren Blut. Die der zweiten Generation hingegen greifen überwiegend Blasten im Knochenmark an (Konig und Levis, 2015). Zeitlich gesehen greift die Eliminierung im Knochenmark erst später als die im peripheren Blut (Hospital et al., 2017). Resistenzen gegenüber FLT3is wurden bei beiden Generationen entdeckt. Desweiteren werden die FLT3is in Typ I und Typ II untergliedert, ausgehend von der Bindung an FLT3 (Larrosa-Garcia und Baer, 2017).

AC220 wird bereits in klinischen Versuchsreihen in Phase I und II angewandt (Cortes et al., 2013, Cortes et al., 2018). AC220 ist ein Inhibitor der zweiten Generation und wird als Typ II klassifiziert. Zweite Generation bedeutet, dass diese Inhibitoren gegenüber der ersten Generation potenter und spezifischer wirken und dabei weniger toxisch sind. Sie binden überwiegend an FLT3. Typ II kennzeichnet die Inhibitoren dahingehend aus, dass sie überwiegend an FLT3-ITD Zellen im Gegensatz zu FLT3-TKD binden (Larrosa-Garcia und Baer, 2017). Eine klinische Versuchsreihe in Phase I mit AC220 als Einzelbehandlung von rückfällig gewordenen oder resistenten Patienten hat eine maximal tolerierte orale Dosis von 200 mg pro Tag ermitteln können (Cortes et al., 2013). Gerade für diese AML-Patienten ist die Prognose schlecht, da Chemotherapie wenig Erfolg zeigt. Entscheidende Faktoren für den Verlauf der Behandlung sind das Vorliegen einer FLT3-Mutation sowie das Patientenalter. Eine schlechte Voraussetzung für eine erfolgreiche Behandlung sind FLT3-ITD-positive Patienten im hohen Alter. In Phase II der klinischen Versuchsreihe mit 333 Patienten wurde die Dosis für Männer auf 135 mg und für Frauen auf 90 mg pro Tag gesenkt, da Herzrhythmusstörungen in Form von verlängerten QT-Zeiten aufgetreten sind. Weitere häufige Nebenwirkungen waren aufgrund der Entwicklung der verschiedenen hämatopoetischen Zellen aus einer Stammzelle Anämie, Thrombozytopenie und Pneumonie (Cortes et al., 2018). Dadurch treten typische Symptome wie Müdigkeit, Immunschwäche oder Haut- und Schleimhautblutungen auf (Röllig et al., 2018). Die Halbwertszeit von AC220 liegt bei etwa 3 Tagen (Sanga et al., 2017). Ein Drittel der Patienten unter 60 Jahren konnte erfolgreich bis zur Stammzelltransplantation behandelt werden. Die Patienten, die länger als 1 Jahr überlebt haben, gehörten größtenteils genau dieser Gruppe an, sprich erfolgreiche Behandlung mit AC220 und darauf folgend eine Stammzelltransplantation (Cortes et al., 2018). Allerdings belegen Studien, dass es zu Resistenzen gegenüber

FLT3i kommen kann (Heydt et al., 2018). Dabei wird zwischen primären und sekundären Resistenzen unterschieden. Die primären Resistenzen liegen bereits vor einer Behandlung mit einem FLT3i vor, während sich sekundäre Resistenzen aufgrund einer Behandlung entwickeln (Larrosa-Garcia and Baer, 2017). Die Induktion des antiapoptotischen Proteins *B-cell lymphoma 2* (BCL2) kann bereits eine primäre Resistenz bewirken (Kohl et al., 2007). Im Fall von AC220 wurden Resistenzen behandlungsbedingt durch sekundäre Mutationen erworben (Heydt et al., 2018). Beispielsweise kann eine FLT3-TKD-Mutation zusätzlich zur bereits vorliegenden FLT3-ITD-Mutation eine sekundäre Resistenz verursachen (Larrosa-Garcia and Baer, 2017).

2.6 Histon-Deacetylasen und Histon-Acetyl-Transferasen

HDACs sind Enzyme und werden in vier Klassen unterteilt (Taunton et al., 1996). Dabei werden die zinkabhängigen von den Nicotinamidadenindinukleotid-(NAD⁺-) abhängigen unterschieden. Zu der erstgenannten Gruppe zählt die Klasse I (HDAC1, 2, 3 und 8), Klasse IIa (HDAC4, 5, 7 und 9), Klasse IIb (HDAC6 und 10) und Klasse IV (HDAC11). Zu der zweitgenannten Gruppe gehört die Klasse III (SIRT1-7) (Van Dyke, 2014). HDACs steuern posttranslationale Modifikationen an Proteinen, indem sie den Acetylierungszustand von Histonen und Nicht-Histon-Proteinen verändern. Die Deacetylierung von Lysin an Histonen und Nicht-Histon-Proteinen (Van Dyke, 2014) führt zur Beendigung der Transkription (Bolden et al., 2006). HDACs sind ebenfalls an Prozessen wie DNA-Reparatur (Gong und Miller, 2013) und Apoptose (Fulda, 2012) beteiligt. Weiterhin ist bekannt, dass in manchen Karzinomarten HDACs hoch-, bei anderen Arten runterreguliert werden. Somit sind HDACs bei der Krebstherapie von Interesse (Roos und Krumm, 2016). Das Ausschalten von z.B. HDAC1 und HDAC2 fördert die Entstehung von AML (Santoro et al., 2013). HDAC3 ist in die embryonale Entwicklung involviert (Bhaskara et al., 2008) und damit für die Zellen ein überlebenswichtiger Bestandteil. Die Hemmung von HDAC3 ist daher bei der Behandlung von Krebs ein möglicher Ansatzpunkt (Wilson et al., 2006). Neben der unterschiedlichen Regulation der HDACs in Karzinomarten wurde festgestellt, dass in Krebszellen auch eine Dysregulation von Histon-Acetyl-Transferasen (HATs) vorliegen kann (Brownell et al., 1996). Denn neben den deacetylierenden Enzymen liegen in Zellen auch Enzyme vor, welche Acetylreste an u.a. Histone anhängen. Dabei handelt es sich um HATs. In gesunden Zellen stehen HATs und HDACs in einem dynamischen Gleichge-

wicht, um Prozesse in der Zelle durch die gegenteilige Wirkung der Enzyme zu regulieren (Yang, 2004). Eine fehlerhafte Funktion von HATs kann u.a. Leukämie auslösen. Die Translokation t(11;16) (q23;p13) bspw. führt zur Erkrankung an AML. Diese Translokation generiert eine Fusion aus dem Protein Histon Methyltransferase (MLL) und der HAT *CREB binding protein* (CBP). Dieses Onkoprotein bewirkt eine irreguläre Acetylierung und damit Aktivierung der *Homöobox-(Hox-)*Gene (Yang, 2004). Dies löst die Erkrankung am Myelodysplastischen Syndroms aus, welches wiederum die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Leukämie steigert (Lavau et al., 2000).

2.7 Histon-Deacetylase-Inhibitoren als Therapie von AML

Die Behandlung mit HDACis hat bereits bei einigen Krebsarten zu positiven Resultaten geführt. So kann die Unterdrückung von HDAC1, 2 und 3 zur Wachstumsabnahme bei Kolonkarzinomen durch Hemmung der Zellproliferation und Erhöhung der Apoptose rate führen (Wilson et al., 2006). Resistenzen in Krebszellen gegenüber Medikamenten konnten aufgrund der Hemmung von *insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF-1R) aufgehoben werden (Sharma et al., 2010), indem Zellen durch HDACi sensibilisiert wurden. HDACis senken u.a. die Expression von Proteinen zur Reparatur von DNA-Schäden, sodass die Zelle den Zelltod einleitet (Roos und Krumm, 2016). Eine Überexpression an HDACs führt dazu, dass Krebszellen Chemotherapeutika aufgrund der erhöhten Aktivität des Effluxtransporters P-Glykoprotein besser verstoffwechseln und somit eliminieren können. Dies macht die Zellen resistenter gegenüber solchen Behandlungen (Kaewpiboon et al., 2015, Ye et al., 2016). HDACis beeinflussen die Genexpression, indem sie die Deacetylierung von Histonen und Nicht-Histon-Proteinen verhindern (Buchwald et al., 2009). Prozesse wie Transkription oder DNA-Replikation werden durch HDACi moduliert (Roos und Krumm, 2016). Die Unterdrückung der genannten Abläufe in der Zelle wird mitunter durch das Protein Poly-(ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP-1) bewirkt. Liegen DNA-Schäden in der Zelle vor, ist das Protein PARP-1 an der DNA-Reparatur beteiligt, indem es an Chromatinproteine ADP-Ribose anhängt, um Zugang zum Schaden zu ermöglichen (Satoh und Lindahl, 1992). Dieser Prozess verbraucht allerdings NAD⁺ (D'Amours et al., 1999). Zum Teil wird dabei NAD⁺ in so hohen Mengen verbraucht, dass es nicht mehr ausreichend für andere Reparaturprozesse zur Verfügung steht. In Folge dessen leitet die Krebszelle die Apoptose ein (Roos et al., 2016). Ein weiterer Aspekt ist, dass HDACs die Chromatinstruktur durch Deacetylierung verändern können. So machen HDACis die DNA angreifbar für

Chemotherapeutika, da die DNA-Struktur durch die erhaltenen Acetylgruppen in Form von Euchromatin aufgelockert vorliegt (Kim et al., 2003). Zusammenfassend zeigt eine Behandlung mit HDACis eine erhöhte Apoptoserate (Roos und Krumm, 2016), indem Mechanismen zur Einleitung des Zelltods schneller veranlasst werden. Das lässt sich dadurch erklären, dass die „Barriere zur Zelltodeinleitung“ durch HDACis gesenkt wird. So wird die Apoptose schon durch das Vorliegen von geringeren Mengen an Schäden initiiert (Roos et al., 2016). Des Weiteren wird die *DNA damage response* (DDR) in Tumorzellen durch HDACis stark vermindert, während zum Vergleich eine Behandlung gesunder Zellen mit HDACis kaum Auswirkungen zeigen. Gesunde Zellen sind in der Lage den erzeugten DNA-Schaden durch den HDACi zu reparieren, Tumorzellen dagegen nicht (Lee et al., 2010).

Der HDACi FK228 wird aus dem Bakterium *Chromobacterium violaceum* gewonnen. FK228 wirkt als Prodrug und inhibiert HDACs der Klasse I (Odenike et al., 2008, Liu et al., 2018), davon hauptsächlich HDAC1 und HDAC2 (Furumai et al., 2002). Vergleicht man die Gensequenzen der Proteine, so fällt auf, dass sich HDAC1 und HDAC2 stark ähneln. HDAC3 hingegen, welche auch der Klasse I angehört, stimmt nur zu 53 % mit HDAC1 und zu 52 % mit HDAC2 überein (Yang et al., 2002). Ein Knockdown von HDAC1 bzw. HDAC2 führt dazu, dass die Expression des jeweils anderen kompensiert wird. Wird dagegen HDAC3 ausgeschaltet, werden zum Ausgleich keine anderen HDACs vermehrt exprimiert (Wells et al., 2013). Diese Aspekte machen deutlich, dass es relativ schwer ist Inhibitoren zu entwickeln, die sich nur auf eine HDAC spezifizieren (Wells et al., 2013). Des Weiteren regulieren HDAC1 und HDAC2 die Phosphorylierung von Kinasen, welche an Kontrollpunkten des Zellzyklus beteiligt sind. Diese kontrollieren die Phosphorylierung der Kinasen anhand des Proteins PR130, indem HDAC1 und HDAC2 die Aktivität von PR130 hemmen. Eine Hemmung von HDAC1 und HDAC2 sensibilisiert Tumorzellen gegenüber replikativem Stress, da die Zellzykluskontrollpunkte unterdrückt werden. Dies wird dadurch bewirkt, dass Proteine wie *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) aufgrund der Unterdrückung von HDAC1 und HDAC2 dephosphoryliert werden, da es zur erhöhten Expression an PR130 kommt. Folglich sind HDAC1 und HDAC2 notwendig, um PR130 zu inhibieren und damit die Phosphorylierung von Kontrollpunkt-Kinasen zu erhalten (Goeder et al., 2018). Dieser Aspekt ist für die Inhibition mit HDACs wichtig, da replikativer Stress die Apoptose induzieren kann (Tanaka et al., 2017). Ein weiterer Unterschied zwischen den HDACs 1, 2 und 3 zeigt sich bei der Behandlung mit Vorinostat, auch bekannt unter dem Na-

men SAHA (Bhaskara et al., 2008). Vorinostat inhibiert HDACs der Klasse I und II (Marks und Xu, 2009). Der Vergleich an DNA-Schäden nach der Behandlung mit Vorinostat und einem Knockdown an HDAC3 zeigt größere Apoptoseraten bei Vorinostat. Die Hemmung mehrerer HDACs überwiegt also hier gegenüber dem selektiven Ausschalten von nur einer HDAC (Bhaskara et al., 2008).

Der HDACi RGFP966 ist ein spezifischer Inhibitor gegen HDAC3. Der *half maximal inhibitory concentration* (IC₅₀) Wert liegt bei 0,08 µM. Bis zu einer Dosis von 15 µM werden keine anderen HDACs beeinflusst (Malvaez et al., 2013). Die volle Wirkung von RGFP966 tritt nach etwa 4 h auf, welche mit einer starken Zunahme der Acetylierung von Histon 4 korreliert (Wells et al., 2013). RGFP966 zeigt gegenüber AML-Zellen eine stärkere Wirkung im Vergleich mit anderen Zelllinien wie z.B. menschlichen embryonale Nierenzellen, humanen Lungen- und Brustkrebszellen. Dies spiegelt sich in den untersuchten Überlebensraten der Zellen wieder. Dabei wird die Vitalität der AML-Zellen bereits mit geringeren Dosen an RGFP966 stärker gehemmt verglichen mit anderen Zelllinien (Li et al., 2017).

RGFP966 kann nachweislich das Wachstum von kutanen T-Zell-Lymphomen verlangsamen. Die Behandlung führt zu einem Anstieg von apoptotischen Zellen und zu einer Veränderung der Anzahl der sich in der S-Phase befindlichen Zellen. Die Geschwindigkeit, mit der die DNA-Replikation erfolgt, nimmt aufgrund des HDAC3i um 50 % ab. Die Behandlung mit RGFP966 führt in Tumorzellen folglich zur Schädigung der Replikation. Die beobachtete Zunahme der Zellzahl der kutanen T-Zell-Lymphomzellen in der S-Phase nach Behandlung mit RGFP966 im Vergleich zu den Kontrollzellen wird dabei in Verbindung mit der Beeinträchtigung der DNA-Replikation gebracht (Wells et al., 2013).

Mutierte Tyrosinkinase-Rezeptoren sind nicht nur bei AML zu finden. Bei Colon-Karzinomen beispielsweise liegen Mutationen des Tyrosinkinase-Rezeptors *epidermal growth factor receptor* (EGFR) vor (Chou et al., 2011). Dieser TKR ist vergleichbar mit dem Tyrosinkinase-Rezeptor FLT3 bei AML. Beide weisen eine Aktivierung der Signalwege RAS/RAF/MEK/ERK und PI3K/AKT auf (Normanno et al., 2006). Eine weitere Gemeinsamkeit ist, dass beim Colon-Karzinom die HDACs der Klasse I überexprimiert sind (Mariadason, 2008). Behandlungen mit HDACis (Inhibition der Klasse I und II mit Vorinostat) haben gezeigt, dass die Expression des EGFR-Rezeptors sowie die Phosphorylierung an ERK blockiert werden. Außerdem sind im Zellzyklus Zunahmen der Zellanteile in der G1- und G2-Phase zu beobachten (Chou et al., 2011). Versuche mit

FK228 haben ebenfalls eine Abnahme von EGFR und ERK im Fall von Lungenkrebs ergeben (Yu et al., 2007). Bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen liegt ebenfalls eine Mutation der Tyrosinkinase EGFR vor. Die Bronchialkarzinomzellen entwickelten bei der Behandlung mit einem RTKi Resistenzen, was wiederum eine Parallele zur AML bei der Behandlung mit AC220 ist. Bei der kombinierten Gabe des RTKi mit dem HDACi Vorinostat traten diese jedoch nicht auf. Auch die Tumorgroße nahm durch die Kombinationsgabe ab und im Western-Blot konnte eine signifikante Zunahme an aktivierter *cysteinyl aspartate-specific protease 3* (Caspase 3) festgestellt werden, was mit einer hohen Apoptoserate korreliert. Vor allem stellen die Autoren dabei die wohl führende Rolle von HDAC3 im Fall von EGFR-Mutationen bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen heraus (Tanimoto et al., 2017). Betrachtet man FLT3-mutierte AML-Zellen im Vergleich zu EGFR-mutierten Bronchialkarzinomzellen, so zeigt die Inhibition von FLT3 bei gleichzeitiger Hemmung von HDAC3 mit 10 µM RGFP966 bereits nach 24 h eine deutliche Abnahme an FLT3 in Western-Blot-Analysen. Damit zeigen Li et al. (2017) eine vergleichbare Rolle von HDAC3 bei den Tyrosinkinasen FLT3 und EGFR auf (Li et al., 2017). Aufgrund der Literatur lässt sich folglich vermuten, dass konstitutiv aktive RTKs empfindlich gegenüber HDACi sind.

Andere Forschungsergebnisse zum Thema kombinierte Gabe mit HDACis bei AML liefern Zhou et al. (2015). Sie schließen aus ihren Forschungsergebnissen, dass eine Hemmung von WEE1 die Wirkung von HDACis bei der Behandlung von AML verbessert. Dabei ist irrelevant, ob die Hemmung auf genetischer Ebene durch einen Knock-down oder auf pharmakologischer Ebene durch einen Inhibitor generiert wird (Zhou et al., 2015). Andere Studien haben gezeigt, dass AML-Patienten, die resistent gegenüber Chemotherapie sind, den Oberflächenmarker CD123 auf Zellen aufweisen (Yan et al., 2018). CD123 ist auch unter dem Namen Interleukin 3-Rezeptor bekannt (Testa et al., 2014). Er ist ein Marker für leukämische Stammzellen. CD123 wird auf vielen CD34-positiven Stammzellen der AML überexprimiert (Jordan et al., 2000). Rund 45 % der AML-Patienten weisen solch eine Überexpression auf, welche eine schlechte Prognose für Patienten darstellt (Testa et al., 2002). FK228 kann bei diesen CD123-positiven Zellen Apoptose induzieren und sensibilisiert diese so gegen Ara-C. FK228 wirkt dabei eher auf die langsamer wachsenden CD123-positiven Zellen, Ara-C dagegen wirkt eher auf die schneller wachsenden CD123-negativen Zellen. Somit schließen Yan et al. (2018) aus ihren Forschungsergebnissen, dass sich FK228 und Ara-C in Kombination zu einer synergistischen Wirkung potenzieren (Yan et al., 2018).

2.8 Der Zellzyklus und die Regulation der Kontrollpunkte als Ansatzpunkt in der Behandlung der AML

Im Verlauf des Zellzyklus muss der DNA-Gehalt erst verdoppelt werden, damit dieser gleichermaßen auf zwei Zellen durch Zellteilung übertragen werden kann. Der Zellzyklus besteht aus der *Gap 1*-(G1-), Synthese-(S-), *Gap 2*-(G2-) und Mitose-(M-)Phase. In der S-Phase wird der DNA-Gehalt verdoppelt und in der M-Phase teilt sich die Zelle in zwei Tochterzellen mit gleichem DNA-Gehalt auf. Diese beiden Phasen werden durch die zwei G-Phasen voneinander getrennt (Barnum und O'Connell, 2014). Die Phasen G1, S und G2 werden als Interphase zusammengefasst. Die Übergänge der Zellzyklusphasen werden durch Kontrollpunkte gesteuert, wodurch die Integrität der DNA kontrolliert wird. Liegen Schäden in der Zelle vor, werden Proteine aktiviert, welche die Zellzyklusphase zum Zeitpunkt der Schadenserkennung arretieren. Es gibt drei Kontrollpunkte: den G1/S-, den Intra-S- und den G2/M-Kontrollpunkt. So kann der Zellzyklus im Fall eines DNA-Schadens angehalten und Reparaturmechanismen eingeleitet werden, bevor sich die Zelle in der M-Phase teilt (Kastan und Bartek, 2004). An der Regulierung des Zellzyklus sind Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) beteiligt (Malumbres und Barbacid, 2009). CDKs können nur als Komplex mit einem Cyclin in den aktiven Zustand übergehen. Je nach Phosphorylierungsstelle der CDK-Cyclin-Komplexe entscheidet sich, ob diese stimuliert oder inaktiviert werden. Der Übergang zur Mitose wird durch den Kontrollpunkt G2/M reguliert. Zur Veranschaulichung der molekularen Vorgänge des G2/M-Kontrollpunkts sind diese in Abb. 4 dargestellt. Für den G2/M-Kontrollpunkts ist die Tyrosinkinase WEE1 ein wichtiges Regulatorprotein, welches den Übergang in die M-Phase bei vorliegenden Schäden in der Zelle blockiert (Do et al., 2013). Phosphoryliert WEE1 CDK1 an Tyr15, hat dies zur Folge, dass die Cyclin-abhängige Kinase inaktiviert und damit der Übergang in die M-Phase durch einen G2-Arrest blockiert wird (Parker und Piwnicka-Worms, 1992, Do et al., 2013). Der Übergang hängt also vom Phosphorylierungszustand von CDK1 ab (Nurse, 1990, Dunphy, 1994). In der S- und G2-Phase ist die Transkriptionsrate und die Aktivität von WEE1 hoch, in der M-Phase dagegen sinkt sie. Liegt in der Zelle kein DNA-Schaden vor, kann die Zelle zur Zellteilung übergehen. Für die Einleitung der M-Phase wird *polo-like kinase 1* (PLK1) benötigt. Diese Kinase phosphoryliert u.a. WEE1 und CDC25. WEE1 wird dadurch ubiquitiniert und abgebaut (Lindqvist et al., 2009, Matheson et al., 2016). Die Phosphatase *cell division cycle 25* (CDC25) wird dagegen durch das Anhängen von Phosphat aktiviert (Lindqvist et al., 2009) und führt eine Dephosphorylierung von CDK1 durch. Das Resultat ist eine Aktivierung von CDK1

(Boutros et al., 2007). Durch Komplexbildung von CDK1 mit Cyclin B wird schließlich der Übergang zur Mitose eingeleitet (O'Farrell, 2001). Dieser Komplex wird *Mitosis Promoting Factor* (MPF) genannt (Masui und Markert, 1971, Smith und Ecker, 1971). MPF phosphoryliert u.a. Histon 1, was mit dem Einleiten der Prophase der Mitose im Zusammenhang steht (Chesnel et al., 2006).

Liegen Schäden in Form von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) vor, wird ATM aktiviert. ATM phosphoryliert und aktiviert *Checkpoint-Kinase 2* (CHK2). CHK2 phosphoryliert seinerseits CDC25 C an Serin (Ser)216. Die Phosphorylierung von CDC25 C führt zu einem Transport des Proteins aus dem Zellkern ins Zytoplasma und verhindert damit den Übergang in die M-Phase (Matsuoka et al., 2000). Liegen Schäden in Form von DNA-Einzelstrangbrüchen (SSBs) vor, wird *ataxia telangiectasia and Rad3 related* (ATR) aktiviert (Jazayeri et al., 2006). ATR phosphoryliert *Checkpoint-Kinase 1* (CHK1) und aktiviert es damit. CHK1 phosphoryliert WEE1 und CDC25 C. WEE1 wird dadurch aktiviert, CDC25 C dagegen wird gehemmt (Do et al., 2013).

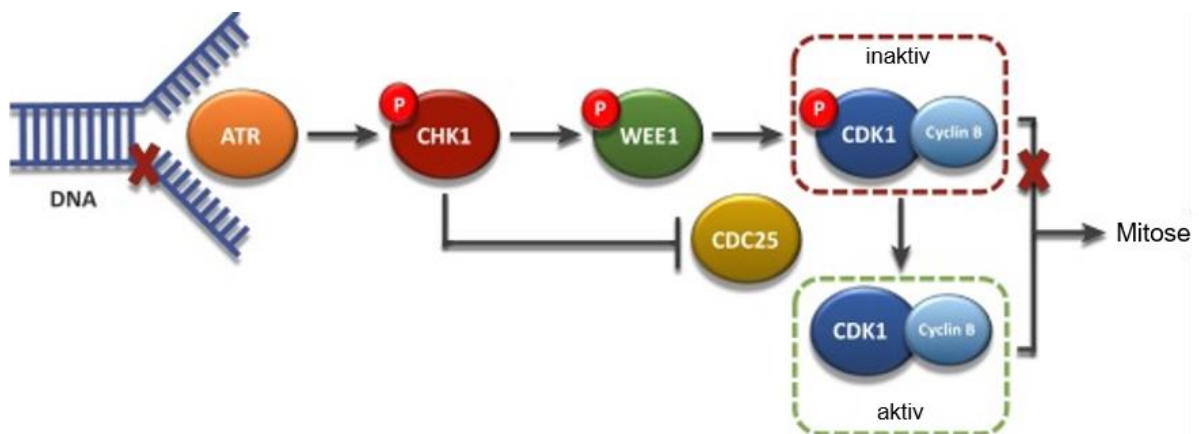


Abbildung 4: Signalkaskade bei Einzelstrangbrüchen der DNA

Dargestellt ist der Signalweg zur Regulierung des G2/M-Kontrollpunkts im Zellzyklus; modifiziert nach (Matheson et al., 2016).

Neben dem G2/M-Kontrollpunkt ist der G1/S-Kontrollpunkt von Interesse, da der G1/S-Kontrollpunkt oftmals bei Tumorzellen fehlerhaft ist. So kann der Zellzyklus nicht vorzeitig angehalten werden und die Zelle geht trotz DNA-Schaden in die S-Phase über. Der G2/M-Kontrollpunkt ist daher von großer Bedeutung und bewahrt die Tumorzellen vor der Apoptose trotz DNA-Schaden. Damit wird der Zelltod aufgrund einer „mitotischen Katastrophe“ verhindert (Bucher und Britten, 2008, Chen et al., 2012). Unter dem Begriff mitotische Katastrophe versteht man die Einleitung eines Zustandes, aus dem die Zelle aus der M-Phase entweder in den Zelltod oder in die Seneszenz übergeht. Es kann damit als „onkosuppressiver Mechanismus“ beschrieben werden

(Galluzzi et al., 2012). Die irregulär eingeleitete Mitose lässt sich anhand von stark veränderten Nukleoli beobachten. Dabei entstehen z.B. stark verkleinerte oder multiple Zellkerne. Diese prägnanten Veränderungen können als Marker für Zellen angesehen werden, welche in eine mitotische Katastrophe übergeleitet wurden (Kroemer et al., 2009). Im Umkehrschluss lässt sich daraus deuten, dass die Hemmung des G2/M-Kontrollpunkts gezielt Tumorzellen in die Apoptose treiben müsste, da intakte Zellen über beide Kontrollpunkte verfügen. Damit sind Tumorzellen um zu überleben von dem G2/M-Kontrollpunkt abhängig (Matheson et al., 2016).

An dem G2/M-Kontrollpunkt ist auch das Protein WEE1 beteiligt, welches bereits vor über 30 Jahren in der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* entdeckt wurde (Russell und Nurse, 1987). Neben seiner Rolle in der Zellzykluskontrolle ist WEE1 noch an der DNA-Replikation in der S-Phase beteiligt (Do et al., 2013). WEE1 stabilisiert die Replikationsgabel (Dominguez-Kelly et al., 2011) und phosphoryliert Histon H2B an Tyr37. Mit der Phosphorylierung wird signalisiert, dass die Histonsynthese abgeschlossen und die Zelle bereit zum Übergang in die Mitose ist. Sobald die Synthese der Histone abgeschlossen ist, verlassen die Zellen recht zügig die S-Phase und Histon H2B wird dephosphoryliert (Mahajan et al., 2012). Wird jedoch das Protein HIRA (Lamour et al., 1995) exprimiert, kommt es zum S-Phase-Arrest. HIRA ist ein Cyclin-CDK2-Substrat und ist an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt (Hall et al., 2001). Die Phosphorylierung von HIRA aktiviert das HIRA-Protein und bewirkt eine Akkumulation der Zellen in der S-Phase. Aus diesen Untersuchungen lässt sich schließen, dass HIRA an der Regulierung der Genexpression von Histonen beteiligt ist (Hall et al., 2001).

Untersuchungen haben gezeigt, dass WEE1 in vielen Tumorzellen überexprimiert wird, so auch in AML-Zellen (Porter et al., 2012). Aufgrund der vermehrten Expression in Tumorzellen wird die Inhibition von WEE1 als Therapiemöglichkeit bei der Behandlung der AML angesehen. Durch die Abhängigkeit der Tumorzellen vom G2/M-Kontrollpunkt ist auch das Überleben der AML-Zellen besonders von diesem Kontrollpunkt abhängig. Die Hemmung von WEE1 sensibilisiert diese Zellen so gegenüber Chemotherapeutika, da ohne WEE1 der G2/M-Kontrollpunkt gehemmt ist und die Zellen in die mitotische Katastrophe getrieben werden (Matheson et al., 2016). Die kombinierte Behandlung von Brustkrebszellen mit einem WEE1i und Chemotherapeutika erhöht die Apoptoserate, indem Zellen aus dem S-Phase-Arrest in die M-Phase überführt werden, obwohl DNA-Schäden in der S-Phase nicht repariert wurden (Aarts et al., 2012).

Die Replikation der DNA findet in der S-Phase des Zellzyklus statt. Dabei steht der Zelle nur eine limitierte Zeit zur Verfügung, sodass die Geschwindigkeit der Replikation genau auf die anderen Zellzyklusphasen abgestimmt sein muss (Conti et al., 2007). In Tumorzellen kommt es oft zu einer Anhäufung von einzelsträngiger DNA, da die Replikationsgabeln aufgrund des erhöhten replikativen Stresses durch bspw. Mangel an Nukleotiden gehemmt werden. Dies führt dazu, dass der ATR-CHK1-WEE1-Signalweg aktiviert wird (Saini et al., 2015). Die Zelle kann eine Erhöhung der Replikationsgeschwindigkeit bis zu einem gewissen Grad tolerieren. Nimmt die mit Hilfe von DNA Fibre Assay gemessene Geschwindigkeit jedoch über 40 % im Vergleich zur Geschwindigkeit gesunder Zellen zu, führt das zu DNA-Schäden. Somit führt eine zu starke Deregulierung der Replikationsgabel zu replikativem Stress und zur Aktivierung der DDR (Maya-Mendoza et al., 2018). Ein Ansatzpunkt der Behandlung von Krebs ist die Verstärkung von replikativem Stress in Tumorzellen, welcher in mutierten Zellen bereits in erhöhter Menge vorhanden ist (Dobbelstein und Sorensen, 2015). Eine Möglichkeit, den replikativen Stress in der Zelle zu erhöhen, wird anhand der Hemmung von WEE1 erzielt. Die WEE1-Inhibition vermindert indirekt auch das Protein CHK1 durch eine Rückkopplung. Durch die Hemmung von WEE1 wird auch das Protein Claspin vermindert, welches als Koaktivator für CHK1 benötigt wird. Durch diese indirekte Reduktion von CHK1 nimmt gleichzeitig auch der replikative Stress in der Zelle zu (Saini et al., 2015).

Das Tumorsuppressorprotein 53 (p53) wird auch als „Hüter des Genoms“ (Lane, 1992) oder als „Wächter der Zelle“ (Levine, 1997) bezeichnet. Es ist verantwortlich für die Transkription von Regulationsgenen des Zellzyklus (Jabbur et al., 2000), der DNA-Reparatur (Christmann und Kaina, 2013) und der Apoptose (Hopker et al., 2012). p53 spielt oft bei der Entstehung von Krebs eine wichtige Rolle (Abraham et al., 2016). Fehlt p53 in den Zellen, ist der Allgemeinzustand der Zellen deutlich verschlechtert (Maya-Mendoza et al., 2018). In gesunden Zellen wird p53 durch E3-Ligasen wie z.B. *murine double minute oncogene* (MDM2) gesteuert und runterreguliert (Wu et al., 1993).

Das Protein *cyclin-dependent kinase inhibitor 1* (p21^(Cip1/Waf1)) wird der CDK-Inhibitor-Familie zugeordnet (Abbas und Dutta, 2009). Kommt es in der Zelle zu DNA-Schäden, wird p53 an Ser20 aktiviert und agiert als Transkriptionsfaktor für p21^(Cip1/Waf1) (el-Deiry et al., 1993, Jabbur et al., 2000). Die Aktivierung von p21^(Cip1/Waf1) löst einen G1-Arrest in den Zellen aus (Deng et al., 1995). Der Arrest der Zellen in der G1-Phase wird

dadurch erzielt, dass p21^(Cip1/Waf1) CDK2 inhibiert. Aktiviertes CDK2 wird aber zur Überleitung in die S-Phase benötigt (Zhu et al., 2005, Abbas und Dutta, 2009). Außerdem kann p21^(Cip1/Waf1) Seneszenz einleiten. Die aufgeführten Funktionen von p21^(Cip1/Waf1) schützen somit die Zelle vor der Einleitung der Apoptose (Roninson, 2002). Die Hemmung der Apoptose wird durch p21^(Cip1/Waf1) erzielt, da das Protein ein entscheidender Regulator der Replikation ist. Die Aktivierung von p21^(Cip1/Waf1) führt dazu, dass die Replikationsgeschwindigkeit abnimmt (Maya-Mendoza et al., 2018), indem p21^(Cip1/Waf1) an das Protein *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) (Moldovan et al., 2007) bindet. PCNA wird als Kofaktor für die DNA-Polymerase benötigt. Durch die Bindung von p21^(Cip1/Waf1) an PCNA wird es als Kofaktor unwirksam und die Replikation wird damit gehemmt. Gleichzeitig aber werden durch die Bindung von p21^(Cip1/Waf1) an PCNA Reparaturvorgänge aktiviert (Abbas und Dutta, 2009).

2.9 DNA-Schäden und die Rolle von HDACs in der DNA-Reparatur

Die Behandlung von Tumorzellen ist darauf ausgerichtet, in Zellen Schäden zu verursachen und die Tumorzellen damit in den Zelltod zu treiben. Bei den Schäden kann es sich beispielsweise um Strangbrüche in Form von SSBs oder DSBs handeln (Vilenchik and Knudson, 2003). Weitere Arten an DNA-Schäden sind u.a. Schädigungen durch Oxidation (Ward, 1988) oder Methylierung (Tan et al., 1999).

Typische Anzeichen von Strangbrüchen sind einerseits die Aktivierung von Kontrollpunkten im Zellzyklus, um dessen Fortschreiten zu verhindern. Andererseits kommt es zum Einsatz von DNA-Reparatur-Proteinen (Roos und Krumm, 2016). Bei DSBs kommt es über mehrere Zwischenschritte, u.a. ATM (Thurn et al., 2013), zur Aktivierung des *nucleosome remodelling deacetylase*-(NuRD-) Komplexes (Chou et al., 2010). Dieser Komplex ist in DNA-Reparaturprozesse involviert (Li und Kumar, 2010) und besteht aus HDAC1, HDAC2 und weiteren Proteinen (Xue et al., 1998). Diese beiden genannten HDACs kommen nur im Zellkern vor (Graff und Tsai, 2013). Sie entfernen Acetylgruppen von Lysin (Lys)56 an Histon 3 (Zhu et al., 2015) und von Lys16 an Histon 4 (Miller et al., 2010). Bei der Formgebung des Chromatins und der Aktivierung der Reparaturmechanismen bei DSBs sind somit HDAC1 und HDAC2 mitbeteiligt (Thurn et al., 2013, Roos und Krumm, 2016). Im Laufe des Reparaturprozesses kommt es erneut zur Beteiligung des Proteins ATM, aber zusammen mit *60 kDa tat-interactive protein* (TIP60), einer Histon-Acetyltransferase (Sun et al., 2005). TIP60 wird von HDAC3 deacetyliert und damit stabilisiert (Yi et al., 2014). Die Aktivierung von

ATM wird durch eine Acetylierung von TIP60 gefördert (Sun et al., 2005). HDAC3 steht damit im Zusammenhang mit dem Erhalt der genomischen Stabilität und der Chromatinstruktur (Bhaskara et al., 2010). Kommt es im Zuge eines SSBs zur Phosphorylierung von ATR, wird die DNA-Polymerase gehemmt, um die Replikation anzuhalten (Zeman und Cimprich, 2014). Durch die Aktivierung von ATR werden Proteine wie CHK1 und H2AX ebenfalls durch das Anhängen einer Phosphatgruppe aktiviert (Rundle et al., 2017). RAD51 wird durch HDAC2 reguliert (Krumm et al., 2016). Somit ist zusammenfassend die DDR für die Kontrollpunkte des Zellzyklus, für die DNA-Reparatur und Apoptose verantwortlich (Lydall und Weinert, 1995). Die Apoptose wird dann eingeleitet, wenn der DNA-Schaden in der Zelle zu groß ist. Neben ATM und ATR spielt bei der DDR das Protein *DNA-dependent protein kinase* (DNA-PK) eine wichtige Rolle. DNA-PK phosphoryliert ATM, ATR und H2AX und aktiviert damit die zuvor beschriebenen Signalwege (Blasius et al., 2011). Weitere typische Proteinmarker für die DDR sind u.a. RAD51 und Replikationsprotein A (RPA) (Maya-Mendoza et al., 2018). Bei RPA handelt es sich um ein Protein, welches durch replikativen Stress induziert wird. Es bindet an einzelsträngige DNA und schützt diese vor beispielsweise Abbau (Toledo et al., 2013). Ein weiterer Bestandteil der DDR ist das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Proteine des UPS werden bei DNA-Schäden überexprimiert (Mu et al., 2007). Das UPS degradiert Proteine, indem es von Ubiquitin-Ligasen markierte Proteine erkennt und diese dann abbaut (Petroski und Deshaies, 2005). Das UPS wird im letzten Kapitel der Literatordiskussion genauer erklärt. Zusammengefasst sind HDACs in die Prozesse der Meldung und Reparatur eines DNA-Schadens beteiligt.

2.10 Apoptose

Bei der Apoptose handelt es sich um einen „programmierten Zelltod“ (Lockshin und Williams, 1965). Die Zellen leiten den Zelltod ein, ohne dabei Entzündungsreaktionen im umliegenden Gewebe auszulösen. Dabei wird die Zelle in Form von Apoptosekörperchen abgebaut und dann durch Phagozytose beseitigt. So wird kein Zellinhalt an das umliegende Gewebe abgegeben. Damit werden keine Stimulation des Immunsystems und folglich keine Entzündungsprozesse ausgelöst (Savill und Fadok, 2000, Elmore, 2007). Es gibt einen extrinsischen und einen intrinsischen Weg, um Apoptose einzuleiten (Vaux und Korsmeyer, 1999). Dabei sind Caspasen wichtige Proteine für die Initiation und Exekution der intrinsischen/mitochondrialen Apoptose (Ellis und

Horvitz, 1986). Stimuli wie Hypoxie oder Toxine können den intrinsischen Apoptoseweg auslösen, indem sie z.B. DNA-Schäden verursachen. Das löst Signalwege aus, welche Auswirkungen auf die Mitochondrienmembran haben. Das Verhältnis zwischen den pro- und antiapoptotischen Faktoren wird an die Situation angepasst, indem sich das Gleichgewicht zu den proapoptotischen hin verschiebt. Die Proteine *BCL2-associated X protein* (BAX) und *BCL2-antagonist-of-cell-death* (BAD) gehören zur BCL2-Familie und haben Einfluss auf die Permeabilität der Mitochondrien. Die Permeabilität nimmt dadurch zu, dass BAX oder BAD auf der Membranoberfläche der Mitochondrien oligomerisieren und dadurch Poren in der Mitochondrienmembran bilden (Dewson und Kluck, 2009, Morsi et al., 2018). Durch die Poren kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (Liu et al., 1996). Cytochrom c bindet an den apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1) und bildet so einen Proteinkomplex (Baliga und Kumar, 2003). Der Cytochrom c-Apaf-1-Komplex aktiviert daraufhin die Initiatorcaspase Caspase 9, welche dann die Effektorcaspase Caspase 3 durch Spaltung aktivieren kann (Li et al., 1997a). Auch aktivierte Initiatorcaspase Caspase 8 kann Caspase 3 initiieren (Muzio et al., 1997). Für die Signalwege der Apoptose sind Proteine der BCL2-Familie wichtig. Je nach Situation sind diese Proteine pro- oder antiapoptotisch (Gross et al., 1999). BCL2 selber agiert als antiapoptotisches Protein, da es die Freisetzung von Cytochrom c verhindert. Damit wirkt es auch der Aktivierung von Caspase 3 entgegen (Swanton et al., 1999). Weitere antiapoptotische Proteine sind *B-cell lymphoma-extra large* (BCL-X_L) und *induced myeloid leukemia cell differentiation protein* (MCL1) (Certo et al., 2006). Die Proteine der BCL2-Familie sind bei AML-Patienten überexprimiert. Vorrangig handelt es sich dabei um BCL2 und BCL-X_L (Andreeff et al., 1999).

In der Literatur wurde bereits mehrfach beschrieben, dass Apoptose auch im Zusammenhang mit *reactive oxygen species* (ROS) stehen kann (z.B. (Li et al., 1997b)). Wird in Zellen Apoptose auf Grund von zu großen Mengen an ROS induziert, wurde der Hauptanteil an ROS dabei meist in den Mitochondrien produziert (Kroemer et al., 1998, Mignotte und Vayssiere, 1998). Die Behandlung mit einem HDAC1 und 3-Inhibitor beispielsweise induziert in leukämischen Zelllinien bereits nach 2 h einen großen Anstieg an ROS, was gleichzeitig mit erhöhter Permeabilität der Mitochondrien und vermehrter Cytochrom c Freisetzung einhergeht (Rosato et al., 2003). Das Verursachen von erhöhten ROS-Werten wurde auch mit dem HDACi Vorinostat festgestellt. Bei diesen Versuchsreihen wurde eine Abnahme der Integrität der Mitochondrienmembran durch

die Spaltung und damit Aktivierung des Proteins *BH3-interacting domain death agonist* (BID) beobachtet, welches wie BAX oder BAD Poren in der Mitochondrienmembran bilden kann. Durch den Einsatz von Antioxidantien konnten sowohl eine Schädigung der Mitochondrien, sowie die Apoptoserate gesenkt werden. Damit wurde gezeigt, dass erhöhte ROS-Werte mit erhöhter Apoptoserate korrelieren können (Ruefli et al., 2001).

2.11 Die E2 Ubiquitin-Konjugase UBCH8

Das Protein *Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 E2* (UBE2E2), welches auch unter dem Namen UBCH8 bekannt ist, wird vom *UBE2L6*-Gen kodiert und gehört zur UBE2E-Protein-Familie. Dabei handelt es sich um Ubiquitin-konjugierende Enzyme (Shibata et al., 2011). Diese Enzyme sind an der Ubiquitinierung von Proteinen beteiligt. Der Prozess der Ubiquitinierung markiert Proteine für den Abbau durch Proteasomen (Arrigo et al., 1988). Proteasekomplexe bestehen aus drei Untereinheiten. Eine zentrale, zylinderförmige 20S-Untereinheit (Yoshimura et al., 1993, Tamura et al., 1995) und zwei daran endständig aufsitzende 19S-Untereinheiten. Die 19S-Untereinheiten haben die Aufgabe, markierte Proteine zu identifizieren und diese der 20S-Untereinheit zuzuführen (Peters et al., 1993, Yoshimura et al., 1993). Zur Ubiquitinierung kommt es in drei Schritten. Als erstes wird Ubiquitin durch ATP anhand eines E1 Ubiquitin-aktivierenden Enzymes stimuliert. Danach folgt die Übertragung des aktivierten Ubiquitins auf ein E2 Ubiquitin-konjugierendes Enzym. Als letztes erfolgt die Übertragung des Ubiquitins auf das zu markierende Protein durch eine E3 Ubiquitin Ligase. Das Ubiquitin wird dabei durch kovalente Bindung auf ein spezifisches Lysin des Zielproteins übertragen (Hershko und Ciechanover, 1992, Hershko und Ciechanover, 1998). Eine große Gruppe an E3 Ubiquitin Ligasen bilden die *cullin ring-based E3 ubiquitin ligases* (CRLs) (Hotton und Callis, 2008). So spielt CRL4^{Cdt2} eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Zellzyklus (Abbas und Dutta, 2011). Das E2-Enzym UBCH8 und das E3-Enzym CRL4^{Cdt2} sind gemeinsam an der Polyubiquitinierung von p21^(Cip1/Waf1) beteiligt. Damit regen sie den Abbau von p21^(Cip1/Waf1) an. UBCH8 und CRL4^{Cdt2} regulieren die Menge an p21^(Cip1/Waf1), um einen korrekten Übergang in die S-Phase zu ermöglichen. Wird UBCH8 gehemmt, steigt die Menge des Proteins p21^(Cip1/Waf1), sowie dessen Halbwertszeit an. Das führt dazu, dass der Anteil der Zellen in der G1-Phase zunimmt und der Anteil der Zellen in der S-Phase abnimmt (Shibata et al., 2011).

Wird die Menge des Proteins UBCH8 bei der Behandlung von AML-Zellen mit dem HDACi LBH589 betrachtet, so fällt auf, dass das E2-Enzym UBCH8 verstärkt induziert wird. Die Menge des dabei untersuchten E3-Enzyms *seven in absentia homolog 1* (SIAH1) dagegen bleibt konstant. Dadurch wird eine Ubiquitinierung des FLT3-ITD-Rezeptors induziert. Dies führt schließlich zum Abbau des Rezeptors durch Proteasomen. Der entscheidende Faktor um FLT3-ITD zu ubiquitinieren, ist die Fähigkeit des Rezeptors zur Phosphorylierung an Tyr591. Wird jedoch die Phosphorylierung des FLT3-ITD-Rezeptors aufgrund eines FLT3i gehemmt, resultiert dies darin, dass der Rezeptor resistent gegenüber UBCH8 wird. Der Abbau der FLT3-ITDs wird jedoch nicht alleine durch das Proteasom induziert. Die Behandlung mit LBH589 generiert sowohl einen proteasomalen, als auch einen durch Caspasen initiierten Abbau. Die Inkubation der Zellen mit dem HDACi und Z-VAD-FMK, einem pan-Caspase-Inhibitor, bewirkt keine gravierende Apoptoseinduktion. Folglich wird der Großteil des Abbaus des FLT3-Rezeptors durch die Aktivität von Caspasen generiert. Die Proteolyse durch Proteasomen dagegen macht einen geringeren Anteil der Apoptoseinduktion aus (Buchwald et al., 2010).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe Vacusafe	Integra
Blottingapparatur Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad
CO ₂ -Inkubator HeraCell150	Thermo Scientific
Durchflusszytometer FACSCanto™	BD Biosciences
Eisflockenbereiter AF 80	Scotsman
Elektrophoresekammer	Bio-Rad
Feinwaage Basic	Sartorius
Gefrierschrank Liebherr GNP 2713	Liebherr
Gefrierschrank VIP Series -86C Ultra-Low Temperature	SANYO
Gelgießapparatur	Bio-Rad
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf
Konfokales Laserscanning Mikroskop LSM710	Carl Zeiss
Kühlschrank Liebherr IKB 2320 Comfort	Liebherr
Mikroskop Primovert	Zeiss
Mini-Centrifuge; Tischzentrifuge	Roth
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 35	Zeiss
Photometer Sunrise Microplate Reader	Tecan
Pipet-X	Mettler Toledo
Pipette AutoRep E	Rainin
Pipet-Lite XLS (2 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL)	Rainin
Rocking Platform	VWR
Rollenmischer RS-TR05	Phoenix Instruments
Rührplattform Variomag Mono	Thermo Scientific
Sonifizier-Gerät UP2200Ht ultrasonic processor	Hielscher
Spannungsquelle PowerPac™ HC	Bio-Rad
Sterilbank LaminAir HB2472	Thermo Scientific
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage Precisa Junior 500	Precisa
Wasseraufbereitungssystem PURELAB Classic	ELGA LabWater
Wasserbad AQUAline AL 5	Lauda
Western-Blot Odyssey®-Infrared Imaging-System	Li-Cor Biosciences
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16	Thermo Scientific

3.1.2 Labormaterialien

Tabelle 2: Labormaterialien

Material	Hersteller
CELLStar® Zellkulturflaschen (40 mL, 200 mL)	Greiner Bio-one
CELLStar® 6-Well-Zellkulturplatten	Greiner Bio-one
CELLStar® 12-Well-Zellkulturplatten	Greiner Bio-one
CELLStar® Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Greiner Bio-one
Chromatography Paper Whatman™	GE Healthcare Life Science
Einmal-Skalpell	Feather
Einweghandschuhe Nitrile Powder-Free	Abena
FACS-Röhrchen	Sarstedt
Falcon-Tubes (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-one
Filter-Pinzette	Millipore
Glaswaren	Schott Duran
Mini PROTEAN® Glass Plates	Bio-Rad
Neubauer Zählkammer	Marienfeld-Superior Germany
Nitrozellulose-Membran Amersham Protan 0.2 µm NC	GE Healthcare Life Science
Pasteurpipetten	Roth
Pipette AutoRep E	Rainin
Pipette Tips Pipettenspitzen (10 µL, 200 µL, 1250 µL)	Greiner Bio-one
Reagiergefäß 1,5 mL EASY CAP	Sarstedt
Rotilabo®-Mikrotiterplatten	Roth
Safe Lock Tubes 1,5 mL	Eppendorf
Serologische Messpipetten aus Glas	Hirschmann Instruments™

3.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid Rotiphorese® Gel 40	Roth
Ammoniumperoxidsulfat	Roth
Annexin V	Miltenyi Biotec
Aqua dest.	BRAUN
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue®	Merck
Dimethylsulfoxid	Roth
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich
EdU	Sigma-Aldrich
Ethanol, vergällt	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure	Applichem
FACS clean	Becton Dickinson
FACS flow	Becton Dickinson
Gelatine	Sigma-Aldrich
Glycerin	Sigma-Aldrich
Glycin	Roth
Isopropanol	Roth

Kaliumchlorid	Roth
Low-melting point Agarose	Roth
Milchpulver Blotting grade, pulv., fettarm	Roth
Natriumazid	Roth
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich
NEWBlot™ Nitro Strippingbuffer	Li-COR Biosciences
Nonidet® P-40	Fluka
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
PBS Dulbecco	Biochrom
Phosphataseinhibitor	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure	Roth
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
Proteaseinhibitorcocktail-Tablette	Roche
Salzsäure 37%	Roth
Sodiumdodecylsulfat	Roth
Tetramethylethylendiamin	Roth
TO-PRO-3 Stain	Thermo Scientific
Tris Puffer	Roth
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Tween®	Roth
VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium	Vector Laboratories

3.1.4 Puffer- Lösungen und Färbungen

Tabelle 4: Puffer, Lösungen und Färbungen

Name	Zusammensetzung
Annexin V Puffer (1x)	10 mM HEPES/NaOH pH 7,4 140 mM NaCl 2,5 mM CaCl ₂ 0,1 % BSA
Apoptose-Färbung	Annexin V Puffer (1X) 50 µg/mL PI 2 µL Annexin V (1x) pro Probe
Blotpuffer	5x Lämmli-Puffer 20 % Ethanol
Blockpuffer	5 %ig Milchpulver in TBS-T (w/v) mit 0,1 % Tween
Bradford Reagenz	0,061 mM Coomassie Brilliant Blue® 5 % Ethanol 10 % Phosphorsäure
Comet-Assay Elektrophoresepuffer (alkalisch)	300 mM NaOH 1 mM EDTA pH über 13 einstellen
Comet-Assay Elektrophoresepuffer (neutral)	90 mM Tris 90 mM Borsäure 2 mM EDTA pH 7,5
Comet-Assay Lysepuffer	2,5 M NaCl 100 mM EDTA

	10 mM Tris Alkalisch: pH 10 mit NaOH einstellen Neutral: pH 7,5 mit HCl einstellen 1 % Triton X-100 10 % DMSO
Comet-Assay Neutralisationspuffer (alkalisch)	0,4 M Tris pH 7,5
FACS-Puffer	PBS + 2 mM EDTA
HFS-Puffer	3,88 mM Natriumcitrat 0,1 % (v/v) Triton X-100
Immunfluoreszenz Block-Puffer	0,3 % (v/v) Triton X-100 5 % (w/v) BSA in PBS
Immunfluoreszenz Fixier-Lösung	Methanol und Aceton im Verhältnis 7:3
Immunfluoreszenz hochsalzhaltiges PBS	0,4 M NaCl in PBS
5x Lämmli-Puffer	0,25 M Tris 1,92 M Glycin
Low-melting point Agarose	0,5 %ig Low-melting point Agarose in Aqua dest. (w/v)
Net-N Lysepuffer	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 10 % Glycerin 1 mM EDTA 0,5 % NP-40 Zusätze: Proteaseinhibitorcocktail-Tablette (1 Tablette/10 mL), Phosphataseinhi- bitor (1:100), DTT (1:1000)
Propidiumiodid-Lösung (Comet-Assay)	50 µg/mL PI, Verdünnung 1:20 in Aqua dest.
Propidiumiodid-Lösung (FACS)	50 µg/mL PI in PBS
6x Probenpuffer nach Lämmli	375 mM Tris-HCl pH 6,8 12 % SDS 30 % Glycerin 500 mM DTT 0,01 % Bromphenolblau
SDS-Elektrophoresepuffer	5x Lämmli-Puffer 0,1 % (w/v) SDS
10x TBS-Puffer	20 mM Tris 1,4 M NaCl
TBS-T Puffer	10 x TBS 0,05 % Tween®
Trypanblau	0,5 % Trypanblau
Viability-Färbung	3,6 mM DAPI im Verhältnis 1:1000 in FACS-Puffer

3.1.5 Acrylamidgele

Tabelle 5: Acrylamidgele

7,5 %iges Trenngel	1,08 M Aqua dest. 1,5 M Tris pH 8,8 110 mM Acrylamid (40 %) 1,26 mM SDS (10 %) 1,56 mM APS (10 %) 0,12 mM TEMED
15 %iges Trenngel	0,7 M Aqua dest. 1,5 M Tris pH 8,8 219 mM Acrylamid (40 %) 1,26 mM SDS (10 %) 1,56 mM APS (10 %) 0,12 mM TEMED
4 %iges Sammelgel	0,49 M Aqua dest. 1,5 M Tris pH 6,8 24 mM Acrylamid (40 %) 0,4 mM SDS (10 %) 1,04 mM APS (10 %) 0,08 mM TEMED

3.1.6 Zelllinie

Tabelle 6: Zelllinie

Zelllinie	Herkunft	Kultureigenschaft	Hersteller
MV4-11	isoliert aus dem peripheren Blut eines zehnjährigen, männlicher AML-Patienten in der myeloischen Blastenkrise	Suspensionszellen	Zellen erhalten von Prof. Dr. Frank-Dietmar Böhrner, Friedrich-Schiller-Universität Jena; verifiziert von DSMZ in Braunschweig

MV4-11 Zellen sind AML-Zellen mit mutiertem FLT3-ITD-Rezeptor (Li et al., 2017). Es handelt sich hierbei um humane Blasten mit einer Translokation an t(4;11) (American Type Culture Collection, 2016). Die Verdopplungszeit der MV4-11 Zellen liegt bei ca. 50 Stunden (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, 2018).

3.1.7 Medium und Mediumzusätze

Tabelle 7: Medium und Mediumzusätze

Name	Hersteller
Fötales Kälberserum	Biochrom
RPMI-1640	Sigma-Aldrich

3.1.8 Inhibitoren

Tabelle 8: Inhibitoren

Inhibitor	Konzentration Hauptstock [mM]	Katalognummer	Hersteller
AC220	10		Zur Verfügung gestellt von AG Mabhoobi (Universität Regensburg)
FK228	10	S3020	Selleck Chemicals
RGFP966	50	S7229	Selleck Chemicals

3.1.9 Primäre Antikörper

Tabelle 9: Primäre Antikörper (Western-Blot- und Immunfluoreszenz-Analyse)

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
ac-H3 ^(Lys14)	Kaninchen	1:1000	Milli 06-599	Millipore
ac-H4 ^(Lys5)	Kaninchen	1:1000	Cellsig#86475	Cell Signaling
ac-p53 ^(Lys382)	Kaninchen	1:1000	Cellsig#2524	Cell Signaling
α-Tubulin	Kaninchen	1:1000	Ab176560	Abcam
β-Aktin	Maus	1:200	Sc-47778	Santa Cruz
clvd. Caspase 3	Kaninchen	1:500	Cellsig#9661	Cell Signaling
ERK 1	Maus	1:1000	Cellsig#271269	Cell Signaling
γ-H2AX ^(Ser139)	Kaninchen	1:500	Cellsig#9718	Cell Signaling
GAPDH	Kaninchen	1:1000	Ab128715	Abcam
p21 ^(Cip1/Waf1)	Kaninchen	1:1000	Ab109520	Abcam
p-CHK1 ^(Ser296)	Kaninchen	1:1000	Cellsig#2349	Cell Signaling
p-CHK1 ^(Ser345)	Kaninchen	1:1000	Cellsig#2348	Cell Signaling
pan-CHK1	Maus	1:500	Cellsig#2360	Cell Signaling
p-ERK 1 ^(Thr202) / p-ERK 2 ^(Tyr204)	Kaninchen	1:1000	Cellsig#9101	Cell Signaling
p-FLT3 ^(Tyr591)	Kaninchen	1:250	Cellsig#3461	Cell Signaling
pan-FLT3	Kaninchen	1:500	Sc-480	Santa Cruz
pan-HSP90	Kaninchen	1:1000	Cellsig#4877	Cell Signaling
p-p53 ^(Ser15)	Kaninchen	1:1000	Cellsig#9284	Cell Signaling
p-RPA ^(Thr21)	Kaninchen	1:1000	Ab661065	Abcam
p-STAT5 ^(Tyr694)	Kaninchen	1:500	Thermo MA5-14973	Thermo Fisher
pan-STAT5	Maus	1:250	BD616191	BD Biosciences
RAD51	Kaninchen	1:1000	Ab6380	Abcam
UBCH8	Kaninchen	1:500	AP2118a	Abgent
Vinculin	Maus	1:500	Sc-7336	Santa Cruz
WEE1	Maus	1:200	Sc-5285	Santa Cruz

Alle Erstantikörper wurden in Net-G, TBS-T und 3 mM NaAz angesetzt und bei 4 °C gelagert. Die STAT-Antikörper wurden in 2 %-iger Milch mit 3 mM NaAz angesetzt und bei -20 °C gelagert.

3.1.10 Sekundäre Antikörper (Western-Blot-Analyse)

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper (Western-Blot-Analyse)

Antikörper	Wirt	Verdünnung in TBS-T	Hersteller
IgG Kaninchen IRDye® 800CW	Esel	1:10000	Li-Cor Biosciences
IgG Maus IRDye® 800CW	Esel	1:10000	Li-Cor Biosciences
IgG Kaninchen IR-Dye® 680RD	Esel	1:10000	Li-Cor Biosciences
IgG Maus IRDye® 680RD	Esel	1:10000	Li-Cor Biosciences

3.1.11 Sekundäre Antikörper (Immunfluoreszenz-Analyse)

Tabelle 11: Sekundäre Antikörper (Immunfluoreszenz Analyse)

Antikörper	Wirt	Verdünnung im Block-Puffer	Hersteller	Fluoreszenzfarbe
IgG Anti-Maus Alexa Fluor 488	Ziege	1:300	Thermo Fisher	grün

3.1.12 Software

Tabelle 12: Software

Name	Hersteller
Combenefit	Cancer Research UK Cambridge Institute (zum Herunterladen verfügbar)
EndNote X7	Bilaney Consultants GmbH
FACSDiva™ Software	BD Biosciences
FlowJo® Version 10	FlowJo, LLC
GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc.
Image Studio Lite Version 5.2	Li-Cor Biosciences
Microsoft Office 2016	Microsoft
Odyssey Software	Li-Cor Biosciences
Zen 2	Carl Zeiss

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde unter der Sterilbank mit Handschuhen, sowie mit zuvor durch einen Sterilisationsprozess in einem Autoklav sterilisierten Materialien gearbeitet. Desinfektionsmaßnahmen wurden mit 70 %igem Ethanol durchgeführt.

3.2.1.1 Auftauen der Zellen

Die Lagerung der Zellen erfolgte in -196 °C kaltem, flüssigen Stickstoff. Zum Auftauen der Zellen wurden diese in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Zur Lagerung mit flüssigem Stickstoff wurde DMSO als Frostschutzmittel verwendet. Um dieses zu entfernen, wurden die Zellen bei $1,2 \times G$ für 5 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Danach wurde der Überstand mittels Vakuumpumpe abgesaugt und das entstandene Zellpellet mit auf 37 °C vorgewärmtem Medium resuspendiert. Nach etwa einer Woche konnten die Zellen für Experimente verwendet werden.

3.2.1.2 Erhaltungskultur

Die Zellen werden im Inkubator bei 37 °C und einer Atmosphäre von 5% CO_2 kultiviert. Zur Aufrechterhaltung der Kultur musste das Medium regelmäßig gewechselt werden, um eine zu starke Zunahme der Zelldichte und folglich ein Absterben der Zellen zu verhindern. Dazu wurden die Zellen in den Kulturflaschen alle zwei bis drei Tage gesplittet. Abhängig von der Zelldichte wurde dies in einem Verhältnis von 1:8 bis 1:12 durchgeführt.

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Zellaussaat

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden MV4-11-Zellen in einer 1:2 Verdünnung mit Trypanblau gemischt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Unter einem Mikroskop wurde dann die Zellzahl bestimmt. Dazu zählte man die Zellen in der Neubauer-Zählkammer. Diese besteht aus vier Quadranten, wovon jeder Quadrant aus 16 Quadranten besteht (s. Abb. O im Anhang). Alle Zellen, die sich in den vier Quadranten befinden, werden addiert. Anhand folgender Rechenformel kann dann die Zelldichte bestimmt werden:

$$\frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{4} \times 2 \times 10^4 \times \frac{1}{\text{mL}} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}}$$

Formel 1: Berechnung der Zelldichte

Um zu berechnen, wie viele mL der Zellsuspension für die Aussaat gebraucht werden, wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{gewünschte Zelldichte}}{\text{vorliegende Zelldichte}} = \text{benötigtes Zellsuspensionsvolumen}$$

Formel 2: Berechnung des benötigten Zellsuspensionsvolumens

Die berechnete Menge an Volumen wurde dann bei 1,2 x G bei RT für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit dem gewünschten Volumen wurde die benötigte Zelldichte eingestellt.

3.2.3 Behandeln der Zellen mit Inhibitoren

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Zellen sowohl einzeln mit AC220, FK228 und RGFP966, als auch in Kombination behandelt. Zur Kombinationsbehandlung wurde AC220 jeweils mit FK228 oder mit RGFP966 verwendet.

AC220 und FK228 lagen als 1 mM Stocklösung vor. Zur Behandlung der Zellen wurden Stocks von 1 µM angesetzt. RGFP966 lag als 50 mM Stocklösung vor, behandelt wurde mit einer Stockkonzentration von 1 µM.

3.2.4 Herstellung von Proteinlysaten

Die Zellen wurden bei 1,2 x G für 5 min bei RT zentrifugiert. Die folgenden Schritte wurden alle auf Eis durchgeführt. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in Net-N Puffer resuspendiert und für 10 min lysiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Amplitude von 40 % und jeweils 10 Pulsstößen sonifiziert. Danach wurden die Zellen bei 21,1 x G für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit den darin enthaltenen Proteinen wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und für eine zeitnahe Verwendung bei -20 °C gelagert. Für die Langzeitlagerung wurden die Proteinproben bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.5 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Zur Bestimmung der Proteinmenge in der Proteinsuspension wurde die von Bradford entwickelte Methode genutzt. Hierbei wird die Veränderung des Absorptionsspektrums des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue® genutzt. Das Absorptionsmaximum der Bradfordlösung liegt ohne Bindung an Proteine bei 465 nm und stellt sich in der Farbe Rot dar. Kommt es zur Bindung des negativ geladenen Farbstoffes an positiv geladene

Seitenketten der Proteine, steigt das Absorptionsmaximum auf 595 nm an und stellt sich in der Farbe Blau dar. Die optische Dichte korreliert hierbei mit der Menge an Protein-Farbstoff-Komplexen. Die Strahlungsintensität wird durch absorbierende Substanzen abgeschwächt, wodurch der Extinktionskoeffizient ansteigt (Lambert, 1760).

Die Proteinmenge konnte anhand einer zuvor erstellten Standardgerade von bekannten Proteinkonzentrationen bestimmt werden. Die Absorption der Probe wurde zur Bestimmung der vorliegenden Proteinmenge mit der Absorption der Eichgerade verglichen.

3.2.6 SDS-Gelelektrophorese

Bei der Natriumdodecylsulfat-(SDS-) Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteingemische anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Durch das Aufkochen der Proteine bei 95 °C werden diese denaturiert. Das SDS kann sich an die Proteine anlagern und bildet mit ihnen SDS-Protein-Komplexe. Der SDS-Protein-Komplex erhält eine stark negative Ladung. Durch das SDS wird die Eigenladung der Proteine überdeckt, sodass ein konstantes Ladungs- zu Masseverhältnis entsteht. Wird eine Spannung am Acrylamid-Gel angelegt, wandern die Proteine je nach Stokes-Radius unterschiedlich schnell durch die Polyacrylamid-Matrix zur Anode. Sie werden nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Kleine Proteine wandern schneller, da sie vom Molekulargewicht her leichter sind. Schwere Proteine wandern langsamer. Je größer die Proteine sind, umso weniger % -ig sollte das Acrylamidgel sein. Kleine Proteine dagegen werden bei höher % -igen Gelen besser aufgetrennt, da der Polyacrylamidgehalt höher ist und die Poren damit kleiner sind und folglich eine erfolgreichere Trennung der Proteine erreicht wird (Smith, 1984).

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden Zellen in einer Dichte von $0,2 \times 10^6$ Zellen/mL ausgesät. Pro Geltasche wurden 40 µg Proteine aufgetragen. Dazu wurde 6-facher Probenpuffer hinzugefügt und die Probe für 5 min bei 95 °C im Heizblock erhitzt und dann bei -20 °C gelagert. Die Acrylamidgele (Zusammensetzung siehe Kap. 3.1.5) bestehen aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Das Sammelgel überschichtet das Trenngel und ordnet die Proteine auf gleicher Höhe an. Im Trenngel erfolgt dann die Separierung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht durch den Siebeffekt der porösen Polyacrylamidmatrix.

3.2.7 Western-Blot

Im Anschluss an die Elektrophorese erfolgt das Blotten der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Diese spezielle Membran bindet Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen (Blancher und Jones, 2001, Rehm und Letzel, 2016), wo letztendlich die Proteine über spezifische Antikörper detektiert werden können.

In einer Western-Blot-Kammer wandern in einem elektrischen Spannungsfeld die negativ geladenen Proteine Richtung Anode und damit aus dem Acrylamid-Gel auf die Nitrocellulosemembran. Dabei wurde die Kammer mit Blotting-Puffer gefüllt. Geblottet wurde zwei Stunden lang. Die Anordnung in der Blotkammer ist in Abb. 5 dargestellt.

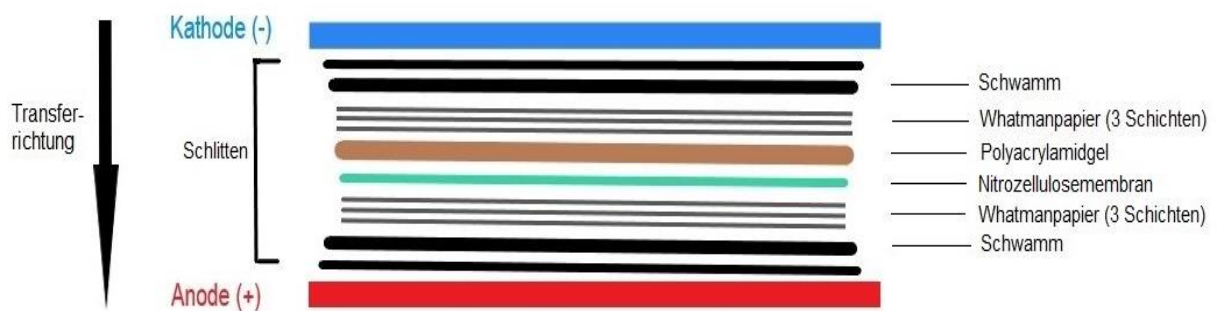


Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines Western-Blots

Quelle: eigene Darstellung

Nach dem Blotten wurden die Membranen in 5 %-iger Trockenmilchpulverlösung (w/v) in TBS-T für eine Stunde bei RT geblockt. Damit wurden verbliebene freie Proteinbindungsstellen abgesättigt, um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu vermeiden. Die Membranen wurden über Nacht bei 4 °C auf einem 3-dimensionalen-Taumelrollmischer im Primärantikörper inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Membranen am nächsten Tag drei Mal in TBS-T gewaschen. Die Membranen wurden für zwei Stunden in Sekundärantikörper bei RT inkubiert. Diese binden spezifisch an die Erstantikörper und sind für die Detektion mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Folgende Schritte erfolgten in Dunkelheit. Mit Hilfe des Western-Blot Odyssey[®]-Infrared Imaging-System konnten die Proteine detektiert werden. Je nach gekoppeltem Fluoreszenzfarbstoff wurden diese im roten oder grünen Kanal detektiert.

3.2.8 Durchflusszytometrische Analysen

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen nach gewünschten Eigenschaften gemessen (Kamentsky et al., 1965). Die Zellen werden dafür in eine Kapillare gedrückt und passieren aufgrund einer trichterförmigen Anordnung des Flüssigkeitsstromweges mit hoher Geschwindigkeit einzeln nacheinander aufgereiht einen Laserstrahl

(Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2013). Die resultierende Lichtstreuung gibt dabei Auskunft über die Größe der Zelle (*forward scatter*; FSC) und die Granularität der Zelle (*sideward scatter*; SSC). Bei dem Vorwärtsstreulicht (FSC) wird die Zeit, die die Zelle braucht um den Laser zu passieren, gemessen. Proportional steigt die benötigte Zeit der Passage mit der Größe der Zelle. Das Maß für die Granularität der Zelle bildet das Seitwärtsstreulicht (SSC). Je stärker die Streuung ist, umso granulärer ist die Zelle. Durch Aktivierung unterschiedlicher Laser können, angeregt von Fluoreszenzfarbstoffen und fluoreszenzgekoppelten Antikörpern, Zellen nach DNA Gehalt, Proteingehalt und Proteinmodifikationen analysiert werden. Dabei regt der Laser den Fluoreszenzfarbstoff an und bringt diesen so zum Leuchten. Je intensiver das Leuchten ist, umso höher ist der Proteingehalt (Basiji et al., 2008).

Alle Messungen wurden am FACS Canto II durchgeführt. Zur Auswertung wurden die Computerprogramme FACSDiva™ und FlowJo® genutzt. Für durchflusszytometrische Analysen wurden die Zellen in einer Dichte von $0,1 \times 10^6$ Zellen/mL ausgesät. Nach der Ernte wurden die Zellen bei $1,4 \times G$ bei RT für 5 min zentrifugiert. Der Überstand in den FACS-Röhrchen wurde abgesaugt und das Zellpellet wurde, je nach gewünschter Messung, mit dem entsprechenden Farbstoff inkubiert.

3.2.8.1 Apoptose-Messung

Zur Bestimmung der apoptotischen Zellen werden diese mit Propidiumiodid (PI) und fluoreszenz-gekoppeltem Annexin V gefärbt (Vermees et al., 1995). Im frühen Stadium der Apoptose verlagern Zellen Phosphatidylserine von der Innenseite der Lipidmembran auf die Außenseite (Beveris et al., 1983, Vermees et al., 1995). In der Anwesenheit von Calcium-Ionen bindet das Protein Annexin V an exponierte Phosphatidylserine. Um das Protein detektieren zu können, wurde es an das Fluorochrom *fluorescein isothiocyanate* (FITC) gekoppelt. Da Annexin V unspezifisch bindet, also sowohl an nekrotische als auch apoptotische Zellen, wurden die Zellen zusätzlich mit PI angefärbt. PI dringt in nekrotische Zellen mit lytischen Zellmembranen ein und interkaliert dort in der DNA. Vitale Zellen sind folglich Annexin V- und PI-negativ. Zellen in Apoptose sind Annexin V-positiv und PI-negativ. Nekrotische und spät apoptotische Zellen sind Annexin V- und PI-positiv (Vermees et al., 1995, Wallberg et al., 2016).

Die Zellen wurden erst kurz vor der durchflusszytometrischen Messung mit 200 µL der Apoptose-Färbung für 15 min inkubiert.

3.2.8.2 Vitalitäts-Messung

Mit dieser Messung kann die Lebensfähigkeit (Vitalität) der Zellen beurteilt werden. Dafür werden die Zellen mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der nicht durch intakte Zellmembranen diffundieren kann. Bei sterbenden Zellen ist die Integrität der Membran gestört und DAPI kann durch Perforationen in der Membran eindringen. Somit können mit dieser Methode lebende von toten Zellen unterschieden werden. DAPI bindet dabei an die DNA, wodurch die Fluoreszenz um das 20-fache gesteigert wird. Das Emissionsmaximum liegt bei 460 nm. Bindet DAPI an Ribonukleinsäure (RNA), so führt das zu einer Steigerung der Fluoreszenz von nur 20 %. Außerdem liegt hierbei das Emissionsmaximum bei 500 nm. Dadurch ist eine recht spezifische Bindung an die DNA gewährleistet (Tanious et al., 1992, Kapuscinski, 1995, Wallberg et al., 2016).

Die Zellen wurden unmittelbar vor der Messung mit 200 µL der Vitalitäts-Färbung inkubiert. DAPI-negative Zellen entsprechen vitalen Zellen, DAPI-positive Zellen werden als tote Zellen definiert.

3.2.8.3 Zellzyklus-Messung

Zur Bestimmung der Zellzyklusphasen werden die Zellen mit PI gefärbt. Anhand des DNA-Gehalts kann dann auf das Zellzyklusstadium der zuvor behandelten und auf die Messung vorbereiteten Zellen rückgeschlossen werden, da die Fluoreszenz an PI proportional zum DNA-Gehalt ist. PI interkaliert, wie in der Apoptose-Messung beschrieben, in die DNA von apoptotischen Zellen mit lytischen Zellmembranen. In der subG1-Phase liegt nur noch fragmentierte DNA vor, da diese bei sterbenden Zellen degradiert wird. Es ist folglich nur ein schwaches Fluoreszenzsignal messbar. In der G1-Phase beginnt die Zelle mit dem Wachstum, bis ein bestimmtes Verhältnis zwischen Kern und Plasma erreicht ist. Dort liegen die Chromosomen als ein Chromatid (2 C) vor. Anschließend geht die Zelle in die Synthese-Phase über. Nach der Replikation in der S-Phase liegt die Erbinformation in der G2-Phase als doppeltes Chromatid (4 C) vor. Die G2-Phase hat die Aufgabe, die Zelle auf die anstehende Zellteilung abschließend vorzubereiten, indem u.a. Reparaturmechanismen oder Proteinsynthesen initiiert werden. Das Fluoreszenzsignal ist folglich in der G2-Phase am stärksten (Poeggel, 2009) und etwa doppelt so stark wie in der G1-Phase, da ein doppelter Gehalt an DNA vorhanden ist.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde *hypotonic fluorochrome solution*-(HFS-) Puffer genutzt (Fried et al., 1978). Dadurch entfiel das Fixieren der Zellen und die Lyse der Zellmembran durch Ethanol, sowie die Nutzung der RNase A zur Verdauung der RNA. Die Elimination der RNA ist wichtig, da das PI sowohl an DNA, als auch an RNA binden kann. Alle zuvor genannten Vorgänge werden durch den HFS-Puffer in einem Schritt vereint. Der Einsatz einer RNase ist nicht nötig, da Nicoletti et al. (1991) durch den Einsatz von HFS-Puffer eine bessere Auftrennung und Darstellbarkeit der Diploidie der DNA feststellen konnten im Vergleich zur klassischen Fixierung und Lyse. Durch die hypotone Lösung kommt es zu einem massiven Einstrom an Wasser in die Zellen, sodass der innere osmotische Druck zum Platzen der Zelle führt. Das Detergenz Triton X-100 sorgt ebenfalls für die Beschädigung der Zellmembran, indem es die Oberflächenspannung senkt. Angesetzt wurde der HFS-Puffer mit PI in einer Konzentration von 50 µg/mL PI (Nicoletti et al., 1991).

Die Zellen wurden kurz vor der Messung mit 200 µL HFS-Puffer mit PI inkubiert.

3.2.8.4 Combenefit

Combeneft ist ein Programm zur Ermittlung der pharmakodynamischen Interaktion von pharmakologisch aktiven Substanzen. Das Programm stellt drei Algorithmen zur Berechnung der Interaktionen zur Verfügung: den Algorithmus nach Loewe (Loewe und Muchnick, 1926), nach Bliss (Bliss, 1939) und den *highest single agent* (HSA) (Tan et al., 2012, Mathews Griner et al., 2014). Die in der Dissertation vorliegenden Berechnungen wurden anhand des Synergismusalgorithmus HSA vorgenommen, da dieser Algorithmus die aktuellste Variante darstellt und die beiden älteren Varianten in sich vereint.

Der errechnete Synergismus zwischen den in dieser Dissertation verwendeten Inhibitoren wird farblich definiert. Je höher der synergistische Effekt ausfällt, umso tief blauer gestaltet sich die farbliche Darstellung. Die Farbe Grün bedeutet, dass sich die Inhibitoren gegenseitig nicht beeinflussen. Gelb dagegen definiert einen schwachen antagonistischen Effekt. Eine starke antagonistische Wirkung wird Rot dargestellt. Die statistische Signifikanz des Synergismus wird durch die Anzahl der Sterne (*) ausgezeichnet. Ein Stern bedeutet statistisch signifikant, zwei Sterne sind hoch signifikant und drei sehr hoch signifikant. Parallel dazu zeigt ein Score an, in wie weit sich ein Synergismus oder Antagonismus ermitteln lässt. Dieser Score wird anhand der größer dargestellten Zahl im Kästchen gezeigt (Di Veroli et al., 2016).

3.2.9 Comet Assay

Der Comet Assay wird zur Messung und Quantifizierung von DNA-Schäden in Form von Strangbrüchen genutzt. Die Methode wird auch Einzelzellgelelektrophorese genannt, da Einzelzellen auf Objektträger aufgetragen und unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden. Dafür werden die Zellen in Agarose eingebettet, anschließend lysiert und mit PI angefärbt. Die durch die Lyse freigegebene DNA kann sich dann entwinden. Der Nachweis von Einzelstrangbrüchen wird mit Hilfe des alkalischen Comet Assay durchgeführt. Dazu wird zur Entwindung der DNA ein pH-Wert von über 13 benötigt. Dieser hohe pH-Wert löst die Wasserstoffbrückenbindungen in der DNA-Doppelhelix, sodass Einzelstränge entstehen. Für einen neutralen Comet Assay, zum Nachweis von Doppelstrangbrüchen, ist dagegen ein pH-Wert von 7,5 erforderlich. Anschließend kommt es zur Wanderung der DNA-Bruchstücke im elektrischen Feld. Diese werden hierbei in Abhängigkeit ihrer Größe aufgetrennt. Die negativ geladenen DNA-Bruchstücke wandern zur positiv geladenen Anode, sodass sich im Fall eines DNA-Schadens ein Kometenschweif ausbildet. Die kleinsten DNA-Bruchstücke legen die längste Strecke zurück und bilden das Ende des Kometenschweifs. Je nach Bruchstückgröße ordnen sich somit die DNA-Fragmente zwischen Kopf und Schweifende an. Liegen keine DNA-Schäden vor, können keine Bruchstücke im elektrischen Feld wandern, da eine intakte DNA nicht aus dem Zellkern wandern kann. Die Intensität im Kometenkopf entspricht der nicht gewanderten DNA. Im Kometenschweif wird folglich die DNA sichtbar, die aufgrund der Fragmentierung im elektrischen Feld gewandert ist. Die Fluoreszenzintensität einer Zelle beträgt insgesamt eins. Anhand von Formeln kann der prozentuale DNA-Gehalt in Kopf und Schweif berechnet werden. Je länger der Schweif ist, umso größer ist der DNA-Schaden. Die Anzahl an Zellen mit oder ohne DNA-Schaden wird mit Hilfe eines Computerprogrammes quantifiziert und visuell erfasst (Ostling und Johanson, 1984, Collins, 2004, Majtnerova und Rousar, 2018).

In der vorliegenden Dissertation wurde zur Auswertung die % DNA im Schweif (% *tail* DNA) genutzt. Diese berechnet sich folgendermaßen:

$$\% \text{ DNA im Schweif} = 1 - \left(\frac{\text{optische Intensität im Kopf}}{\text{optische Intensität in Kopf und Schweif}} \times 100 \right)$$

Formel 3: Berechnung der % DNA im Schweif

Für den Comet Assay wurden die Zellen in einer Dichte von $0,1 \times 10^6$ Zellen/mL ausgesät. Als Negativkontrolle wurde die unbehandelte CTRL verwendet. Als Positivkontrolle

wurden die Zellen 30 min vor der Ernte mit 70% t-BOOH behandelt. t-BOOH initiiert u.a. Radikale und oxidative Prozesse, welche unmittelbar DNA-Schäden auslösen.

Die Schritte der Zellernte bis zur Übergabe zur weiteren Abwicklung der Analyse an eine Mitarbeiterin des Instituts für Toxikologie, erfolgten alle auf Eis. Nach der Zentrifugation bei 1,2 x G bei RT für 5 min wurde der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 1 mL *phosphate buffered saline* (PBS) resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 21,1 x G bei 4 °C für 5 min. Nach dem Absaugen des Überstands wurden die Zellpellets zur Durchführung der weiteren Schritte des Comet Assays an eine Technische Assistentin im Labor übergeben. Es folgte die Aufnahme der Zellsuspension in 37 °C warme low-melting point Agarose, die Inkubation im Lysepuffer und die Überführung in die Elektrophoresekammer. Die Elektrophorese findet bei 25 V für 10-20 min statt. Anschließend wurden die Präparate im Fall des alkalischen Comet Assays mit Neutralisationspuffer für insgesamt 15 min überschichtet. Zur Fixierung wurden die Zellen für 5 min in 100% Ethanol getaucht und danach für 2 h zum Trocknen ausgelegt. Die anschließende Färbung der DNA mit PI in einer Konzentration von 50 µg/mL PI erfolgte in einer Verdünnung von 1:20.

3.2.10 Immunfluoreszenz-Analyse

Die Immunfluoreszenz ist eine Methode, um mit Hilfe eines Konfokalen Laserscanning Mikroskops Proteine in Zellen durch Fluoreszenzfärbung genauer lokalisieren und quantifizieren zu können. Hierfür nutzt man die Antigen-Antikörper-Reaktion. Bei der hier genutzten indirekten Methode richtet sich der Primärantikörper gegen das gewünschte Antigen. Erst durch den fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper entsteht ein detektierbares Fluoreszenzsignal (Rehm und Letzel, 2016).

5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) ist ein Analogon des Nukleosids Desoxythymidin, welches nur in der S-Phase der Zellen eingebaut werden kann (Salic und Mitchison, 2008). Durch einen sogenannten „Klick-Mechanismus“ (Rostovtsev et al., 2002, Tornøe et al., 2002) geht EdU eine kovalente Bindung mit der DNA ein (Buck et al., 2008). Der Nachweis erfolgt mit Hilfe von fluoreszierenden Aziden (Diermeier-Daucher et al., 2009). EdU dient damit der Markierung der DNA-Synthese und ist somit ein Marker der S-Phase (Cavanagh et al., 2011).

Für die Immunfluoreszenz-Analyse wurden die Zellen in einer Dichte von $0,1 \times 10^6$ Zellen/mL ausgesät. 45 min vor der Ernte wurden die Zellen im Verhältnis von 1:1000 mit

EdU behandelt. EdU wurde hier als Primärantikörper verwendet. Die Stockkonzentration des EdU lag bei 10 μM . Die Schritte der Zellernte bis zur Übergabe an eine Institutsmitarbeiterin der Toxikologie zur Fertigstellung der Immunfluoreszenz-Analyse erfolgten alle auf Eis und bei Dunkelheit. Nach der Zentrifugation bei 1,2 x G bei RT für 5 min wurde der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 10 μL PBS resuspendiert und anschließend auf ein Deckgläschen aufgetragen. Anschließend wurden die Zellen mittels der vorgekühlten Methanol-Aceton-Lösung für 9 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert. Danach wurden die fixierten Zellen drei Mal für jeweils 5 min bei RT mit PBS gewaschen. Zur Durchführung der weiteren Schritte der Immunfluoreszenz-Analyse wurden die Proben an eine Mitarbeiterin des Instituts für Toxikologie übergeben. Die Proben wurden anschließend für 60 min mittels 0,3 %-igem Triton X-100 (v/v) und 5 %-igem BSA (w/v) in PBS bei RT geblockt. Anschließend folgte die Inkubation mit Primärantikörpern zur Detektion des Proteins über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dieser Schritt ist aufgrund der Vorbehandlung mit EdU entfallen. Die Proben wurden drei Mal mit PBS gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden in Dunkelheit durchgeführt. Es folgte die Inkubation für 60 min bei RT mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor 488. Dieser Sekundärantikörper bindet an EdU als Primärantikörper, wodurch der EdU-Anteil bei der Betrachtung unter dem Mikroskop in Grün dargestellt wird. Anschließend wurde zwei Mal für 5 min mit PBS und einmal für 2 min mit hochsalzhaltigem PBS gewaschen. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Proben mit TO-PRO-3 (Stockkonzentration: 100 μM) zur Anfärbung der Zellkerne im Verhältnis von 1:100 in PBS für 15 min inkubiert. Das Fluoreszenzsignal wird hierbei durch Bindung an die DNA aktiviert und ist abhängig von Nukleinsäuren. Die Zellkern-Färbung stellt sich unter dem Mikroskop in der Farbe Blau dar. Im Anschluss daran wurden die Deckgläschen mit VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium eingedeckelt. VECTASHIELD® verhindert ein zu schnelles Verblasen bzw. Ausbleichen der Fluoreszenz-Färbungen. Mit farblosem Nagellack wurden die Deckgläschen zum Schluss versiegelt. Analysiert wurden die Objektträger mit einem Konfokalen Laserscanning Mikroskop LSM710.

4 Ergebnisse

FK228 wurde bereits von der *Food and Drug Administration* (FDA) für die Behandlung von kutanen T-Zell-Lymphomen genehmigt (Li et al., 2012). In kutanen T-Zell-Lymphom-Zelllinien ist FK228 gegenüber RGFP966 ein stärkerer Induktor der mit Apoptose assoziierten DNA-Fragmentierung. Außerdem wurde beobachtet, dass FK228 deutlich stärker als RGFP966 zu einem Anstieg der S-Phasen-Population führt. Wells et al. (2013) führen diese Ergebnisse darauf zurück, dass FK228 eine ganze Klasse an HDACs inhibiert, wohingegen RGFP966 nur HDAC3 hemmt (Wells et al., 2013). Auf Grundlage dieser Daten habe ich zuerst untersucht, wie sich die Behandlung mit FK228 auf die Zellzyklusverteilung in Kulturen der AML-Zelllinie MV4-11 auswirkt. Im zweiten Teil meiner Analysen habe ich analoge Versuche mit RGFP966 durchgeführt. Außerdem wurden auf Basis der von Pietschmann et al. (2012) entdeckten synergistischen Wirkung von AC220 mit LBH589 kombinierte Behandlungen von AC220 mit FK228 bzw. RGFP966 durchgeführt.

Verweise auf Abbildungen mit einem Großbuchstaben befinden sich im Anhang.

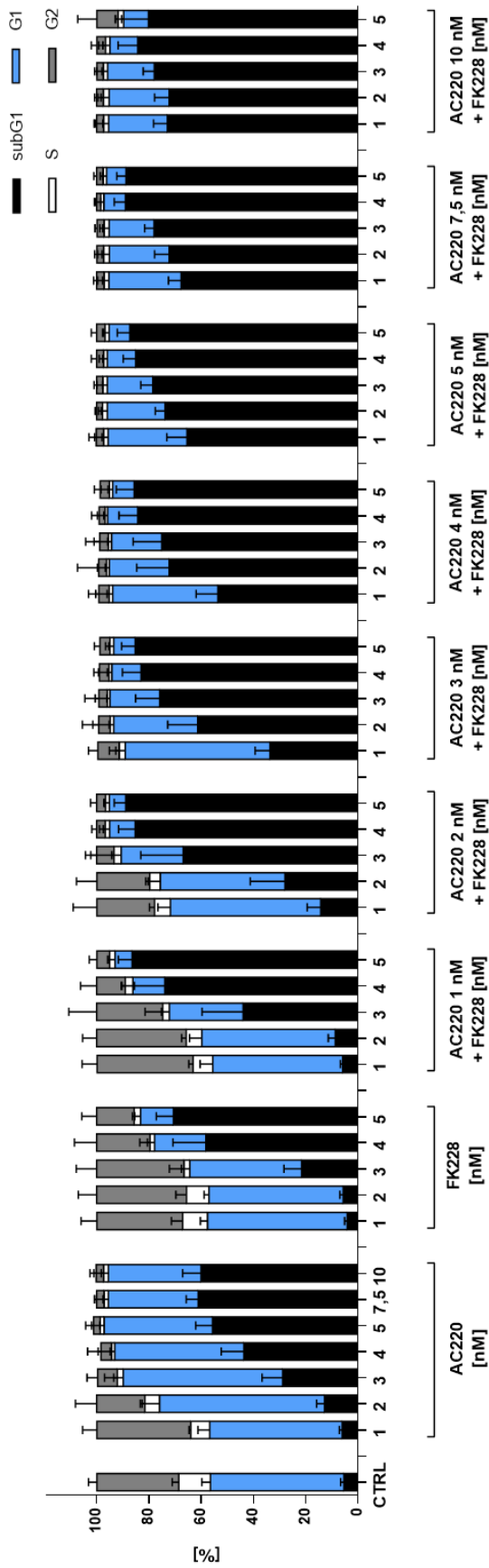
4.1 Ermittlung zellulärer Reaktionen auf die Behandlung mit AC220 und/oder FK228 via Durchflusszytometrie nach 24 h

Es wurde untersucht, wie die Behandlung der MV4-11 Zellen mit AC220 und FK228 die Phasen des Zellzyklus beeinflusst. Dazu wurden sowohl Einzelbehandlungen, als auch Kombinationsbehandlungen mit beiden Inhibitoren durchgeführt.

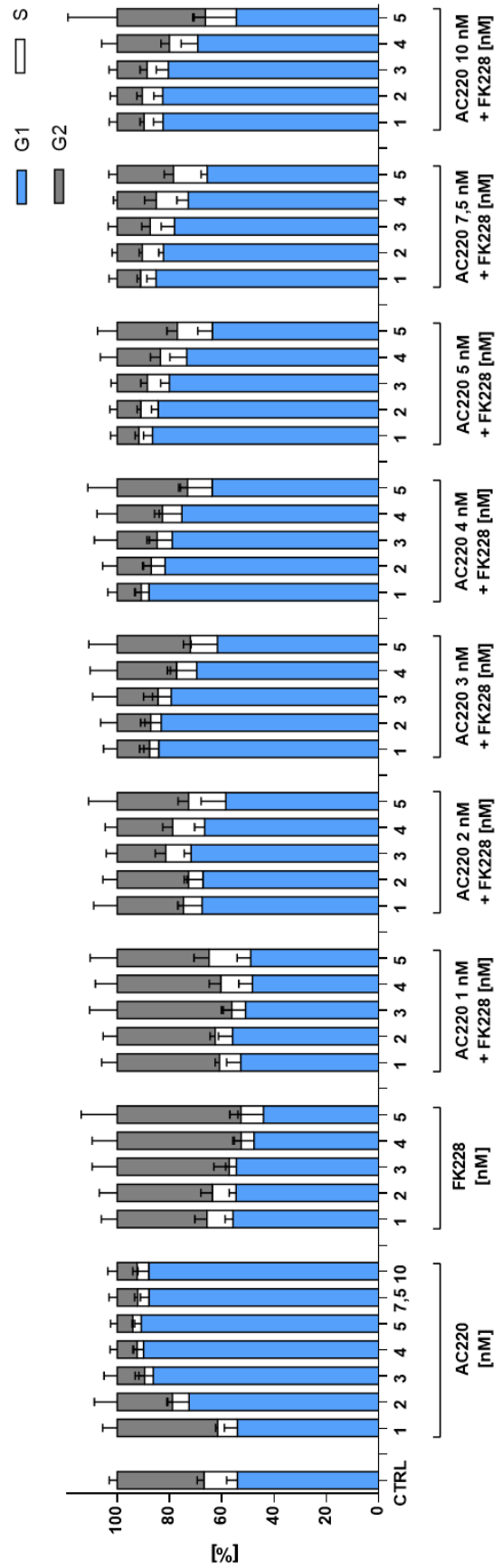
Zuerst wurde eine Dosisreihe erhoben, um effektive Konzentrationen von AC220 und FK228 zu ermitteln. So sollte festgestellt werden, in welchem Dosisbereich Steigerungen der antiproliferativen Wirkungen durch Kombinationsbehandlungen erzielbar sind. Die entsprechenden Dosisreihen sind im Anhang als Abb. A und Abb. B zu finden. Abb. A stellt den Vorversuch zur Zellzyklusanalyse dar. FK228 generiert im Bereich zwischen 0,5 nM und 1 nM jeweils knapp 3 % an Zellen in der subG1-Phase. AC220 generiert mit 5 nM eine Apoptoseinduktion von 52,7 % und FK228 erzeugt mit 5 nM eine Apoptoseinduktion von 61,9 %, gemessen als Akkumulation der subG1-Population. Ein Vorversuch mit dem Farbstoff DAPI (s. Abb. B) lieferte ähnliche Ergebnisse wie die Untersuchung der Zellzyklusverteilung mittels PI.

Die Verteilung der Zellzyklusphasen nach Gabe von 1-10 nM AC220 und 1-5 nM FK228 ist in Abb. 6-A dargestellt. Mit ansteigenden Konzentrationen an AC220 und FK228 in Einzel- und Kombinationsbehandlung der MV4-11 Zellen zeichnet sich eine Zunahme der Zellen in der subG1-Phase ab. Bei einer Dosis von 1 nM AC220 ist der prozentuelle subG1-Anteil mit 6,1 % sehr gering und übersteigt kaum die basal auftretende Apoptose in unbehandelten Kontrollzellen. Ab einer Dosis über 2 nM AC220 nimmt dieser Anteil stetig zu und steigt bei den höchsten Konzentrationen (7,5 nM, 10 nM AC220) auf knapp über 60 % an. Die Behandlung mit 1 nM und 2 nM FK228 bewirkt eine geringfügige Zunahme der subG1-Population auf 5,6 % im Vergleich zu den Kontrollzellen. Ab 3 nM FK228 steigt der Anteil an Zellen in der subG1-Phase mit 21,6 % schon deutlich an. Bei einer Behandlung mit 5 nM FK228 befinden sich 70,5 % der Zellpopulation in der subG1-Phase. Mit steigenden Dosen wird erkennbar, dass mit FK228 in Einzelbehandlung sprunghafte Zunahmen der subG1-Population zu beobachten sind, wohingegen AC220 einen gleichmäßigeren Anstieg, bei steigenden Konzentrationen, an Signal in der subG1-Phase erzielt. Bei der Kombinationsbehandlung fällt auf, dass bereits in den hier angewandten geringeren Dosen an AC220 und FK228 (2-3 nM) ein hoher Anteil an Zellen oder Zelltrümmern mit fragmentierter DNA vorliegt. Die Einzelbehandlung mit 2 nM AC220 induziert ein subG1-Population von 12,8 %. Die Einzelbehandlung mit 2 nM des HDACi FK228 erzeugt einen subG1-Anteil von 5,6 %. Werden MV4-11 Zellen mit beiden Substanzen in Konzentrationen von 2 nM kombiniert behandelt, so steigt der Anteil der detektierten Zellen in der subG1-Phase auf 27,9 % an. Noch deutlicher wird der Anstieg der subG1-Population bei der Kombination aus 2 nM AC220 mit 3 nM FK228. Bei Einzelbehandlung mit 2 nM AC220 wird eine subG1-Population von 12,8 % generiert. Die Gabe von 3 nM FK228 bewirken einen Anstieg der Zellen in der subG1-Phase auf 21,6 %. Werden die Zellen mit 2 nM AC220 und 3 nM FK228 kombiniert behandelt, befinden sich 66,8 % der Zellen in der subG1-Phase, was etwa mit deren Verfünffachung im Vergleich zur Einzelbehandlung mit 2 nM AC220 und mit deren Verdreifachung im Vergleich zur Einzelbehandlung mit 3 nM FK228 entspricht.

6-A



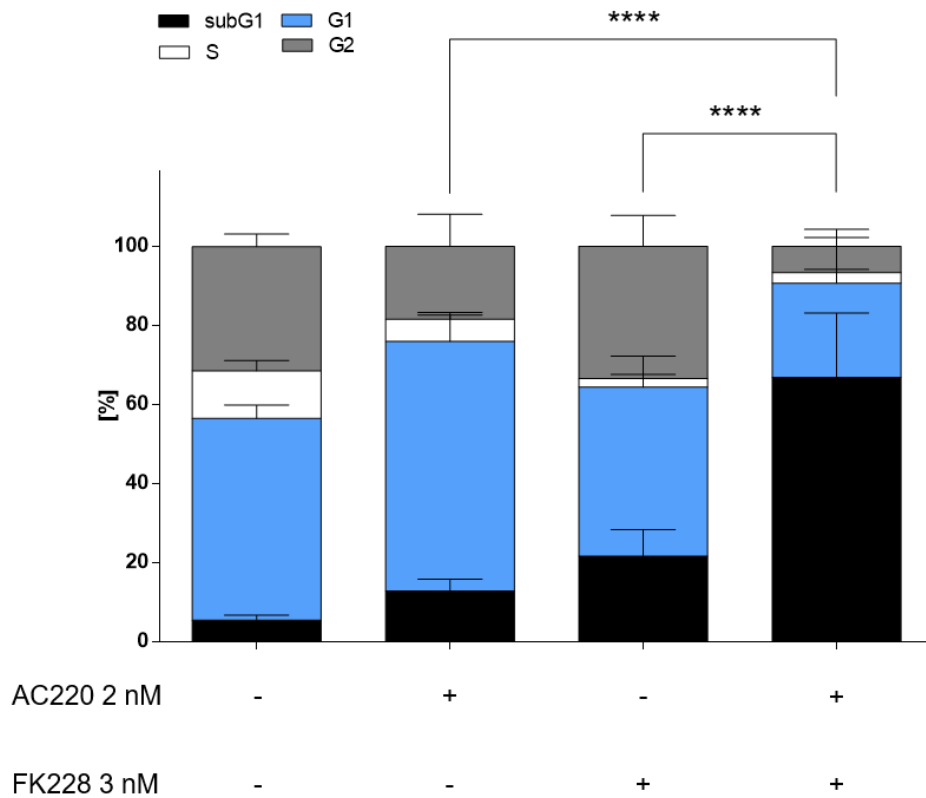
6-B



6-C

Ausgangswert	Vergleichswert	Signifikanz
AC220 1 nM	AC220 1 nM + FK228 2 nM	ns
FK228 2 nM	AC220 1 nM + FK228 2 nM	ns
AC220 1 nM	AC220 1 nM + FK228 3 nM	****
FK228 3 nM	AC220 1 nM + FK228 3 nM	****
AC220 2 nM	AC220 2 nM + FK228 2 nM	**
FK228 2 nM	AC220 2 nM + FK228 2 nM	****
AC220 2 nM	AC220 2 nM + FK228 3 nM	****
FK228 3 nM	AC220 2 nM + FK228 3 nM	****
AC220 3 nM	AC220 3 nM + FK228 2 nM	****
FK228 2 nM	AC220 3 nM + FK228 2 nM	****
AC220 3 nM	AC220 3 nM + FK228 3 nM	****
FK228 3 nM	AC220 3 nM + FK228 3 nM	****
AC220 5 nM	AC220 5 nM + FK228 2 nM	***
FK228 2 nM	AC220 5 nM + FK228 2 nM	****
AC220 5 nM	AC220 5 nM + FK228 3 nM	****
FK228 3 nM	AC220 5 nM + FK228 3 nM	****

6-D



6-E

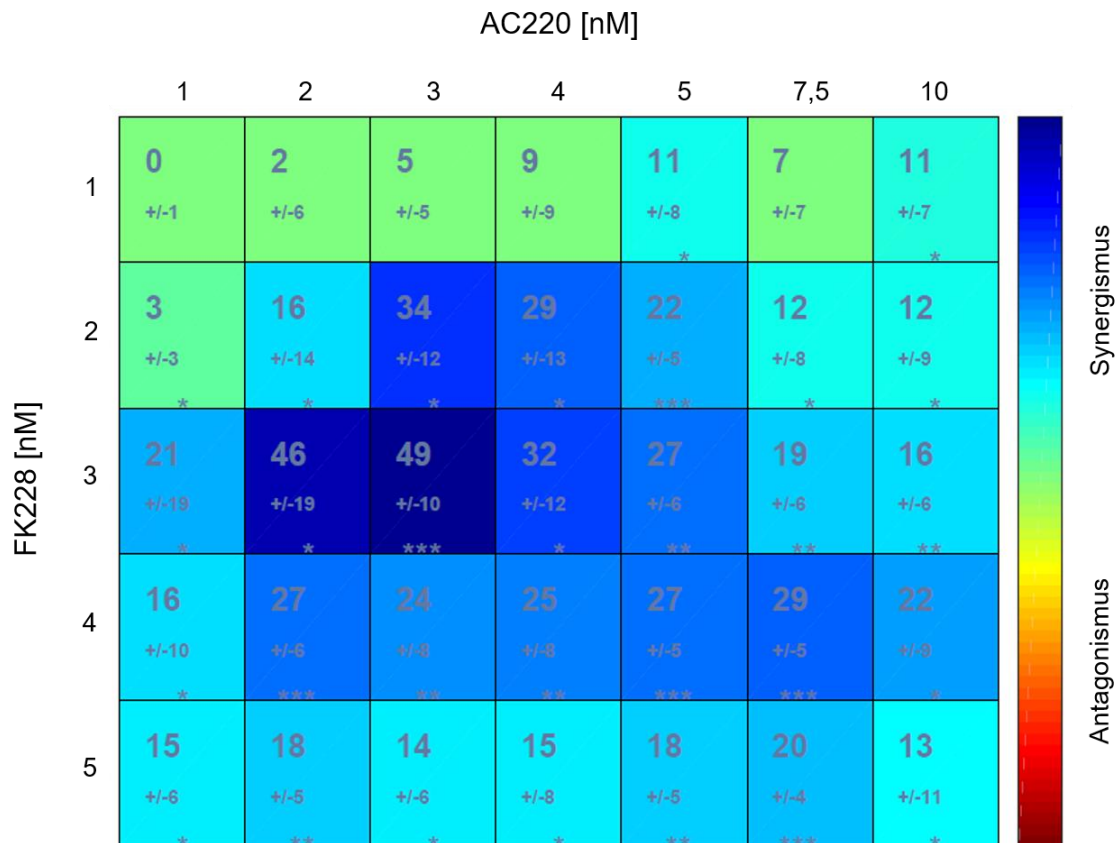


Abbildung 6: Zelluläre Reaktionen auf kombinierte Behandlungen aus FLT3i AC220 mit Klasse I HDACi FK228 in MV4-11 Zellen nach 24 h

Die Werte sind Mittelwerte aus sechs Versuchen. (A) MV4-11 Zellen wurden mit dem FLT3i AC220 und dem HDACi FK228 einzeln und kombiniert behandelt. Im Anschluss wurde eine Zellzyklusfärbung mit PI durchgeführt und die Proben über Durchflusszytometrie gemessen. Die jeweiligen Zellzyklusphasen sind prozentual dargestellt. Das Balkendiagramm wurde mittels GraphPad Prism 6 erstellt. (B) Das Balkendiagramm wurde auf Basis der Daten von Abb. 6-A erstellt. Die prozentuellen Anteile der Zellzyklusphasen, die Zelllinie, die Behandlung, der Behandlungszeitraum und das Messverfahren entsprechen den Angaben aus Abb. 6-A. Die subG1-Anteile wurden von der Gesamtpopulation subtrahiert und die verbleibende Population auf 100 % gesetzt. (C) Tabellarische Aufführung der Signifikanz erwähnenswerter Mengen von AC220 und FK228 in Einzelbehandlung im Vergleich zur Kombinationsbehandlung bezogen auf die subG1-Population aus Abb. 6-A. *Two way ANOVA*; $p < 0,05$; $n = 3 + SD$; Bonferroni *multiple comparison test*; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns = nicht signifikant. Die Signifikanz wurde mittels GraphPad Prism 6 berechnet. (D) Beispielhafte Darstellung der Signifikanz der subG1-Population einer attraktiven Kombinationsbehandlungsmenge, basierend auf Abb. 6-C. Quantitative Darstellung der Zellzyklusverteilung der Zelllinie MV4-11. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte anhand einer PI-Färbung. *Two way ANOVA*; $p < 0,05$; $n = 6 + SD$; Bonferroni *multiple comparison test*; **** $p < 0,0001$. (E) Die Abbildung wurde unter Verwendung des Synergismus-Programmes Combenefit erstellt. Die Illustration basiert auf Abb. 6-A. Die Darstellung zeigt den Mittelwert des Synergismus anhand des Scores, die statistische Signifikanz des Synergismus sowie die Standardabweichung. Letztgenannte wird durch die Zahl mit vorangesetztem +/- repräsentiert.

Das Balkendiagramm (s. Abb. 6-A) zeigt einen starken Anstieg der subG1-Population in MV4-11 Kulturen, die eine kombinierte Gabe beider Inhibitoren erhalten haben. Aus Abb. 6-E wird ersichtlich, dass Kombinationen aus 2 nM AC220 und 2 nM FK228 sowie

2 nM AC220 mit 3 nM FK228 synergistisch wirken, erkennbar an der hellblau bzw. tiefblauen Farbe, dem als statistisch signifikant (*) eingestuften Synergismus und einem Score von 16 bzw. 46 (s. Abb. 6-E).

Zur besseren Einschätzung der Anteile der Zellzyklusphasen G1, S und G2 wurde in Abb. 6-B der subG1-Anteil von der Gesamtpopulation aus den Daten von Abb. 6-A subtrahiert und die verbleibende Population auf 100 % gesetzt. In Abb. 6-B ist ersichtlich, dass die Einzelbehandlung mit 1 nM AC220 kaum Auswirkungen auf die Verteilung der Zellen in der G1-, S- und G2-Phase hat. In der G1-Phase befinden sich nach Behandlung mit 1 nM AC220 54,1 % der Zellen, in der G2-Phase 38,4 %. Mit ansteigender Dosis des FLT3i nimmt der Anteil an Zellen in der G1-Phase weiter zu. Bei 5 nM des FLT3i steigen die Zellen in der G1-Phase auf 90,9 % an, die G2-Population sinkt auf 5,9 %. Die Behandlung mit dem HDACi zeigt dagegen ein anderes Verhältnis zwischen den G1- und G2-Phasen-Anteilen. Nach Gabe von 1 nM FK228 liegt die G1-Population bei 55,7 %, die G2-Population bei 34,3 %. Bei 5 nM FK228 liegt der G1-Anteil bei 44,1 %, der G2-Anteil bei 47,3 %. Die Kombinationsbehandlungen mit 1 nM bzw. 2 nM AC220 mit verschiedenen Dosen an FK228 zeigen vom Verteilungsmuster der Zellen in der G1- und G2-Phase her starke Ähnlichkeit mit der Verteilung nach Gabe von AC220. Ab 3 nM AC220 bis 10 nM AC220 zeigt sich im Verlauf der ansteigenden Konzentration an FK228, dass die G2-Population ansteigt und damit der Zellzyklusphasen-Verteilung der HDACi-Behandlung ähnelt. Besonders deutlich wird dies bei der kombinierten Gabe von AC220, in den Konzentrationen von 1 nM bis 5 nM, mit 5 nM FK228. Des Weiteren zeigt Abb. 6- B, dass in den Kombinationsbehandlungen, v.a. mit 4 nM und 5 nM FK228, der Anteil der S-Phasen-Population merklich zunimmt. Vergleicht man hierfür die einzeln behandelten Zellen mit den in Kombination behandelten Zellen, so steigt der S-Phasen-Anteil bei den Einzelbehandlungen von AC220 mit 2 nM auf 6,4 % an. Bei FK228 steigt der Anteil der S-Phase-Population mit 5 nM auf 8,6 % an. Die Zellen, die mit einer Kombination aus 2 nM AC220 und 5 nM FK228 behandelt wurden, weisen eine Zunahme der S-Phasen-Population auf 14,3 % auf. Dieser Wert entspricht in etwa der Summe aus den Werten der Einzelbehandlung mit 2 nM AC220 und 5 nM FK228.

Zur Einschätzung der vorliegenden Ergebnisse wurde die Signifikanz eines vorliegenden Synergismus oder Antagonismus mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism 6 ermittelt. Dabei bedeutet ein Stern (*) signifikant, zwei (**) sehr signifikant, drei (***) hoch signifikant und vier (****) sehr hoch signifikant. Die später auch per Western-Blot

(s. Abb. 7, 8, 9) analysierten und als Kombinationsbehandlung als interessant bestimmten Mengen an AC220 und FK228 sind in Abb. 6-C tabellarisch zusammengefasst. Dabei wurde jeweils der Anteil der subG1-Fraktion der Einzelbehandlung mit dem Anteil der subG1-Population der Kombinationsbehandlung verglichen. Bei der Kombination aus 1 nM AC220 mit 2 nM FK228 zeigt sich keine signifikante Veränderung der subG1-Population im Vergleich zur jeweiligen Einzelbehandlung. Ab einer kombinierten Gabe von 1 nM AC220 mit 3 nM FK228 zeigt sich eine sehr signifikantes (***) bis sehr hoch signifikantes (****) Ergebnis.

Die Abb. 6-D zeigt exemplarisch die quantitative Auswertung der Zellzyklusverteilung bei Behandlung mit ausschließlich 2 nM AC220, 3 nM FK228 bzw. die Kombination beider Inhibitoren. Die abgebildeten Daten werden hier exemplarisch gesondert aus Abb. 6-A, prozentuale Verteilung der Zellzyklusanteile, und aus Abb. 6-C, Signifikanz der subG1-Population der Ausgangswerte im Bezug zu den Vergleichswerten, dargestellt. Der Vergleich der subG1-Anteile nach Behandlung mit 2 nM AC220 mit 12,8 % mit der Kombination aus 2 nM AC220 und 3 nM FK228 mit 66,8 % entspricht einer sehr hohen Signifikanz (****). Der subG1-Anteil wird bei der Kombinationsbehandlung ca. verfünffacht. Auch der Vergleich aus 3 nM FK228 mit 21,6 % mit der Kombinationsbehandlung liefert eine sehr hohe Signifikanz (****). Hierbei nimmt der Anteil der subG1-Population in der Kombination um etwa das Dreifache zu.

Um die zuvor ermittelte Signifikanz zu bestätigen, wurde auf das Programm Combenefit zurückgegriffen. Die Darstellung der Ergebnisse ist Abb. 6-E zu entnehmen. In dieser Abbildung ist auffallend, dass bei der Verwendung von 1 nM FK228 kein Synergismus erkennbar ist. Mittels Durchflusszytometrie konnte nachgewiesen werden, dass die subG1-Population nach Behandlung mit 1 nM FK228 auf 4,2 % ansteigt (s. Abb. 6-A). Es wirkt in dieser Menge weder synergistisch, noch antagonistisch. Dies wird mit der grünen Farbe in Abb. 6-E dargestellt. Behandlungen im Bereich zwischen 2 nM und 5 nM FK228 zeigen hingegen eine durchgehend synergistische Tendenz. Besonders hervorstechend sind die Kombinationen aus 2 nM AC220 mit 3 nM FK228, sowie aus 3 nM AC220 mit 3 nM FK228. Beide Kombinationen weisen eine dunkelblaue Farbe auf, welche mit dem hohen Mittelwert in dem jeweiligen Kästchen korreliert. Außerdem weisen beide Kombinationen Sterne auf. Die erstgenannte Kombination ist statistisch signifikant (*), die zweite sehr hoch signifikant (***).

Nach der Darstellung der durchflusszytometrischen Messungen des Zellzyklus stellt sich die Frage, ob diese Ergebnisse mit anderen Messverfahren der Durchflusszytometrie vergleichbar sind. Die Messungen, die in Abb. 6-A und 6-B dargestellt werden, wurden parallel auch als Vitalitäts-Messung durchgeführt (s. Abb. C u. D). Unglücklicherweise steigt der Anteil der noch vitalen Zellen bei hohen Dosen an Kombinationen aus AC220 und FK228 wieder an. Dies ist beispielsweise bei der Kombination aus 5 nM AC220 mit 2 nM FK228 gegeben. Hierbei liegt der Anteil an DAPI-negativen Zellen bei 22,5 %. Im Vergleich dazu liegt der Anteil an DAPI-negativen Zellen nach Behandlung mit 5 nM AC220 in Kombination mit 5 nM FK228 bei 40,5 %. Durch diese Beobachtung ist keine adäquate Auswertung der Zellen im Verlauf an ansteigenden Kombinationsdosen möglich. Aufgrund der Unempfindlichkeit des Systems gewisse Unterschiede zu detektieren, wurde die Priorität auf die Ergebnisse der Zellzyklusmessungen gelegt. Mit der Vitalitäts-Färbung ist der Synergismus folglich nicht so überzeugend darstellbar wie mit dem Zellzyklus, da er weniger empfindlich ist, weshalb Abb. D überwiegend die Farbe Grün zeigt.

4.2 Zelluläre Effekte der Kombinationsbehandlungen auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analysen

Bei allen dargestellten Western-Blots erfolgte die Einschätzung der Intensitätsveränderungen visuell. Waren jedoch nur minimale Veränderungen erkennbar und dementsprechend die Western-Blots nicht klar beurteilbar, wurde auf die Quantifizierung der Bandenintensität mit Hilfe des Programms Image Studio Lite von Li-Cor Biosciences zurückgegriffen. Die prozentualen Angaben beziehen sich immer auf den Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle, welche auf den Zahlenwert 1 gesetzt wurde. Die Western-Blot-Ergebnisse wurden mindestens als biologische Triplikate angefertigt, um vergleichbare Ergebnisse vorzuweisen, die nicht auf Zufällen oder sonstigen methodischen Einschränkungen beruhen.

4.2.1 Einzelbehandlung der MV4-11 Zellen mit AC220 und FK228 hemmt die Induktion von FLT3 und ERK

Neben den Messungen der Durchflusszytometrie wurde unter Zuhilfenahme von Western-Blots geschaut, welche Veränderungen auf Proteinebene bei der Behandlung der MV4-11 Zellen mit AC220 und FK228 erfolgen. Es wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben, dass STAT5, ERK1 und ERK2 typische Schlüsselproteine des

FLT3-Signalwegs sind (Small, 2006). STAT5 ist für das Überleben der FLT3-ITD Zellen notwendig, da es direkt vom mutierten Rezeptor phosphoryliert und konstitutiv aktiviert wird. Durch konstitutive Aktivierung des Rezeptors kann die Zelle liganden-unabhängig proliferieren (Choudhary et al., 2007). Auch ERK1 und ERK2 werden dauerhaft phosphoryliert. Der Verlust an STAT5 und den beiden ERKs kann als Marker für die Wirksamkeit des Inhibitors angesehen werden (Pietschmann et al., 2012). Aus diesem Grund wurde als erstes geschaut, inwiefern die Behandlung mit AC220 und/oder FK228 die Zielproteine von FLT3 beeinflusst.

Abb. E zeigt die Wirksamkeit der Inhibitoren AC220 und FK228 in der Einzelbehandlung. AC220 und FK228 verändern die Phosphorylierung von FLT3 und ERK. Durch die Behandlung mit AC220 reduziert sich die Phosphorylierung von FLT3 an Tyr591 bereits mit 1 nM im Vergleich zur Kontrolle um etwa 46,5 % bei beiden Banden. Ab einer Behandlung von 5 nM AC220 ist keine Phosphorylierung an FLT3 mehr sichtbar, die Reduktion beläuft sich bei beiden Banden auf circa 94,8 %. Die Behandlung mit FK228 erzeugt mit 1 nM erste Abschwächungen an p-FLT3^(Tyr591). Dabei reduziert sich die Intensität der beiden Banden von p-FLT3^(Tyr591) im Vergleich zur Kontrolle um etwa 36,9 %. Mit einer Behandlung von 3 nM FK228 verstärkt sich die Reduktion der Bande auf etwa 73,3 %. Mit 5 nM FK228 nimmt das Signal der beiden Banden von p-FLT3^(Tyr591) um etwa 94,8 % ab. Bei der Betrachtung von pan-FLT3 fällt im Verlauf der Behandlung mit 1 bis 10 nM AC220 eine Zunahme der oberen und eine Abnahme der unteren Bande auf. Dabei nimmt die obere Bande im Vergleich zur Kontrolle nach Behandlung mit 1 nM AC220 um das 1,8-fache zu, mit 5 nM AC220 um das 2,4-fache und mit 10 nM AC220 um das 1,6-fache zu. Die Abnahme der Intensität der unteren Bande von pan-FLT3 liegt bei 1 nM AC220 bei 33,8 %, bei 5 nM AC220 bei 50 % und bei 10 nM AC220 bei 73,5 %. In der Literatur steht geschrieben, dass der FLT3-Rezeptor als hyperglykosylierte Form mit ca. 160 kDa und als hypoglykosylierte Form mit 130-143 kDa vorkommt. Dabei wird davon ausgegangen, dass sich die hyperglykosylierte Form an der Zelloberfläche befindet (Lyman et al., 1993). Aufgrund des veränderten Zustands der Glykosylierung ist die posttranslationale Proteinmodifikation dysreguliert (Lyman et al., 1993). So kommt FLT3-ITD meist im endoplasmatischen Retikulum vor, während sich der nicht-mutierte FLT3-Rezeptor in der Zellmembran befindet (Schmidt-Arras et al., 2005). Folglich entspricht die beobachtete Zunahme nach Behandlung mit AC220 der oberen Bande von pan-FLT3 und ist durch die Hyperglykosylierung des FLT3-Rezeptors zu erklären. Durch die Behandlung wird der mutierte

FLT3-Rezeptor vom endoplasmatischen Retikulum zur Zelloberfläche transportiert. Die Betrachtung von pan-FLT3 zeigt bei einer Steigerung der Dosis von FK228 eine nahezu kongruente Abnahme der beiden Banden. Dabei reduziert sich das Signal von etwa 36,5 % nach Behandlung mit 1 nM FK228 zu etwa 84,4 % mit 3 nM und letztlich zu etwa 96,6 % mit 5 nM. Des Weiteren zeigt Abb. E die Proteinmenge von p-ERK1^(Thr202), p-ERK2^(Tyr204) und ERK1. Die Phosphorylierung von ERK1 an Threonin (Thr)202 und ERK2 an Tyrosin (Tyr)204 reduziert sich nach Behandlung mit 5 nM AC220 um etwa 57,7 %, mit 10 nM AC220 um etwa 82,2 %. FK228 dagegen bewirkt keine derart offensichtliche Abnahme der Intensität der Phosphorylierung von ERK1 und ERK2. Während sich die Phosphorylierung von ERK1 bis zu einer Behandlung mit 3 nM FK228 um das 1,5-fache verstärkt, ist die Intensität bei 5 nM FK228 vergleichbar mit der Kontrolle. Die Phosphorylierung von ERK2 gleicht bei 3 nM FK228 in etwa wieder der Intensität der Kontrolle. Mit 5 nM FK228 verbleiben nur noch ca. 63,1 % der Phosphorylierung. Damit ist erst ab 5 nM eine Reduktion an p-ERK2^(Tyr204) durch FK228 messbar. Bei ERK1 nimmt das Signal mit 1 nM AC220 um etwa 25,8 % ab. Dieser Wert wird mit der Behandlung von 3 nM FK228 erreicht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aktivität von FLT3 selber und seinem Schlüsselprotein ERK durch die Gabe von AC220 und FK228 gehemmt wird. Bei Behandlung mit beiden Inhibitoren zeigt sich eine starke Reduktion von p-FLT3^(Tyr591) und pan-FLT3. Während die beiden phosphorylierten Varianten von ERK mit AC220 stark reduziert werden, bleibt p-ERK1^(Thr202) mit FK228 unverändert, p-ERK2^(Tyr204) wird dagegen durch Behandlung mit FK228 reduziert. ERK1 wiederum wird mit beiden Inhibitoren leicht reduziert. Schlussendlich zeigt ERK1 im Vergleich mit den anderen untersuchten Proteinen in Bezug auf Zielproteine von FLT3 die geringste Beeinflussung.

Alle folgenden Western-Blot-Abbildungen vergleichen AC220 oder FK228 als Einzelbehandlung mit der kombinierten Gabe von AC220 und FK228 in den zuvor beschriebenen Dosen. Die Abb. 6-E diente als Grundlage für die Auswahl der vielversprechendsten Dosen an Kombinationsbehandlungen von AC220 mit FK228. Dabei wurden die Konzentrationen nach erreichtem Synergismus ausgewählt. Vertreten sind eine Kombination ohne Wechselwirkung der Inhibitoren (Farbe Grün) und Kombinationsdosen mit unterschiedlich starken synergistischen Wirkungen (Farbe Blau).

4.2.2 Synergistische Wirkungen gegenüber FLT3, STAT5 und ERK durch Kombinationsbehandlung der Zellen mit AC220 und FK228

Die Reduktion der Phosphorylierung von FLT3 und ERK nach Einzelbehandlungen mit AC220 und FK228 (s. Abb. E) waren Anlass der Analyse der Wirkungen dieser Substanzen in Kombination. Damit sollen die Ergebnisse der Durchflusszytometrie (s. Abb. 6-A) und des errechneten Synergismus (s. Abb. 6-E) des FLT3i in Kombination mit dem Klasse I HDACi bestätigt und der damit verbundene Mechanismus untersucht werden.

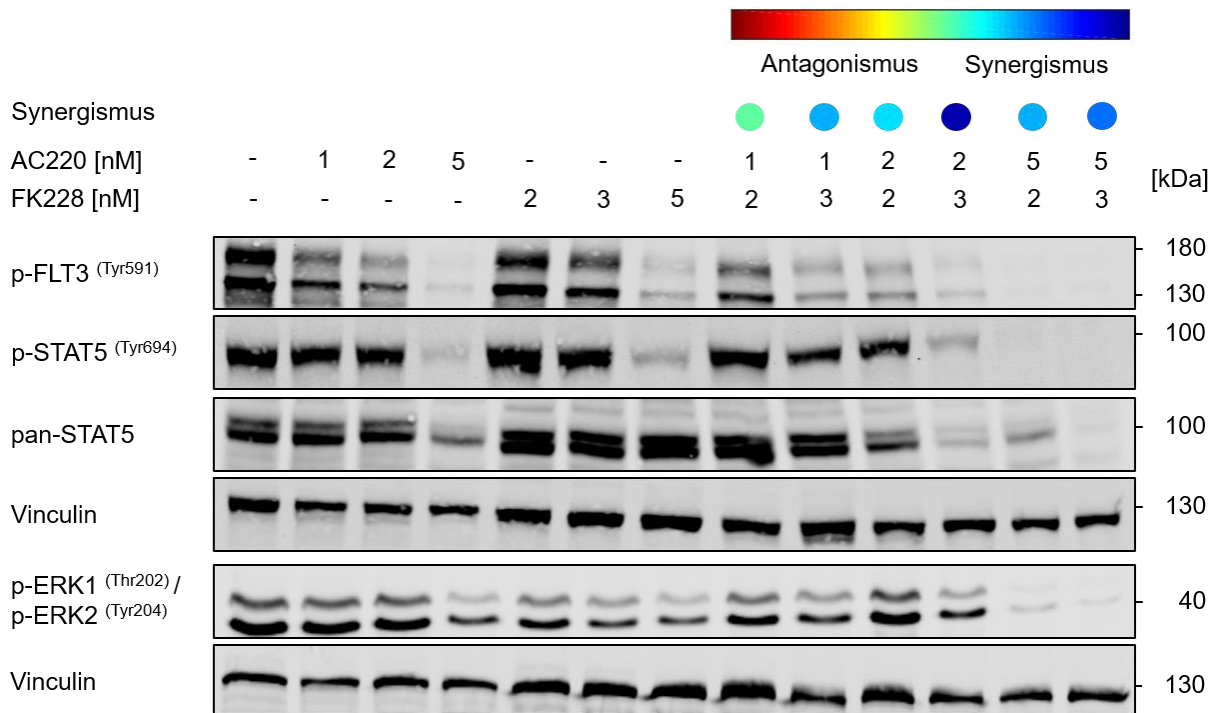


Abbildung 7: Western-Blot-Analyse von Schlüsselproteinen des FLT3-Signalweges in MV4-11 Zellen nach Behandlung mit AC220 und/oder FK228 für 24 h

Gezeigt sind p-FLT3^(Tyr591), p-STAT5^(Tyr694), pan-STAT5, p-ERK1^(Thr202) und p-ERK2^(Tyr204). Als Ladekontrolle wurde Vinculin verwendet. Die farbliche Darstellung der pharmakologischen Interaktion beider Inhibitoren basiert auf Abb. 6-E.

Die Auswirkungen der Einzelbehandlungen mit AC220 und FK228 auf p-FLT3^(Tyr591), p-ERK1^(Thr202) und p-ERK2^(Tyr204) in MV4-11 Zellen zeigen ähnliche Ergebnisse wie bereits in Abb. E beschrieben. Bei deren kombinierter Gabe zeigt p-FLT3^(Tyr591) bereits ab 1 nM AC220 mit 3 nM FK228 einen starken Rückgang (s. Abb. 7). Ein abnehmendes Signal wird bei der Phosphorylierung von ERK1 an Thr202 und ERK2 an Tyr204 ab einer Kombination von 5 nM AC220 mit 2 nM FK228 deutlich. Die Einzelbehandlung mit 5 nM AC220 zeigt einen sehr starken Rückgang des Signals von p-STAT5^(Tyr694) und pan-STAT5. Die Einzelbehandlung mit 5 nM FK228 führt ebenfalls zu einem sehr deutlichen Rückgang von p-STAT5^(Tyr694), das Signal an pan-STAT5 dagegen bleibt konstant bestehen. In kombinierter Gabe von 2 nM AC220 mit 3 nM FK228 nimmt die

Phosphorylierung von STAT5 an Tyr694 stark ab. Bei pan-STAT5 ist eine deutliche Reduktion der detektierbaren Menge ab einer Kombination von 2 nM AC220 mit 2 nM FK228 zu erkennen.

Alle zuvor genannten kombinierten Dosen haben die Gemeinsamkeit, dass das Signal der in der Kombination verwendeten Dosen im Vergleich zu den Einzeldosen schwächer ist. Die Aussagen des vorliegenden Western-Blots stützen damit die Ergebnisse der aus Abb. 6-A und 6-E entnommenen synergistischen Kombinationsdosen. Damit werden FLT3-ITD-typische Schlüsselproteine durch die gemeinsame Gabe von AC220 und FK228 bereits in geringeren Konzentrationen reduziert.

4.2.3 Inhibition der an der Regulation des G2/M-Kontrollpunkts beteiligten Proteine durch kombinierte Behandlung von AC220 und FK228

Bei der Analyse der durchflusszytometrischen Untersuchungen ist aufgefallen, dass Kombinationsbehandlungen von AC220 mit FK228 den Anteil der Zellen in der G2-Phase verändern (s. Abb. 6-B). Um den Einfluss auf den Zellzyklus zu konkretisieren, wurde nach Schlüsselproteinen des G2/M-Kontrollpunkts geschaut. Ein wichtiger Bestandteil davon ist die Tyrosinkinase WEE1, welche den Übergang in die Mitose bei einem Vorliegen von DNA-Schäden in der Zelle verhindert (Do et al., 2013). Liegen DNA-Schäden in Form von DNA-Einzelstrangbrüchen vor, wird ATR aktiviert (Jazayeri et al., 2006). ATR phosphoryliert und aktiviert CHK1. CHK1 wiederum phosphoryliert WEE1 (Do et al., 2013).

Die Proteinmenge an WEE1, hier in Abb. 8 dargestellt, nimmt bei der Behandlung mit AC220 ab 2 nM ab und ist bei 5 nM nicht mehr detektierbar. Bei der Behandlung mit FK228 nimmt die Menge an WEE1 ab 5 nM stark ab. Bei der kombinierten Behandlung mit 2 nM AC220 und 2 nM FK228 reduziert sich die Bande von WEE1 deutlich im Vergleich zu den jeweiligen Dosen in der Einzelbehandlung. Die Phosphorylierung von CHK1 an Ser345 ist bei 5 nM AC220 sowie ab einer Kombinationsbehandlung von 2 nM AC220 mit 2 nM FK228 nachweisbar. Die Phosphorylierung an Ser345 steht dabei im Zusammenhang mit der Aktivierung des G2-Kontrollpunkts und wird bei Zellen in der S-Phase vermehrt exprimiert (Niida et al., 2007). Vergleicht man die Menge an pan-CHK1 in Einzel- und Kombinationsbehandlung, so fällt auch hier bereits ab geringen kombinierten Dosen ein Rückgang der Banden auf. In Einzelbehandlung mit AC220 ist eine Reduktion des Signals ab 2 nM sichtbar. Das Bandensignal in der Einzelbehandlung mit FK228 bleibt bei den Konzentrationen 2, 3 und 5 nM relativ kon-

stant. Kombiniert bewirkt die Gabe von 1 nM AC220 mit 3 nM FK228 bereits einen klaren Rückgang.

Analysiert man den in Abb. 8 vorliegenden Western-Blot, lässt sich daraus schlussfolgern, dass die Phosphorylierung von CHK1 an Ser345 aufgrund eines vorliegenden DNA-Schadens durch die Behandlung mit 5 nM AC220 verstärkt wird. Es lässt vermu-

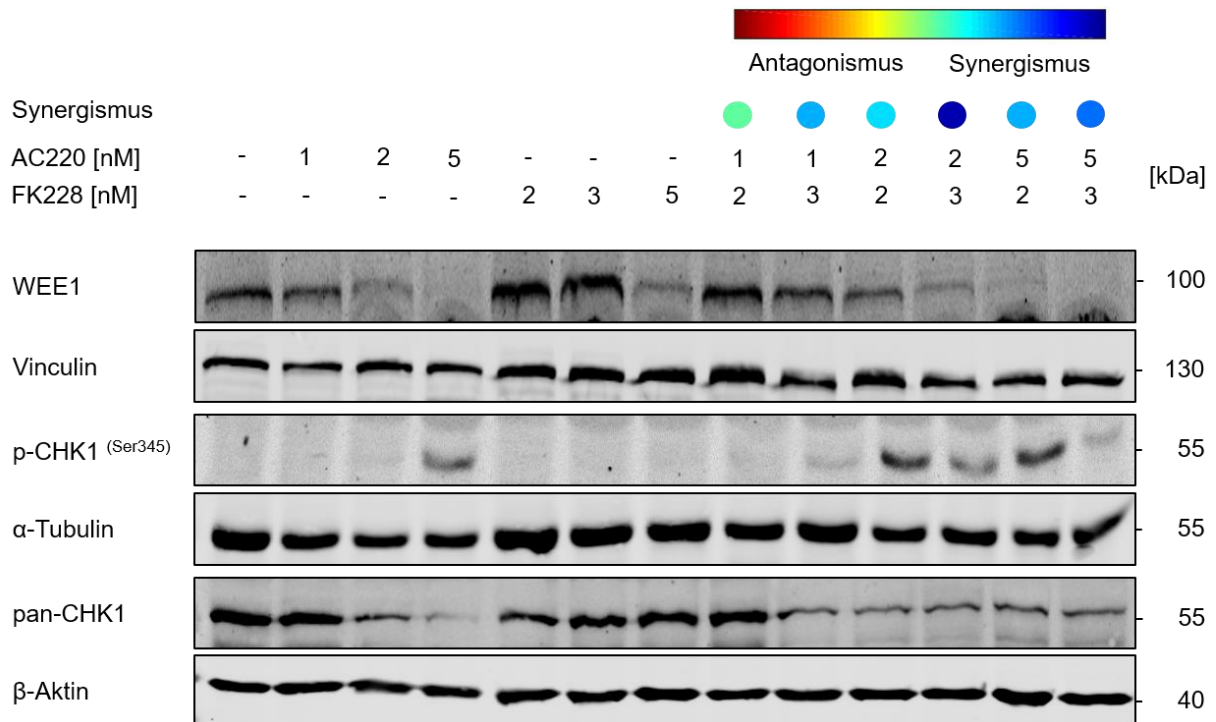


Abbildung 8: Western-Blot-Analyse von Regulatorproteinen des G2/M-Kontrollpunkts des Zellzyklus in MV4-11 Zellen nach Behandlung mit AC220 und/oder FK228 für 24 h

Die oben aufgeführten Proteine werden gezeigt. Als Ladekontrolle wurden Vinculin, α-Tubulin und β-Aktin verwendet. Die farbliche Darstellung der pharmakologischen Interaktion beider Inhibitoren basiert auf Abb. 6-E.

ten, dass dadurch der Übergang der Zellen in die Mitose verhindert wird, da der G2/M-Kontrollpunkt aktiviert wird. Die gesamte Menge an WEE1 und pan-CHK1 dagegen wird in Einzelbehandlung mit 5 nM AC220 und in Kombination stark reduziert. Der Verlust dieser beiden Proteine lässt vermuten, dass die Zelle aufgrund dessen nicht mehr in der Lage ist, den G2/M-Kontrollpunkt zu aktivieren und dieser damit nicht mehr existent ist. Außerdem liefert Abb. 8 erneut einen Nachweis für die synergistische Wirkung der Kombinationsbehandlungen, da sich die Menge an WEE1 und pan-CHK1 in Abb. 8 in Kombination früher reduziert, verglichen mit der Einzelbehandlung.

4.2.4 p53 wird durch die Behandlung mit AC220 und FK228 in Kombination stabilisiert, p21^(Cip1/Waf1) dagegen wird reduziert

Auf Grundlage der Daten zur detektierten Phosphorylierung von CHK1 an Ser345 (s. Abb. 8) ist das Interesse an den Zellzyklus-Regulatorproteinen p53 und p21^(Cip1/Waf1)

aufgekommen. Das Protein p53 wird u.a. durch ATM, ATR, CHK1 oder bei DNA-Schäden an verschiedenen Positionen phosphoryliert. Die Phosphorylierung schützt p53 vor proteasomalem Abbau (Honda et al., 1997, Chehab et al., 2000). Kommt es zur Dysregulationen in der Zelle, wird p53 durch Phosphorylierung stabilisiert und damit aktiviert (el-Deiry et al., 1994). Es kann dann an die DNA binden, die Transkription von bestimmten Proteinen wie p21^(Cip1/Waf1) initiieren und somit den Zellzyklus anhalten (el-Deiry et al., 1993). Neben der Phosphorylierung ist die Acetylierung eine posttranslationale Möglichkeit der Proteinmodifikation (Gu und Roeder, 1997, Blasius et al., 2011). Je nach Phosphorylierungsstelle an p53 wird eine Acetylierung des Proteins erleichtert oder erschwert (Reed und Quelle, 2014). Die acetylierte Form von p53 wird im Zusammenhang mit Tumorsuppression gesehen (Wang et al., 2016), da eine Acetylierung antiproliferativ wirkt (Reed und Quelle, 2014). Eine Acetylierung von p53

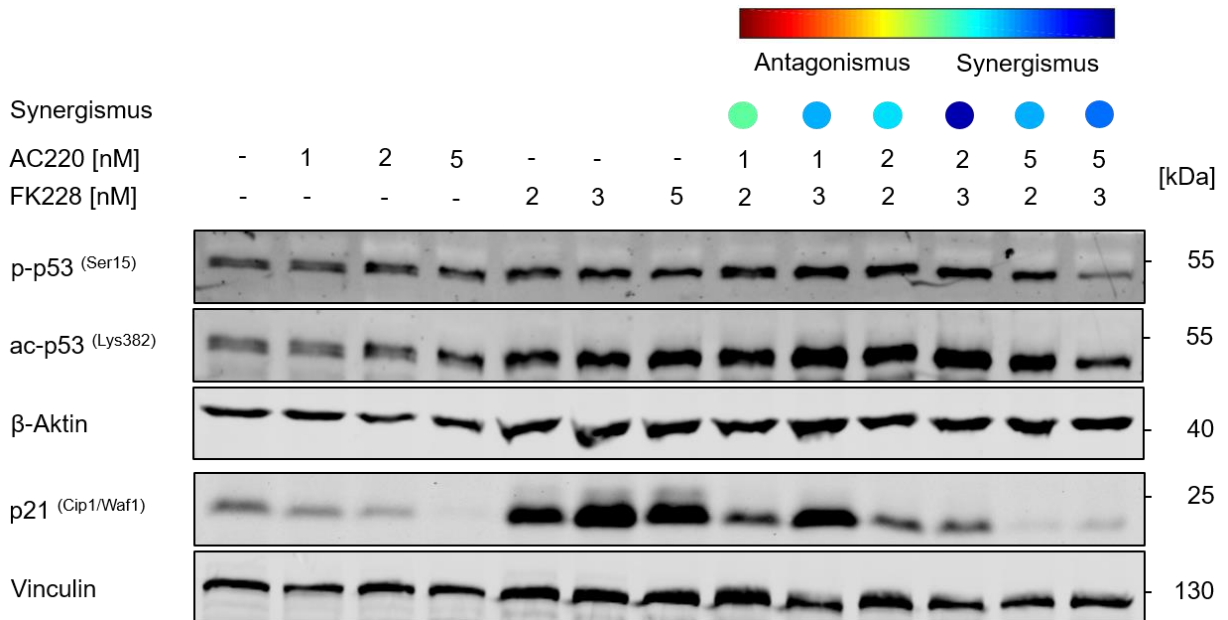


Abbildung 9: Western-Blot-Analyse von Zellzyklus-Regulationsproteinen in MV4-11 Zellen nach Behandlung mit AC220 und/oder FK228 für 24 h

Die Proteine p-p53^(Ser15), ac-p53^(Lys382) und p21^(Cip1/Waf1) werden gezeigt. Als Ladekontrolle wurden β-Aktin und Vinculin verwendet. Die farbliche Darstellung der pharmakologischen Interaktion beider Inhibitoren basiert auf Abb. 6-E.

wirkt stabilisierend, da kein Abbau von p53 durch die E3-Ligase MDM2 mehr möglich ist (Wu et al., 1993). p53 kann von HDAC1, 2 und 3 beeinflusst werden, indem p53 deacetyliert wird. Damit wird die Aktivität von p53 verringert (Juan et al., 2000). Die Aktivierung von p21^(Cip1/Waf1) wurde bereits mehrfach in der Literatur mit Zunahme der Zellen in der G1-Phase beschrieben (z.B. (Deng et al., 1995)). Damit kann p21^(Cip1/Waf1) den Zellzyklus zur Reparatur der Schäden arretieren und Zellen so vor der Einleitung der Apoptose schützen (Roninson, 2002).

Der Verlauf der Phosphorylierung von p53 an Ser15 und der Acetylierung von p53 an Lys382 in Abb. 9 ähneln sich recht stark. Bei beiden fällt eine moderate Zunahme der Bande bei den Kombinationsbehandlungen im Vergleich zu den Einzeldosen auf. Auch die Intensität der Bande bei beiden Proteinen nimmt lediglich bei der Kombination von 5 nM AC220 mit 3 nM FK228 ab. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass sich bei dieser hohen Kombinationsdosis die Zellen größtenteils in der subG1-Phase befinden (s. Abb. 6-A). Durch den hohen Anteil an toten Zellen könnte eine Korrelation zur Abnahme der Proteine gesehen werden. Bei p21^(Cip1/Waf1) fällt auf, dass das Signal bei der Einzelbehandlung mit AC220 sehr schwach ist und im Verlauf der Dosissteigerung reduziert wird im Vergleich zur Kontrolle. Bei 5 nM AC220 ist es schließlich nicht mehr sichtbar. Folglich generiert AC220 eine Reduktion der Proteinmenge von p21^(Cip1/Waf1). Bei der Behandlung mit dem HDACi wird p21^(Cip1/Waf1) dagegen stark induziert. Dies korreliert mit den Aussagen der Literaturangaben. Diese besagen, dass HDACs u.a. auch für die Unterdrückung des Proteins p21^(Cip1/Waf1) verantwortlich sind (Wilson et al., 2006). Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass mit HDACi p21^(Cip1/Waf1) verstärkt induziert wird. Dies steht auch im Zusammenhang mit einem G2-Arrest (Chou et al., 2011), welcher in den Messungen der Durchflusszytometrie mit FK228 beobachtet wurde (s. Abb. 6-B). In allen Kombinationsdosen wird das Signal an p21^(Cip1/Waf1) im Gegensatz zur Einzelbehandlung mit FK228 deutlich reduziert, bis auf die Kombination aus 1 nM AC220 mit 3 nM FK228. Bei dieser Kombination ist eine deutliche Induktion der Bande trotz synergistischer Wirkung zu beobachten.

Die anhaltenden Stabilisierungen von p-p53^(Ser15) und ac-p53^(Lys382) in Abb. 9 deuten darauf hin, dass durch die Behandlung mit AC220 und FK228 eine Dysregulation durch verursachte Zellschäden herrscht. Die starke Induktion von p21^(Cip1/Waf1) bei HDACi verdeutlicht, dass der Zellzyklus nach Behandlung mit FK228 offenkundig angehalten wird. Nach Behandlung mit AC220 dagegen sinkt die Proteinmenge an p21^(Cip1/Waf1). Diese Beobachtung wurde auch von Abe et al. (2016) gemacht. Durch den FLT3i wird die Proteinmenge an p21^(Cip1/Waf1) reduziert und damit die Zellproliferation beschleunigt. Damit steigt die Ansprechbarkeit der FLT3-ITD Zellen gegenüber Chemotherapeutika. Die Induktion von p21^(Cip1/Waf1) geht einher mit der Resistenz der Zellen gegenüber Inhibitoren (Abe et al., 2016).

4.2.5 Induktion von γ H2AX^(Ser139) und Reduktion von RAD51 deuten DNA-Schäden bei gemeinsamer Gabe von AC220 und FK228 an

Um den aus den zuvor beobachteten Ergebnissen vermuteten DNA-Schaden zu bestätigen (s. Abb. 8), wurden typische Schlüsselproteine der DNA-Reparatur untersucht. Ein typisches Protein der DNA-Reparatur ist RAD51, welches an der Reparatur von DSB beteiligt ist (Shinohara et al., 1992). Die Phosphorylierung von H2AX an Ser139 wird als Marker für DDR angesehen (Rogakou et al., 1998), wobei die Phosphorylierung u.a. durch DSB ausgelöst werden kann (Rogakou et al., 2000). Phosphoryliertes (γ) H2AX^(Ser139) hat dabei zwei Funktionen. Entweder es erleichtert die Einleitung der Apoptose durch Beteiligung der Verpackung fragmentierter DNA in Apoptoskörperchen oder γ H2AX^(Ser139) leitet DNA-Reparatur durch Aktivierung von Endonukleasen ein (Rogakou et al., 2000).

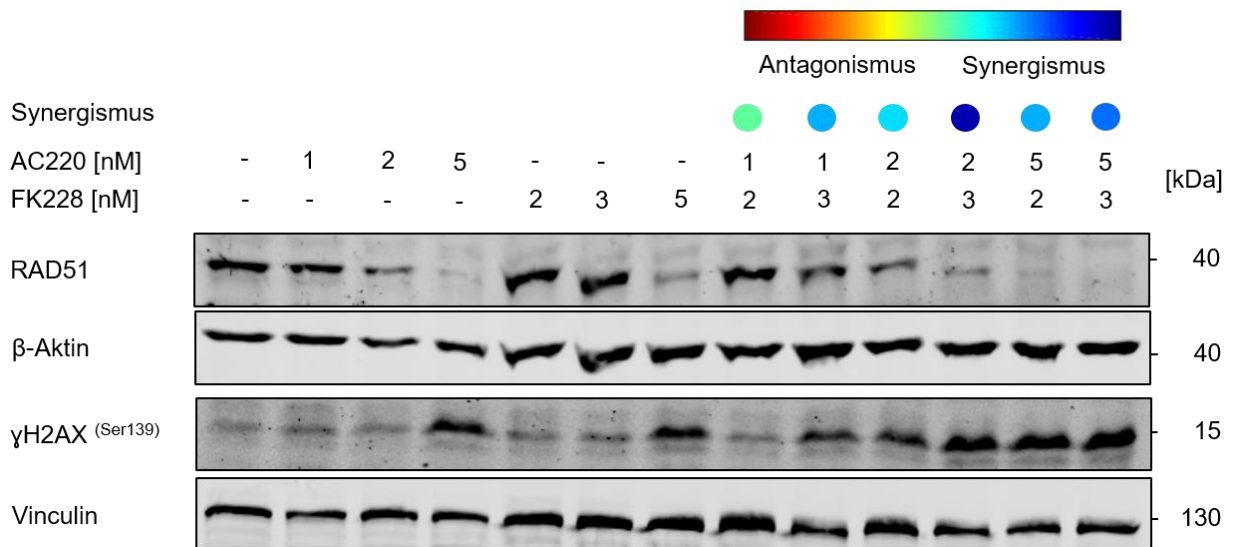


Abbildung 10: Western-Blot-Analyse von DNA-Schaden- und Reparaturmarkern in MV4-11 Zellen nach Behandlung mit AC220 und/oder FK228 für 24 h

Die oben aufgeführten Proteine werden gezeigt. Als Ladekontrolle wurden β -Aktin und Vinculin verwendet. Die farbliche Darstellung der pharmakologischen Interaktion beider Inhibitoren basiert auf Abb. 6-E.

Bei der Betrachtung von Abb. 10 sind bereits basale Level an γ H2AX^(Ser139) in der Einzelbehandlung erkennbar. Es folgt eine Zunahme der Intensität mit 5 nM AC220. Diese Beobachtung der Induktion durch FLT3i stimmt mit der Literatur überein. Eine Zunahme an γ H2AX^(Ser139) bedeutet gleichzeitig eine Abnahme der DNA-Reparatur (Seedhouse et al., 2006). Auch bei der Behandlung mit FK228 ist eine starke Bande bei 5 nM erkennbar. Kombiniert man AC220 und FK228, so ist bereits bei Konzentrationen ab 1 nM AC220 mit 3 nM FK228 eine höhere Intensität in der Bande von γ H2AX^(Ser139) zu sehen, verglichen mit den jeweiligen Einzelbehandlungen. RAD51

zeigt bei den eingesetzten Dosen an Einzelbehandlung von AC220 und FK228 anfänglich eine leichte Induktion. Bei beiden Inhibitoren nimmt die Menge an RAD51 mit Zunahme der Konzentration stark ab. Vergleicht man auch hier die Bande der Kombination aus 1 nM AC220 und 3 nM FK228 mit den jeweiligen Einzeldosen, fällt in der Kombination eine Abnahme des Signals im Vergleich zur ersten angewandten Kombination auf. Dies zeigt, dass in Kombination bereits geringere Dosen ausreichen, um einen größeren DNA-Schaden zu generieren, da das Signal an RAD51 schwächer ausfällt.

Der Vergleich der Bandensignale von γ H2AX^(Ser139) mit RAD51 zeigt, dass sich diese Proteine reziprok zueinander verhalten. Wenn sich die Intensität an RAD51 reduziert, wird γ H2AX^(Ser139) induziert. Dies ist dadurch erklärbar, dass der vorliegende Schaden in der Zelle zu groß ist, folglich keine Reparatur mehr sinnvoll ist. Deswegen erhöht sich daraufhin γ H2AX^(Ser139). Die Funktion von γ H2AX^(Ser139) kann hier als Marker der Apoptose vermutet werden. Kritisch anzusehen wäre bei der Analyse von Abb. 10, dass das Signal an RAD51 bereits in der Kontrolle recht stark ist. Diese Beobachtung lässt sich aber durch bereits veröffentlichte Untersuchungen erklären. Bei FLT3-ITD Zellen kommt es zur Induktion von RAD51, da die Transkription von FLT3-ITD einhergeht mit der Transkription von RAD51 (Rebecchi und Pratz, 2017). Die Behandlung von FLT3-ITD-positiven Zellen mit einem FLT3i zeigt eine Reduktion des Proteins RAD51 (Seedhouse et al., 2006), was mit den hier vorliegenden Ergebnissen übereinstimmt.

4.2.6 Erhöhte Apoptoseinduktion durch die Kombination aus AC220 und FK228

Buchwald et al. (2010) haben in ihren Forschungsergebnissen gesehen, dass der Abbau von FLT3-ITD Zellen nicht nur durch Proteasomen, sondern vor allem durch Caspasen verursacht wird. Eine erhöhte Apoptose korrelierte bei der Behandlung mit einem HDACi mit der erhöhten Induktion an Caspase 3 (Buchwald et al., 2010). Auch die Forschungsgruppe um Pietschmann et al. (2012) haben sich mit der Aktivität von Caspase 3 beschäftigt. Sie konnten beobachten, dass Kombinationen aus FLT3i und HDACi eine Induktion von aktivierter Caspase 3 bewirkt, welche dabei im Zusammenhang mit proteolytischem Abbau von FLT3 und STAT5 steht (Pietschmann et al., 2012). UBC1H ist ein Protein, welches mit an der Ubiquitinierung und damit Markierung von Proteinen zum Abbau beteiligt ist (Shibata et al., 2011). Mit diesem Wissen

liegt es nahe, sich die Aktivität von aktivierter Caspase 3 und UBCH8 genauer anzuschauen.

Die Induktion an aktivierter Caspase 3 in Abbildung 11 zeigt in der Einzelbehandlung mit 1 nM AC220 bzw. mit 2 nM FK228 eine mit der Kontrolle vergleichbare Intensität auf. Die Kombination aus den zuvor genannten Dosen dagegen weist schon eine deutlich sichtbare Bande an aktivierter Caspase 3 auf. Dies ist ein erneuter Hinweis auf die Frage nach der synergistischen Wirkung. Betrachtet man UBCH8, fällt eine Abnahme der Bandenintensität bei 5 nM AC220 und bei den Kombinationsdosen mit 5 nM AC220 auf. Aufgrund dessen kann bei UBCH8 von keiner synergistischen Wirkung gesprochen werden. Interessant ist, dass durch die Behandlung mit 5 nM AC220, 5 nM FK228 und durch Kombinationen ab 1 nM AC220 mit 3 nM FK228 eine Doppelbande

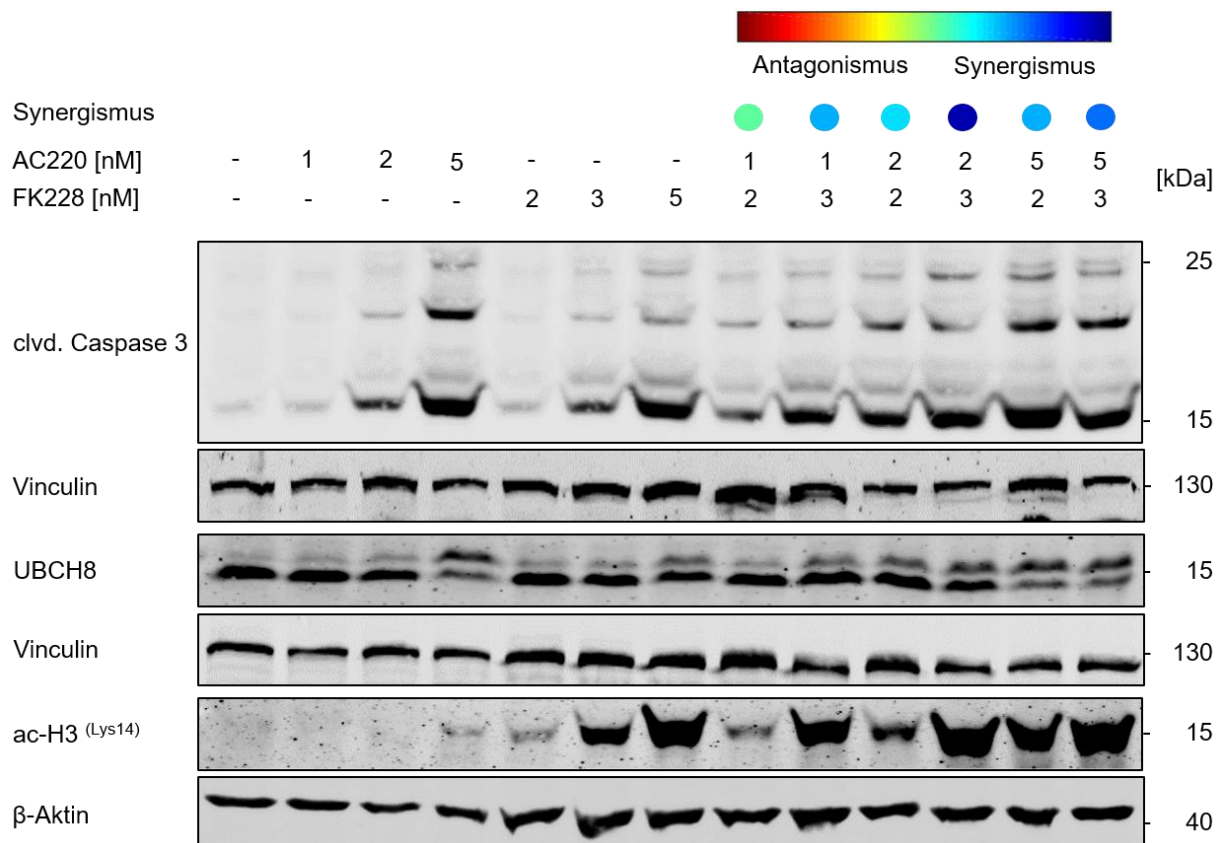


Abbildung 11: Western-Blot-Analyse von Apoptose-, HDACi- und Proteasom-Marken in MV4-11 Zellen nach Behandlung mit AC220 und/oder FK228 für 24 h

Die oben aufgeführten Proteine werden gezeigt. Als Ladekontrolle diente Vinculin und β-Aktin. Die farbliche Darstellung der pharmakologischen Interaktion beider Inhibitoren basiert auf Abb. 6-E.

von UBCH8 induziert wurde. Auf Vermutungen dazu wird in der Diskussion eingegangen. Zu sehen ist in Abb. 11 noch die Detektion der Acetylierung von Histon 3 (H3) an Lys14. Damit wird ein Beweis für die Wirksamkeit von FK228 geliefert, da sich die

Acetylierung von Histonen bei der Behandlung mit FK228 auf Lysine von H3 und H4 beschränkt (Aron et al., 2003). Mit zunehmender Dosis des HDACi in Einzelbehandlung wird die Induktion an acetyliertem-H3 stärker. Die Intensität der Banden bei Kombinationsbehandlungen spiegelt erneut das synergistische Zusammenwirken von AC220 mit FK228 wider. Beispielsweise das Bandensignal nach Gabe von 1 nM AC220 mit 3 nM FK228 ist in dieser Kombination deutlich stärker ausgeprägt als nach Einzelbehandlung mit 3 nM FK228.

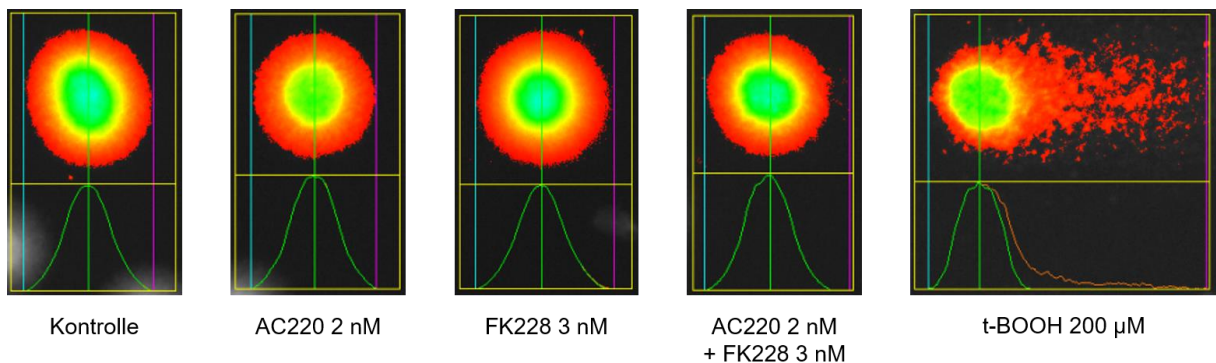
Aus den ermittelten Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Untersuchungen von aktivierter Caspase 3 und ac-H3^(Lys14) die synergistische Wirkung von AC220 mit FK228 bestätigen. Der Prozess der Apoptose, hier durch aktivierte Caspase 3 vertreten, zeigt sich in Kombinationsbehandlung als synergistische Wirkung von AC220 mit FK228. Auch die Induktion an acetyliertem-H3 verstärkt sich deutlich in Kombination.

4.3 Ermittlung des DNA-Schadens durch Comet Assays

Aufgrund der starken Induktion von aktivierter Caspase 3 (Abb. 11), der Aktivierung von p-CHK1^(Ser345) (Abb. 8), der Induktion von γ H2AX^(Ser139) in niedrigen Dosen (Abb. 10) sowie der großen Anteile der Zellen in der subG1-Phase (Abb. 6-A) sollte anhand des Comet Assays untersucht werden, ob eine Akkumulation von DNA-Schäden in den Zellen vorliegt. Ein anfänglicher Versuch mit MV4-11 Zellen, die über 24 h behandelt wurden, ergab keine auswertbaren Ergebnisse. Die Zellen waren bereits zu beschädigt und größtenteils nur noch als Fragmente auf den Objektträgern sichtbar und daher nicht auswertbar. Dies lässt sich anhand des in Abb. F dargestellten Western-Blots nachvollziehen. Die Bande an aktivierter Caspase 3 zeigt nach 24 h eine sehr starke Induktion, sowohl nach der Behandlung mit AC220, als auch mit FK228. Dies korreliert mit der Beobachtung von sehr vielen fragmentierten und folglich toten Zellen bei Betrachtung unter dem Mikroskop. Aus diesem Grund wurde der Behandlungszeitraum für die vorliegenden Analysen der Comet Assays von 24 h auf 16 h verkürzt. Begründen lässt sich diese Entscheidung mit der nach 16 h bereits leichten Intensitätssteigerung an aktivierter Caspase 3 im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. F). Damit liegen in den Zellen erste Anzeichen einer Apoptoseinduktion vor. Diese ist aber nicht zu stark ausgeprägt und damit für die angestrebten Analysen verwendbar. Weitere Vergleiche der Behandlung nach 16 und 24 h der in Abb. F detektierten Proteine befürworten ebenfalls die Reduktion des Behandlungszeitraumes. Besonders deutlich wird dies neben aktivierter Caspase 3 bei pan-FLT3. Während nach 24 h pan-FLT3

bei beiden Inhibitoren sehr stark reduziert wurde, sind nach 16 h noch schwache Signale detektierbar. Das Signal an p21^(Cip1/Waf1) unterscheidet sich allerdings nach Behandlungen mit AC220 von FK228. Mit AC220 ist weder nach 16, noch nach 24 h eine Zunahme zu sehen. Mit FK228 ist die Induktion von p21^(Cip1/Waf1) nach 16 h besonders stark, nach 24 h dagegen nur noch sehr schwach. Bezogen auf die DNA-Reparatur lässt sich daraus schließen, dass nach 16 h der Zellzyklus angehalten wurde, um der Zelle die Möglichkeit zur Reparatur zu bieten. Nach 24 h dagegen scheint die Zellproliferation aufgrund von zu starker DNA-Schädigung wieder fortgeführt zu werden.

12-A



12-B

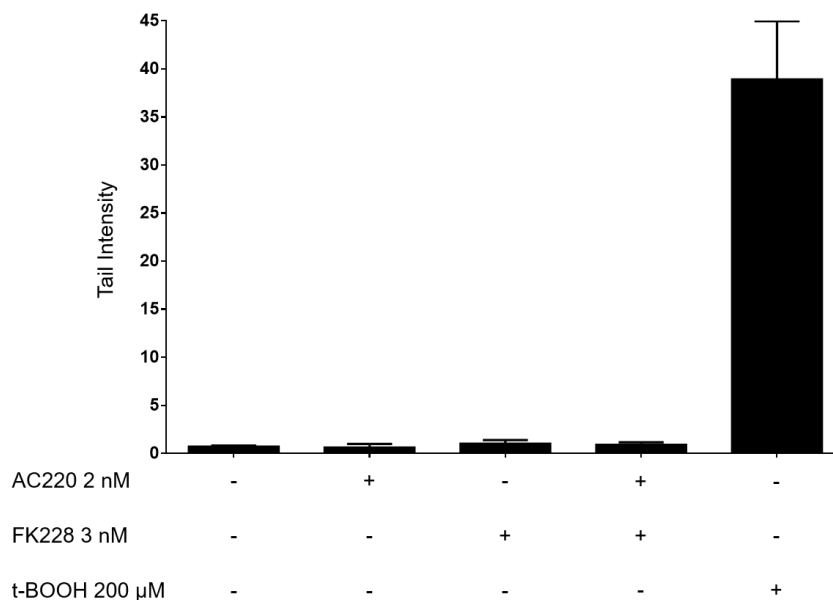


Abbildung 12: Alkalischer Comet Assay zur Detektion von Einzelstrangbrüchen in MV4-11 Zellen nach 16 h

Die Behandlung mit t-BOOH dient als Positivkontrolle. Verwendet wurden 2 nM AC220 und 3 nM FK228 in Einzel- oder Kombinationsbehandlung. (A) Exemplarische Darstellung einzelner Zellen. Der gemessene Kometenschweif wird in den Abbildungen von der blauen Linie links und der lila Linie rechts begrenzt. Die im unteren Bereich der Abbildungen in Form einer Gaußschen Glockenkurve in Grün dargestellten Verteilung entspricht der Gesamtheit der intakten DNA. Gewanderte DNA-Bruchstücke werden dagegen als orange Kurve dargestellt. (B) Quantitative Darstellung der *Tail Intensity*; n = 2.

Die Ergebnisse in Abb. 8 haben Reduktionen der Proteine pan-CHK1 und WEE1 gezeigt. Modifikationen der Expression dieser Proteine können Hinweise auf DNA-Einzelstrangbrüchen liefern (Jazayeri et al., 2006, Do et al., 2013), weswegen mit Hilfe von Comet Assays danach geschaut wurde.

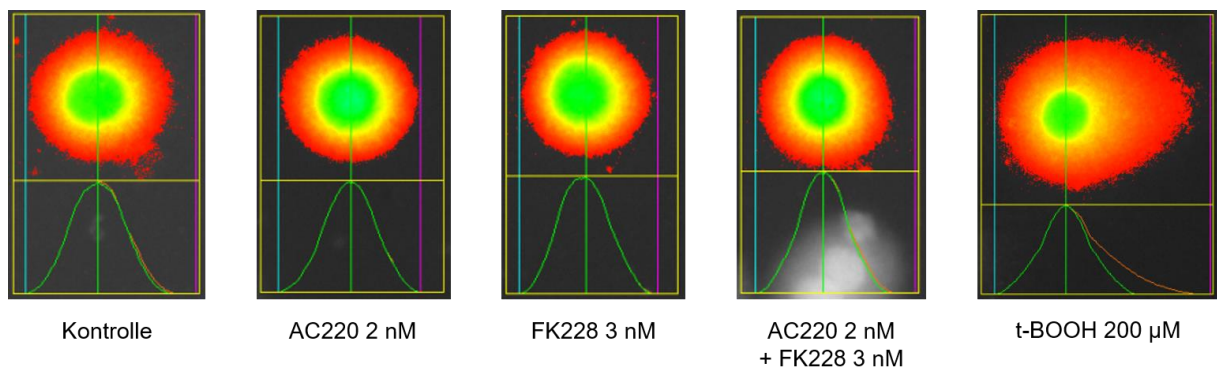
Abb. 12 zeigt die Ergebnisse des alkalischen Comet Assays. Die Kontrollzellen, welche aus unbehandelten Zellen bestehen und wie erwartet keinen Schweif zeigen, dienen als Negativkontrolle. Die Behandlung mit der genotoxischen Substanz t-BOOH dagegen zeigt einen deutlichen Kometenschweif. Die Behandlung hat folglich funktioniert und den erwarteten DNA-Schaden verursacht. t-BOOH ist ein Oxidationsmittel, das zu freien Radikalen in Zellen und damit zu DNA-Schäden durch oxidativen Stress führt (Cesquini et al., 2003). Vergleicht man nun den prozentualen Anteil der DNA im Schweif, weisen die Kontrollzellen einen Wert von 0,75 % auf. Die Einzelbehandlung mit 2 nM AC220 erreicht einen Wert von 0,65 %, mit 3 nM FK228 einen von 1,05 %. Die Kombination aus den zuvor genannten Einzeldosen erzielt einen Wert von 0,95 %. Zusammenfassend zeigt sich hier also keine nennenswerte Steigerung des prozentualen Anteils der DNA im Schweif, weder mit der Behandlung von AC220, noch mit FK228. Die Behandlung mit t-BOOH dagegen zeigt mit 38,9 % einen hohen Wert. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Zunahme der apoptotischen Zellen anscheinend nicht aufgrund von Einzelstrangbrüchen verursacht wird.

Aufgrund des nicht detektierbaren DNA-Schadens im alkalischen Comet Assay, den Hinweisen auf mögliche Doppelstrangbrüche durch die Reduktion von RAD51 und die Induktion von γ H2AX^(Ser139) in Abb. 10, wurde mittels neutralem Comet Assay nach DNA-Schäden in Form von DSBs geschaut.

Abb. 13 zeigt erneut die Kontrollzellen als Negativkontrolle und t-BOOH als Positivkontrolle. Auch hier zeigt sich im Vergleich der einzeln und kombiniert behandelten Zellen keine Zunahme des Schweifs. Die Kontrollzellen erreichen ein Maß an prozentualen Anteilen der DNA im Schweif von 1,3 %. Die Einzelbehandlung mit AC220 erzeugt 1,0 %, die mit FK228 1,1 %. Die Kombination aus beiden erzielt mit 1,3 % keine nennenswerte Steigerung an detektierbaren DNA-Schäden. Die Positivkontrolle mit t-BOOH dagegen zeigt einen Wert von 19,9 %. Der neutrale Comet Assay zeigt, dass die Einleitung der Apoptose wahrscheinlich nicht durch Doppelstrangbrüche ausgelöst wird.

Damit ist, basierend auf den vorliegenden Ergebnissen, ein DNA-Schaden durch die Behandlung mit AC220 und/oder FK228 eher auszuschließen.

13-A



13-B

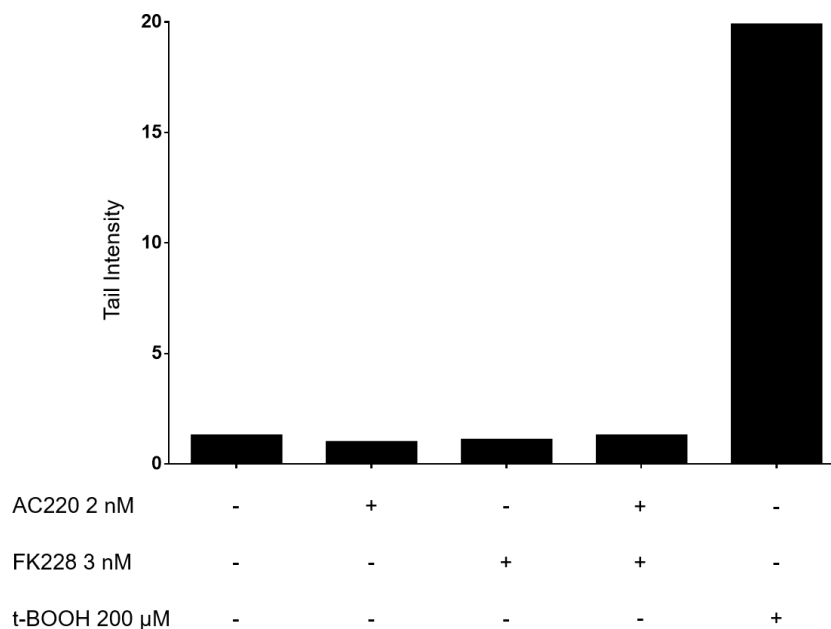


Abbildung 13: Neutraler Comet Assay zur Detektion von Doppelstrangbrüchen in MV4-11 Zellen nach 16 h

Die Behandlung mit t-BOOH dient als Positivkontrolle. Verwendet wurden 2 nM AC220 und 3 nM FK228 in Einzel- oder Kombinationsbehandlung. (A) Exemplarische Darstellung einzelner Zellen. Der gemessene Kometenschweif wird in den Abbildungen von der blauen Linie links und der lila Linie rechts begrenzt. Die im unteren Bereich der Abbildungen in Form einer Gaußschen Glockenkurve in Grün dargestellten Verteilung entspricht der Gesamtheit der intakten DNA. Gewanderte DNA-Bruchstücke werden dagegen als orange Kurve dargestellt. (B) Quantitative Darstellung der *Tail Intensity*; n = 1.

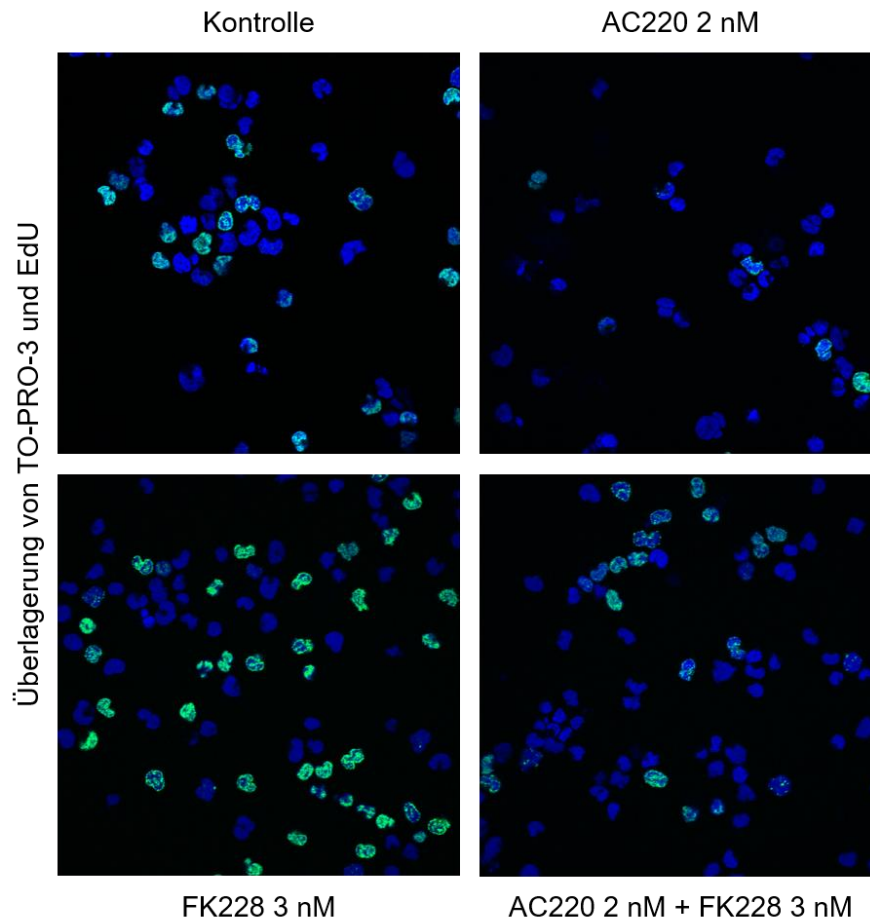
4.4 Nachweis von Veränderungen in der S-Phase durch die Behandlung mit AC220 und/oder FK228 unter Zuhilfenahme von Immunfluoreszenz

Der Anlass für diesen Versuch war die bereits beschriebene Zunahme der S-Phase-Population nach Behandlung der Zellen mit FK228 (s. Abb. 6-B). Damit soll ein Nach-

weis für die unterschiedlichen Verteilungen der Anteile der Zellzyklusphasen nach Behandlung mit AC220 und FK228 erbracht werden. Es wurden drei Hypothesen aufgestellt. Erstens weisen die mit AC220 behandelte Zellen einen G1-Arrest und eine Reduktion der S-Phasen-Population auf (s. Abb. 6-B) und bauen daher weniger EdU im Vergleich zu den Kontrollzellen ein. Zweitens weisen die mit FK228 behandelte Zellen sowohl einen G1-, als auch einen G2-Arrest und einen erhöhten S-Phase-Anteil auf (s. Abb. 6-B), weshalb sie deutlich mehr EdU einbauen müssten. Drittens sollte die Kombination aus AC220 mit FK228 von der Anzahl der EdU-positiven Zellen eher der Anzahl der mit FK228 behandelten Zellen ähneln. Wie bereits beim Comet Assay wurden zur Immunfluoreszenz die Zellen aufgrund der Aussagen von Abb. F nur über einen Zeitraum von 16 h behandelt, um eine zu starke apoptotische Fragmentierung der Zellen zu vermeiden.

Abb. 14-A zeigt repräsentative Aufnahmen als Überlagerung der zwei Kanäle, von der Zellkernfärbung TO-PRO-3 und EdU. Der Vergleich der Gesamtzellzahl zu den EdU-positiven Zellen wurde immer auf 100 Zellkerne bezogen. Bei den Kontrollzellen lagen durchschnittlich 53 EdU-positive Zellen vor. Nach der Behandlung mit 2 nM AC220 wurden 21 EdU-positive Zellen gezählt und nach der Behandlung mit 3 nM FK228 37 EdU-positive Zellen. Nach der Kombinationsbehandlung aus 2 nM AC220 mit 3 nM FK228 wurden 24 EdU-positive Zellen gezählt. Diese Durchschnittswerte werden in Abb. 14-B dargestellt. Das Ergebnis zeigt, dass sich mit AC220 etwa halb so viele Zellen in der S-Phase befinden im Vergleich zu den Kontrollzellen. Vergleicht man die EdU-positiven Kontrollzellen mit den FK228 behandelten Zellen, fällt auf, dass sich ca. 70 % davon in der S-Phase befinden. Eine quantitative und repräsentative Darstellung der Zellkernzahl im Verhältnis zur Anzahl der EdU-positiven Zellen liefert auch Abb. G. In dieser Darstellung sind die Zellen in den einzelnen Kanälen sowie in der Überlagerung abgebildet. Allgemein fällt in Abb. 14-A auf, dass sich die Gesamtzellzahl pro Probe unterscheidet, trotz gleichmäßiger Aussaat. Während sich auf den Objektträgern der Kontrollzellen durchschnittlich 73 Zellkerne befanden, waren es bei den mit AC220 behandelten nur 63. Bei den mit FK228 behandelten waren es 150 und bei der Kombinationsbehandlung 98. Diese Zellzahlunterschiede traten auf, obwohl für alle Behandlungen die gleiche Dichte an Zellen ausgesät wurde. Inwiefern dies auf eine Hyperproliferation hindeuten könnte, wird in der Diskussion erläutert.

14-A



14-B

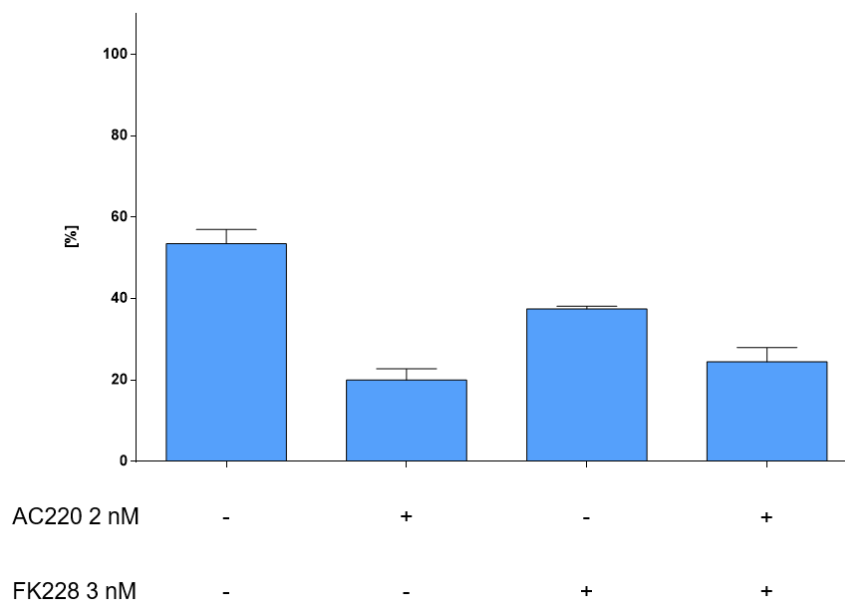


Abbildung 14: Repräsentative Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung mit EdU in MV4-11 Zellen nach 16 h Einzel- und Kombinationsbehandlung mit AC220 und FK228; n = 2

(A) Überlagerung der Kanäle. (B) Quantitative Darstellung der EdU-positiven Zellen, bezogen auf eine Gesamtzellzahl von 100.

Die zuvor aufgestellten Hypothesen wurden damit nicht im erwarteten Ausmaß erfüllt. Die Anzahl der EdU-positiven Zellen ist wie vermutet bei der Behandlung mit AC220 geringer als mit FK228 und im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Anzahl der EdU-positiven Zellen der Kombinationsbehandlung (24) ähnelt eher der Anzahl der EdU-positiven Zellen nach der Behandlung mit 2 nM AC220 (21) und nicht wie erwartet der der Anzahl an EdU-positiven Zellen nach der Behandlung mit FK228 (37).

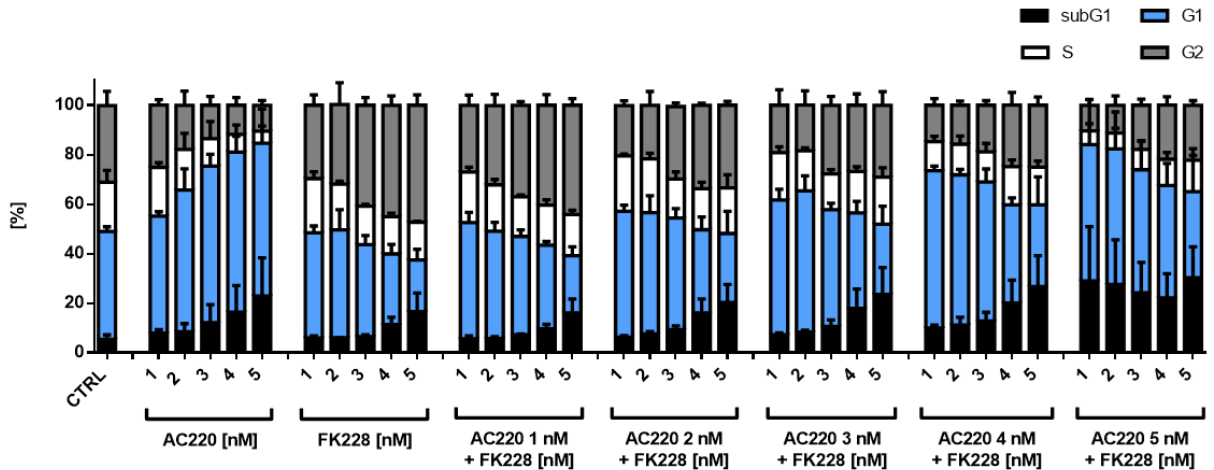
4.5 Ermittlung zellulärer Reaktionen via Durchflusszytometrie durch Veränderungen im Zellzyklus nach 16 h Behandlung mit AC220 und/oder FK228

Aufgrund der Ergebnisse der Immunfluoreszenz haben sich neue Fragen aufgeworfen. Beispielsweise muss in Betracht gezogen werden, dass die Resultate der Immunfluoreszenz nach 16 h erhoben wurden und damit nicht vollständig mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie nach 24 h verglichen werden können. Möglicherweise sind die bestehenden Unterschiede der Grund dafür, dass die zuvor aufgestellten Hypothesen in Kap. 4.4 nicht erfüllt wurden. Um den Einfluss von AC220 und FK228 auf MV4-11 Zellen nach 16 h beurteilen zu können, wurde die Versuchsreihe aus Abb. 6 mit einer 16-stündigen Behandlungszeit durchgeführt.

Die Verteilung der Populationen in den Zellzyklusphasen wird in Abb. 15-A dargestellt. Die Einzelbehandlung mit AC220 bewirkt mit einer Dosis von 1 nM einen subG1-Anteil von 7,9 %, bei 5 nM steigt dieser auf 22,9 % an. Die Behandlung mit FK228 erzeugt bei 1 nM, 2 nM und 3 nM etwa gleiche Anteile an Zellen in der subG1-Phase mit um die 6 %. Bei 5 nM FK228 ist eine Zunahme der Zellen in der subG1-Phase auf 16,5 % zu erkennen. Bei den Kombinationsbehandlungen fällt auf, dass sich kaum additive oder synergistische Effekte an subG1-Anteilen abzeichnen, was mit der Beschreibung von Abb. J zu einem späteren Zeitpunkt untermauert wird. Bei niedrigen Dosen von 1 nM der Inhibitoren sind eher antagonistische Tendenzen zu erkennen. Die Einzelbehandlung mit 4 nM AC220 erzeugt einen subG1-Anteil von 16,3 %. Die Einzelbehandlung mit 1 nM FK228 generiert einen subG1-Anteil von 5,9 %. In Kombination erzeugen die zuvor genannten Konzentrationen einen Anteil an Zellen in der subG1-Phase von 9,9 %. Erst bei der höchsten angewandten kombinierten Gabe zeichnet sich eine leichte synergistische Tendenz ab. Mit 5 nM AC220 in Einzelbehandlung wird eine subG1-Population von 22,9 % erreicht. Eine Einzelbehandlung von 5 nM FK228 liefert einen subG1-Wert von 16,5 %. Die Kombinationsbehandlung aus den beiden generiert eine subG1-Population von 30,2 %. Zur besseren Übersicht der Verteilung der Zellen

in den jeweiligen Zellzyklusphasen G1, S und G2 wurde in Abb. 15-B der subG1-Anteil von der Gesamtpopulation aus den Daten von Abb. 15-A subtrahiert und die verbleibende Population auf 100 % gesetzt.

15-A



15-B

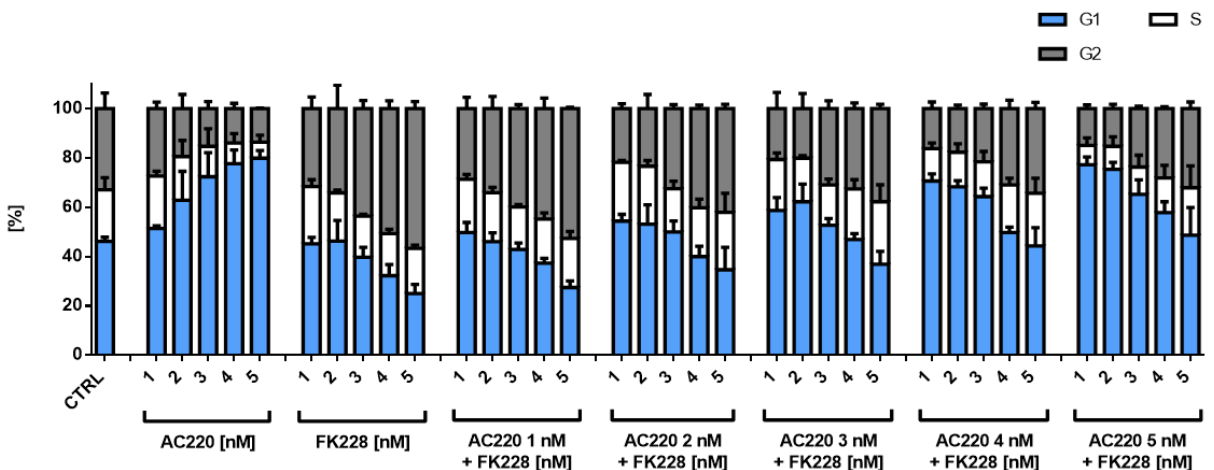


Abbildung 15: Zelluläre Reaktionen auf kombinierte Behandlungen aus FLT3i AC220 mit Klasse I HDACi FK228 in MV4-11 Zellen nach 16 h

Die Werte entsprechen Mittelwerten aus drei Versuchen. (A) MV4-11 Zellen wurden mit dem FLT3i AC220 und dem HDACi FK228 einzeln und kombiniert behandelt. Im Anschluss wurde eine Zellzyklusfärbung mit PI durchgeführt und die Proben über Durchflusszytometrie gemessen. Die jeweiligen Zellzyklusphasen sind prozentual dargestellt. Das Balkendiagramm wurde mittels GraphPad Prism 6 erstellt. (B) Das Balkendiagramm wurde auf Basis von Abb. 15-A erstellt. Die prozentuellen Anteile der Zellzyklusphasen, die Zelllinie, die Behandlung, der Behandlungszeitraum und das Messverfahren entsprechen den Angaben aus Abb. 15-A. Die subG1-Anteile wurden von der Gesamtpopulation subtrahiert und die verbleibende Population auf 100 % gesetzt.

Die Behandlung mit 1 nM AC220 zeigt, dass die Verteilung der Zellen in der G1-, S- und G2-Phase der Verteilung der Phasen der Kontrollzellen ähnelt. Mit ansteigender Dosis an AC220 nimmt der G1-Phase-Anteil dabei stetig zu, die Anteile der S- und G2-Phase dagegen nehmen ab. Nach Behandlung mit 1 nM AC220 zeigt sich, dass

51,3 % der Zellen in der G1-Phase, 21,3 % in der S-Phase und 27,4 % in der G2-Phase sind. Nach Behandlung mit 5 nM AC220 verschiebt sich die Verteilung hin zu 79,9 % in der G1-Phase, 6,5 % in der S-Phase und 13,6 % in der G2-Phase. Man erkennt bei der Behandlung mit dem FLT3i den überwiegenden Arrest der Zellen in der G1-Phase. Vergleicht man dazu die Verteilung der drei Zellzyklusphasen mit der Verteilung der Phasen nach FK228-Behandlung, fällt eine andere Gewichtung auf. Nach Behandlung mit 1 nM FK228 befinden sich 45,2 % der Zellen in der G1-Phase, 23,2 % in der S-Phase und 31,6 % in der G2-Phase. 5 nM FK228 dagegen erzeugt eine G1-Population von 24,9 %, eine S-Population von 18,4 % und eine G2-Population von 56,7 %. Folglich verbleiben nach Behandlung mit dem HDACi unter Steigerung der Dosis mehr Zellen in der G2-Phase und weniger in der G1-Phase. Die S-Phasen-Population hingegen weist keine signifikanten Unterschiede auf. Vergleicht man die Behandlungen in Kombination, so fällt auf, dass sich in der Verteilung der Zellzyklusphasen das Verteilungsmuster von FK228 durchsetzt. Zu erkennen ist pro dargestellter Kombinationsbehandlungsgruppe mit einer Konzentration an AC220, dass mit steigender Dosis an FK228 die G1-Population ab-, und die G2-Population zunimmt. Die S-Phasen-Population bleibt ab 3 nM AC220 mit FK228 immer größer als im Vergleich mit der jeweiligen Einzelbehandlung mit AC220. Die Kombinationsbehandlungen mit 1 nM bzw. 2 nM AC220 weisen teilweise leichte Abnahmen der Zellzahl in der S-Phase auf. Der größte Unterschied liegt bei 1 nM AC220 mit 3 nM FK228 mit 17,2 % der Zellen in der S-Phase im Vergleich zu 21,4 % bei 1 nM AC220 vor. Die S-Phasen-Population der Kombinationsbehandlung sinkt dabei um 19,6 % verglichen mit der Einzelbehandlung des FLT3i.

Zur Einschätzung der vorliegenden Ergebnisse wurde die Signifikanz des Synergismus oder Antagonismus ermittelt. Abb. H stellt die gleichen Kombinationsbehandlungen wie Abb. 6-C dar. Es wurde jeweils der Anteil der subG1-Fraktion der Einzelbehandlung mit dem Anteil der subG1-Population der Kombinationsbehandlung verglichen. Der tabellarischen Ansicht kann entnommen werden, dass so gut wie keine Signifikanz vorliegt. Nur Behandlungen in Kombination mit 5 nM AC220 liefern einen Synergismus, welcher als signifikant (*) bzw. sehr signifikant (***) eingestuft wird.

Abb. I zeigt repräsentativ die quantitative Auswertung der Zellzyklusverteilung nach Behandlung mit entweder 2 nM AC220 oder mit 3 nM FK228 sowie nach kombinierter Gabe aus 2 nM AC220 mit 3 nM FK228 im Vergleich. Die prozentuale Verteilung der Zellzyklusanteile basiert dabei auf Abb. 15-A. Die Signifikanz der subG1-Population

der Ausgangswerte zu den Vergleichswerten beruht auf Abb. H. Der Anteil an Zellen in der subG1-Phase nach Behandlung mit 2 nM AC220 liegt bei 8,5 % und bei 3 nM FK228 bei 6,4 %. Die kombinierte Behandlung erreicht einen Wert an subG1-Population von 9,2 %. Damit ist der Vergleich der Kombinationsbehandlung weder mit der Einzelbehandlung mit AC220, noch mit der Einzelbehandlung mit FK228 signifikant.

Zum Vergleich der berechneten zellulären Effekte mit GraphPad wurden diese auch mit Combobenefit errechnet. Die Darstellung der Ergebnisse ist Abb. J zu entnehmen. Evident ist anhand der grünen Farbe, dass kein Synergismus vorliegt. Größtenteils beeinflussen sich die Inhibitoren in kombinierter Gabe nach 16 h nicht gegenseitig. Die Kombination aus 1 nM FK228 mit 2 nM, 3 nM und 4 nM AC220 wirkt allerdings leicht antagonistisch. Eine leichte Tendenz zum Synergismus wird anhand des Scores deutlich. Dieser stellt sich in der Spalte mit 5 nM AC220 und in der Zeile mit 5 nM FK228 als positiver Zahlenwert, zum Teil als zweistellige Zahl dar. Damit deutet sich nach 16 h Kombinationsbehandlung eine anfängliche Entstehung des Synergismus in den höchsten untersuchten Konzentrationen an.

4.6 Ermittlung zellulärer Reaktionen auf die Behandlung mit AC220 und/oder RGFP966 via Durchflusszytometrie nach 24 h

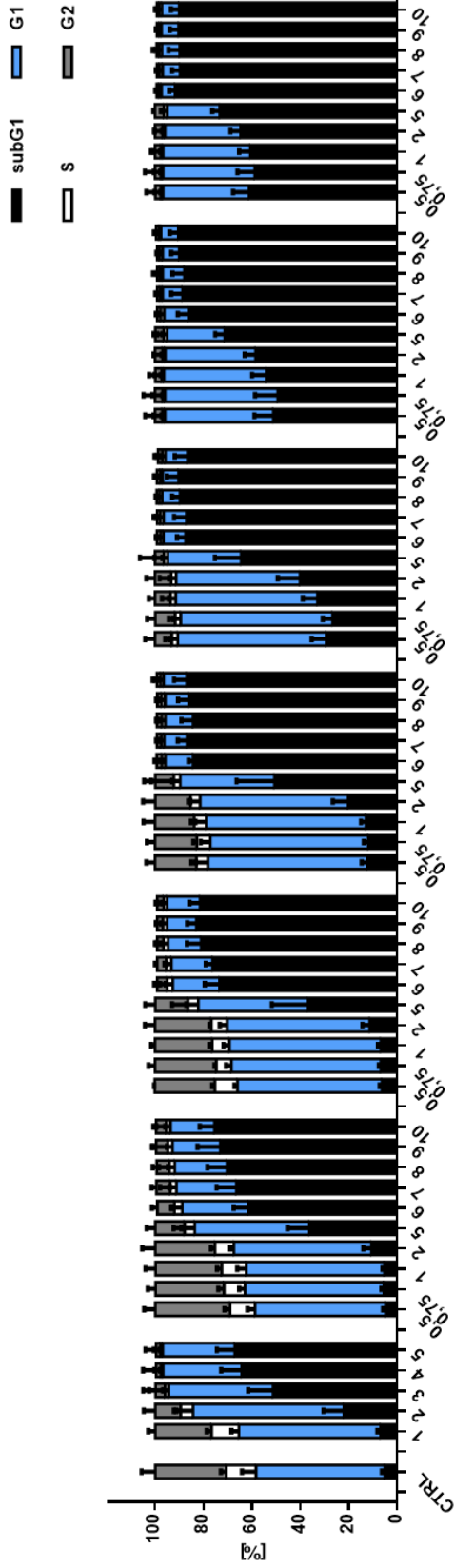
Bisher wurde gezeigt, dass die Inhibition der HDAC-Klasse I synergistisch mit der Inhibition von FLT3 wirkt. Nach der Inhibition einer ganzen HDAC-Klasse kam die Frage auf, was bei der Inhibition eines einzelnen HDACs passiert in Bezug auf Veränderungen im Zellzyklus und auf Proteinebene. Von Interesse hierbei ist, ob sich der synergistische Effekt auch mit der Inhibition eines HDACs darstellt. Aufgrund der guten synergistischen Wirkung von AC220 in Kombination mit der HDAC-Klasse I, fiel die Auswahl auf RGFP966, einen selektiven HDAC3i (Malvaez et al., 2013), da HDAC3 mit zur Klasse I der HDACs gehört. Vorteilhaft wäre die gezielte Hemmung nur eines HDACs dahingehend, dass sich vermutlich durch HDACi verursachte Nebenwirkungen reduzieren. Außerdem ist diese Versuchsreihe interessant, da in der Literatur bisher sehr wenige Veröffentlichungen zu der Kombination aus FLT3i und HDAC3i zu finden sind. In diesem Abschnitt, den Versuchen der Durchflusszytometrie, wurden Analysen zur Veränderung der Zellzyklusphasen durch Einzel- und Kombinationsbehandlung der FLT3-ITD-positiven MV4-11 Zellen mit AC220 und RGFP966 durchgeführt.

Vor Ausführung der eigentlichen Versuchsreihe wurde eine Dosisreihe erhoben (s. Abb. K und L), um rationale Konzentrationen des HDACis RGFP966 zu ermitteln.

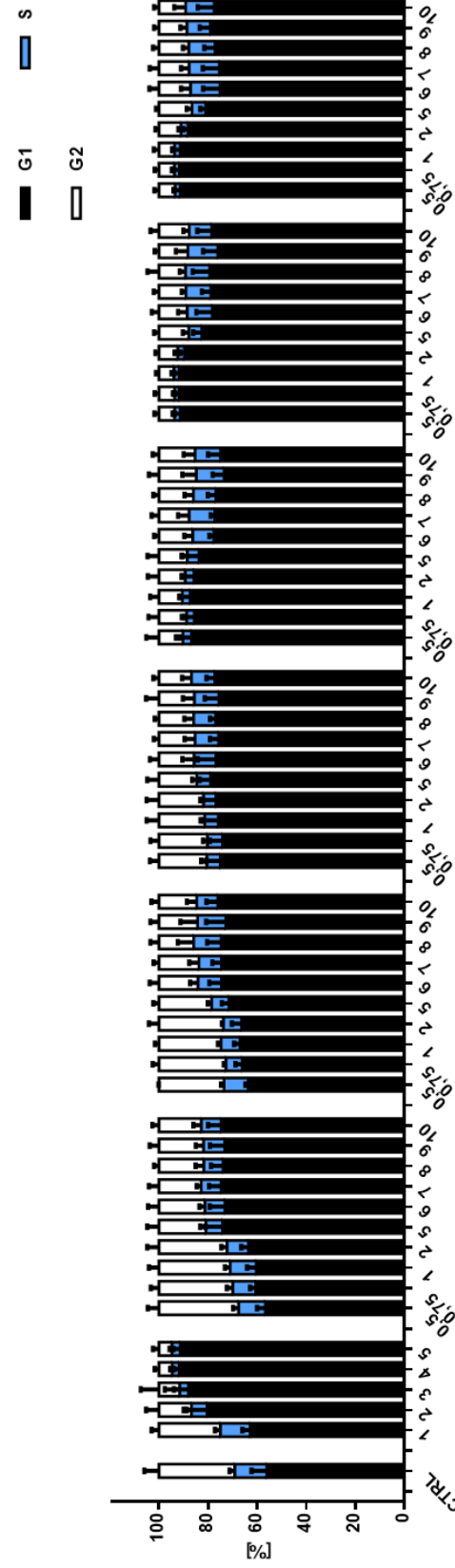
Abb. K zeigt dazu den Vorversuch zur Zellzyklusverteilung nach Behandlung. Die Dosen von AC220 wurden als Schlussfolgerung aus Abb. K bis zu einer Konzentration von 5 nM getestet, da die Konzentration von 10 nM sehr ähnliche Resultate zu 5 nM an Zellen in der subG1-Phase liefert. Nach einer Behandlung mit 5 nM AC220 steigt die subG1-Population auf 72,7 %, mit 10 nM AC220 auf 70,7 %. Bei RGFP966 wurde mit einer Dosis von 0,5 μ M begonnen, welche eine subG1-Population von 4,6 % generiert. Die niedrigeren getesteten Konzentrationen von 0,05 μ M und 0,1 μ M erzeugen mit 3,7 % und 4,7 % sehr ähnliche Anteile an Zellen in der subG1-Phase. Da der Unterschied zwischen 1 μ M mit einer subG1-Population von 5,5 % und 5 μ M mit 34,3 % recht groß ist, wurde in der eigentlichen Versuchsreihe auch die Konzentration von 2 μ M RGFP966 untersucht. Auf Grundlage des Vorversuchs in Abb. K lässt sich die Hypothese aufstellen, dass Kombinationsbehandlungen von AC220 mit RGFP966 nicht den gewünschten synergistischen Effekt aufweisen wie Kombinationsbehandlungen aus AC220 mit FK228. Dies lässt sich daran begründen, dass die Einzelbehandlung mit 2 nM AC220 eine subG1-Population von 35,2 % generiert. Die versuchsweise in Abb. K dargestellten getesteten Kombinationen mit 2 nM AC220 und RGFP966 dagegen erreichen mit 0,05 μ M des HDACi 32,4 % an subG1-Population, mit 0,1 μ M 26,5 % und mit 0,5 μ M 20,7 %. Es zeigt sich tendenziell eine antagonistische Wirkung der Kombination aus AC220 mit RGFP966. Zum Vergleich der Färbung mit PI für die Zellzyklusmessung wurde die Dosisreihe noch als Apoptosemessung mit Annexin V durchgeführt. Das Ergebnis dazu ist in Abb. L dargestellt. Die Messungen bestätigten die bereits bei der Zellzyklusverteilung beschriebenen Beobachtungen zur Bestimmung der letztlich verwendeten Dosen an AC220 und RGFP966 sowie die Tendenz zur antagonistischen Wirkung der Inhibitoren in Kombination.

Die Versuchsreihe zur Zellzyklusverteilung ist in Abb. 16 dargestellt. Bei der Betrachtung der subG1-Population nach Behandlung mit AC220 fällt die schon aus den Versuchen mit FK228 bekannte Zunahme bei steigenden Dosen auf. Bei einer Dosis von 1 nM AC220 liegt der subG1-Anteil bei 6,8 %. Bei 3 nM AC220 werden bereits Anteile an subG1 von 51,3 % erreicht. Die Konzentrationen 4 nM und 5 nM AC220 generieren mit 64,2 % und 67,1 % ähnliche Mengen an subG1-Populationen. Die Einzelbehandlung mit RGFP966 bewirkt mit 0,5 μ M und 1 μ M bereits aus dem Vorversuch bekannte Ergebnisse der subG1-Population mit 4,9 % und 5,3 %, welche vergleichbar sind mit der subG1-Fraktion der Kontrollzellen mit 5,2 %. Die Konzentration von 2 μ M erzeugt einen Anteil an subG1 von 10,7 %. 5 μ M entsprechen mit 36,2 % fast dem Wert des

16-A



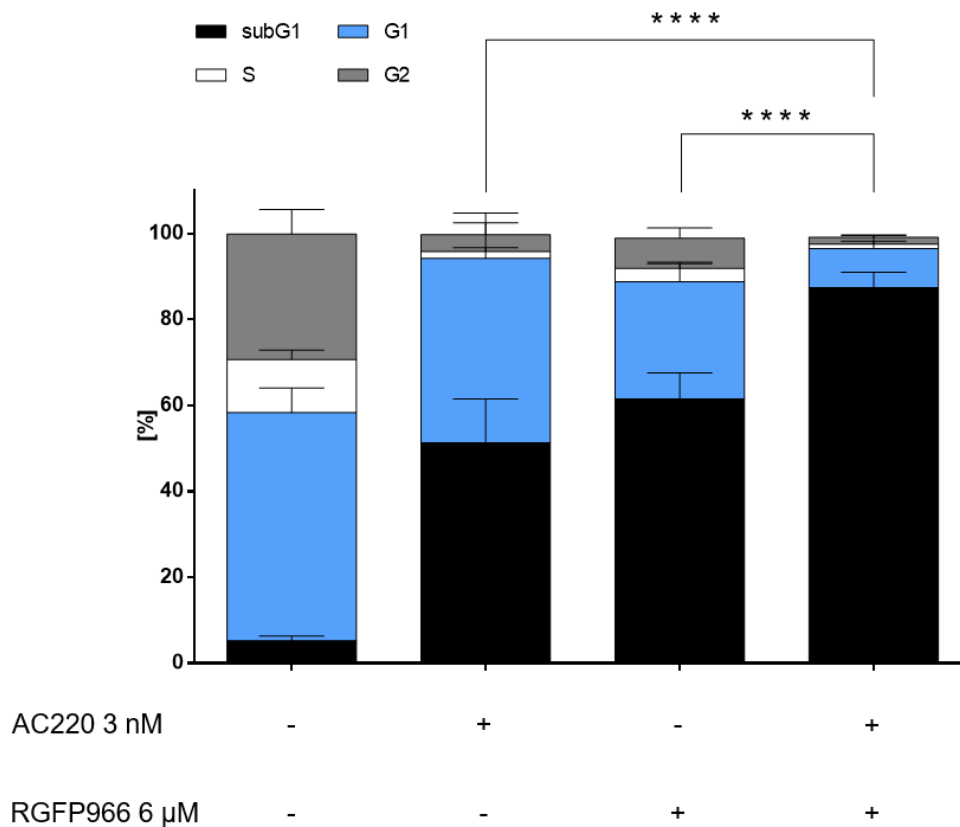
16-B



16-C

Ausgangswert	Vergleichswert	Signifikanz
AC220 1 nM	AC220 1 nM + RGFP966 6 µM	****
RGFP966 6 µM	AC220 1 nM + RGFP966 6 µM	*
AC220 1 nM	AC220 1 nM + RGFP966 7 µM	****
RGFP966 7 µM	AC220 1 nM + RGFP966 7 µM	ns
AC220 3 nM	AC220 3 nM + RGFP966 0,75 µM	****
RGFP966 0,75 µM	AC220 3 nM + RGFP966 0,75 µM	****
AC220 3 nM	AC220 3 nM + RGFP966 2 µM	**
RGFP966 2 µM	AC220 3 nM + RGFP966 2 µM	****
AC220 3 nM	AC220 3 nM + RGFP966 5 µM	***
RGFP966 5 µM	AC220 3 nM + RGFP966 5 µM	****
AC220 3 nM	AC220 3 nM + RGFP966 6 µM	****
RGFP966 6 µM	AC220 3 nM + RGFP966 6 µM	****

16-D



16-E

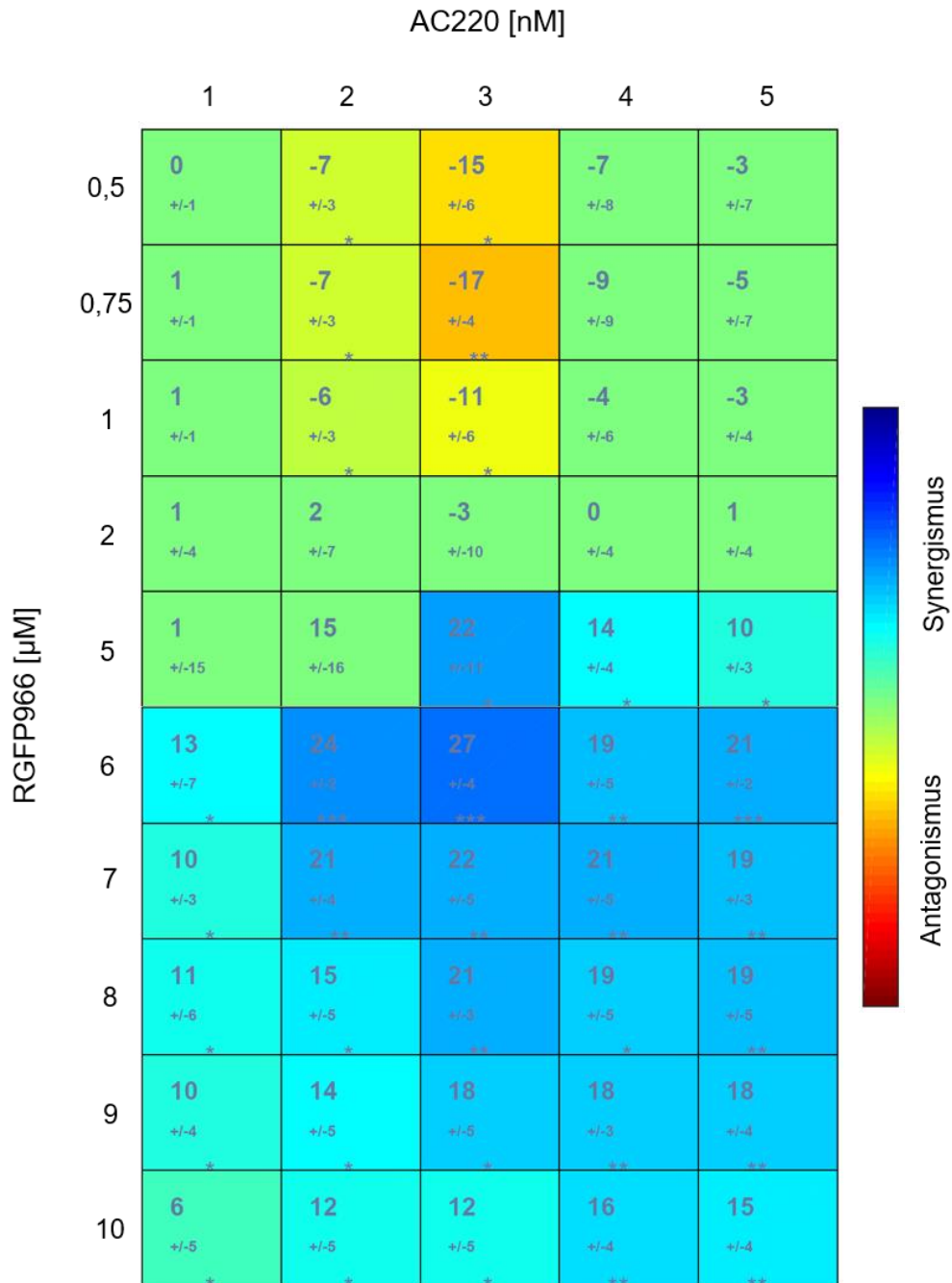


Abbildung 16: Zelluläre Reaktionen auf kombinierte Behandlungen aus FLT3i AC220 und HDAC3i RGFP966 in MV4-11 Zellen nach 24 h

Die Werte sind Mittelwerte aus fünf Versuchen. (A) MV4-11 Zellen wurden mit dem FLT3i AC220 und dem HDACi RGFP966 einzeln und kombiniert behandelt. Im Anschluss wurde eine Zellzyklusfärbung mit PI durchgeführt und die Proben über Durchflusszytometrie gemessen. Die jeweiligen Zellzyklusphasen sind prozentual dargestellt. Das Balkendiagramm wurde mittels GraphPad Prism 6 erstellt. (B) Das Balkendiagramm wurde auf Basis der Daten von Abb. 16-A erstellt. Die prozentuellen Anteile der Zellzyklusphasen, die Zelllinie, die Behandlung, der Behandlungszeitraum und das Messverfahren entsprechen den Angaben aus Abb. 16-A. Die subG1-Anteile wurden von der Gesamtpopulation subtrahiert und die verbleibende Population auf 100 % gesetzt. (C) Tabellarische Aufführung der Signifikanz erwähnenswerter Mengen von AC220 und RGFP966 in Einzelbehandlung im Vergleich zur Kombinationsbehandlung bezogen auf die subG1-Population aus Abb. 16-A. *Two way ANOVA*; $p < 0,05$; $n = 3 + SD$; Bonferroni *multiple comparison test*; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns = nicht

signifikant. Die Signifikanz wurde mittels GraphPad Prism 6 berechnet. (D) Beispielhafte Darstellung der Signifikanz der subG1-Population einer attraktiven Kombinationsbehandlungsmenge, basierend auf Abb. 16-C. Quantitative Darstellung der Zellzyklusverteilung der Zelllinie MV4-11. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte anhand einer PI-Färbung. *Two way ANOVA*; $p < 0,05$; $n = 5 + SD$; Bonferroni *multiple comparison test*; **** $p < 0,0001$. (E) Die Abbildung wurde unter Verwendung des Synergismus-Programmes Combeneft erstellt. Die Illustration basiert auf Abb. 16-A. Die Darstellung zeigt den Mittelwert des Synergismus anhand des Scores, die statistische Signifikanz des Synergismus sowie die Standardabweichung. Letztgenannte wird durch die Zahl mit vorangesehtem +/- repräsentiert.

Vorversuchs. Mit Dosen über 5 μM steigt die subG1-Population auf über 60 % an und erreicht mit 10 μM 75,5 %. Die Kombinationsbehandlung zeigt, dass sich zwei Konzentrationsbereiche unterscheiden lassen, in denen unterschiedliche Wirkungen erzielt werden. Die Kombinationen mit RGFP966 in den Dosen von 0,5 μM bis 5 μM wirken mit AC220 neutral bis antagonistisch und bestätigen die aus der Dosisreihe geschlussfolgerte Hypothese zur kombinierten Gabe. Die Kombinationen mit RGFP966 in den Dosen von 6 μM bis 10 μM mit AC220 wirken hingegen synergistisch. Ein gutes Beispiel einer antagonistisch wirkenden Kombination bietet 3 nM AC220 zusammen mit 0,5 μM RGFP966. Als Einzelbehandlung erzeugt 3 nM AC220 einen Anteil an subG1 von 51,3 %, 0,5 μM RGFP966 erzeugt 4,9 %. Die Kombination aus beiden generiert nur einen subG1-Anteil von 29,4 %. Ein Beispiel einer tendenziell synergistisch wirkenden Kombination bietet die Behandlung mit 3 nM AC220 und 6 μM RGFP966. 3 nM AC220 induziert einen subG1-Anteil von 51,3 %, 6 μM RGFP966 induziert 61,5 %. Kombiniert man diese beiden Inhibitoren in den genannten Mengen, steigt die Population an subG1 auf 87,4 % an. Dies entspricht etwa einer 1,5-fachen Zunahme der subG1-Fraktion im Vergleich zu den Einzelbehandlungen. Diese Steigerung der subG1-Population ist damit als schwach synergistisch einzuschätzen. Zu beachten ist bei der Bewertung des Synergismus, dass 3 nM AC220 und 6 μM RGFP966 bereits als Einzelbehandlung über 50 % an subG1-Population erzielen. Damit wird die Aussagekraft über additive oder synergistische Wirkungen deutlich erschwert.

Zur besseren Auswertbarkeit der Zellzyklusphasen G1, S und G2 wurde in Abb. 16-B der subG1-Anteil von der Gesamtpopulation aus den Daten von Abb. 16-A subtrahiert und die verbleibende Population auf 100 % gesetzt. Abb. 16-B zeigt, dass die Einzelbehandlung mit 1 nM AC220 im Vergleich zu den Kontrollzellen keine nennenswerten Veränderungen Zellen in der G1-, S- und G2-Phase aufweist. Mit ansteigender Dosis des FLT3i nimmt die Population in der G1-Phase weiter zu, die in der S- und G2-Phase nehmen ab. Nach Behandlung mit 1 nM AC220 sind 62,9 % der Zellen in der G1-Phase, 12,1 % in der S-Phase und 25 % in der G2-Phase. Nach 5 nM AC220 erreicht die G1-Phasen-Population einen Anteil von 91,5 %, die S-Phasen-Population 3,3 %

und die G2-Phasen-Population 5,2 %. Nach der Behandlung mit RGFP966 sind trotz einer ebenfalls ansteigenden G1-Phasen-Population mit ansteigender Konzentration des Inhibitors durchgehend höhere Anteile an Zellen in der S- und G2-Phase zu erkennen im Vergleich zu AC220. Nach Behandlung mit 0,5 μM RGFP966 sind 56,7 % der Zellen in der G1-Phase, 10,9 % in der S-Phase und 32,4 % in der G2-Phase. Nach einer Behandlung mit 10 μM RGFP966 liegt der Anteil der Zellen in der G1-Phase bei 74,8 %, der S-Phase bei 8 % und der G2-Phase bei 17,2 %. Damit wird ersichtlich, dass RGFP966 bevorzugt Zellen in der G1-Phase arretiert. Nach Kombinationsbehandlungen aus RGFP966 und 1 nM sowie 2 nM AC220 ist auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse nicht abschätzbar, welcher Inhibitor mit seiner typischen Zellzyklusverteilung dominierend ist. Ab einer Kombination von RGFP966 mit 3 nM AC220 und höher fällt auf, dass vor allem ab einer Dosis von 6 μM RGFP966 die Verteilung der Phasen eher dem Verlauf der Einzelbehandlung mit dem HDACi entspricht. Dies zeigt sich daran, dass die Anteile der S- und G2-Phasen-Population im Gegensatz zur Verteilung der Phasen nach Einzelbehandlung mit AC220 höher vertreten sind.

Die Signifikanz eines vorliegenden Synergismus oder Antagonismus, welche mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism 6 berechnet wurde, ist tabellarisch in Abb. 16-C dargestellt. Dabei wurde jeweils der Anteil der subG1-Fraktion der Einzelbehandlung mit dem Anteil der subG1-Population der Kombinationsbehandlung verglichen. Die Kombinationen aus 1 nM AC220 und 6 μM RGFP966 sowie 1 nM AC220 und 7 μM RGFP966 weisen unterschiedliche Signifikanzen auf. Das liegt daran, dass die subG1-Population nach Gabe von AC220 im Vergleich zur subG1-Population nach Kombinationsbehandlung einen großen Unterschied aufweist. Dagegen fällt der Unterschied in der subG1-Fraktion nach RGFP966-Gabe und der subG1-Fraktion nach Kombinationsbehandlung recht klein aus. Die anderen aufgelisteten Kombinationen in Abb. 16-C zeigen sehr signifikante (**) bis sehr hoch signifikante (****) Ergebnisse an. Dabei handelt es sich um Kombinationsbehandlungen aus 3 nM AC220 mit RGFP966.

Zur besseren Veranschaulichung des Synergismus zeigt Abb. 16-D exemplarisch die quantitative Auswertung der Zellzyklusphasenverteilung bei Behandlung ausschließlich mit 3 nM AC220, 6 μM RGFP966 bzw. die Kombination beider Inhibitoren. Die abgebildeten Daten werden hier exemplarisch gesondert aus Abb. 16-A, prozentuale Verteilung der Zellzyklusanteile, und aus Abb. 16-C, Signifikanz der subG1-Population der Ausgangswerte im Bezug zu den Vergleichswerten, dargestellt. Der Vergleich der subG1-Anteile nach Behandlung mit 3 nM AC220 mit 51,3 % mit der Kombination aus

3 nM AC220 und 6 μ M RGFP966 mit 87,4 % entspricht einer sehr hohen Signifikanz (****). Der subG1-Anteil steigt nach Kombinationsbehandlung um etwa das 1,7-fache an. Der Vergleich der subG1-Population nach 6 μ M RGFP966 mit 61,5 % mit der Kombinationsbehandlung liefert ebenfalls eine sehr hohe Signifikanz (****).

Um die Signifikanz des Synergismus oder Antagonismus aus Abb. 16-C mit anderen Synergismusberechnungen zu vergleichen, wurde Combenefit verwendet. Die Ergebnisse werden in Abb. 16-E dargestellt. Der obere Anteil der Abbildung, von 0,5 μ M bis 5 μ M RGFP966, zeigt überwiegend keinen Synergismus an. Kombinationen von 2 nM und 3 nM AC220 mit Dosen zwischen 0,5 μ M und 1 μ M RGFP966 wirken sogar antagonistisch. Erst ab einer kombinierten Gabe von AC220 mit 5 μ M RGFP966 ist ein Synergismus zu erkennen. Die Versuche mit dem HDACi RGFP966 hatten sich anfangs auf den oberen Anteil der Abb. 16-E beschränkt. Der angezeigte Synergismus ab einer Kombination aus 3 nM AC220 mit 5 μ M RGFP966 gab die Anregung zu Kombinationen mit höheren Dosen an RGFP966. Diese Resultate sind im unteren Abschnitt der Abbildung unter den RGFP966-Mengen von 6 μ M bis 10 μ M dargestellt. Es zeigt sich ein nahezu einheitlich synergistisch wirkender Bereich. Besonders hervorstechend sind die Kombinationen aus 3 nM AC220 mit 5 μ M RGFP966 im oberen Abschnitt, sowie aus 3 nM AC220 mit 6 μ M RGFP966 im unteren Abschnitt der Abbildung. Beide Kombinationen weisen eine dunkelblaue Farbe auf, welche mit dem jeweiligen hohen Score korreliert. Außerdem ist die erstgenannte Kombination statistisch signifikant (*), die zweite sehr hoch signifikant (***). Verglichen mit den generierten Ergebnissen der Kombinationsbehandlung mit FK228 (s. Abb. 6-E) zeigt sich aber kein so stark wirkender Synergismus mit RGFP966. Der höchste erreichte Score bei FK228 liegt bei 49, RGFP966 kommt dagegen nur auf einen maximalen Score von 27.

Die Gegenüberstellung der Signifikanz der Programme GraphPad Prism 6 und Combenefit liefert vergleichbare Resultate. Die Kombination aus 3 nM AC220 und 0,75 μ M RGFP966 wird in Abb. 16-C bei beiden Vergleichswerten mit sehr hoher Signifikanz (****) angezeigt. In Abb. 16-E hat besagte Kombination einen Score von -17, ein sehr signifikantes Ergebnis (**), und trägt die einen Antagonismus anzeigende Farbe Orange. Die kombinierte Gabe aus 1 nM AC220 mit 7 μ M RGFP966 wird in der tabellarischen Signifikanzaufstellung mit sehr hoher Signifikanz (****) bzw. ns deklariert. Die mit Combenefit erstellte Abbildung gibt einen Score von 10 und eine leicht Blaue Farbe an und wird als signifikant (*) dargestellt. Zu erklären ist der Signifikanzunterschied

durch die bereits in der Einzelbehandlung unterschiedlich starke Verteilung der Zellen in der subG1-Phase.

Die Ergebnisse aus Abb. 16-A und -B wurden analog auch als Vitalitäts-Messung durchgeführt (s. Abb. M und N), um die Ergebnisse der Zellzyklus-Messung mit einem anderen durchflusszytometrischem Messverfahren vergleichen zu können. Wie bereits bei der Vitalitäts-Messung mit FK228 (s. Abb. C), steigt auch hier der Anteil an noch vitalen Zellen bei hohen Kombinationsdosen von AC220 mit RGFP966 wieder an. Es lässt sich vermuten, dass das System zu unempfindlich ist um gewisse Unterschiede noch detektieren zu können. Dadurch, dass so keine verwendbaren Schlussfolgerungen aus Kombinationen der angewandten Inhibitoren in hohen Konzentrationen gezogen werden konnten, wurde auch im Fall der RGFP966-Versuchsreihe die Darstellung der Ergebnisse vorrangig auf die Zellzyklus-Messungen gelegt. Dennoch zeigt Abb. N sowohl im oberen als auch im unteren Abschnitt tendenziell ähnliche Ergebnisse zur Zellzyklusmessung an, nämlich im oberen Bereich keinen Synergismus und im unteren einen teilweise vorliegenden Synergismus.

Zusammenfassend zeigen die durchflusszytometrischen Analysen der Kombinationen aus AC220 mit RGFP966, dass in Dosen von über 5 μM RGFP966 eine synergistische Wirkung vorliegt. Allerdings fällt diese deutlich schwächer aus als mit FK228. Die aus der Dosisreihe gezogene Hypothese, dass die Kombination aus AC220 und RGFP966 antagonistisch wirkt, konnte aufgrund der Dosissteigerung von RGFP966 widerlegt werden. Bei den im Rahmen der Dissertation verwendeten Inhibitoren wurde FK228 im Bereich von nM verwendet, RGFP966 dagegen in μM , was einer Differenz um das 1000-fache entspricht. Auch Wells et al. (2013) haben in ihrer Versuchsreihe FK228 im nM-Bereich und RGFP966 im μM -Bereich verwendet. Damit wird die hier festgestellte Beobachtung bestätigt, dass die subG1-Population durch FK228 in stärkerem Maße generiert wird als mit RGFP966. Allgemein konnte in der vorliegenden Arbeit durch die HDACi eine Anreicherung der Zellen in der S-Phase beobachtet werden, wobei diese Zunahme am stärksten bei der Behandlung mit FK228 ausfällt. Der von Pietschmann et al. (2012) erzeugte starke Synergismus mit LBH589 konnte durch die Behandlung der Zellen mit RGFP966 nicht erreicht werden. Hierbei stellt sich nun die Frage, ob der im Gegensatz zu LBH589 und FK228 erreichte schwache Synergismus mit RGFP966 dadurch erzielt wird, dass nur eine einzige HDAC gehemmt wird oder ob HDAC3 allgemein bei der Generierung des Synergismus keine wichtige Stellung einnimmt.

4.7 Zelluläre Effekte der Kombinationsbehandlungen auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analysen

Auch bei der Behandlung der MV4-11 Zellen mit AC220 und RGFP966 wurden Proteine mit Hilfe von Western-Blots nachgewiesen, um die antagonistischen und synergistischen Wirkungen besser verstehen zu können. Die im Folgenden abgebildeten Western-Blots zeigen zu Beginn die Dosen der Einzelbehandlungen, welche auch in den Kombinationsdosen verwendet wurden. Die angewandten Dosen von AC220 und RGFP966 basieren auf den Ergebnissen aus Abb. 16-E. Dabei wurde eine antagonistisch wirkende Kombination (markiert durch die Farbe Orange), eine Kombination die weder synergistisch noch antagonistisch wirkt (markiert durch die Farbe Grün) sowie synergistisch wirkende Kombinationen (markiert durch die Farbe Blau) ausgewählt. Die vier synergistisch wirkenden und durch die Farbe Blau dargestellten Kombinationsdosen weisen unterschiedliche Stärken des Synergismus auf. Die dabei u.a. verwendete Kombination aus 3 nM AC220 mit 6 μ M RGFP966 generiert den stärksten ermittelten Synergismus.

4.7.1 Kombinationsbehandlung der Zellen mit AC220 und RGFP966 zeigt synergistische Wirkung gegenüber FLT3 und ERK

Als erstes wurden Proteine detektiert, welche für die Inhibition des bei der AML mutierten FLT3-Rezeptors von Interesse sind. Dabei handelt es sich sowohl um FLT3 selber, als auch um dessen typische Schlüsselproteine ERK1 und ERK2 (Small, 2006). Abb. 17 zeigt, dass sich nach Behandlung mit 3 nM AC220 die Phosphorylierung von FLT3 an Tyr591 um etwa 41,3 % bei beiden Banden im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Die Behandlung mit RGFP966 erzeugt ab 2 μ M eine Abschwächung der Phosphorylierung um etwa 57,8 %. Mit 7 μ M RGFP966 verbleibt bei FLT3 nur noch eine Phosphorylierung von etwa 3,8 %. Bei den Kombinationsbehandlungen sieht man bei 3 nM AC220 mit 0,75 μ M RGFP966 im Vergleich zu den anderen Behandlungen in Kombination die Banden am deutlichsten. Trotz oranger Farbe, also antagonistischer Wirkung, ist nur eine Phosphorylierung von etwa 1 % nachweisbar. Bei der Betrachtung von pan-FLT3 fällt im Verlauf der Einzelbehandlung mit 1 nM bis 3 nM eine Zunahme der oberen, hyperglykosylierten Bande auf, was wieder die Verlagerung des FLT3-ITD-Rezeptors vom endoplasmatischen Retikulum zur Zelloberfläche anzeigt (s. Kap. 4.2.1). So nimmt die obere Bande von pan-FLT3 bei 1 nM AC220 um das 2,9-fache, mit 3 nM sogar um das 3,6-fache zu. Mit RGFP966 dagegen nimmt die Intensität

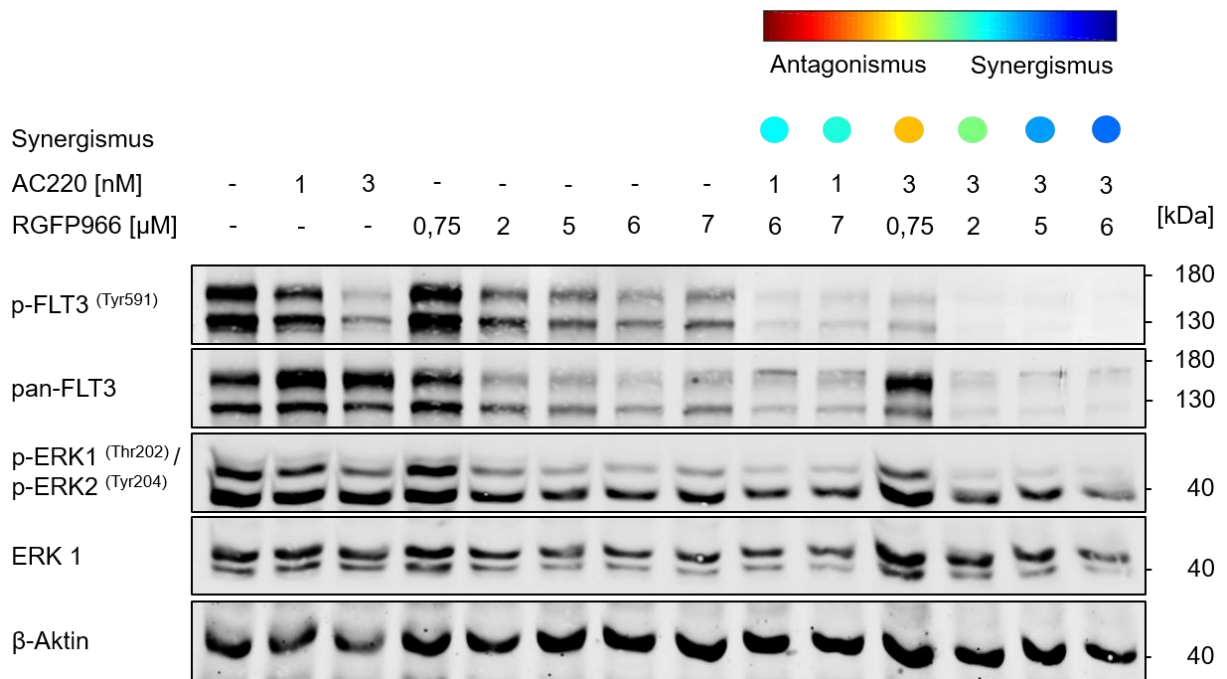


Abbildung 17: Western-Blot-Analyse von Schlüsselproteinen des FLT3-Signalwegs in MV4-11 Zellen nach Behandlung mit AC220 und/oder RGFP966 für 24 h

Gezeigt sind p-FLT3^(Tyr591), pan-FLT3, p-ERK1^(Thr202), p-ERK2^(Tyr204) und ERK1. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet. Die farbliche Darstellung der pharmakologischen Interaktion beider Inhibitoren basiert auf Abb. 16-E.

beider Banden von pan-FLT3 mit steigender Konzentration ab. Bei 2 μM RGFP966 verbleibt nur eine Bandenintensität von etwa 42,3 %, bei 7 μM nur noch 4,4 %. Auch bei pan-FLT3 wirkt sich die gemeinsame Gabe von 3 nM AC220 mit 0,75 μM RGFP966 am stärksten antagonistisch aus, da die Proteinbanden von pan-FLT3 mit einer verbleibenden Intensität von 4,9 % am stärksten sichtbar sind verglichen mit allen anderen Kombinationsdosen. Die Phosphorylierung von ERK1 an Thr202 und ERK2 an Tyr204 reduziert sich bei den dargestellten Einzeldosen an AC220 minimal bzw. bleibt mit der Kontrolle vergleichbar. RGFP966 dagegen bewirkt ab 2 μM eine Veränderung der Phosphorylierung von ERK1 und ERK2. Diese nimmt um etwa 63,1 % ab. Mit 7 μM RGFP966 verbleibt bei ERK1 und ERK2 nur noch eine Phosphorylierung von etwa 3,9 %. Bei den synergistischen Kombinationsbehandlungen nimmt die Intensität der Banden stark ab, sie reduziert sich um etwa 96,5 %. Die Intensität der ERK1-Bande zeigt mit 3 nM AC220 eine 2,1-fache Verstärkung. Mit 2 μM RGFP966 sinkt die Intensität an ERK1 um ca. 31,5 %. Die Kombinationsbehandlung aus 3 nM AC220 mit 5 μM RGFP966 erzielt eine Senkung des Bandensignals von ERK1 um etwa 90,8 % im Vergleich zur Kontrolle.

Zusammenfassend zeigt Abb. 17, dass nach Kombinationsbehandlungen die Bandensignale mit dem in der Legende angegebenen Synergismus bzw. Antagonismus über-

einstimmen. FLT3 und ERK werden sowohl in der phosphorylierten-, als auch in der pan-Variante, in den als synergistisch markierten Kombinationen, reduziert.

4.7.2 Hemmung von WEE1 und CHK1 im Bezug zum G2/M-Kontrollpunkt durch kombinierte Behandlung in MV4-11 Zellen von AC220 und RGFP966

Auch bei der Behandlung mit AC220 und RGFP966 wurde nach Schlüsselproteinen des G2/M-Kontrollpunkts geschaut. Mitbeteiligt an der Regulation des G2/M-Kontrollpunkts sind die Proteine WEE1 und CHK1, welche bei DNA-Schäden durch Phosphorylierung aktiviert werden (Do et al., 2013).

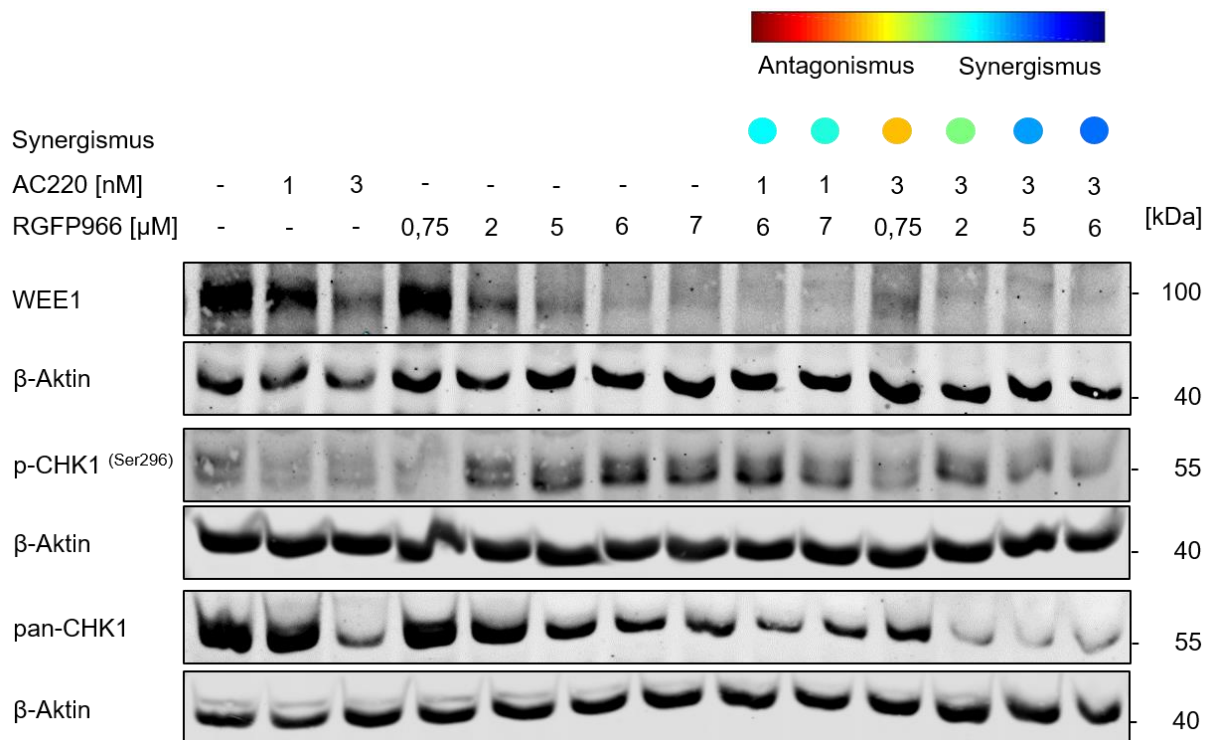


Abbildung 18: Western-Blot-Analyse von Regulatorproteinen des G2/M-Kontrollpunkts des Zellzyklus in MV4-11 Zellen nach Behandlung mit AC220 und/oder RGFP966 für 24 h

Die oben aufgeführten Proteine werden gezeigt. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet. Die farbliche Darstellung der pharmakologischen Interaktion beider Inhibitoren basiert auf Abb. 16-E.

Abb. 18 zeigt, dass die Menge an WEE1 nach Behandlung mit 3 nM AC220 im Vergleich zur Kontrolle abnimmt. Nach Behandlung mit RGFP966 ist ab 2 µM eine deutliche Abschwächung zu beobachten. Bei allen angewandten Kombinationsdosen sind deutliche Reduktionen an WEE1 zu erkennen, nur bei der antagonistisch wirkenden Kombination (markiert durch die Farbe Orange) ist wieder ein etwas stärkeres Signal im Vergleich zu den anderen kombinierten Dosen zu sehen. Auffällig ist hierbei jedoch, dass das Signal an WEE1 bei der Kombination aus 3 nM AC220 mit 0,75 µM RGFP966 deutlich schwächer ausfällt als durch die jeweiligen Einzelbehandlungen

vermutet. Die Phosphorylierung von CHK1 an Ser296 zeigt in Einzelbehandlung mit AC220 keine Induktion, sondern eine abnehmende Bandenintensität im Vergleich zur Kontrolle. Bei Einzelbehandlung mit RGFP966 dagegen ist ab 2 μM eine Induktion an p-CHK1^(Ser296) sichtbar. In Kombination ist das Signal der Phosphorylierung bei 1 nM AC220 mit 6 μM und 7 μM RGFP966 sowie bei 3 nM AC220 mit 2 μM RGFP966 zu erkennen. Nach Behandlung mit 3 nM AC220 und 5 μM bzw. 6 μM RGFP966 dagegen sinkt die Menge an p-CHK1^(Ser296) wieder im Vergleich zu den davor genannten Kombinationsdosen. Das Bandensignal von pan-CHK1 stellt sich im Verlauf im Gegensatz zu p-CHK1^(Ser296) anders dar. Die Intensität an pan-CHK1 sinkt stark ab 3 nM AC220. Bei 0,75 μM RGFP966 ist das Signal mit der Kontrolle vergleichbar. Mit ansteigender Konzentration an RGFP966 sinkt die Intensität an pan-CHK1, ist bei 7 μM RGFP966 aber immer noch vorhanden. Die Kombinationen aus 3 nM AC220 mit 2 bzw. 5 bzw. 6 μM RGFP966 zeigen im Vergleich zu den Einzelbehandlungen ein schwächeres Signal und deuten damit eine synergistische Wirkung an.

Die Analyse der an der Regulierung des G2/M-Kontrollpunkts beteiligten Proteine zeigt, dass es in Kombination mit 1 nM AC220 zur leichten, mit 3 nM AC220 zur deutlichen Reduktionen der Bandenintensitäten von pan-CHK1 und WEE1 kommt. Generell fällt auf, dass das Signal von pan-CHK1 bei allen Kombinationsversuchen schwächer ausfällt als in den Einzelversuchen. Bei p-CHK1^(Ser296) dagegen ist eine Reduktion des Bandensignals nach Kombinationen aus 3 nM AC220 mit 5 bzw. 6 μM RGFP966 zu sehen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das synergistische Potential von RGFP966 im Gegensatz zur Behandlung mit FK228 deutlich geringer ausfällt.

4.7.3 RGFP966 induziert p21^(Cip1/Waf1), in Kombination mit AC220 ist kein Signal an p21^(Cip1/Waf1) detektierbar

Die Beobachtung eines möglichen DNA-Schadens aufgrund der Aktivierung von p-CHK1^(Ser296) (Abb. 18) durch die Behandlung mit AC220 und RGFP966 führte zu der Frage nach möglichen Veränderungen der am Zellzyklus beteiligten Proteine p53 und p21^(Cip1/Waf1).

Die Phosphorylierung von p53 an Ser15 in Abb. 19 reduziert sich bei 3 nM AC220 im Vergleich zur Induktion bei 1 nM AC220. Durch die Behandlung mit RGFP966 zeigt sich bei 0,75 μM ein sehr starkes Signal an p-p53^(Ser15), welches sich ab 2 μM deutlich reduziert. In Kombination reduziert bzw. erhöht sich das Signal entsprechend des angegebenen Synergismus bzw. Antagonismus. Das Signal an pan-p53 ähnelt stark dem

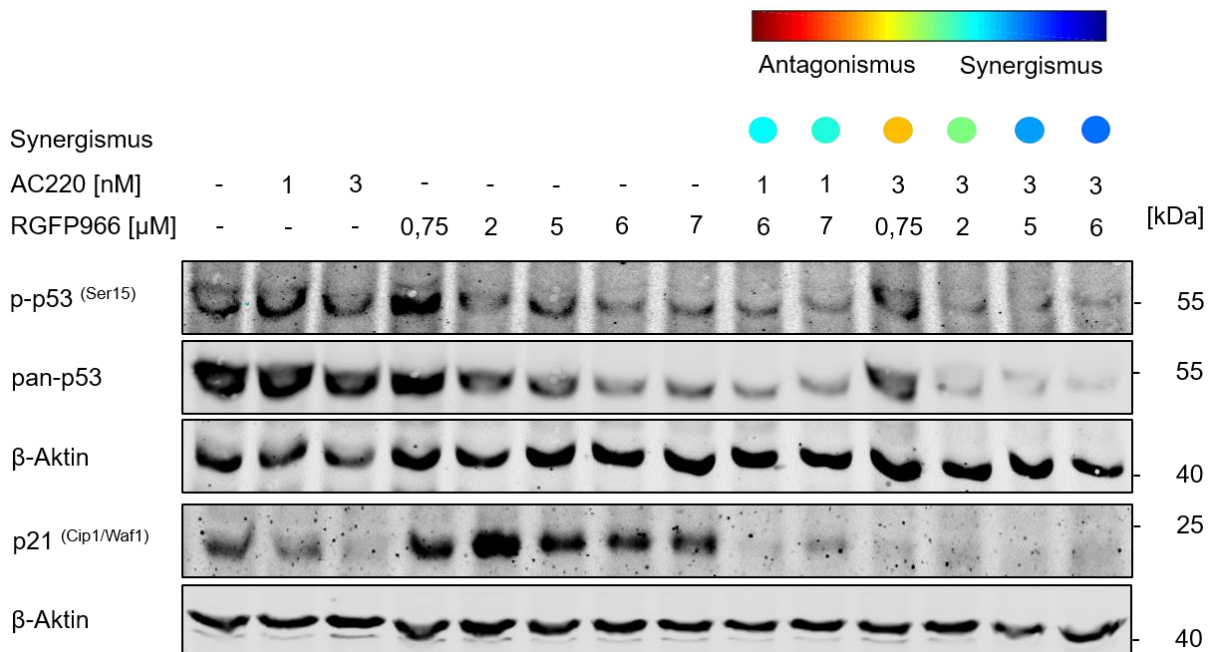


Abbildung 19: Western-Blot-Analyse von am Zellzyklus beteiligten Proteinen in MV4-11 Zellen nach Behandlung mit AC220 und/oder RGFP966 für 24 h

Die oben aufgeführten Proteine werden gezeigt. Als Ladekontrolle diente β-Aktin. Die farbliche Darstellung der pharmakologischen Interaktion beider Inhibitoren basiert auf Abb. 16-E.

beschriebenen Verlauf von p-p53^(Ser15), mit dem Unterschied einer schwächeren Reduktion der Intensität von pan-p53 bei 3 nM AC220. Das Signal von p21^(Cip1/Waf1) bei der Einzelbehandlung mit AC220 nimmt im Vergleich zur Kontrolle ab. Der HDACi dagegen induziert p21^(Cip1/Waf1) in hohem Maße, besonders stark bei 2 μM RGFP966. Bei sämtlichen untersuchten Kombinationsdosen ist kaum p21^(Cip1/Waf1) detektierbar, was einen Nachweis für den ermittelten Synergismus darstellt. Mit 1 nM AC220 ist p21^(Cip1/Waf1) detektierbar, mit 6 μM RGFP966 ist das Protein deutlich induziert. Die Kombination aus 1 nM AC220 mit 6 μM RGFP966 dagegen weist ein kaum mehr sichtbares Signal an p21^(Cip1/Waf1) auf.

Im Gegensatz zur Behandlung mit FK228 wird p-p53^(Ser15) durch RGFP966 bereits ab 2 μM reduziert. Dies macht einen Unterschied zwischen den HDACis FK228 und RGFP966 deutlich. Für HDACis typisch zeigt sich in Abb. 19 außerdem eine hohe Induktion an p21^(Cip1/Waf1). Daraus lässt sich vermuten, dass die Zelle nach Behandlung mit RGFP966 den Zellzyklus anhält um Reparaturmechanismen einzuleiten, während sämtlich getestete Kombinationsbehandlungen kein p21^(Cip1/Waf1) aufweisen. Folglich stellt sich die Frage, ob der Synergismus bei den Kombinationsbehandlungen aus RGFP966 mit AC220 für das fehlende p21^(Cip1/Waf1)-Signal verantwortlich ist.

4.7.4 Erhöhte Induktion von p-RPA^(Thr21) und γ H2AX^(Ser139) bei gemeinsamer Gabe von AC220 und RGFP966

Falls durch die Kombinationsgabe aus AC220 und RGFP966 der DNA-Schaden in erhöhtem Maße aktiviert wird, was auf Grundlage von Abb. 19 vermutet wird, müssten Schlüsselproteine der DDR induziert werden. Dazu gehören u.a. RPA (Maya-Mendoza et al., 2018) und H2AX (Rogakou et al., 1998).

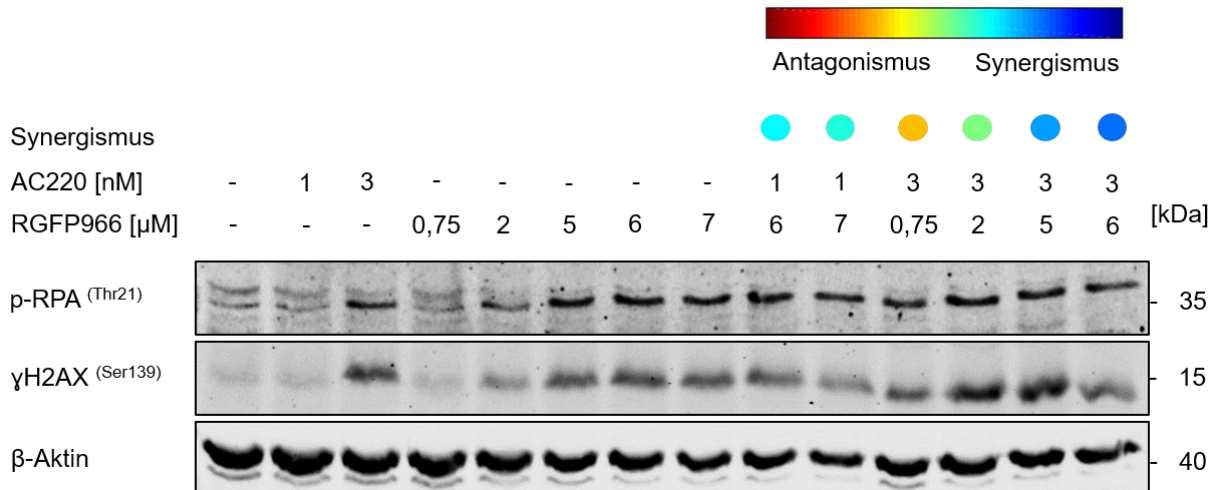


Abbildung 20: Western-Blot-Analyse von Schlüsselproteinen der DDR in MV4-11 Zellen nach Behandlung mit AC220 und/oder RGFP966 für 24 h

Gezeigt sind p-RPA^(Thr21) und γ H2AX^(Ser139). Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Die farbliche Darstellung der pharmakologischen Interaktion beider Inhibitoren basiert auf Abb. 16-E.

Vergleicht man in Abb. 20 den Verlauf der Induktion der beiden detektierten Proteine, zeigt sich ein sehr ähnliches Muster. Die Phosphorylierung von RPA an Thr21 und von H2AX an Ser139 verstärkt sich deutlich bei 3 nM AC220. Auch ab 2 μ M RGFP966 nimmt die Induktion zu. Bei allen angewandten Kombinationsdosen ist ein Signal detektierbar. Bei γ H2AX^(Ser139) ist die Intensität der Bande mit 3 nM AC220 in Kombination mit 2 und 5 μ M RGFP966 besonders deutlich zu sehen, obwohl die erstgenannte Kombination nicht synergistisch ist (markiert durch die Farbe Grün).

Die in Abb. 20 detektierten Proteine unterstützen die Vermutung, dass DNA-Schäden induziert werden. Daraus lässt sich mutmaßen, dass die Zellen Mechanismen wie Reparatur oder Apoptose einleiten.

4.7.5 Erhöhtes aktivierte Caspase 3-Signal als Resultat der Kombination aus AC220 und RGFP966 in MV4-11 Zellen

Infolge der erhöhten Induktion an DDR-Proteinen (s. Abb. 20) wurde geschaut, ob die DNA-Schäden so groß sind, dass die Zellen den Zelltod einleiten. Dafür wurde nach der Aktivität von Caspase 3 geschaut. Ausstehend bei der Versuchsreihe mit

RGFP966 ist noch der Nachweis der Wirksamkeit des HDAC3is. Dies kann an einer erhöhten Induktion der Acetylierung an Histon 4 nachgewiesen werden, welches vornehmlich an Lysin 5 acetyliert wird nach Behandlung mit RGFP966 (Liu et al., 2005).

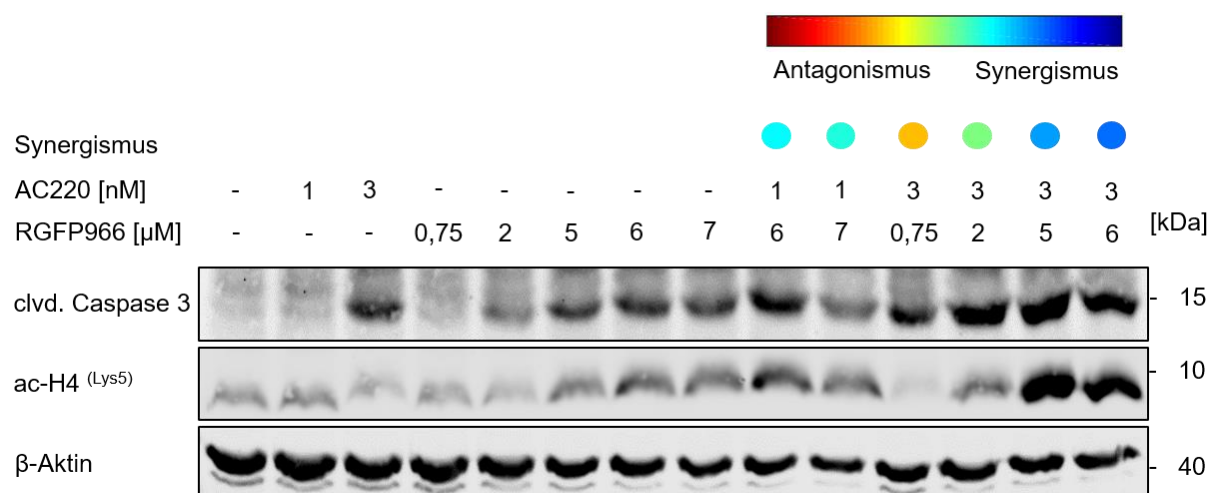


Abbildung 21: Western-Blot-Analyse von Apoptose- und HDACi-Markern in MV4-11 Zellen nach Behandlung mit AC220 und/oder RGFP966 für 24 h

Gezeigt sind clvd. Caspase 3 und ac-H4^(Lys5). Als Ladekontrolle diente β-Aktin. Die farbliche Darstellung der pharmakologischen Interaktion beider Inhibitoren basiert auf Abb. 16-E.

Der Apoptosemarker aktivierte Caspase 3 (Tanimoto et al., 2017) weist bei 3 nM AC220 und ab einer Behandlung mit 5 μM RGFP966 ein deutlich stärkeres Signal auf im Vergleich zur Kontrolle. Die Kombinationsbehandlung bestehend aus 3 nM AC220 und 5 μM RGFP966 bspw. zeigt eine viel höhere Induktion im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen und ist damit eine Bestätigung der synergistischen Wirkung der genannten Kombination. Interessanterweise zeigt sogar schon die als nicht synergistisch gekennzeichnete (markiert in der Farbe Grün) Kombination aus 3 nM AC220 mit 2 μM RGFP966 ein deutlich stärkeres Bandensignal an aktivierter Caspase 3 als die Einzelbehandlungen der genannten Kombination. Die Wirksamkeit des HDACi RGFP966 wurde anhand der Acetylierung von H4 an Lys5 belegt. Die Stärke der Bande nimmt bei der Einzelbehandlung mit RGFP966 ab 5 μM zu und zeigt sich bei den beiden letzten aufgetragenen Kombinationsbehandlungen am stärksten. Genau diese beiden Kombinationen aus AC220 und RGFP966 sind von den sechs ausgewählten diejenigen mit dem stärksten Synergismus. Somit kann auch anhand von ac-H4^(Lys5) der Synergismus von 3 nM AC220 mit 5 bzw. 6 μM RGFP966 bestätigt werden.

Ein verstärktes Signal an aktivierter Caspase 3 ist bei fast allen Kombinationsdosen gegeben im Vergleich zur Kontrolle. Es lässt sich vermuten, dass die Zelle aufgrund des hohen Schadens durch die Behandlung mit AC220 und RGFP966 die Apoptose einleitet.

5 Diskussion

5.1 Inhibition von HDACs der Klasse I wirkt synergistisch mit der Inhibition von FLT3 in FLT3-ITD-positiven Zellen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei einer Kombinationsbehandlung aus dem FLT3i AC220 und dem HDACi FK228 nach 24 h die Wirkung synergistisch ist. Auch bei der Kombination aus AC220 und dem HDAC3i RGFP966 wurde eine synergistische Wirkung nachgewiesen. In der nachweislich synergistischsten Dosis wurde gezeigt, dass die subG1-Population verdreifacht wurde. Damit kann der von Pietschmann et al. (2012) veröffentlichte Synergismus zwischen einem FLT3i und einem pan-HDACi in FLT3-ITD Zellen bestätigt bzw. ergänzt werden. Die vorliegenden Ergebnisse konkretisieren die Ergebnisse von Pietschmann et al. (2012) dahingehend, dass HDACs der Klasse I an dem Synergismus beteiligt sind. Bei den Daten dieser Dissertation zeigen sich im Vergleich von FK228 und RGFP966 aber Unterschiede bezüglich der Signifikanz des festgestellten Synergismus. Der durch das Programm CombeneFit ermittelte Synergismus erreicht mit FK228 einen max. Score von 49 (s. Abb. 6-E), während der Score bei der kombinierten Behandlung mit RGFP966 max. auf 27 ansteigt (s. Abb. 16-E). Außerdem ist zu beachten, dass RGFP966 in μM -Dosen eingesetzt wurde, FK228 dagegen in nM. Diese affinitätsbedingten Konzentrationseigenschaften zeigen einen weiteren Unterschied der beiden eingesetzten HDACis auf. Die in der Arbeit dargestellten Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass der Synergismus mit FK228 deutlich stärker ausfällt als mit RGFP966. Eine Behandlung mit 6 μM RGFP966 zeigt schon eine starke Wirkung auf MV4-11 Zellen mit über 60 % der Zellen in der subG1-Phase (s. Abb. 16-A). Erst ab dieser Dosis konnte in Kombination mit AC220 ein Synergismus erreicht werden. Untersuchte niedrigere Dosen an RGFP966 dagegen zeigten keine synergistische Wirkung mit AC220. Daher fällt der Synergismus wahrscheinlich generell schwächer mit RGFP966 als mit FK228 aus. Dies deutet auf eine Relation der Menge der gehemmten HDACs zur Stärke des Synergismus hin. Zu beachten ist außerdem bei RGFP966, dass die Messbarkeit am Durchflusszytometer dahingehend erschwert wird, dass für die Ermittlung synergistischer Wirkungen hohe Dosen an RGFP966 verwendet werden müssen, sodass eine Steigerung der subG1-Population im Vergleich der Einzel- und Kombinationsbehandlung schwerer nachweisbar ist. Optimale kombinierte Wirkungen mit FK228 dagegen zeichnen sich durch geringe Dosen in Einzelbehandlung mit subG1-Populationen von < 6 % bzw. < 22 % ab (s. Abb. 6-A). Gestützt wird die Synergismushypothese auch durch die Tatsache, dass

das Signal an aktivierter Caspase 3 in Kombinationsbehandlung von AC220 mit FK228 bzw. RGFP966 deutlich an Intensität zunimmt im Vergleich zur Einzelbehandlung (s. Abb.11 u. 21). Auch die verstärkte Induktion an ac-H3^(Lys14) in Kombination mit FK228 bzw. ac-H4^(Lys5) in Kombination mit RGFP966 befürworten den ermittelten Synergismus (s. Abb.11 u. 21). Interessant an dem verstärkten Signal der acetylierten Histone ist die Tatsache, dass in Folge einer Behandlung mit AC220 keine Acetylierung von Proteinen durchgeführt wird, was im Kontrast zu der Behandlung mit HDACis steht. Daraus lässt sich schließen, dass die Inhibition der HDAC-Klasse I MV4-11 Zellen anfälliger macht gegenüber der Behandlung mit AC220 oder umgekehrt. Da die Zellen immer gleichzeitig mit dem FLT3i und HDACi behandelt wurden, kann nicht gesagt werden, in welcher Reihenfolge die Sensitivierung und Potenzierung ausfällt. Daher würde es sich anbieten, eine zeitversetzte Gabe der Inhibitoren zu untersuchen, bei der geschaut wird, ob der FLT3i durch den HDACi an inhibitorischer Potenz gewinnt oder umgekehrt oder ob eine zeitversetzte Behandlung mit beiden Inhibitoren gar keinen Unterschied macht.

Der Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit den Ergebnissen der Arbeit von Pietschmann et al. (2012) zeigt, dass die dort ermittelten Ergebnisse bezüglich der Konzentrationen des FLT3i AC220 vergleichbar sind mit den hier vorliegenden Untersuchungen. Im veröffentlichten Artikel wurden optimale Ergebnisse des pan-HDACi in Kombination mit 2 nM AC220 erzielt. Dabei wurde eine Steigerung der subG1-Population nach Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Einzelbehandlung um etwa das 4,5-fache erzielt. Auch die in dieser Arbeit gezeigten synergistischen Wirkungen wurden nach Behandlung mit 2 nM und 3 nM AC220 als optimal angesehen. Die Zunahme der Zellanzahl in der subG1-Phase bei Pietschmann et al. (2012) lässt sich dadurch erklären, dass LBH589 ein pan-HDACi ist. Im Vergleich lässt sich festhalten, dass eine Hemmung aller HDACs eine Steigerung um etwa das 4,5-fache erzeugt (2 nM AC220 mit 10 nM LBH589), eine Hemmung der Klasse I der HDACs eine 3-fache Erhöhung (2 nM AC220 mit 3 nM FK228) und eine Hemmung von HDAC3 eine 1,5-fache Steigerung (3 nM AC220 mit 6 µM RGFP966) der subG1-Population in kombinierter Gabe mit AC220. Somit zeigt sich, dass je mehr HDACs gehemmt werden, umso stärker fällt der Synergismus einer Kombinationsbehandlung aus. Aus den zusammengefassten Ergebnissen zeigt sich, dass FK228 gegenüber LBH589 mit der Hemmung nur einer Klasse der HDACs eine beachtliche Akkumulation an Zellen in der subG1-Phase generiert. Vergleicht man dafür die Entwicklung der subG1-Population bei steigenden

Dosen der Kombinationsbehandlungen, erzielt FK228 mit einer 3-fachen Erhöhung fast 67 % der Steigerung von LBH589. Folglich zeigt sich bei FK228 ein günstigeres Verhältnis zwischen der Menge der gehemmten HDACs und der Höhe der erreichten subG1-Population im Vergleich zu LBH589. Bei Betrachtung der Kombinationsbehandlung mit AC220 ist denkbar, dass durch FK228 mit der Hemmung nur einer HDAC-Klasse geringere Nebenwirkungen in Patienten möglich wären als mit der Hemmung aller HDACs, da die Inhibition spezifischer und damit weniger toxisch ist. Die Korrelation zwischen der Menge der gehemmten HDACs und der Höhe der subG1-Population wurde auch schon von Bhaskara et al. (2008) bei Untersuchungen von murinen embryonalen Fibroblasten festgestellt und ähnelt den vorliegenden Untersuchungen. Damit kann diese Beobachtung auf zwei Entitäten bezogen werden.

Die vorliegenden Versuche zeigen in Übereinkunft mit der Literatur, dass die Behandlung FLT3-ITD-positiver AML-Zellen durch eine Kombinationsbehandlung von FLT3i mit HDACi als vielversprechende Behandlungsmethode angesehen werden kann. Dabei wird der FLT3i AC220, welcher bereits in klinischen Studien untersucht wurde (Cortes et al., 2013, Cortes et al., 2018), in Kombination mit dem HDACi FK228 im Gegensatz zu RGFP966 favorisiert, da MV4-11 Zellen deutlich sensitiver gegenüber Kombinationen aus AC220 und FK228 reagieren als auf die Einzelbehandlung. Es besteht die Möglichkeit, dass die Dosis von 2 nM AC220 so gering ist, dass bei Patienten keine toxischen Nebenwirkungen entwickelt werden. Versuchsreihen mit Mäusen haben gezeigt, dass eine orale Gabe von AC220 mit 10 mg/kg nach 2 h einen max. Plasmaspiegel von 3,8 µM erreicht. Die Aktivität des FLT3-ITD-Rezeptors war nach Gabe der genannten Menge nach 2 h zu 90 %, nach 24 h zu 40 % inhibiert (Zarrinkar et al., 2009). In Bezug auf die vorliegende Arbeit wäre es von Interesse herauszufinden, welcher Plasmaspiegel durch Kombinationen von 2 nM AC220 mit FK228 erreicht werden und wie stark die Inhibition nach unterschiedlichen Behandlungszeiten ausfällt. Mit solch einem Versuch könnte der Vorteil einer Kombinationsbehandlung von AC220 mit HDACi durch synergistische Wirkung im Vergleich zur Einzelbehandlung mit FLT3i bekräftigt werden. Außerdem könnte der als optimal ermittelte Wirkbereich von 2 nM AC220 mit 3 nM FK228 der *in vitro*-Untersuchungen auf *in vivo*-Versuche spezifiziert bzw. angepasst werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die synergistische Wirkung von AC220 in Kombination mit FK228 in dem Zeitraum zwischen 16 h und 24 h nach der Behandlung der Zellen eintritt (s. Abb. 6, 15 u. H-J). Nach einer 16-stündigen Behandlung zeigen weder der

FLT3i, noch der HDACi in Einzelbehandlung eine derartige Steigerung der subG1-Population (s. Abb. 15), wie sie nach einer 24-stündigen Behandlung vorzufinden ist (s. Abb. 6). Die Toxizität der Inhibitoren ist noch nicht messbar, es kommt nach 16 h auch zu keiner signifikanten synergistischen Wirkung (s. Abb. H-J). Um den genauen Zeitpunkt des Eintritts des Synergismus konkreter zu ergründen, könnte die unter Kap. 4.1 und 4.5 durchgeführte Versuchsreihe nach einer Behandlung von beispielsweise 20 h via Durchflusszytometrie über die Messung der Induktion der Fragmentierung erfolgen oder allgemein eine Zeitreihe dazu untersucht werden. Daraus rückschließend könnten Versuche via Western-Blot durchgeführt werden, allerdings zu einem früheren Zeitpunkt als der ermittelte Eintritt des Synergismus. Der verantwortliche Mechanismus für die synergistische Wirkung muss bereits vorher eintreten, sonst würde es nicht zur Akkumulation der Zellen in der subG1-Phase kommen.

Zur Bestätigung des ermittelten Synergismus, könnte im nächsten Schritt ein Knockdown der HDACs 1, 2 oder 3 mit Hilfe von siRNA erfolgen. Der Nachweis des Synergismus würde sich darin zeigen, dass die siRNA-veränderten Zellen empfindlicher gegenüber der Behandlung mit AC220 reagieren, im Vergleich zu Zellen ohne HDAC Knockdown. Chou et al. (2011) konnten in ihren Versuchen durch eine Ausschaltung von HDAC1-3 zeigen, dass diese überlebenswichtig für mutierte EGFRs in Kolonkarzinomen sind. Durch die Ausschaltung von HDAC3 verblieben mehr Zellen in der S- und der G2-Phase als durch die Ausschaltung von HDAC1 und HDAC2. Durch einen Knockdown könnte somit spezifischer geschaut werden, welche Inhibition der HDACs der Klasse I (HDAC1, 2 o. 3) eine für den Synergismus mit AC220 relevante Rolle spielt. Auch die Wichtigkeit von HDAC1 und HDAC2 in Bezug auf die Veränderung der Zellzykluspopulationen könnte ermittelt werden, indem untersucht wird, welche HDAC die gleiche Verteilung an Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen bewirkt. Die Spezifizierung, welche HDACs wirklich an der synergistischen Wirkung beteiligt sind, kann mit Hilfe eines Knockdowns erfolgen, da auch mehrere siRNAs pro Versuchsreihe eingeschleust werden können. So kann bspw. ein Knockdown von HDAC1 und HDAC2 gleichzeitig untersucht werden. Es könnte somit auch herausgefunden werden, inwiefern die Kombination aus mehreren HDACs benötigt wird oder welcher Unterschied zwischen der Hemmung von HDAC1 und HDAC2 bzw. deren Kombination besteht. Zusammengefasst könnte somit die Menge der für den Synergismus benötigten HDACs auf ein Minimum reduziert werden.

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob die Hemmung anderer HDAC-Klassen oder spezifischer HDACs, wie z.B. HDAC6, in Kombination mit FLT3i eine synergistische Wirkung hervorruft. Folglich könnten Versuchsreihen mit anderen HDACis und anderen HDAC Knockdowns durchgeführt werden. Anhand dieser Versuche könnte herausgefunden werden, in wie fern die jeweiligen HDACs an der synergistischen Wirkung von pan-HDACis in Kombination mit AC220 beteiligt sind, welche bei Pietschmann et al. (2012) bereits festgestellt wurde. Es ist zu vermuten, dass je spezifischer die Inhibition der HDACs ausfällt, umso geringer fallen die Nebenwirkungen in Bezug auf die Toxizität aus. Jedoch sollte bei der Erforschung dieser Frage berücksichtigt werden, dass es nicht nur auf die Anzahl der gehemmten HDACs ankommt, sondern auch auf die erzeugte synergistische Wirkung. Zwar wäre anhand des in dieser Arbeit untersuchten Inhibitors RGFP966 die Hemmung auf nur eine HDAC begrenzt, jedoch fällt die synergistische Wirkung nicht stark genug aus, um die wahrscheinlich geringere Toxizität durch die Hemmung einer HDAC zu rechtfertigen im Vergleich zu anderen HDACis, welche mehrere HDACs hemmen. Außerdem ist in Bezug auf die Toxizität noch zu erwähnen, dass FLT3is in Einzelbehandlung wahrscheinlich nicht auf gesunde Zellen wirken, da der FLT3-Rezeptor nur in der Hämatopoese vorkommt. Kombinationsbehandlungen aus FLT3i und HDACi könnten folglich schädlich für das blutbildende System sein.

Durch die Versuche der vorliegenden Arbeit ist die Frage aufgekommen, inwiefern sich die ermittelten synergistischen Wirkungen in anderen Zelllinien auswirken. Zu untersuchen wäre, ob nur FLT3-ITD Zellen von der Kombination der Inhibitoren AC220 und FK228 beeinflusst werden, oder ob diese Inhibitoren auch auf nicht-mutierte Zellen wirken. In MOLM-13 Zellen, einer anderen FLT3-ITD Zelllinie, konnten Pietschmann et al. (2012) zeigen, dass auch in diesen Zellen starke synergistische Wirkungen zwischen AC220 und LBH589 auftreten. Weitere Zelllinien wie K562, ein Vertreter der chronisch myeloischen Leukämie ohne konstitutiv aktiven mutierten FLT3-Rezeptor, zeigten dagegen nur schwache Beeinflussungen durch die Inhibitorkombination. So lag die Apoptoserate bei sämtlich getesteten Konzentrationen von AC220 mit LBH589 unter 10 % bei anderen getesteten nicht-mutierten FLT3-ITD Zelllinien wie K562 (Pietschmann et al., 2012). Auf Grundlage der Ergebnisse von Pietschmann et al. (2012) kann spekuliert werden, dass auch mit der Kombination aus AC220 und FK228 der Synergismus spezifisch in FLT3-ITD Zellen generiert wird. In diesem Fall wäre dies ein positiver Aspekt in der Behandlung von AML-Patienten, da so anzunehmen ist,

dass durch die Kombinationsgabe von AC220 und FK228 nur FLT3-ITD Zellen angegriffen werden und keine gesunden. Außerdem könnte durch Untersuchungen mit MOLM-13 Zellen gezeigt werden, dass der Synergismus nicht nur ein zelllinien-spezifischer Effekt in MV4-11 Zellen ist, sondern spezifisch auf FLT3-ITD-positive Zellen wirkt.

5.2 AC220, FK228 und RGFP966 induzieren unterschiedliche Anteile der Zellen in den Zellzyklusphasen G1, S und G2

Es wurde per Durchflusszytometrie ermittelt, dass FLT3i und HDACi unterschiedliche Auswirkungen auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus haben. Die Behandlung von Zellen mit AC220 über 16 h und 24 h korreliert dabei immer mit einem deutlichen G1-Arrest der Zellen (s. z.B. Abb. 6-B). Mit steigender Dosis an AC220 reduziert sich dabei die Menge an p21^(Cip1/Waf1) (s. Abb. 9). Die Behandlung mit dem HDACi FK228 mit 5 nM über 24 h resultiert dagegen in einer etwa gleichen Aufteilung der Zellen in der G1- und G2-Phase mit 44,1 % bzw. 47,3 % (s. Abb. 6-B). Der große Anteil an Zellen in der G2-Phase könnte u.a. durch die hohe Induktion an p21^(Cip1/Waf1) bei der Behandlung mit FK228 im Zusammenhang stehen (s. Abb. 9), sowie mit der Induktion an pan-CHK1 (s. Abb. 8). Kombinationsbehandlung ab 3 nM AC220 mit FK228 zeigen, dass sich das Verteilungsmuster der Zellen in der G1- und G2-Phase mehr dem für den HDACi typischen Verteilungsmuster anpasst. Dies ist daran erkennbar, dass die prozentuale Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen mehr der Verteilung der Zellen nach Behandlung mit FK228 ähnelt als mit AC220. Auf Proteinebene zeigt sich dabei bei p21^(Cip1/Waf1) ein nur noch sehr schwach detektierbares Signal (s. Abb. 9). Nach einer 16-stündigen Behandlung mit 5 nM FK228 überwiegt der Zellanteil in der G2-Phase mit 56,7 % deutlich gegenüber dem in der G1-Phase mit 24,9 % (s. Abb. 15-B). Auch bei diesem Behandlungszeitraum zeigt sich in Kombination eine deutliche Tendenz der für FK228 typischen hohen Akkumulation der Zellen in der G2-Phase. Interessanterweise zeigt sich bei Betrachtung der S-Phase, dass der Anteil der sich in dieser Phase befindlichen Zellen bei FK228 nach 24 h höher ist als bei AC220, und dass die S-Phasen-Population bei Kombinationen mit 5 nM FK228 deutlich zunimmt (s. Abb. 6-B). Auch nach einer Behandlung von 16 h mit FK228 zeichnet sich der verstärkte Anteil an Zellen in der S-Phase bei den Kombinationsbehandlungen ab. Diese Beobachtung wirft die Vermutung auf, dass die Zellen vermehrt in die S-Phase übergehen, möglicherweise durch den Verlust des G1-Kontrollpunkts. Bestätigt bzw. beobachtet werden konnte diese Annahme jedoch nicht anhand der Immunfluoreszenz-

Analysen (s. Kap. 4.4). Dort ist der S-Phasen-Anteil nach Kombinationsbehandlung eher mit dem nach Behandlung mit AC220 vergleichbar. Fraglich ist hierbei, warum die Ergebnisse der Durchflusszytometrie und der Immunfluoreszenz bezüglich der Akkumulation der Zellen in der S-Phasen bei Kombinationsbehandlungen nicht übereinstimmen. Ein Unterschied der beiden Analysen besteht darin, dass die durchflusszytometrischen Daten Mittelwerte aus sechs Versuchen darstellen, während die Immunfluoreszenz zwei Mal durchgeführt wurde. Es würde sich anbieten, die Immunfluoreszenz-Analyse noch mindestens einmal durchzuführen. Möglicherweise lässt sich die Diskrepanz auch anhand des manuellen *Gatings* der Zellzyklusphasen bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erklären. Sollten diese Untersuchungen keine Kongruenz schaffen, sollte das Ergebnis der Immunfluoreszenz favorisiert werden, da hier aufgrund der geringeren untersuchten Zellzahl anzunehmen ist, dass diese Methode genauere Ergebnisse bezüglich der Zellen in der S-Phase liefert.

Die Behandlung mit RGFP966 zeigt, dass Zellen in der G1-Phase deutlich stärker vertreten sind als mit FK228 (s. Abb. 16-B). Vergleicht man jedoch die Zellzyklusanteile von RGFP966 mit AC220, zeichnen sich größere Anteile an Zellen in der S-Phase und der G2-Phase bei RGFP966 ab. Nach Kombinationsbehandlungen ab 3 nM AC220 mit 6 μ M RGFP966 oder mehr lässt sich wieder eine Dominanz des Verteilungsmusters von RGFP966 beobachten. Summa summarum lässt sich bezüglich der G1- und G2-Phasen-Anteile nach 24-stündiger Behandlung im Vergleich der drei Inhibitoren sagen, dass sich eine Abstufung der Zellen in der G1-Phase abzeichnet. Dabei generiert AC220 die größte G1-Population, bei RGFP966 fällt diese geringer aus als bei AC220. FK228 erzeugt die geringsten Zellanteile in der G1-Phase verglichen mit den beiden anderen. Vergleicht man zu der G1-Phasen Abstufung von AC220 über RGFP966 zu FK228 das Signal an p21^(Cip1/Waf1), fällt auf, dass AC220 das p21^(Cip1/Waf1)-Level stark reduziert. RGFP966 zeigt eine mittelstarke Induktion. Das stärkste Signal wird von FK228 generiert. Damit verhält sich die Menge der Zellen in der G1-Phase gegenteilig zur Menge an p21^(Cip1/Waf1). In mehreren Veröffentlichungen wurde bereits bestätigt, dass HDACis die Induktion von p21^(Cip1/Waf1) fördern (Ocker und Schneider-Stock, 2007). Diese Beobachtung wurde auch in den durchgeführten Western-Blot-Analysen deutlich (s. Abb. 9 u. Abb. 19). Weiterhin ist bekannt, dass p21^(Cip1/Waf1) durch Dephosphorylierung und damit Aktivierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) eine Akkumulation der Zellen in der G1-Phase erzeugen kann (Broude et al., 2007). Ebenfalls veröffentlicht wurde aber auch, dass p21^(Cip1/Waf1) im Zusammenhang mit einem zellulären

G2-Phase-Arrest stehen kann. Dabei ist wieder das Zusammenspiel aus p21^(Cip1/Waf1) mit Rb entscheidend (Niculescu et al., 1998). In Bezug auf die vorliegende Arbeit kann aus der Induktion von p21^(Cip1/Waf1) die Hypothese geschlussfolgert werden, dass p21^(Cip1/Waf1) mit einem erhöhten G2-Arrest der Zellen im Zusammenhang stehen könnte. Um genauere Rückschlüsse zum Mechanismus des G2-Arrests zu ziehen, könnte per Western-Blot-Analyse die Phosphorylierung von Rb untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die nach Behandlung generierten Anteile der Zellzyklusphasen der untersuchten HDACs gegenüber denen nach FLT3i-Behandlung durchsetzen. Ein Vergleich der Hemmung der HDACs 1-3 mit bereits veröffentlichten Versuchen zeigt, dass HDAC3 an Prozessen in der S-Phase beteiligt zu sein scheint, da ein Knockdown in embryonalen Fibroblasten dazu führt, dass die Zellen später als üblich in die G2-Phase übergehen (Bhaskara et al., 2008). Ebenfalls wurde ein Anstieg der Zellen in der S-Phase von Wells et al. (2013) durch HDAC3-Inhibition festgestellt. Damit wird der S-Phase-Anstieg auch in einer anderen Entität, nämlich in Zellen des kutanen T-Zell-Lymphoms, beobachtet und kann durch die hier vorliegenden Versuche in AML-Zellen belegt werden. Da das Protein HIRA in der Veröffentlichung von Mahajan et al. (2012) im Zusammenhang steht mit einer beobachteten Akkumulation von Zellen in der S-Phase, könnte die Detektion dieses Proteins mittels Western-Blot-Analyse eventuell mehr Aufschluss über den Grund der Anreicherung der Zellen in der S-Phase geben. Ein Zusammenhang zwischen bisher detektierten Proteinen und der Akkumulation der Zellen in der S-Phase konnte bislang nicht gefunden werden und bedarf daher genauerer Untersuchungen. Wilson et al. (2006) konnten in Kolonkarzinomzellen unterschiedliche Zellzyklusveränderungen zwischen der Hemmung von HDAC2 und HDAC3 feststellen. Während die Inhibition von HDAC2 sowohl einen G1-, als auch einen G2-Phase-Anstieg generiert, bewirkt die Hemmung von HDAC3 einen deutlichen G2-Arrest. Mit diesen Daten stimmen die hier vorliegenden Ergebnisse dahingehend überein, dass sich die Hemmung der HDAC-Klasse I und HDAC3 unterschiedlich ausprägt, sowohl die durchflusszytometrischen Untersuchungen, als auch die Western-Blot-Analysen betreffend. Die in der Literatur dargestellte Verteilung der Zellen in der G1- und der G2-Phase entspricht der hier vorliegenden Untersuchung von FK228. Allerdings erzeugt die Hemmung von HDAC3 durch RGFP966 eine weniger prägnante Zunahme der Population in der G2-Phase. Zu beachten ist hierbei, dass zwei unterschiedliche Entitäten miteinander verglichen werden, nämlich AML-Zellen, welche in der vorliegenden Dissertation genutzt wurden, mit Ko-

lonkarzinomzellen. Es wäre daher interessant, weitere Untersuchungen dazu durchzuführen, nicht nur auf unterschiedliche Entitäten, sondern auch auf unterschiedliche HDACs bezogen.

Aufgrund der erhöhten Population in der S-Phase wurde die Immunfluoreszenz-Färbung mit EdU-Einbau der Zellen durchgeführt (s. Kap. 4.4). Als Ergebnis der EdU-positiven Zellen wurde ermittelt, dass sich nach einer 16-stündigen Behandlung der Zellen mit AC220 ca. 50 % in der S-Phase befinden und mit FK228 ca. 70 % der Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Anzahl der EdU-positiven Zellen der Kombinationsbehandlung dagegen waren vergleichbar mit der Anzahl der EdU-positiven Zellen der Einzelbehandlung mit AC220 und entsprachen damit nicht der vermuteten Dominanz des HDACi. Eine interessante Beobachtung lieferte der Versuch dahingehend, dass sämtlich getestete Proben mit FK228 ungefähr doppelt so viele Zellkerne aufwiesen wie die Kontrollzellen. Die mit AC220 behandelten Zellen dagegen waren von der Zellkernanzahl her geringer vertreten als die Kontrollzellen. Durch diese Beobachtung stellt sich die Frage, ob der FLT3i einen schnelleren Zellzyklusstopp bewirkt als FK228 bzw. ob es durch die Behandlung mit dem HDACi zu einer Hyperproliferation der Zellen kommt. Die Hypothese der beschleunigten Proliferation wurde aufgestellt, weil in allen Proben die gleiche Menge an Zellen ausgesät wurde und trotzdem die Zellzahl auffälliger Weise zwischen den Proben voneinander abwich. Um diese Fragestellung zu beantworten, wäre es von Interesse zu wissen, wie viele Zellzyklen die Zellen nach der Behandlung mit AC220 bzw. FK228 noch durchlaufen. Diese Untersuchung lässt sich mit Hilfe der sog. *carboxyfluorescein succinimidyl ester*-(CFSE-) Färbung (Parish, 1999) als durchflusszytometrische Messung durchführen. In den Zellen wird der Fluoreszenzfarbstoff kovalent u.a. an Lysinreste gebunden. Die kovalente Bindung wird dadurch abgeschwächt, dass sich die Zelle teilt. Das bedeutet, dass pro Zellzyklus die Intensität des Farbstoffs um die Hälfte reduziert wird (Quah und Parish, 2010). So könnte herausgefunden werden, ob die mit FK228 behandelten Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen und den mit AC220 behandelten einen zusätzlichen Zellzyklus durchlaufen. Von Interesse wäre hier auch zu wissen, ob die eventuelle Hyperproliferation nur bei FLT3-ITD-positiven Zellen auftritt oder auch bei anderen Zelllinien zu beobachten ist. Würde sich die Anregung der Proliferation nur auf die FLT3-ITD Zellen beschränken, wäre dies ein weiterer Vorteil in der Behandlung der AML. Es würde sich die Hypothese aufstellen lassen, dass die Behandlung spezifisch auf mutierte FLT3-Zellen wirkt und gesunde Zellen von der Behandlung nicht stark beeinflusst werden.

5.3 Kombinationsbehandlungen aus AC220 und HDACi wirken in AML-Zellen synergistisch auf die Degradation/Reduzierung von Proteinen

In der vorliegenden Dissertation werden Ansätze zum Wirkmechanismus der beobachteten Akkumulation der Zellen in der subG1-Population und der damit einhergehenden synergistischen Wirkung dargestellt. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen zeigen, dass sowohl nach Kombinationsbehandlung von AC220 mit FK288, als auch nach AC220 mit RGFP966, FLT3 selber und dessen Schlüsselproteine STAT5 und ERK früher reduziert werden im Vergleich zur jeweiligen Einzelbehandlung (s. Abb. 7 u. 17). Die Beobachtung, dass bereits geringe Dosen der Inhibitoren höhere Degradationen an FLT3 und STAT5 induzieren, wurde auch von Pietschmann et al. (2012) festgestellt und konnte mit den im Rahmen der Dissertation genutzten Inhibitoren somit bestätigt werden. Aufgrund der hier vorliegenden Western-Blot-Analysen zu FLT3, STAT5 und ERK und in Übereinkunft mit der Literatur, liefern diese Ergebnisse einen weiteren Nachweis für den festgestellten Synergismus und zeigen außerdem, dass der mutierte FLT3-Rezeptor als Zielstruktur erfolgreich degradiert wurde. Durch die Kombination aus FLT3i und HDACi kommt es durch zwei Mechanismen zum Verlust an FLT3, da nicht nur FLT3is, sondern auch HDACis alleine zur Degradation von FLT3 führen, was die Effektivität der Behandlung steigert. Zwar fällt die Reduktion von FLT3 in Einzelbehandlung mit den HDACis nicht so stark aus wie mit AC220, dennoch ist eine Reduktion des Bandensignals zu sehen. Diese Erkenntnis beruht darauf, dass Pietschmann et al. (2012) auf zweierlei Wegen gegen den FLT3-ITD-Rezeptor der AML angehen, da in Einzelbehandlung die Gabe von AC220 kaum einen vollständigen Rückgang der Erkrankung trotz Blockade der katalytischen Aktivität des FLT3-ITD-Rezeptors aufweist (Pietschmann et al., 2012). Die kombinierte Gabe aus AC220 und LBH589 soll einerseits die Kinase-Aktivität sowie die Induktion bekannter FLT3-Schlüsselproteine durch den FLT3i hemmen und andererseits zur Degradation durch den HDACi führen (Pietschmann et al., 2012). Die Grundidee von Pietschmann et al. (2012) konnte demnach mit den dargelegten Versuchen und Analysen bestätigt werden. Hervorzuheben ist hier im Vergleich zur bereits veröffentlichten Untersuchung mit LBH589, dass diese synergistischen Effekte der Degradation des FLT3-ITD-Rezeptors im Rahmen der Dissertation auch mit FK228 und mit RGFP966 nachgewiesen wurden. Demnach bedarf es nicht der Inhibition aller HDACs, um eine Verstärkung der Degradation des FLT3-ITD-Rezeptors durch eine Kombination aus AC220 mit HDACi zu erreichen. Des Weiteren zeigen die Western-Blot-Analysen in Abb. 8 und 18, dass WEE1 und pan-CHK1 in Kombinationsbehandlung hochgradig abgebaut werden. Es ist folglich denkbar,

dass so der G2-Kontrollpunkt der Zellen gehemmt wird. Da viele Tumorzellen einen dysregulierten G1-Kontrollpunkt aufweisen (Chen et al., 2012), würden somit beide Kontrollpunkte des Zellzyklus in der Zelle fehlerhaft sein. Dies könnte darauf hindeuten, dass die durch AC220 mit FK228 bzw. RGFP966 behandelten Zellen in eine mitotische Katastrophe gedrängt werden (Matheson et al., 2016), wodurch sich die in Kombinationsbehandlung erhöhte Zellpopulation in der subG1-Phase erklären ließe. Die Behandlung von AML-Zellen mit einem WEE1i in Kombination mit dem HDACi Vorinostat hat gezeigt, dass es zum verfrühten Eintritt der Zellen in die Mitose aufgrund des Verlusts des G2-Kontrollpunkts kommt, da die kombinierte Behandlung sowohl WEE1, als auch pan-CHK1 reduziert. Zhou et al. (2015) vermuten, dass durch die gemeinsame Gabe des WEE1i mit dem HDACi sowohl der G2-, als auch der G1-Kontrollpunkt übergangen werden (Zhou et al., 2015). Diese Möglichkeit einer mitotischen Katastrophe (s. Kap. 2.8) stimmt zwar mit der Vermutung von Zhou et al. (2015) überein, konnte mit dem EdU-Einbau via Immunfluoreszenz bisher jedoch nicht belegt werden. Falls dies stimmt, müsste die Immunfluoreszenz-Analyse zeigen, dass in der kombinierten Gabe wesentlich mehr Zellen EdU-positiv sind. Daher bedarf diese Hypothese genauerer Untersuchung.

Es wurde untersucht, ob die Proteinspiegel von p53 und p21^(Cip1/Waf1) miteinander korrelieren und ob die angewendeten Behandlungen hierauf einen Einfluss haben. AC220 verringert die Menge an p21^(Cip1/Waf1) ohne eine signifikante Reduktion von p53 zu bewirken (s. Abb. 19). 2 µM RGFP966 induzieren p21^(Cip1/Waf1) stärker als höhere Dosen an RGFP966. Ab ca. 6 µM RGFP966 entsprechen die p21^(Cip1/Waf1)-Spiegel den in unbehandelten Zellen. p53 wird dosisabhängig von RGFP966 verringert (s. Abb. 19). Alle getesteten Kombinationsbehandlungen aus AC220 mit RGFP966 reduzieren p53 und p21^(Cip1/Waf1). Verglichen mit RGFP966 ist FK228 ein wesentlich stärkerer Induktor von p21^(Cip1/Waf1) (s. Abb. 9 u. 19). Dies entspricht auch unseren Erwartungen. Durch FK228 kommt es zu einer Inhibition der HDACs 1-3, während RGFP966 nur HDAC3 hemmt. Dies deutet auf eine Regulation des p21^(Cip1/Waf1)-Gens durch HDAC1-3 hin. In Kombination mit AC220 werden die von HDACis induzierten Signale für p21^(Cip1/Waf1) verringert. In diesem Kontext weisen Publikationen darauf hin, dass die Induktion von p21^(Cip1/Waf1) im Zusammenhang mit dem Schutz der Zellen vor durch HDACi induzierte Apoptose gebracht wird (Rosato et al., 2003, Krämer et al., 2008). Das lässt sich damit erklären, dass p21^(Cip1/Waf1) an Caspase 3 binden kann und die Caspase somit im inaktiven Zustand gehalten wird (Suzuki et al., 1999). Rosato et al. (2003) haben bei der

Behandlung leukämischer Zellen mit einem HDAC1- und HDAC3-Inhibitor festgestellt, dass die Zunahme von p21^(Cip1/Waf1) mit einem Anstieg der Zellen in der G1-Phase korreliert. Die p21^(Cip1/Waf1)-Induktion unterbricht das Fortschreiten des Zellzyklus, woraufhin die Zellen Zeit zur Reparatur von Schäden haben und somit vor Apoptose geschützt werden (Rosato et al., 2003). Weiter ist bekannt, dass p21^(Cip1/Waf1) in Darmkrebszellen Apoptose durch replikativen Stress und Klasse I HDACi unterdrücken kann (Krämer et al., 2008). Außerdem ist bekannt, dass p21^(Cip1/Waf1) auch Seneszenz einleiten kann (Roninson, 2002). Daher wäre auch denkbar, dass die im Rahmen der Dissertation behandelten Zellen zum Schutz vor apoptotischem Abbau den Zustand der Seneszenz einleiten und somit ihre Zellteilung einstellen. Andere Versuche zeigen, dass ein Knockdown von p21^(Cip1/Waf1) keine Veränderungen in Bezug auf die bewirkte Apoptose hat (Newbold et al., 2014). Mit einem Knockdown von p21^(Cip1/Waf1) unter den in der Arbeit angewandten Bedingungen könnte herausgefunden werden, inwieweit p21^(Cip1/Waf1) mit der Apoptose in Verbindung steht und ob p21^(Cip1/Waf1) tatsächlich Auswirkungen auf einen G1- bzw. G2-Arrest hat. Strittig ist der Aspekt, ob die Induktion von p21^(Cip1/Waf1) dabei von p53 abhängig ist (el-Deiry et al., 1993) oder ob sie auch unabhängig stattfinden kann (Richon et al., 1996). Im Fall der hier vorliegenden Analysen ist denkbar, dass die gewählten Kombinationen eine Induktion von p21^(Cip1/Waf1) in Abhängigkeit von p53 bewirken. Um dies genauer zu untersuchen könnte ein Knockdown von p53 durchgeführt und dann analysiert werden, inwiefern sich die Induktion an p21^(Cip1/Waf1) der p53-modifizierten und unbehandelten Zellen unterscheidet.

Versucht man die Western-Blot-Analysen von CHK1, p53 und p21^(Cip1/Waf1) miteinander in Verbindung zu bringen, können weder die Ergebnisse von Beckerman et al. (2009), noch die von Umezawa et al. (2016) in Bezug auf einen schlüssigen Wirkmechanismus genutzt werden. Laut der Forschergruppe um Beckerman, kann bei Zellen im S-Phase-Arrest beobachtet werden, dass mit einer Reduktion an CHK1 gleichzeitig eine Induktion an p21^(Cip1/Waf1) einhergeht. Dies liegt möglicherweise daran, dass CHK1 p21^(Cip1/Waf1) unterdrücken könnte oder daran, dass die Reduktion von CHK1 auf einem noch nicht bekannten Signalweg die Aktivierung von p21^(Cip1/Waf1) auslöst (Beckerman et al., 2009). Die Arbeitsgruppe von Umezawa dagegen hat herausgefunden, dass unter Chemotherapie bei hämatopoetischen Zellen die Induktion an p53 in Korrelation steht mit der Reduktion an CHK1. Damit verbunden sind der Verlust des G2-Kontrollpunkts und erhöhte Apoptoseraten (Umezawa et al., 2016). Weder der Zusammenhang zwischen CHK1 und p21^(Cip1/Waf1), noch der zwischen CHK1 und p53 kann laut

Abb. 8 u. 9 auf FK228 oder laut Abb. 18 u. 19 auf RGFP966 bezogen werden. Demnach bedarf es weiterer Untersuchungen von Proteinen, um die Signalwege, die damit verbundenen Mechanismen und die gegenseitige Beeinflussung zu ergründen, um einen verständlichen Zusammenhang zu finden. Eventuell könnten Untersuchungen anderer Phosphorylierungsstellen von p53 oder CHK1 aufschlussreich sein.

5.4 Rolle von DNA-Schäden als Mechanismus der Apoptoseinduktion durch Kombinationsbehandlungen von FLT3i und HDACi

In der vorliegenden Arbeit wurden RAD51 als Vertreter der DNA-Reparaturproteine (Shinohara et al., 1992) und γ H2AX^(Ser139) (Rogakou et al., 1998) sowie RPA (Maya-Mendoza et al., 2018) als Marker für DDR analysiert. Dabei wurde deutlich, dass bei der Behandlung mit AC220 und FK228 bzw. RGFP966 die Menge an RAD51 abnimmt und die an γ H2AX^(Ser139) sowie an p-RPA^(Thr21) zunimmt (s. Abb. 10 u. 20). Auch wurde bei beiden HDACis eine Induktion der Phosphorylierung von CHK1 an Ser345 bzw. Ser296 beobachtet (s. Abb. 8 u. 18). Auf Grund der Western-Blot-Analysen wurde die Hypothese aufgestellt, dass es in den Zellen durch die Kombinationsbehandlungen zu DNA-Schäden kommt. Die Tatsache, dass via Comet Assays nach einer Behandlungszeit von 16 h keine DNA-Schäden nachgewiesen wurden (s. Abb. 12 u. 13), stimmt nicht mit den aus den Western-Blot-Analysen gezogenen Erwartungen aufgrund der Modifikationen von RAD51, γ H2AX^(Ser139) und p-RPA^(Thr21) überein. Des Weiteren wurden in den vorliegenden Ergebnissen aktivierte Caspase 3 als Apoptosemarker (Tanimoto et al., 2017) und UBCH8 als Marker des proteasomalen Abbaus untersucht (Arigo et al., 1988; Shibata et al., 2011). Bei der Behandlung der Zellen mit AC220 und den HDACis wird aktivierte Caspase 3 deutlich induziert (s. Abb. 11 u. 21). Bei der Gabe von AC220 mit FK228 zeigt auch die Bandenintensität von UBCH8 bis zu einer Dosis von 5 nM AC220 ein deutlich detektierbares Signal (s. Abb. 11). Die ermittelte Zunahme an aktivierter Caspase 3 wurde auch von Pietschmann et al. (2012) anhand der Kombination eines FLT3i und eines pan-HDACi gesehen und kann damit bestätigt werden. Bereits in Kombinationsbehandlung mit geringeren Dosen als in Einzelbehandlung ist ein Anstieg an aktivierter Caspase 3 zu sehen (Pietschmann et al., 2012). Die Induktion an aktivierter Caspase 3 steht dabei laut Pietschmann et al. (2012) im Zusammenhang mit dem proteolytischen Abbau von FLT3-ITD und STAT5. Die Reduktion von STAT5, einem antiapoptotischen Protein (Pietschmann et al., 2012), wurde in Kap. 5.1 beschrieben. Um herauszufinden, wodurch die Apoptose im Zusammenhang mit dem deutlichen Anstieg an aktivierter Caspase 3 in den Versuchen mit

AC220 und FK228 bzw. RGFP966 induziert wurde, könnten Versuche mit Hilfe von Z-VAD-FMK durchgeführt werden. Dabei handelt es sich um einen pan-Caspase-Inhibitor (Van Noorden, 2001). Um den Signalweg des Zellabbaus besser zu verstehen, kann so herausgefunden werden, inwiefern die Apoptoseinduktion durch Caspasen abhängig ist, da durch Z-VAD-FMK alle Caspasen gehemmt und damit inaktiviert werden. So wären die Zellen vor einem proteolytischen Abbau durch Caspasen geschützt und die subG1-Population würde nicht so stark ansteigen. Dies wäre gleichzeitig ein Nachweis dafür, dass wirklich Apoptose in den Zellen ausgelöst wird (Porter und Janicke, 1999). Dadurch könnten mehr Rückschlüsse über die Gewichtung zwischen Caspasen und UBCH8 bezüglich der Zelldegradation der FLT3-ITD gezogen werden.

In der vorliegenden Dissertation wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen UBCH8 und anderen Proteinen zu finden ist. In der Literatur wurde beschrieben, dass eine Reduktion von UBCH8 in Verbindung steht mit einer Induktion an p21^(Cip1/Waf1), was zu einem G1-Phase-Arrest führt, da UBCH8 p21^(Cip1/Waf1) polyubiquitinyliert (Shibata et al., 2011). Diese Korrelation lässt sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen. Gründe hierfür könnten zum Beispiel die Wahl des Zellmodells sein, da die Versuche von Shiabata et al. (2011) mit humanen Dickdarmkrebszellen durchgeführt wurden. Die Ergebnisse von Buchwald et al. (2010) dagegen lassen sich gut auf die hier dargestellten Ergebnisse beziehen. Bei den Versuchen von Buchwald et al. (2010) wurden AML-Zellen mit LBH589 behandelt. Dabei wurde eine Induktion von UBCH8 sowie eine Degradation von FLT3-ITD aufgrund von proteasomalem Abbau beobachtet. In Bezug auf hier angewandte Kombination aus FLT3i und HDACi ist die Untersuchung von UBCH8 von Interesse, denn durch den FLT3i wird die Fähigkeit von FLT3-ITD zur Phosphorylierung gehemmt. Inwiefern der FLT3i die Degradation von FLT3-ITD durch die HDAC-induzierte Ubiquitinierung unterstützt, könnte durch weitere Forschungen untersucht werden. Es ist denkbar, dass die erhöhte Aktivierung von Caspasen in mit AC220 und HDACi behandelten Zellen den Abbau von FLT3-ITD bewirkt. Demnach würde die Zugabe von AC220 zu mit HDACi behandelten Zellen einen Wechsel von dem vorwiegend proteasomalen Abbau von FLT3-ITD in nur mit HDACi behandelten Zellen (Buchwald et al., 2010) zu einem von Caspasen vermittelten Abbau in mit AC220 und HDACi behandelten Zellen bewirken.

Von Interesse wäre in Zukunft in Bezug auf das Protein UBCH8 herauszufinden, wodurch die durch Behandlung induzierte Doppelbande in Abb. 11 entstanden ist. Untersuchungen haben gezeigt, dass FLT3-ITD von UBCH8 polyubiquitiniert und damit

zur Proteolyse markiert wird (Buchwald et al., 2010). Es besteht die Möglichkeit, dass es sich um eine Phosphorylierung von UBCH8 handeln könnte und dass diese regulatorische Effekte hat. Es könnte untersucht werden, ob Tyrosin- oder Serin-/Threonin-kinasen diese Modifikation katalysieren. Am deutlichsten ist die Doppelbande von UBCH8 nach Behandlung mit 5 nM AC220 zu sehen (s. Abb. 11). Daher würde es sich empfehlen, diese Konzentration bevorzugt für zukünftige Analysen zu verwenden. Nach der Ernte könnten die Proben dann mit unterschiedlichen Lysepuffern inkubiert werden. Dafür könnte auf verschiedene Kombinationen mit und ohne EDTA, Natriumorthovanadat und Natriumfluorid zurückgegriffen werden. EDTA besitzt die Eigenschaft, Chelatkomplexe zu bilden und so Kofaktoren zu binden, welche von Phosphatasen benötigt werden (The MAK-Collection for Occupational Health and Safety, 2009). Mit Hilfe von Natriumorthovanadat bzw. Natriumfluorid könnte nachgewiesen werden, welche Kinase-Familie eine mögliche Phosphorylierung von UBCH8 katalysiert. Natriumorthovanadat inhibiert ausschließlich Tyrosin-Phosphatasen (Buchwald et al., 2010). Natriumfluorid inhibiert sowohl Serin-, als auch Threonin-Phosphatasen. Würde sich die Intensität der mit AC220 Gabe entstandenen Doppelbande nicht verändern, würde sich kein Rückschluss auf eine Phosphorylierung ergeben. Es könnten aber auch andere posttranslationale Modifikationen des UBCH8 auftreten. In Erwägung zu ziehen ist beispielsweise eine Modifikation durch den *small ubiquitin-related modifier* (SUMO), welcher an Prozessen wie der Apoptose oder der Transkription beteiligt ist. SUMO-Proteine (SUMO1, -2, -3) besitzen eine Größe von 11,5 kDa und sind mit Ubiquitin verwandt. Beispielsweise ist die Modifikation mit SUMO sowie Ubiquitin von ATP in der Zelle abhängig. Interessanterweise sind Ubiquitinierung und SUMOylierung zum Teil gemeinsam an Prozessen in der Zelle beteiligt, aber SUMOylierung markiert Proteine im Unterschied zu Ubiquitin meist nicht zur Degradation (Mahajan et al., 1997, Jackson und Durocher, 2013, Barysch et al., 2014). Eine SUMOylierung von UBCH8 könnte eine Verbindung zwischen den SUMOylierenden und ubiquitinyrenden Systemen darstellen. Es ist allerdings anzunehmen, dass die von mir gefundene zusätzliche Bande des UBCH8 aufgrund der Größe keine Ubiquitinylierung oder SUMOylierung repräsentiert. Diese Modifikation würde UBCH8 eine Größe von ca. 23 bis 25 kDa verleihen. Die von mir beobachtete Modifikation verändert das Laufverhalten von UBCH8 in der Gelelektrophorese nur um ca. 3-5 kDa (s. Abb. P). Allgemein wären weitere Untersuchungen von UBCH8 von Interesse, um beurteilen zu können, ob UBCH8, wie von Buchwald et al. (2010) beschrieben, wirklich auch bei den in der Dis-

sertation verwendeten Kombination aus FLT3i und HDACi eine Rolle spielt.

Da durch die Comet Assays ein DNA-Schaden in Form eines SSB oder DSB ausgeschlossen wurde (s. Abb. 12 u. 13), sollte dem Grund für die starke Induktion der Apoptose weiter nachgegangen werden. Bevor DNA-Schäden aber vollkommen ausgeschlossen werden können, sollte ein Comet Assay erneut durchgeführt werden, allerdings zu einem deutlich früheren Zeitpunkt nach der Behandlung, z.B. nach 4 h. Es besteht die Möglichkeit, dass nach den hier getesteten 16 h bereits die Schäden in der Zelle zu groß waren, um überhaupt detektiert werden zu können. Fraglich wäre dann allerdings, warum zu einem späteren Zeitpunkt keine DNA-Schäden mehr detektierbar sind, obwohl sich die DNA-schädigenden Effekte theoretisch verstärken müssten. Möglicherweise sind die Analysen des Comet Assays nicht empfindlich genug, sodass alternative Methoden zur Messung von DNA-Schäden genutzt werden sollten, wie z.B. die γ H2AX-Immunfluoreszenz, bei der DSBs in Form von Focis zur Quantifizierung des DNA-Schadens detektiert werden (Rothkamm und Lobrich, 2003).

Als weitere mögliche Ursache für die Apoptose könnten genauere Untersuchungen des Radikals ROS vorgenommen werden. In der Literatur wurde des Öfteren schon ein Zusammenhang zwischen erhöhten Werten an ROS durch HDACi und der Apoptoseeinleitung beschrieben (Rosato und Grant, 2005, Wang et al., 2018). Mit Hilfe eines Antioxidants wie Glutathion oder *N-acetyl-cysteine* (NAC) kann ROS abgefangen werden (Kerksick und Willoughby, 2005). Somit könnte untersucht werden, ob sich die Apoptoseinduktion mit bzw. ohne ROS in der Zelle verändert. Würde man den Effekt der Behandlung aus bspw. AC220 und FK228 aufheben, indem NAC oder Glutathion hinzugefügt wird, wäre denkbar, dass kaum noch Apoptoseinduktion messbar ist. Dies wäre ein Nachweis dafür, dass ROS eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit Apoptose spielt. Alternativ könnte der Einfluss von ROS mit Hilfe des Comet Assays ermittelt werden. ROS induziert u.a. die DNA-Läsion 8-Oxoguanin, welche durch das Enzym *formamidopyrimidine DNA glycosylase* (FPG) abgebaut wird. Dieser Prozess hinterlässt in der DNA eine Lücke, wodurch die DNA-Fragmentierung zunimmt und im Comet Assay einen Kometenschweif ausbildet (Leipold et al., 2000).

Es sollten auch Proteine untersucht werden, welche in der Kontrolle der Apoptose eine Rolle spielen. Hierbei handelt es sich um Proteine der BCL2-Familie, welche jeweils pro- oder antiapoptotische Funktionen erfüllen. Bei der Behandlung von Zellen eines Lymphoms mit einem Inhibitor, der HDAC1 und HDAC3 hemmt, konnten in Western-Blot-Analysen bei den Proteinen BCL2, BCL-X_L und MCL1 keine Veränderungen nach

Behandlung für 24 h festgestellt werden. Nach 48 h dagegen war eine zweite Bande bei BCL2 in Form von clvd. BCL2 sowie eine Abnahme an MCL1 sichtbar (Rosato et al., 2003). Allgemein ist bekannt, dass CD34-positive Zellen eine erhöhte Induktion an BCL2 aufweisen, was für diese Zellen ein verstärktes Überlebenssignal ist (Andreeff et al., 1999). Einerseits wurden Zusammenhänge in Bezug auf eine Prognose für AML-Patienten zwischen der Induktion von BCL2 und dem FAB-Typen festgestellt (Venditti et al., 2004), andererseits wurden keine Korrelationen zwischen diesen Faktoren gefunden (Kornblau et al., 1999). Andere Quellen wiederum sind sich sicher, dass eine erhöhte Generierung der BCL2-Proteine für AML-Patienten eine schlechte Prognose liefert und mit geringeren Remissionsraten korreliert (Karakas et al., 1998). Zum Protein BAX ist dagegen bekannt, dass dessen verstärkte Induktion im Zusammenhang mit höheren Überlebensraten und längeren Remissionsraten steht (Ong et al., 2000). Es wird deutlich, dass oft ein Zusammenhang zwischen Proteinen der BCL2-Familie und AML gefunden wurde, die Literatur darüber aber unterschiedliche Ergebnisse liefert. Es wäre also von Interesse zu untersuchen, ob bei Proteinen der BCL2-Familie Veränderungen durch Kombinationsbehandlungen auftreten, um zu schauen, ob der intrinsische Weg neue Erkenntnisse bezüglich der Apoptoseinduktion liefert.

Laut Literatur könnte auch die genauere Prüfung von Survivin eventuell Aufschluss über den Mechanismus der Apoptoseinduktion geben. Survivin ist ein Protein, welches als Apoptose-Inhibitor fungiert und gehört der *inhibitor of apoptosis protein* (IAP)-Familie an. In Tumorzellen wurde eine veränderte Genexpression von Survivin beobachtet (Ambrosini et al., 1997). Eine Hemmung der Survivin-Expression steht dabei in Relation mit der Einleitung der Apoptose (Ambrosini et al., 1998). Die antiapoptotische Wirkung von Survivin wird u.a. dadurch erwirkt, dass das Protein an aktivierte Caspase 3 bindet und diese damit gehemmt wird (Tamm et al., 1998). Zhou et al. (2009) haben nach der Generierung einer resistenten MV4-11-Zelllinie gegen RTKi herausgefunden, dass in diesen resistenten Zellen eine Überexpression an STAT-Proteinen und an Survivin induziert wird. Bei ERK dagegen wurden keine Veränderungen festgestellt. Untersuchungen mit dieser resistenten Zelllinie zeigen außerdem eine Akkumulation der Zellen in der S-Phase (Zhou et al., 2009). Laut Zhou et al. (2009) haben folglich FLT3is Einfluss auf Survivin. Auch HDACis bewirken eine Reduktion an Survivin (Chowdhury et al., 2011). Es könnte also nach der durch AC220 und FK228 bzw. RGFP966 bewirkten Veränderung von Survivin geschaut werden, da eine Hemmung von Survivin durch eine Kombinationsbehandlung aus FLT3i und HDACi nicht unwahr-

scheinlich wäre. Es wäre zu erwarten, dass das Signal an Survivin in der Kontrolle deutlich sichtbar ist und sowohl durch Einzel-, als auch durch Kombinationsbehandlung reduziert wird, im Idealfall in kombinierter Gabe schon früher als in Einzelbehandlung. Damit könnte nicht nur der in der Arbeit unergründete Auslöser der Apoptose näher untersucht werden, sondern auch Rückschlüsse aus der Tatsache gezogen werden, dass eine verstärkte Induktion an Survivin als Resistenzmechanismus angesehen wird (Zhou et al., 2009). So könnte eine Verbesserung des Problems mit entstehenden Resistenzen gegenüber FLT3is im Allgemeinen angegangen werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Aufklärung der Ursache der verstärkten Apoptose nach Kombinationsbehandlung könnte die Prüfung der Autophagie liefern. Bei der Autophagie handelt es sich um einen Prozess, bei dem die Zelle eigene beschädigte Bestandteile abbaut und recycelt. Die abzubauenen Bestandteile sind z.B. Proteine oder Organellen. Diese werden von Autophagosomen aufgenommen. Autophagosomen sind Vesikel mit Doppelmembranen. Diese sequestrieren das aufgenommene Material bevor es zum endgültigen Abbau mit Lysosomen fusioniert. So verhindert die Zelle toxisch wirkende Ansammlungen von nicht funktionsfähigen Proteinen (Mizushima und Komatsu, 2011). Das Thema Autophagie hat bei der Krebsentstehung ebenfalls eine Bedeutung. In der Anfangsphase wirkt Autophagie als Tumorsuppressor. Bei schon fortgeschrittenen Krebsformen dagegen unterstützt es das Überleben der Tumorzellen (White, 2015). Bei einigen Behandlungsformen von Krebs wurde die erhöhte Aktivierung von Autophagie als Grund für Therapieresistenz festgestellt. Die Hemmung der Autophagie erhöhte daraufhin den Therapieerfolg (Bellodi et al., 2009). Ein Inhibitor der Autophagie ist bspw. Hydroxychloroquin (Rebecca und Amaravadi, 2016). Auch FLT3-ITD Zellen der AML weisen erhöhte Werte an Autophagie auf. Dabei hat *activating transcription factor 4* (ATF4) eine Bedeutung in der Signalkaskade zum Anstieg der Autophagie. ATF4 wird relativ früh in der Signaltransduktionskaskade von FLT3-ITD exprimiert. Dabei ist die Proliferation der mutierten Zellen von ATF4 abhängig, das Überleben dagegen nicht. Die Inhibition von ATF4 oder Autophagie führt zur Proliferationsschädigung der leukämischen Zellen, selbst wenn diese resistent gegenüber FLT3is sind. Eine kombinierte Behandlung aus Hemmung der Autophagie und FLT3-ITD liefert minimal erfolgreichere Ergebnisse als die jeweilige Einzelbehandlung (Heydt et al., 2018). Folglich könnten Untersuchungen bezüglich einer Behandlung mit Hydroxychloroquin oder Analysen von ATF4 in Zukunft neue Informationen zum Apoptosemechanismus liefern.

6 Zusammenfassung

Innerhalb der malignen Entartungen des blutbildenden Systems weist die akute myeloische Leukämie (AML) die höchste Neuerkrankungsrate auf (Siegel et al., 2019). Bei circa einem Drittel der Patienten mit AML lassen sich Mutationen der Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3 nachweisen (Levis und Small, 2003, Papaemmanuil et al., 2016). Zu diesen zählen zum Beispiel interne Tandemduplikationen (FLT3-ITD), die mit etwa 20 % die am häufigsten auftretende FLT3-Mutation repräsentieren (Thiede et al., 2002). Die Erfolgsquote der Behandlung in FLT3-mutierter AML beträgt nur etwa 35 % (Döhner et al., 2015). Während FLT3-Mutationen oft mit Kinaseinhibitoren adressiert werden können, sind während der Behandlung oftmals entstehende sekundäre Mutationen in FLT3 ein ungelöstes Problem (Smith et al., 2012). Diese führen oft zu Resistenzen und Rezidiven (Pratz und Levis, 2010). Eine Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten wird durch Kombinationsbehandlungen aus FLT3i und anderen Medikamenten angestrebt, wobei sich die Wirkung der Inhibitoren synergistisch potenzieren soll. Die Forschungsergebnisse von Pietschmann et al. (2012) konnten diese synergistische Wirkung in FLT3-ITD-positiven AML-Zellen mit dem FLT3i AC220 und dem pan-HDACi LBH589 generieren. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Zusammenwirken von AC220 mit FK228, einem spezifisch gegen Klasse I HDACs gerichteten Inhibitor (Odenike et al., 2008), und dem spezifisch gegen HDAC3 gerichteten Inhibitor RGFP966 (Malvaez et al., 2013) festzustellen. Dadurch sollte erfasst werden, ob Dosisreduktionen möglich sind, um potentielle Nebenwirkungen zu verringern. Für dieses Vorhaben wurden FLT3-ITD-positive MV4-11 Zellen aus einer kindlichen AML verwendet (Li et al., 2017). Mit Hilfe von durchflusszytometrischen Messungen, Western-Blot-Analysen, Comet Assays und Immunfluoreszenz-Analysen wurden Veränderungen des Zellzyklus, der Proteinexpression und der genomischen Integrität durch die Behandlung mit AC220 in Kombination mit FK228 bzw. RGFP966 analysiert. Zusammenfassend lässt sich aus den ermittelten Ergebnissen sagen, dass AC220 mit FK228 eine starke synergistische Wirkung gegen MV4-11 Zellen entfaltet. Diese lässt sich teilweise als Zunahme der subG1-Population um den dreifachen Wert im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen nachweisen. Derartige synergistische Wirkungen werden außerdem schon mit einer niedrigen Konzentration von 2 bzw. 3 nM AC220 generiert (s. Abb. 6). Die Kombination aus AC220 mit RGFP966 zeigt erst ab einer Dosis von 6 µM RGFP966 synergistische Wirkungen, die im Vergleich zu FK228 deutlich geringer ausfallen (s. Abb. 16). Die Akkumulation von Zellen in der G1-

Phase mit dem FLT3i und die Zunahme von Zellen in der S- und der G2-Phase mit den HDACis sind dabei typische Zellzyklusveränderungen (s. Abb. 6-B u. 16-B). Der beobachtete Synergismus spiegelt sich in einer potenzierten Abnahme der Phosphorylierung und Expression von FLT3-ITD und seinen gleichfalls für das Überleben von Leukämiezellen essentiellen Zielproteinen STAT5 und ERK wider (s. Abb. 7 u. 17). Auch Regulatoren des Zellzyklus wie CHK1 und WEE1, welche den G2-Kontrollpunkt steuern (Do et al., 2013), werden bei Kombinationsbehandlung reduziert (s. Abb. 8 u. 18). Vermuten lässt sich, dass durch die Kombination der Inhibitoren der G2-Kontrollpunkt gehemmt wird und die Zellen damit in eine mitotische Katastrophe getrieben werden (Bucher und Britten, 2008). Beide Inhibitoren aktivieren die Effektorcaspase Caspase 3 in Kombinationsbehandlung deutlich früher und stärker als die Einzelbehandlungen (s. Abb. 11 u. 21). Die Zunahme an durch Autoproteolyse aktivierter Caspase 3 korreliert dabei mit der Akkumulation der Zellen in der subG1-Phase und kann damit als Marker für die Apoptose angesehen werden (Tanimoto et al., 2017). Dass es sich bei den hier vorliegenden Beobachtungen um eine primäre Induktion der Apoptose und um kein sekundäres Ereignis durch DNA-Schäden handelt, zeigen Comet Assays (s. Kap. 4.3). Welche Ursachen bzw. welche Signalwege letztlich für die erhöhte Induktion der Apoptose durch die verwendeten Kombinationsbehandlungen verantwortlich sind, bedarf weiterer Untersuchungen. Mögliche Auslöser könnten Autophagie, erhöhte ROS-Werte oder Veränderungen von Proteinen der BCL2-Familie sein. Diese Hypothesen können in zukünftigen Untersuchungen überprüft werden.

Zusammengefasst zeigt die vorgelegte Dissertation, dass Kombinationen aus AC220 und FK228, zwei bereits klinisch zugelassene Inhibitoren (Li et al., 2012, Cortes et al., 2018), in nanomolaren Dosen als verbesserte Möglichkeit für die Therapie von AML mit mutiertem FLT3 genutzt werden könnten.

Literaturverzeichnis

- Aarts, M., Sharpe, R., Garcia-Murillas, I., Gevensleben, H., Hurd, M. S., Shumway, S. D., Toniatti, C., Ashworth, A. & Turner, N. C. (2012) Forced mitotic entry of S-phase cells as a therapeutic strategy induced by inhibition of WEE1. *Cancer Discov.* 2(6): 524-39.
- Abbas, T. & Dutta, A. (2009) p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature reviews. Cancer.* 9(6): 400-14.
- Abbas, T. & Dutta, A. (2011) CRL4Cdt2: master coordinator of cell cycle progression and genome stability. *Cell Cycle.* 10(2): 241-9.
- Abe, M., Pelus, L. M., Singh, P., Hirade, T., Onishi, C., Purevsuren, J., Taketani, T., Yamaguchi, S. & Fukuda, S. (2016) Internal Tandem Duplication in FLT3 Attenuates Proliferation and Regulates Resistance to the FLT3 Inhibitor AC220 by Modulating p21Cdkn1a and Pbx1 in Hematopoietic Cells. *PloS one.* 11(7): e0158290-e0158290.
- Abraham, S. A., Hopcroft, L. E., Carrick, E., Drotar, M. E., Dunn, K., Williamson, A. J., Korfi, K., Baquero, P., Park, L. E., Scott, M. T., Pellicano, F., Pierce, A., Copland, M., Nourse, C., Grimmond, S. M., Vetrie, D., Whetton, A. D. & Holyoake, T. L. (2016) Dual targeting of p53 and c-MYC selectively eliminates leukaemic stem cells. *Nature.* 534(7607): 341-6.
- Abu-Duhier, F. M., Goodeve, A. C., Wilson, G. A., Care, R. S., Peake, I. R. & Reilly, J. T. (2001) Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 113(4): 983-8.
- Agnes, F., Shamoon, B., Dina, C., Rosnet, O., Birnbaum, D. & Galibert, F. (1994) Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. *Gene.* 145(2): 283-8.
- Ambrosini, G., Adida, C. & Altieri, D. C. (1997) A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med.* 3(8): 917-21.
- Ambrosini, G., Adida, C., Sirugo, G. & Altieri, D. C. (1998) Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem.* 273(18): 11177-82.
- American Type Culture Collection (2016) MV-4-11 (ATCC® CRL-9591™) [Internet]. Last updated 2016 [zitiert am 18.03.2019]. URL: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-9591.aspx>
- Andreeff, M., Jiang, S., Zhang, X., Konopleva, M., Estrov, Z., Snell, V. E., Xie, Z., Okcu, M. F., Sanchez-Williams, G., Dong, J., Estey, E. H., Champlin, R. C., Kornblau, S. M., Reed, J. C. & Zhao, S. (1999) Expression of Bcl-2-related genes in normal and AML progenitors: changes induced by chemotherapy and retinoic acid. *Leukemia.* 13(11): 1881-92.

- Aron, J. L., Parthun, M. R., Marcucci, G., Kitada, S., Mone, A. P., Davis, M. E., Shen, T., Murphy, T., Wickham, J., Kanakry, C., Lucas, D. M., Reed, J. C., Grever, M. R. & Byrd, J. C. (2003) Depsipeptide (FR901228) induces histone acetylation and inhibition of histone deacetylase in chronic lymphocytic leukemia cells concurrent with activation of caspase 8-mediated apoptosis and down-regulation of c-FLIP protein. *Blood*. 102(2): 652-8.
- Arrigo, A. P., Tanaka, K., Goldberg, A. L. & Welch, W. J. (1988) Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature*. 331(6152): 192-4.
- Baliga, B. & Kumar, S. (2003) Apaf-1/cytochrome c apoptosome: an essential initiator of caspase activation or just a sideshow? *Cell Death And Differentiation*. 10: 16-8.
- Barnum, K. J. & O'Connell, M. J. (2014) Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol Biol*. 1170: 29-40.
- Barysch, S.V., Dittner, C., Flotho, A., Becker, J., Melchior, F. (2014) Identification and analysis of endogenous SUMO1 and SUMO2/3 targets in mammalian cells and tissues using monoclonal antibodies. *Nat Protoc*. 9(4): 896-909.
- Basiji, D. A., Ortyn, W. E., Liang, L., Venkatachalam, V. & Morrissey, P. (2008) Cellular Image Analysis and Imaging by Flow Cytometry. *Clin Lab Med*. 27(3): 653-8.
- Baunach, M. (2014) Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen und Applikation in der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis. Göttingen: Cuvillier Verlag.
- Beckerman, R., Donner, A. J., Mattia, M., Peart, M. J., Manley, J. L., Espinosa, J. M. & Prives, C. (2009) A role for Chk1 in blocking transcriptional elongation of p21 RNA during the S-phase checkpoint. *Genes Dev*. 23(11): 1364-77.
- Bellodi, C., Lidonnici, M. R., Hamilton, A., Helgason, G. V., Soliera, A. R., Ronchetti, M., Galavotti, S., Young, K. W., Selmi, T., Yacobi, R., Van Etten, R. A., Donato, N., Hunter, A., Dinsdale, D., Tirrò, E., Vigneri, P., Nicotera, P., Dyer, M. J., Holyoake, T., Salomoni, P. & Calabretta, B. (2009) Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *J Clin Invest*. 119(5): 1109-23.
- Bevers, E. M., Comfurius, P. & Zwaal, R. F. (1983) Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochim Biophys Acta*. 736(1): 57-66.
- Bhaskara, S., Chyla, B. J., Amann, J. M., Knutson, S. K., Cortez, D., Sun, Z. W. & Hiebert, S. W. (2008) Deletion of histone deacetylase 3 reveals critical roles in S phase progression and DNA damage control. *Mol Cell*. 30(1): 61-72.

- Bhaskara, S., Knutson, S. K., Jiang, G., Chandrasekharan, M. B., Wilson, A. J., Zheng, S., Yenamandra, A., Locke, K., Yuan, J. L., Bonine-Summers, A. R., Wells, C. E., Kaiser, J. F., Washington, M. K., Zhao, Z., Wagner, F. F., Sun, Z. W., Xia, F., Holson, E. B., Khabele, D. & Hiebert, S. W. (2010) Hdac3 is essential for the maintenance of chromatin structure and genome stability. *Cancer Cell*. 18(5): 436-47.
- Blancher, C. & Jones, A. (2001) SDS -PAGE and Western Blotting Techniques. *Methods Mol Med*. 57: 145-62.
- Blasius, M., Forment, J. V., Thakkar, N., Wagner, S. A., Choudhary, C. & Jackson, S. P. (2011) A phospho-proteomic screen identifies substrates of the checkpoint kinase Chk1. *Genome Biol*. 12(8): R78.
- Bliss, C. I. (1939) The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology*. 26(3): 585-615.
- Bolden, J. E., Peart, M. J. & Johnstone, R. W. (2006) Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*. 5: 769-784.
- Bornhäuser, M., Illmer, T., Schaich, M., Soucek, S., Ehninger, G. & Thiede, C. (2007) Improved outcome after stem-cell transplantation in FLT3ITD-positive AML. *Blood*. 109(5): 2264-2265.
- Boutros, R., Lobjois, V. & Ducommun, B. (2007) CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer*. 7(7): 495-507.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248-54.
- Broude, E. V., Swift, M. E., Vivo, C., Chang, B. D., Davis, B. M., Kalurupalle, S., Blagosklonny, M. V. & Roninson, I. B. (2007) p21(Waf1/Cip1/Sdi1) mediates retinoblastoma protein degradation. *Oncogene*. 26(48): 6954-8.
- Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y. & Allis, C. D. (1996) Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*. 84(6): 843-51.
- Bucher, N. & Britten, C. D. (2008) G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *Br J Cancer*. 98(3): 523-8.
- Buchwald, M., Kramer, O. H. & Heinzl, T. (2009) HDACi--targets beyond chromatin. *Cancer Lett*. 280(2): 160-7.
- Buchwald, M., Pietschmann, K., Muller, J. P., Bohmer, F. D., Heinzl, T. & Kramer, O. H. (2010) Ubiquitin conjugase UBCH8 targets active FMS-like tyrosine kinase 3 for proteasomal degradation. *Leukemia*. 24(8): 1412-21.

- Buck, S. B., Bradford J Fau - Gee, K. R., Gee Kr Fau - Agnew, B. J., Agnew Bj Fau - Clarke, S. T., Clarke St Fau - Salic, A. & Salic, A. (2008) Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *Biotechniques*. 44(7): 927-9.
- Carow, C. E., Kim, E., Hawkins, A. L., Webb, H. D., Griffin, C. A., Jabs, E. W., Civin, C. I. & Small, D. (1995) Localization of the human stem cell tyrosine kinase-1 gene (FLT3) to 13q12-->q13. *Cytogenet Cell Genet*. 70(3-4): 255-7.
- Cavanagh, B. L., Walker, T., Norazit, A. & Meedeniya, A. C. (2011) Thymidine analogues for tracking DNA synthesis. *Molecules*. 16(9): 7980-93.
- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S. A. & Letai, A. (2006) Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell*. 9(5): 351-65.
- Cesquini, M., Torsoni, M. A., Stoppa, G. R. & Ogo, S. H. (2003) t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. *Biomed Pharmacother*. 57(3-4): 124-9.
- Cehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M. & Halazonetis, T. D. (2000) Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev*. 14(3): 278-88.
- Chen, T., Stephens, P. A., Middleton, F. K. & Curtin, N. J. (2012) Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug Discov Today*. 17(5-6): 194-202.
- Chen, Y., Pan, Y., Guo, Y., Zhao, W., Ho, W. T., Wang, J., Xu, M., Yang, F. C. & Zhao, Z. J. (2017) Tyrosine kinase inhibitors targeting FLT3 in the treatment of acute myeloid leukemia. *Stem Cell Investig*. 4: 48.
- Chesnel, F., Bazile, F., Pascal, A. & Kubiak, J. Z. (2006) Cyclin B dissociation from CDK1 precedes its degradation upon MPF inactivation in mitotic extracts of *Xenopus laevis* embryos. *Cell Cycle*. 5(15): 1687-98.
- Chou, C. W., Wu, M. S., Huang, W. C. & Chen, C. C. (2011) HDAC inhibition decreases the expression of EGFR in colorectal cancer cells. *PLoS One*. 6(3): e18087.
- Chou, D. M., Adamson, B., Dephoure, N. E., Tan, X., Nottke, A. C., Hurov, K. E., Gygi, S. P., Colaiacovo, M. P. & Elledge, S. J. (2010) A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(43): 18475-80.
- Choudhary, C., Brandts, C., Schwable, J., Tickenbrock, L., Sargin, B., Ueker, A., Bohmer, F. D., Berdel, W. E., Muller-Tidow, C. & Serve, H. (2007) Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD. *Blood*. 110(1): 370-4.

- Choudhary, C., Olsen, J. V., Brandts, C., Cox, J., Reddy, P. N., Bohmer, F. D., Gerke, V., Schmidt-Arras, D. E., Berdel, W. E., Muller-Tidow, C., Mann, M. & Serve, H. (2009) Mislocalized activation of oncogenic RTKs switches downstream signaling outcomes. *Mol Cell*. 36(2): 326-39.
- Choudhary, C., Schwable, J., Brandts, C., Tickenbrock, L., Sargin, B., Kindler, T., Fischer, T., Berdel, W. E., Muller-Tidow, C. & Serve, H. (2005) AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. *Blood*. 106(1): 265-73.
- Chowdhury, S., Howell, G. M., Teggart, C. A., Chowdhury, A., Person, J. J., Bowers, D. M. & Brattain, M. G. (2011) Histone Deacetylase Inhibitor Belinostat Represses Survivin Expression through Reactivation of Transforming Growth Factor β (TGF β) Receptor II Leading to Cancer Cell Death. *J Biol Chem*. 286(35): 30937-48.
- Christmann, M. & Kaina, B. (2013) Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. *Nucleic Acids Res*. 41(18): 8403-20.
- Collins, A. R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Mol Biotechnol*. 26(3): 249-61.
- Conti, C., Sacca, B., Herrick, J., Lalou, C., Pommier, Y. & Bensimon, A. (2007) Replication fork velocities at adjacent replication origins are coordinately modified during DNA replication in human cells. *Mol Biol Cell*. 18(8): 3059-67.
- Cortes, J., Perl, A. E., Döhner, H., Kantarjian, H., Martinelli, G., Kovacsovics, T., Rousselot, P., Steffen, B., Dombret, H., Estey, E., Strickland, S., Altman, J. K., Baldus, C. D., Burnett, A., Kramer, A., Russell, N., Shah, N. P., Smith, C. C., Wang, E. S., Ifrah, N., Gammon, G., Trone, D., Lazzaretto, D. & Levis, M. (2018) Quizartinib, an FLT3 inhibitor, as monotherapy in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 19(7): 889-903.
- Cortes, J. E., Kantarjian, H., Foran, J. M., Ghirdaladze, D., Zodelava, M., Borthakur, G., Gammon, G., Trone, D., Armstrong, R. C., James, J. & Levis, M. (2013) Phase I study of quizartinib administered daily to patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia irrespective of FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication status. *J Clin Oncol*. 31(29): 3681-7.
- Crowther, D., Bateman, C. J., Vartan, C. P., Whitehouse, J. M., Malpas, J. S., Fairley, G. H. & Scott, R. B. (1970) Combination chemotherapy using L-asparaginase, daunorubicin, and cytosine arabinoside in adults with acute myelogenous leukaemia. *Br Med J*. 4(5734): 513-7.
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I. & Poirier, G. G. (1999) Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J*. 342(Pt 2): 249-68.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J. & Leder, P. (1995) Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*. 82(4): 675-84.

- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (2018) MV4-11 [Internet]. Last updated Oct. 2018 [zitiert am 18.03. 2019]. URL: <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-102.html>
- Dewson, G. & Kluck, R. M. (2009) Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *J Cell Sci.* 122(16): 2801-08.
- Di Veroli, G. Y., Fornari, C., Wang, D., Mollard, S., Bramhall, J. L., Richards, F. M. & Jodrell, D. I. (2016) Combenefit: an interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. *Bioinformatics.* 32(18): 2866-8.
- Diermeier-Daucher, S., Clarke St Fau - Hill, D., Hill D Fau - Vollmann-Zwerenz, A., Vollmann-Zwerenz A Fau - Bradford, J. A., Bradford Ja Fau - Brockhoff, G. & Brockhoff, G. (2009) Cell type specific applicability of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) for dynamic proliferation assessment in flow cytometry. *Cytometry A.* 75(6): 535-46.
- Do, K., Doroshov, J. H. & Kummar, S. (2013) Wee1 kinase as a target for cancer therapy. *Cell Cycle.* 12(19): 3159-64.
- Dobbelstein, M. & Sorensen, C. S. (2015) Exploiting replicative stress to treat cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 14(6): 405-23.
- Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Dombret, H., Ebert, B. L., Fenaux, P., Larson, R. A., Levine, R. L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M. S., Tien, H.-F., Wei, A. H., Löwenberg, B. & Bloomfield, C. D. (2017) Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 129(4): 424.
- Döhner, H., Weisdorf, D. J. & Bloomfield, C. D. (2015) Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 373(12): 1136-52.
- Dominguez-Kelly, R., Martin, Y., Koundrioukoff, S., Tanenbaum, M. E., Smits, V. A., Medema, R. H., Debatisse, M. & Freire, R. (2011) Wee1 controls genomic stability during replication by regulating the Mus81-Eme1 endonuclease. *J Cell Biol.* 194(4): 567-79.
- Drexler, H. G. (1996) Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia.* 10(4): 588-99.
- Dunphy, W. G. (1994) The decision to enter mitosis. *Trends Cell Biol.* 4(6): 202-7.
- el-Deiry, W. S., Harper, J. W., O'Connor, P. M., Velculescu, V. E., Canman, C. E., Jackman, J., Pietenpol, J. A., Burrell, M., Hill, D. E., Wang, Y. & et al. (1994) WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 54(5): 1169-74.
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 75(4): 817-25.

- Ellis, H. M. & Horvitz, H. R. (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*. 44(6): 817-29.
- Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 35(4): 495-516.
- Fircanis, S., Merriam, P., Khan, N. & Castillo, J. J. (2014) The relation between cigarette smoking and risk of acute myeloid leukemia: an updated meta-analysis of epidemiological studies. *Am J Hematol*. 89(8): E125-32.
- Fried, J., Perez, A. G. & Clarkson, B. D. (1978) Rapid hypotonic method for flow cytofluorometry of monolayer cell cultures. Some pitfalls in staining and data analysis. *J Histochem Cytochem*. 26(11): 921-33.
- Fulda, S. (2012) Histone deacetylase (HDAC) inhibitors and regulation of TRAIL-induced apoptosis. *Exp Cell Res*. 318(11): 1208-12.
- Furumai, R., Matsuyama, A., Kobashi, N., Lee, K. H., Nishiyama, M., Nakajima, H., Tanaka, A., Komatsu, Y., Nishino, N., Yoshida, M. & Horinouchi, S. (2002) FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res*. 62(17): 4916-21.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D. R., Hengartner, M. O., Kepp, O., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nuñez, G., Peter, M. E., Piacentini, M., Rubinsztein, D. C., Shi, Y., Simon, H. U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G. & Kroemer, G. (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 19(1): 107-120.
- Glick, A. D., Paniker, K., Flexner, J. M., Graber, S. E. & Collins, R. D. (1980) Acute leukemia of adults. Ultrastructural, cytochemical and histologic observations in 100 cases. *Am J Clin Pathol*. 73(4): 459-70.
- Goeder, A., Emmerich, C., Nikolova, T., Kiweler, N., Schreiber, M., Kuhl, T., Imhof, D., Christmann, M., Heinzl, T., Schneider, G. & Kramer, O. H. (2018) HDAC1 and HDAC2 integrate checkpoint kinase phosphorylation and cell fate through the phosphatase-2A subunit PR130. *Nat Commun*. 9(1): 764.
- Gong, F. & Miller, K. M. (2013) Mammalian DNA repair: HATs and HDACs make their mark through histone acetylation. *Mutat Res*. 750(1-2): 23-30.
- Graff, J. & Tsai, L. H. (2013) The potential of HDAC inhibitors as cognitive enhancers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 53: 311-30.
- Griffith, J., Black, J., Faerman, C., Swenson, L., Wynn, M., Lu, F., Lippke, J. & Saxena, K. (2004) The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell*. 13(2): 169-78.
- Gross, A., McDonnell, J. M. & Korsmeyer, S. J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 13(15): 1899-911.

- Gu, W. & Roeder, R. G. (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*. 90(4): 595-606.
- Hall, C., Nelson, D. M., Ye, X., Baker, K., DeCaprio, J. A., Seeholzer, S., Lipinski, M. & Adams, P. D. (2001) HIRA, the human homologue of yeast Hir1p and Hir2p, is a novel cyclin-cdk2 substrate whose expression blocks S-phase progression. *Mol Cell Biol*. 21(5): 1854-65.
- Heldin, C. H. (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*. 80(2): 213-23.
- Hershko, A. & Ciechanover, A. (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annual Review of Biochemistry*. 61(1): 761-807.
- Hershko, A. & Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 67: 425-79.
- Heydt, Q., Larrue, C., Saland, E., Bertoli, S., Sarry, J. E., Besson, A., Manenti, S., Joffre, C. & Mansat-De Mas, V. (2018) Oncogenic FLT3-ITD supports autophagy via ATF4 in acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 37(6): 787-97.
- Honda, R., Tanaka, H. & Yasuda, H. (1997) Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett*. 420(1): 25-7.
- Hopker, K., Hagmann, H., Khurshid, S., Chen, S., Schermer, B., Benzing, T. & Reinhardt, H. C. (2012) Putting the brakes on p53-driven apoptosis. *Cell Cycle*. 11(22): 4122-8.
- Hospital, M. A., Green, A. S., Maciel, T. T., Moura, I. C., Leung, A. Y., Bouscary, D. & Tamburini, J. (2017) FLT3 inhibitors: clinical potential in acute myeloid leukemia. *Onco Targets Ther*. 10: 607-15.
- Hotton, S. K. & Callis, J. (2008) Regulation of cullin RING ligases. *Annu Rev Plant Biol*. 59: 467-89.
- Jabbur, J. R., Huang, P. & Zhang, W. (2000) DNA damage-induced phosphorylation of p53 at serine 20 correlates with p21 and Mdm-2 induction in vivo. *Oncogene*. 19(54): 6203-8.
- Jackson, S. P. & Durocher, D. (2013) Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO. *Mol Cell*. 49(5): 795-807.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G. C., Lukas, J. & Jackson, S. P. (2006) ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol*. 8(1): 37-45.
- Jemal, A., Ward, E. M., Johnson, C. J., Cronin, K. A., Ma, J., Ryerson, B., Mariotto, A., Lake, A. J., Wilson, R., Sherman, R. L., Anderson, R. N., Henley, S. J., Kohler, B. A., Penberthy, L., Feuer, E. J. & Weir, H. K. (2017) Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2014, Featuring Survival. *J Natl Cancer Inst*. 109(9).

- Jordan, C. T., Upchurch, D., Szilvassy, S. J., Guzman, M. L., Howard, D. S., Pettigrew, A. L., Meyerrose, T., Rossi, R., Grimes, B., Rizzieri, D. A., Luger, S. M. & Phillips, G. L. (2000) The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia*. 14(10): 1777-84.
- Juan, L. J., Shia, W. J., Chen, M. H., Yang, W. M., Seto, E., Lin, Y. S. & Wu, C. W. (2000) Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation. *J Biol Chem*. 275(27): 20436-43.
- Juliusson, G., Lazarevic, V., Hörstedt, A.-S., Hagberg, O. & Höglund, M. (2012) Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. *Blood*. 119(17): 3890.
- Kaewpiboon, C., Srisuttee, R., Malilas, W., Moon, J., Oh, S., Jeong, H. G., Johnston, R. N., Assavalapsakul, W. & Chung, Y. H. (2015) Upregulation of Stat1-HDAC4 confers resistance to etoposide through enhanced multidrug resistance 1 expression in human A549 lung cancer cells. *Mol Med Rep*. 11(3): 2315-21.
- Kamentsky, L. A., Melamed, M. R. & Derman, H. (1965) Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis. *Science*. 150(3696): 630-1.
- Kapuscinski, J. (1995) DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem*. 70(5): 220-33.
- Karakas, T., Maurer, U., Weidmann, E., Miething, C. C., Hoelzer, D. & Bergmann, L. (1998) High expression of bcl-2 mRNA as a determinant of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Ann Oncol*. 9(2): 159-65.
- Kastan, M. B. & Bartek, J. (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*. 432(7015): 316-23.
- Kelly, L. M., Liu, Q., Kutok, J. L., Williams, I. R., Boulton, C. L. & Gilliland, D. G. (2002) FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood*. 99(1): 310-8.
- Kerksick, C. & Willoughby, D. (2005) The antioxidant role of glutathione and N-acetylcysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *J Int Soc Sports Nutr*. 2(2): 38-44.
- Kim, M. S., Blake, M., Baek, J. H., Kohlhagen, G., Pommier, Y. & Carrier, F. (2003) Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Res*. 63(21): 7291-300.
- Kiyoi, H., Ohno, R., Ueda, R., Saito, H. & Naoe, T. (2002) Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene*. 21(16): 2555-63.
- Knudson, A. G., Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 68(4): 820-3.

- Kohl, T. M., Hellinger, C., Ahmed, F., Buske, C., Hiddemann, W., Bohlander, S. K. & Spiekermann, K. (2007) BH3 mimetic ABT-737 neutralizes resistance to FLT3 inhibitor treatment mediated by FLT3-independent expression of BCL2 in primary AML blasts. *Leukemia*. 21(8): 1763-72.
- Konig, H. & Levis, M. (2015) Targeting FLT3 to treat leukemia. *Expert Opin Ther Targets*. 19(1): 37-54.
- Kornblau, S. M., Thall, P. F., Estrov, Z., Walterscheid, M., Patel, S., Theriault, A., Keating, M. J., Kantarjian, H., Estey, E. & Andreeff, M. (1999) The prognostic impact of BCL2 protein expression in acute myelogenous leukemia varies with cytogenetics. *Clin Cancer Res*. 5(7): 1758-66.
- Krämer, O.H., Knauer, S.K., Zimmermann, D., Stauber, R.H., Heinzl, T. (2008) Histone deacetylase inhibitors and hydroxyurea modulate the cell cycle and cooperatively induce apoptosis. *Oncogene*. 27(6): 732-40.
- Kroemer, G., Dallaporta, B. & Resche-Rigon, M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*. 60: 619-42.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B. & Melino, G. (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 16(1): 3-11.
- Krumm, A., Barckhausen, C., Kucuk, P., Tomaszowski, K. H., Loquai, C., Fahrer, J., Kramer, O. H., Kaina, B. & Roos, W. P. (2016) Enhanced Histone Deacetylase Activity in Malignant Melanoma Provokes RAD51 and FANCD2-Triggered Drug Resistance. *Cancer Res*. 76(10): 3067-77.
- Lambert, J. H. (1760) *Photometria sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae*. Zürich: ETH-Bibliothek.
URL: <https://www.e-rara.ch/zut/wihibe/content/titleinfo/2814923>.
- Lamour, V., Lecluse, Y., Desmaze, C., Spector, M., Bodescot, M., Aurias, A., Osley, M. A. & Lipinski, M. (1995) A human homolog of the *S. cerevisiae* HIR1 and HIR2 transcriptional repressors cloned from the DiGeorge syndrome critical region. *Hum Mol Genet*. 4(5): 791-9.
- Lane, D. P. (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 358(6381): 15-6.
- Larrosa-Garcia, M. & Baer, M. R. (2017) FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Current Status and Future Directions. *Mol Cancer Ther*. 16(6): 991-1001.
- Lavau, C., Du, C., Thirman, M. & Zeleznik-Le, N. (2000) Chromatin-related properties of CBP fused to MLL generate a myelodysplastic-like syndrome that evolves into myeloid leukemia. *Embo j*. 19(17): 4655-64.

- Lee, J. H., Choy, M. L., Ngo, L., Foster, S. S. & Marks, P. A. (2010) Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(33): 14639-44.
- Leipold, M. D., Muller, J. G., Burrows, C. J. & David, S. S. (2000) Removal of hydantoin products of 8-oxoguanine oxidation by the *Escherichia coli* DNA repair enzyme, FPG. *Biochemistry.* 39(48): 14984-92.
- Leung, A. Y., Man, C. H. & Kwong, Y. L. (2013) FLT3 inhibition: a moving and evolving target in acute myeloid leukaemia. *Leukemia.* 27(2): 260-8.
- Levine, A. J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 88(3): 323-31.
- Levis, M. & Small, D. (2003) FLT3: ITDoes matter in leukemia. *Leukemia.* 17(9): 1738-52.
- Li, D. Q. & Kumar, R. (2010) Mi-2/NuRD complex making inroads into DNA-damage response pathway. *Cell Cycle.* 9(11): 2071-9.
- Li, J. Y., Horwitz, S., Moskowitz, A., Myskowski, P. L., Pulitzer, M. & Querfeld, C. (2012) Management of cutaneous T cell lymphoma: new and emerging targets and treatment options. *Cancer Manag Res.* 4: 75-89.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. & Wang, X. (1997a) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 91(4): 479-89.
- Li, P. F., Dietz, R. & von Harsdorf, R. (1997b) Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 96(10): 3602-9.
- Li, Y.-Z., Yu, S., Yan, P.-A., Gong, D.-Y., Wu, F.-L., He, Z., Yuan, Y.-Y., Zhao, A.-Y., Tang, X., Zhang, R.-Q., Peng, C. & Cao, Z.-X. (2017) Crotonoside exhibits selective post-inhibition effect in AML cells via inhibition of FLT3 and HDAC3 6. *Oncotarget.* 8(61): 103087-99.
- Lindqvist, A., Rodriguez-Bravo, V. & Medema, R. H. (2009) The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J Cell Biol.* 185(2): 193-202.
- Liu, H.-I., Chen, Y., Cui, G.-h. & Zhou, J.-f. (2005) Curcumin, a potent anti-tumor reagent, is a novel histone deacetylase inhibitor regulating B-NHL cell line Raji proliferation. *Acta Pharmacol Sin.* 26(5): 603-9.
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. & Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 86(1): 147-57.

- Liu, X., Xie, F., Doughty, L. B., Wang, Q., Zhang, L., Liu, X. & Cheng, Y. Q. (2018) Genomics-guided discovery of a new and significantly better source of anticancer natural drug FK228. *Synth Syst Biotechnol.* 3(4): 268-274.
- Lockshin, R. A. & Williams, C. M. (1965) Programmed cell death. IV. The influence of drugs on the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol.* 11(6): 803-9.
- Loewe, S. & Muchnick, H. (1926) Effect of combinations: mathematical basis of problem. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 114: 313–326.
- Lydall, D. & Weinert, T. (1995) Yeast checkpoint genes in DNA damage processing: implications for repair and arrest. *Science.* 270(5241): 1488-91.
- Lyman, S. D., James, L., Zappone, J., Sleath, P. R., Beckmann, M. P. & Bird, T. (1993) Characterization of the protein encoded by the *flt3* (*flk2*) receptor-like tyrosine kinase gene. *Oncogene.* 8(4): 815-22.
- Mahajan, K., Fang, B., Koomen, J. M. & Mahajan, N. P. (2012) H2B Tyr37 phosphorylation suppresses expression of replication-dependent core histone genes. *Nat Struct Mol Biol.* 19(9): 930-7.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. & Melchior, F. (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell.* 88(1): 97-107.
- Majtnerova, P. & Rousar, T. (2018) An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Mol Biol Rep.* 45(5): 1469-1478.
- Malumbres, M. & Barbacid, M. (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer.* 9(3): 153-66.
- Malvaez, M., McQuown, S. C., Rogge, G. A., Astarabadi, M., Jacques, V., Carreiro, S., Rusche, J. R. & Wood, M. A. (2013) HDAC3-selective inhibitor enhances extinction of cocaine-seeking behavior in a persistent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(7): 2647-52.
- Mariadason, J. M. (2008) HDACs and HDAC inhibitors in colon cancer. *Epigenetics.* 3(1): 28-37.
- Marks, P. A. & Xu, W. S. (2009) Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J Cell Biochem.* 107(4): 600-8.
- Masui, Y. & Markert, C. L. (1971) Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool.* 177(2): 129-45.
- Matheson, C. J., Backos, D. S. & Reigan, P. (2016) Targeting WEE1 Kinase in Cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 37(10): 872-81.

- Mathews Griner, L. A., Guha, R., Shinn, P., Young, R. M., Keller, J. M., Liu, D., Goldlust, I. S., Yasgar, A., McKnight, C., Boxer, M. B., Duvéau, D. Y., Jiang, J. K., Michael, S., Mierzwa, T., Huang, W., Walsh, M. J., Mott, B. T., Patel, P., Leister, W., Maloney, D. J., Leclair, C. A., Rai, G., Jadhav, A., Peyser, B. D., Austin, C. P., Martin, S. E., Simeonov, A., Ferrer, M., Staudt, L. M. & Thomas, C. J. (2014) High-throughput combinatorial screening identifies drugs that cooperate with ibrutinib to kill activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(6): 2349-54.
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K. & Elledge, S. J. (2000) Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(19): 10389-94.
- Maya-Mendoza, A., Moudry, P., Merchut-Maya, J. M., Lee, M., Strauss, R. & Bartek, J. (2018) High speed of fork progression induces DNA replication stress and genomic instability. *Nature.* 559(7713): 279-84.
- Meierhoff, G., Dehmel, U., Gruss, H. J., Rosnet, O., Birnbaum, D., Quentmeier, H., Dirks, W. & Drexler, H. G. (1995) Expression of FLT3 receptor and FLT3-ligand in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia.* 9(8): 1368-72.
- Mignotte, B. & Vayssiere, J. L. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem.* 252(1): 1-15.
- Miller, K. M., Tjeertes, J. V., Coates, J., Legube, G., Polo, S. E., Britton, S. & Jackson, S. P. (2010) Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining. *Nat Struct Mol Biol.* 17(9): 1144-51.
- Mizushima, N. & Komatsu, M. (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 147(4): 728-41.
- Moldovan, G. L., Pfander, B. & Jentsch, S. (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell.* 129(4): 665-79.
- Morsi, R. Z., Hage-Sleiman, R., Kobeissy, H. & Dbaibo, G. (2018) Noxa: Role in Cancer Pathogenesis and Treatment. *Curr Cancer Drug Targets.* 18(10): 914-28.
- Mu, J. J., Wang, Y., Luo, H., Leng, M., Zhang, J., Yang, T., Besusso, D., Jung, S. Y. & Qin, J. (2007) A proteomic analysis of ataxia telangiectasia-mutated (ATM)/ATM-Rad3-related (ATR) substrates identifies the ubiquitin-proteasome system as a regulator for DNA damage checkpoints. *J Biol Chem.* 282(24): 17330-4.
- Muzio, M., Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. (1997) FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J Biol Chem.* 272(5): 2952-6.
- Nakao, M., Yokota, S., Iwai, T., Kaneko, H., Horiike, S., Kashima, K., Sonoda, Y., Fujimoto, T. & Misawa, S. (1996) Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 10(12): 1911-8.

- Newbold, A., Salmon, J. M., Martin, B. P., Stanley, K. & Johnstone, R. W. (2014) The role of p21(waf1/cip1) and p27(Kip1) in HDACi-mediated tumor cell death and cell cycle arrest in the Emu-myc model of B-cell lymphoma. *Oncogene*. 33(47): 5415-23.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. & Riccardi, C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 139(2): 271-9.
- Niculescu, A. B., 3rd, Chen X Fau - Smeets, M., Smeets M Fau - Hengst, L., Hengst L Fau - Prives, C., Prives C Fau - Reed, S. I. & Reed, S. I. (1998) Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol*. 18(1): 629-43.
- Niida, H., Katsuno, Y., Banerjee, B., Hande, M. P. & Nakanishi, M. (2007) Specific Role of Chk1 Phosphorylations in Cell Survival and Checkpoint Activation. *Mol Cell Biol*. 27(7): 2572-81.
- Nordling, C. O. (1953) A new theory on cancer-inducing mechanism. *Br J Cancer*. 7(1): 68-72.
- Normanno, N., De Luca A Fau - Bianco, C., Bianco C Fau - Strizzi, L., Strizzi L Fau - Mancino, M., Mancino M Fau - Maiello, M. R., Maiello Mr Fau - Carotenuto, A., Carotenuto A Fau - De Feo, G., De Feo G Fau - Caponigro, F., Caponigro F Fau - Salomon, D. S. & Salomon, D. S. (2006) Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*. 366(1): 2-16.
- Nurse, P. (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*. 344(6266): 503-8.
- O'Farrell, P. H. (2001) Triggering the all-or-nothing switch into mitosis. *Trends Cell Biol*. 11(12): 512-9.
- Ocker, M. & Schneider-Stock, R. (2007) Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21cip1/waf1. *Int J Biochem Cell Biol*. 39(7-8): 1367-74.
- Odenike, O. M., Alkan, S., Sher, D., Godwin, J. E., Huo, D., Brandt, S. J., Green, M., Xie, J., Zhang, Y., Vesole, D. H., Stiff, P., Wright, J., Larson, R. A. & Stock, W. (2008) Histone deacetylase inhibitor romidepsin has differential activity in core binding factor acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 14(21): 7095-101.
- Ong, Y. L., McMullin, M. F., Bailie, K. E., Lappin, T. R., Jones, F. G. & Irvine, A. E. (2000) High bax expression is a good prognostic indicator in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 111(1): 182-9.
- Ostling, O. & Johanson, K. J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 123(1): 291-8.

- Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Bullinger, L., Gaidzik, V. I., Paschka, P., Roberts, N. D., Potter, N. E., Heuser, M., Thol, F., Bolli, N., Gundem, G., Van Loo, P., Martincorena, I., Ganly, P., Mudie, L., McLaren, S., O'Meara, S., Raine, K., Jones, D. R., Teague, J. W., Butler, A. P., Greaves, M. F., Ganser, A., Döhner, K., Schlenk, R. F., Döhner, H. & Campbell, P. J. (2016) Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 374(23): 2209-21.
- Paracelsus, T. (2014) *Das Buch Paragranum / Septem Defensiones.* Berlin: Hofenberg.
- Parish, C. R. (1999) Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol.* 77(6): 499-508.
- Parker, L. L. & Piwnica-Worms, H. (1992) Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science.* 257(5078): 1955-7.
- Peters, J. M., Cejka, Z., Harris, J. R., Kleinschmidt, J. A. & Baumeister, W. (1993) Structural features of the 26 S proteasome complex. *J Mol Biol.* 234(4): 932-7.
- Petroski, M. D. & Deshaies, R. J. (2005) Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(1): 9-20.
- Pietschmann, K., Bolck, H. A., Buchwald, M., Spielberg, S., Polzer, H., Spiekermann, K., Bug, G., Heinzl, T., Bohmer, F. D. & Kramer, O. H. (2012) Breakdown of the FLT3-ITD/STAT5 axis and synergistic apoptosis induction by the histone deacetylase inhibitor panobinostat and FLT3-specific inhibitors. *Mol Cancer Ther.* 11(11): 2373-83.
- Piper, W. (2006) *Innere Medizin.* Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Poeggel, G. (2009) *Kurzlehrbuch Biologie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Porter, A. G. & Janicke, R. U. (1999) Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6(2): 99-104.
- Porter, C. C., Kim, J., Fosmire, S., Gearheart, C. M., van Linden, A., Baturin, D., Zaberezhnyy, V., Patel, P. R., Gao, D., Tan, A. C. & DeGregori, J. (2012) Integrated genomic analyses identify WEE1 as a critical mediator of cell fate and a novel therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 26(6): 1266-76.
- Pratz, K. W. & Levis, M. J. (2010) Bench to bedside targeting of FLT3 in acute leukemia. *Curr Drug Targets.* 11(7): 781-9.
- Qiu, Q. C., Wang, C., Bao, X. B., Yang, J., Shen, H. J., Ding, Z. X., Liu, H., He, J., Yao, H., Chen, S. N., Li, Z., Xue, S. L. & Liu, S. B. (2018) The impact of FLT3 mutations on treatment response and survival in Chinese de novo AML patients. *Hematology.* 23(3): 131-38.
- Quah, B. J. C. & Parish, C. R. (2010) The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *J Vis Exp.* (44): 2259.

- Rebecca, V. W. & Amaravadi, R. K. (2016) Emerging strategies to effectively target autophagy in cancer. *Oncogene*. 35(1): 1-11.
- Rebechi, M. T. & Pratz, K. W. (2017) Genomic instability is a principle pathologic feature of FLT3 ITD kinase activity in acute myeloid leukemia leading to clonal evolution and disease progression. *Leukemia & lymphoma*. 58(9): 1-11.
- Reckzeh, K., Bereshchenko, O., Mead, A., Rehn, M., Kharazi, S., Jacobsen, S. E., Nerlov, C. & Cammenga, J. (2012) Molecular and cellular effects of oncogene cooperation in a genetically accurate AML mouse model. *Leukemia*. 26(7): 1527-36.
- Reed, S. M. & Quelle, D. E. (2014) p53 Acetylation: Regulation and Consequences. *Cancers*. 7(1): 30-69.
- Rehm, H. & Letzel, T. (2016) *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Richon, V. M., Webb, Y., Merger, R., Sheppard, T., Jursic, B., Ngo, L., Civoli, F., Breslow, R., Rifkind, R. A. & Marks, P. A. (1996) Second generation hybrid polar compounds are potent inducers of transformed cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(12): 5705-8.
- Rogakou, E. P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y. & Bonner, W. M. (2000) Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem*. 275(13): 9390-5.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. & Bonner, W. M. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. 273(10): 5858-68.
- Röllig, C., Beelen, D. W., Braess, J., Greil, R., Niederwieser, D., Passweg, J., Reinhardt, D. & Schlenk, R. F. (2018) Akute Myeloische Leukämie (AML) [Internet]. Last updated April 2018 [zitiert am 19.03.2019]. URL: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@@view/html/index.html>
- Röllig, C., Bornhäuser, M., Thiede, C., Taube, F., Kramer, M., Mohr, B., Aulitzky, W., Bodenstein, H., Tischler, H.-J., Stuhlmann, R., Schuler, U., Stölzel, F., von Bonin, M., Wandt, H., Schäfer-Eckart, K., Schaich, M. & Ehninger, G. (2011) Long-Term Prognosis of Acute Myeloid Leukemia According to the New Genetic Risk Classification of the European LeukemiaNet Recommendations: Evaluation of the Proposed Reporting System. *J Clin Oncol*. 29(20): 2758-65.
- Röllig, C., Serve, H., Hüttmann, A., Noppeney, R., Müller-Tidow, C., Krug, U., Baldus, C. D., Brandts, C. H., Kunzmann, V., Einsele, H., Krämer, A., Schäfer-Eckart, K., Neubauer, A., Burchert, A., Giagounidis, A., Krause, S. W., Mackensen, A., Aulitzky, W., Herbst, R., Hänel, M., Kiani, A., Frickhofen, N., Kullmer, J., Kaiser, U., Link, H., Geer, T., Reichle, A., Junghanß, C., Repp, R., Heits, F., Dürk, H., Hase, J., Klut, I.-M., Illmer, T., Bornhäuser, M., Schaich, M., Parmentier, S., Görner, M., Thiede, C., von Bonin, M., Schetelig, J., Kramer, M., Berdel, W. E. & Ehninger, G. (2015) Addition of sorafenib versus placebo to standard therapy

in patients aged 60 years or younger with newly diagnosed acute myeloid leukaemia (SORAML): a multicentre, phase 2, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 16(16): 1691-9.

- Roninson, I. B. (2002) Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett.* 179(1): 1-14.
- Roos, W. P. & Krumm, A. (2016) The multifaceted influence of histone deacetylases on DNA damage signalling and DNA repair. *Nucleic Acids Res.* 44(21): 10017-30.
- Roos, W. P., Thomas, A. D. & Kaina, B. (2016) DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer.* 16(1): 20-33.
- Rosato, R. R., Almenara J.A. & Grant, S. (2003) 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 p21CIP1/WAF1 1. *Cancer Res.* 63(13): 3637-45.
- Rosato, R. R. & Grant, S. (2005) Histone deacetylase inhibitors: insights into mechanisms of lethality. *Expert Opin Ther Targets.* 9(4): 809-24.
- Rosnet, O., Buhring, H. J., Marchetto, S., Rappold, I., Lavagna, C., Sainty, D., Arnoulet, C., Chabannon, C., Kanz, L., Hannum, C. & Birnbaum, D. (1996) Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia.* 10(2): 238-48.
- Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. & Sharpless, K. B. (2002) A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl.* 41(14): 2596-99.
- Rothkamm, K. & Lobrich, M. (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(9): 5057-62.
- Ruefli, A. A., Ausserlechner, M.J., Bernhard, D., Sutton, V. R., Tainton, K. M., Kofler, R., Smyth, M. J. & Johnstone, R. W. (2001) The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(19): 10833-8.
- Rundle, S., Bradbury, A., Drew, Y. & Curtin, N. J. (2017) Targeting the ATR-CHK1 Axis in Cancer Therapy. *Cancers (Basel).* 9(5): E41.
- Russell, P. & Nurse, P. (1987) Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell.* 49(4): 559-67.
- Saini, P., Li, Y. & Dobbelsstein, M. (2015) Wee1 and Chk1 - crosstalk between key players in replicative stress. *Genes Cancer.* 6(5-6): 182-3.

- Salic, A. & Mitchison, T. J. (2008) A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(7): 2415-20.
- Sanga, M., James, J., Marini, J., Gammon, G., Hale, C. & Li, J. (2017) An open-label, single-dose, phase 1 study of the absorption, metabolism and excretion of quizartinib, a highly selective and potent FLT3 tyrosine kinase inhibitor, in healthy male subjects, for the treatment of acute myeloid leukemia. *Xenobiotica.* 47(10): 856-69.
- Santoro, F., Botrugno, O. A., Dal Zuffo, R., Pallavicini, I., Matthews, G. M., Cluse, L., Barozzi, I., Senese, S., Fornasari, L., Moretti, S., Altucci, L., Pelicci, P. G., Chiocca, S., Johnstone, R. W. & Minucci, S. (2013) A dual role for Hdac1: oncosuppressor in tumorigenesis, oncogene in tumor maintenance. *Blood.* 121(17): 3459-68.
- Satoh, M. S. & Lindahl, T. (1992) Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature.* 356(6367): 356-8.
- Savill, J. & Fadok, V. (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 407(6805): 784-8.
- Schmidt-Arras, D., Bohmer, S. A., Koch, S., Muller, J. P., Blei, L., Cornils, H., Bauer, R., Korasikha, S., Thiede, C. & Bohmer, F. D. (2009) Anchoring of FLT3 in the endoplasmic reticulum alters signaling quality. *Blood.* 113(15): 3568-76.
- Schmidt-Arras, D. E., Bohmer, A., Markova, B., Choudhary, C., Serve, H. & Bohmer, F. D. (2005) Tyrosine phosphorylation regulates maturation of receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol.* 25(9): 3690-703.
- Seedhouse, C. H., Hunter Hm Fau - Lloyd-Lewis, B., Lloyd-Lewis B Fau - Massip, A. M., Massip Am Fau - Pallis, M., Pallis M Fau - Carter, G. I., Carter Gi Fau - Grundy, M., Grundy M Fau - Shang, S., Shang S Fau - Russell, N. H. & Russell, N. H. (2006) DNA repair contributes to the drug-resistant phenotype of primary acute myeloid leukaemia cells with FLT3 internal tandem duplications and is reversed by the FLT3 inhibitor PKC412. *Leukemia.* 20(12): 2130-6.
- Sharma, S. V., Lee, D. Y., Li, B., Quinlan, M. P., Takahashi, F., Maheswaran, S., McDermott, U., Azizian, N., Zou, L., Fischbach, M. A., Wong, K. K., Brandstetter, K., Wittner, B., Ramaswamy, S., Classon, M. & Settleman, J. (2010) A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell.* 141(1): 69-80.
- Shibata, E., Abbas, T., Huang, X., Wohlschlegel, J. A. & Dutta, A. (2011) Selective ubiquitylation of p21 and Cdt1 by UBE2G and UBE2H ubiquitin-conjugating enzymes via the CRL4Cdt2 ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol.* 31(15): 3136-45.
- Shinohara, A., Ogawa, H. & Ogawa, T. (1992) Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell.* 69(3): 457-70.
- Shipley, J. L. & Butera, J. N. (2009) Acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol.* 37(6): 649-58.

- Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. (2019) Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 69(1): 7-34.
- Small, D. (2006) FLT3 mutations: biology and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006(1): 178-84.
- Smith, B. J. (1984) SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Methods Mol Biol.* 1: 41-55.
- Smith, C. C., Wang, Q., Chin, C. S., Salerno, S., Damon, L. E., Levis, M. J., Perl, A. E., Travers, K. J., Wang, S., Hunt, J. P., Zarrinkar, P. P., Schadt, E. E., Kasarskis, A., Kuriyan, J. & Shah, N. P. (2012) Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. *Nature.* 485(7397): 260-3.
- Smith, L. D. & Ecker, R. E. (1971) The interaction of steroids with *Rana pipiens* Oocytes in the induction of maturation. *Dev Biol.* 25(2): 232-47.
- Southam, C. M., Craver, L. F., Dargeon, H. W. & Burchenal, J. H. (1951) A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions. *Cancer.* 4(1): 39-59.
- Stone, R. M., Mandrekar, S., Sanford, B. L., Geyer, S., Bloomfield, C. D., Dohner, K., Thiede, C., Marcucci, G., Lo-Coco, F., Klisovic, R. B., Wei, A., Sierra, J., Sanz, M. A., Brandwein, J. M., de Witte, T., Niederwieser, D., Appelbaum, F. R., Medeiros, B. C., Tallman, M. S., Krauter, J., Schlenk, R. F., Ganser, A., Serve, H., Ehninger, G., Amadori, S., Larson, R. A. & Döhner, H. (2015) The Multi-Kinase Inhibitor Midostaurin (M) Prolongs Survival Compared with Placebo (P) in Combination with Daunorubicin (D)/Cytarabine (C) Induction (ind), High-Dose C Consolidation (consol), and As Maintenance (maint) Therapy in Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia (AML) Patients (pts) Age 18-60 with FLT3 Mutations (muts): An International Prospective Randomized (rand) P-Controlled Double-Blind Trial (CALGB 10603/RATIFY [Alliance]). *Blood.* 126(23): 6.
- Stone, R. M., Mandrekar, S. J., Sanford, B. L., Laumann, K., Geyer, S., Bloomfield, C. D., Thiede, C., Prior, T. W., Döhner, K., Marcucci, G., Lo-Coco, F., Klisovic, R. B., Wei, A., Sierra, J., Sanz, M. A., Brandwein, J. M., de Witte, T., Niederwieser, D., Appelbaum, F. R., Medeiros, B. C., Tallman, M. S., Krauter, J., Schlenk, R. F., Ganser, A., Serve, H., Ehninger, G., Amadori, S., Larson, R. A. & Döhner, H. (2017) Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med.* 377(5): 454-64.
- Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N. & Price, B. D. (2005) A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(37): 13182-7.
- Suzuki, A., Tsutomi, Y., Miura, M. & Akahane, K. (1999) Caspase 3 inactivation to suppress Fas-mediated apoptosis: identification of binding domain with p21 and ILP and inactivation machinery by p21. *Oncogene.* 18(5): 1239-44.

- Swanton, E., Savory, P., Cosulich, S., Clarke, P. & Woodman, P. (1999) Bcl-2 regulates a caspase-3/caspase-2 apoptotic cascade in cytosolic extracts. *Oncogene*. 18(10): 1781-7.
- Takahashi, S. (2011) Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: Biology and therapeutic implications. *J Hematol Oncol*. 4: 13.
- Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D. A., Vigna, N., Oltersdorf, T. & Reed, J. C. (1998) IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res*. 58(23): 5315-20.
- Tamura, T., Nagy, I., Lupas, A., Lottspeich, F., Cejka, Z., Schoofs, G., Tanaka, K., De Mot, R. & Baumeister, W. (1995) The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*. *Curr Biol*. 5(7): 766-74.
- Tan, X., Grollman, A. P. & Shibutani, S. (1999) Comparison of the mutagenic properties of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyadenosine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine DNA lesions in mammalian cells. *Carcinogenesis*. 20(12): 2287-92.
- Tan, X., Hu, L., Luquette, L. J., 3rd, Gao, G., Liu, Y., Qu, H., Xi, R., Lu, Z. J., Park, P. J. & Elledge, S. J. (2012) Systematic identification of synergistic drug pairs targeting HIV. *Nat Biotechnol*. 30(11): 1125-30.
- Tanaka, N., Patel, A. A., Tang, L., Silver, N. L., Lindemann, A., Takahashi, H., Jaksik, R., Rao, X., Kalu, N. N., Chen, T. C., Wang, J., Frederick, M. J., Johnson, F., Gleber-Netto, F. O., Fu, S., Kimmel, M., Wang, J., Hittelman, W. N., Pickering, C. R., Myers, J. N. & Osman, A. A. (2017) Replication Stress Leading to Apoptosis within the S-phase Contributes to Synergism between Vorinostat and AZD1775 in HNSCC Harboring High-Risk TP53 Mutation. *Clin Cancer Res*. 23(21): 6541-54.
- Tanimoto, A., Takeuchi, S., Arai, S., Fukuda, K., Yamada, T., Roca, X., Ong, S. T. & Yano, S. (2017) Histone Deacetylase 3 Inhibition Overcomes BIM Deletion Polymorphism-Mediated Osimertinib Resistance in EGFR-Mutant Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 23(12): 3139-49.
- Tanious, F. A., Veal, J. M., Buczak, H., Ratmeyer, L. S. & Wilson, W. D. (1992) DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry*. 31(12): 3103-12.
- Taunton, J., Hassig, C. A. & Schreiber, S. L. (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*. 272(5260): 408-11.
- Testa, U., Pelosi, E. & Frankel, A. (2014) CD 123 is a membrane biomarker and a therapeutic target in hematologic malignancies. *Biomark Res*. 2(1): 4.

- Testa, U., Riccioni, R., Militi, S., Coccia, E., Stellacci, E., Samoggia, P., Latagliata, R., Mariani, G., Rossini, A., Battistini, A., Lo-Coco, F. & Peschle, C. (2002) Elevated expression of IL-3R α in acute myelogenous leukemia is associated with enhanced blast proliferation, increased cellularity, and poor prognosis. *Blood*. 100(8): 2980-8.
- The MAK-Collection for Occupational Health and Safety (2009) Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und ihre Alkalisalze [MAK Value Documentation in German language, 2009]. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Online Library: The MAK-Collection for Occupational Health and Safety. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/3527600418.mb6000d0046>
- Thiede, C., Steudel, C., Mohr, B., Schaich, M., Schäkel, U., Platzbecker, U., Wermke, M., Bornhäuser, M., Ritter, M., Neubauer, A., Ehninger, G. & Illmer, T. (2002) Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 99(12): 4326-35.
- Thurn, K. T., Thomas, S., Raha, P., Qureshi, I. & Munster, P. N. (2013) Histone deacetylase regulation of ATM-mediated DNA damage signaling. *Mol Cancer Ther*. 12(10): 2078-87.
- Toledo, L. I., Altmeyer, M., Rask, M. B., Lukas, C., Larsen, D. H., Povlsen, L. K., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Bartek, J. & Lukas, J. (2013) ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell*. 155(5): 1088-103.
- Tornøe, C. W., Christensen, C. & Meldal, M. (2002) Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J Org Chem*. 67(9): 3057-64.
- Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*. 61(2): 203-12.
- Umezawa, Y., Kurosu, T., Akiyama, H., Wu, N., Nogami, A., Nagao, T. & Miura, O. (2016) Down regulation of Chk1 by p53 plays a role in synergistic induction of apoptosis by chemotherapeutics and inhibitors for Jak2 or BCR/ABL in hematopoietic cells. *Oncotarget*. 7(28): 44448-61.
- Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (2013) Prinzip der Durchflußzytometrie [Internet]. Last updated 09.11.2013 [zitiert am 22.03.2019]. URL: <http://www.unimedizin-mainz.de/facs/durchflusssysteme/prinzip-der-durchflusssysteme.html>
- Van Dyke, M. W. (2014) Lysine deacetylase (KDAC) regulatory pathways: an alternative approach to selective modulation. *ChemMedChem*. 9(3): 511-22.
- Van Noorden, C. J. (2001) The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta Histochem*. 103(3): 241-51.

- Vaux, D. L. & Korsmeyer, S. J. (1999) Cell death in development. *Cell*. 96(2): 245-54.
- Venditti, A., Del Poeta, G., Maurillo, L., Buccisano, F., Del Principe, M. I., Mazzone, C., Tamburini, A., Cox, C., Panetta, P., Neri, B., Ottaviani, L. & Amadori, S. (2004) Combined analysis of bcl-2 and MDR1 proteins in 256 cases of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 89(8): 934-9.
- Vermes, I., Haanen C Fau - Steffens-Nakken, H., Steffens-Nakken H Fau - Reutelingsperger, C. & Reutelingsperger, C. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 184(1): 39-51.
- Vilenchik, M. M. & Knudson, A. G. (2003) Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(22): 12871-6.
- Virchow, R. (1856) *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin* [electronic resource]. Frankfurt a.M.: Verlag von Meidinger & Sohn Comp. [zitiert am 12.04.2019]. URL: <https://archive.org/details/b21462161>
- Wallberg, F., Tenev, T. & Meier, P. (2016) Analysis of Apoptosis and Necroptosis by Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016(4): pdb.prot087387.
- Wang, L., Leite de Oliveira, R., Huijberts, S., Bosdriesz, E., Pencheva, N., Brunen, D., Bosma, A., Song, J. Y., Zevenhoven, J., Los-de Vries, G. T., Horlings, H., Nuijen, B., Beijnen, J. H., Schellens, J. H. M. & Bernards, R. (2018) An Acquired Vulnerability of Drug-Resistant Melanoma with Therapeutic Potential. *Cell*. 173(6): 1413-25
- Wang, S. J., Li, D., Ou, Y., Jiang, L., Chen, Y., Zhao, Y. & Gu, W. (2016) Acetylation Is Crucial for p53-Mediated Ferroptosis and Tumor Suppression. *Cell Rep*. 17(2): 366-73.
- Ward, J. F. (1988) DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 35: 95-125.
- Wells, C. E., Bhaskara, S., Stengel, K. R., Zhao, Y., Sirbu, B., Chagot, B., Cortez, D., Khabele, D., Chazin, W. J., Cooper, A., Jacques, V., Rusche, J., Eischen, C. M., McGirt, L. Y. & Hiebert, S. W. (2013) Inhibition of histone deacetylase 3 causes replication stress in cutaneous T cell lymphoma. *PLoS One*. 8(7): e68915.
- White, E. (2015) The role for autophagy in cancer. *J Clin Invest*. 125(1): 42-6.
- Wilson, A. J., Byun, D. S., Popova, N., Murray, L. B., L'Italien, K., Sowa, Y., Arango, D., Velcich, A., Augenlicht, L. H. & Mariadason, J. M. (2006) Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem*. 281(19): 13548-58.

- Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D. & Levine, A. J. (1993) The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 7(7A): 1126-32.
- Xue, Y., Wong, J., Moreno, G. T., Young, M. K., Cote, J. & Wang, W. (1998) NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell.* 2(6): 851-61.
- Yan, B., Chen, Q., Shimada, K., Tang, M., Li, H., Gurumurthy, A., Khoury, J. D., Xu, B., Huang, S. & Qiu, Y. (2018) Histone deacetylase inhibitor targets CD123/CD47-positive cells and reverse chemoresistance phenotype in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 33(4): 931-44.
- Yang, W. M., Tsai, S. C., Wen, Y. D., Fejer, G. & Seto, E. (2002) Functional domains of histone deacetylase-3. *J Biol Chem.* 277(11): 9447-54.
- Yang, X. J. (2004) The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Res.* 32(3): 959-76.
- Ye, P., Xing, H., Lou, F., Wang, K., Pan, Q., Zhou, X., Gong, L. & Li, D. (2016) Histone deacetylase 2 regulates doxorubicin (Dox) sensitivity of colorectal cancer cells by targeting ABCB1 transcription. *Cancer Chemother Pharmacol.* 77(3): 613-21.
- Yi, J., Huang, X., Yang, Y., Zhu, W. G., Gu, W. & Luo, J. (2014) Regulation of histone acetyltransferase TIP60 function by histone deacetylase 3. *J Biol Chem.* 289(49): 33878-86.
- Yokota, S., Kiyoi H Fau - Nakao, M., Nakao M Fau - Iwai, T., Iwai T Fau - Misawa, S., Misawa S Fau - Okuda, T., Okuda T Fau - Sonoda, Y., Sonoda Y Fau - Abe, T., Abe T Fau - Kahsima, K., Kahsima K Fau - Matsuo, Y., Matsuo Y Fau - Naoe, T. & Naoe, T. (1997) Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia.* 11(10): 1605-9.
- Yoshimura, T., Kameyama, K., Takagi, T., Ikai, A., Tokunaga, F., Koide, T., Tanahashi, N., Tamura, T., Cejka, Z., Baumeister, W. & et al. (1993) Molecular characterization of the "26S" proteasome complex from rat liver. *J Struct Biol.* 111(3): 200-11.
- Yu, X. D., Wang, S. Y., Chen, G. A., Hou, C. M., Zhao, M., Hong, J. A., Nguyen, D. M. & Schrupp, D. S. (2007) Apoptosis induced by depsipeptide FK228 coincides with inhibition of survival signaling in lung cancer cells. *Cancer J.* 13(2): 105-13.
- Zarrinkar, P. P., Gunawardane, R. N., Cramer, M. D., Gardner, M. F., Brigham, D., Belli, B., Karaman, M. W., Pratz, K. W., Pallares, G., Chao, Q., Sprankle, K. G., Patel, H. K., Levis, M., Armstrong, R. C., James, J. & Bhagwat, S. S. (2009) AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). *Blood.* 114(14): 2984-92.
- Zeman, M. K. & Cimprich, K. A. (2014) Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol.* 16(1): 2-9.

- Zhou, J., Bi, C., Janakakumara, J. V., Liu, S. C., Chng, W. J., Tay, K. G., Poon, L. F., Xie, Z., Palaniyandi, S., Yu, H., Glaser, K. B., Albert, D. H., Davidsen, S. K. & Chen, C. S. (2009) Enhanced activation of STAT pathways and overexpression of survivin confer resistance to FLT3 inhibitors and could be therapeutic targets in AML. *Blood*. 113(17): 4052-62.
- Zhou, L., Zhang, Y., Chen, S., Kmiecik, M., Leng, Y., Lin, H., Rizzo, K. A., Dumur, C. I., Ferreira-Gonzalez, A., Dai, Y. & Grant, S. (2015) A regimen combining the Wee1 inhibitor AZD1775 with HDAC inhibitors targets human acute myeloid leukemia cells harboring various genetic mutations. *Leukemia*. 29(4): 807-18.
- Zhu, Q., Battu, A., Ray, A., Wani, G., Qian, J., He, J., Wang, Q. E. & Wani, A. A. (2015) Damaged DNA-binding protein down-regulates epigenetic mark H3K56Ac through histone deacetylase 1 and 2. *Mutat Res*. 776: 16-23.
- Zhu, W., Abbas, T. & Dutta, A. (2005) DNA replication and genomic instability. *Adv Exp Med Biol*. 570: 249-79.

Anhang

Abb. A

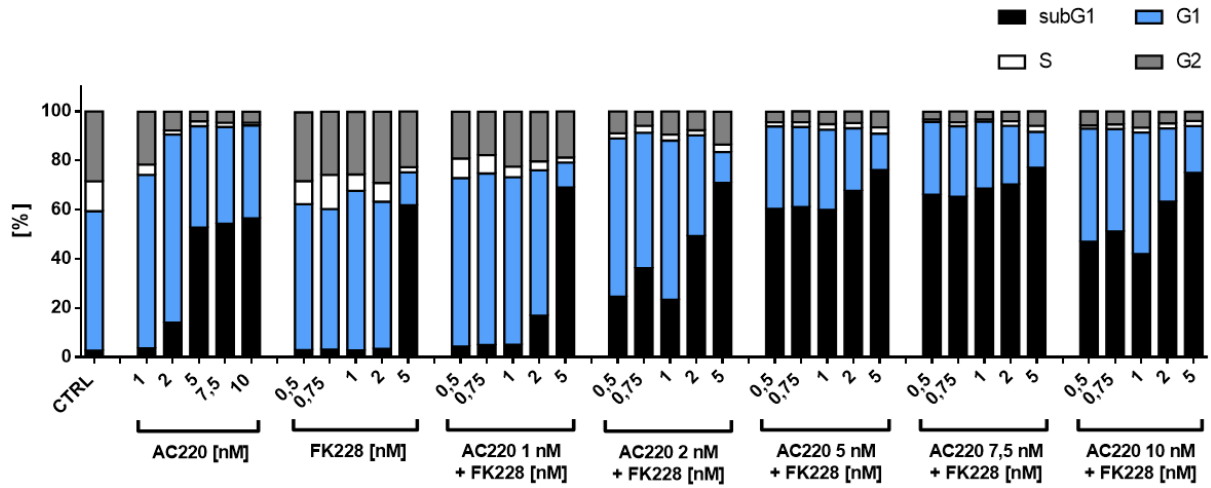
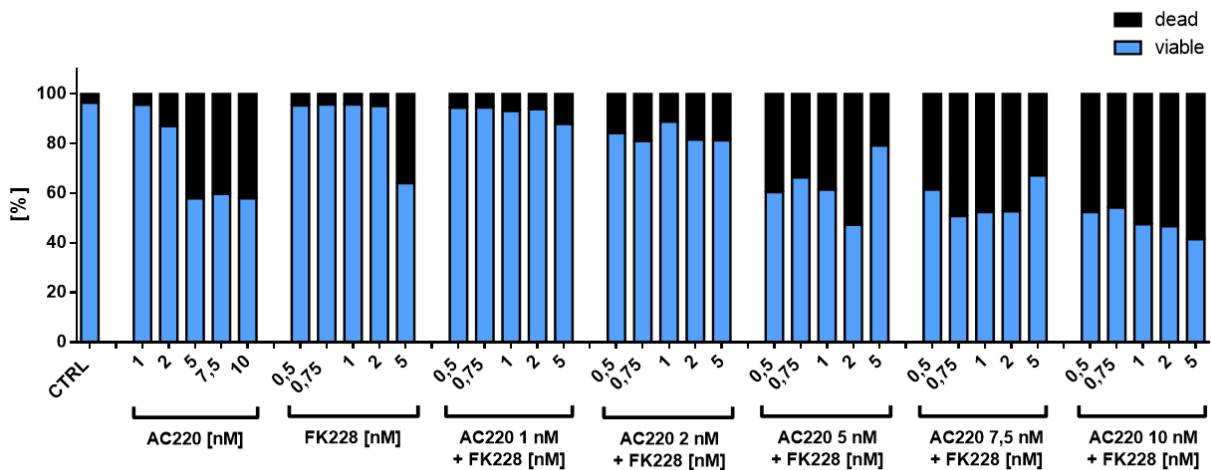


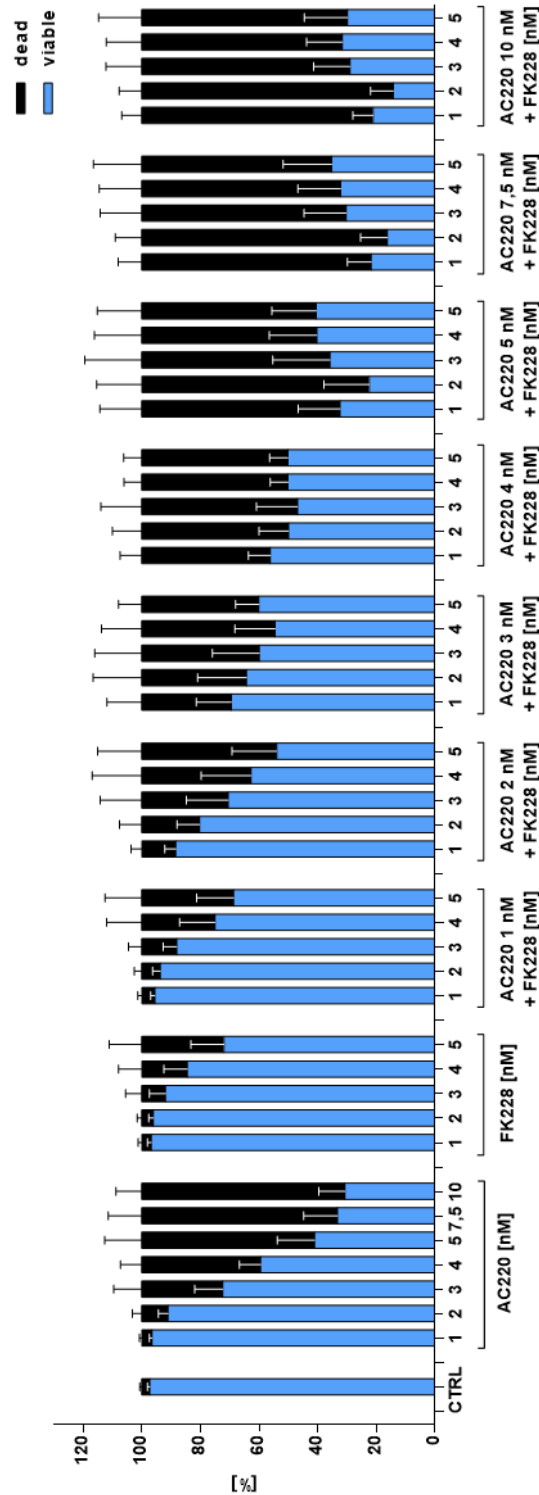
Abb. B



Abbildungen A und B: Quantitative Darstellung der durch Durchflusszytometrie ermittelten zellulären Reaktionen der MV4-11 Zellen nach 24 h mit dem FLT3i AC220 und dem Klasse I HDACi FK228 in Einzel- und/oder Kombinationsbehandlung als Dosisreihe; n = 1

(A) Darstellung der Zellzyklusverteilung mittels PI-Färbung. (B) Darstellung der Vitalität der Zellen durch Anfärben mit DAPI als *Viability*-Messung.

Abb. C



Abbildungen C und D: Zelluläre Reaktionen auf kombinierte Behandlungen aus FLT3i AC220 mit Klasse I HDACi FK228 in MV4-11 Zellen nach 24 h; n = 6

(C) Die Zellen wurden mit AC220 und FK228 einzeln und kombiniert behandelt. Zur Färbung wurde DAPI verwendet. Die Proben wurden über Durchflusszytometrie gemessen. Die *Viability*-Anteile sind prozentual dargestellt. Das Balkendiagramm wurde mittels GraphPad Prism 6 erstellt. (D) Die Abbildung wurde mit dem Programm Combobenefit erstellt und basiert auf Abb. C. Dargestellt werden die Mittelwerte des Synergismus sowie die Standardabweichung.

Abb. D

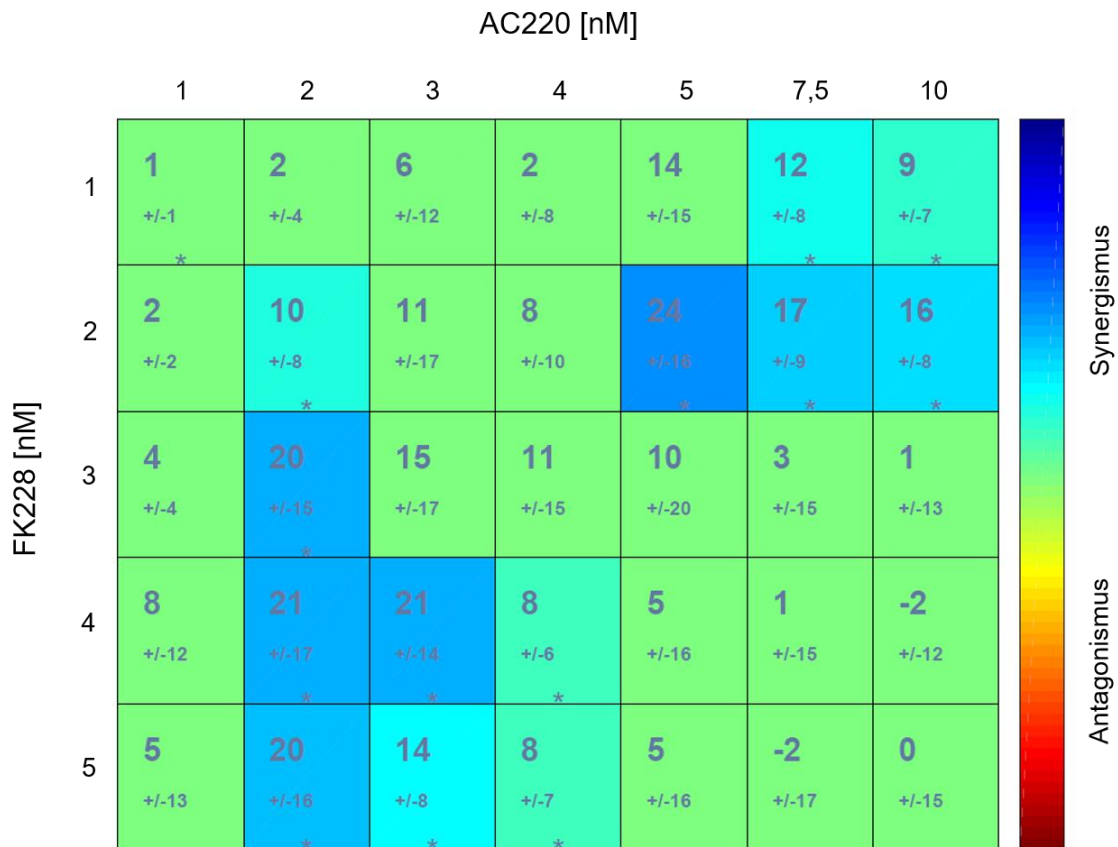


Abb. E

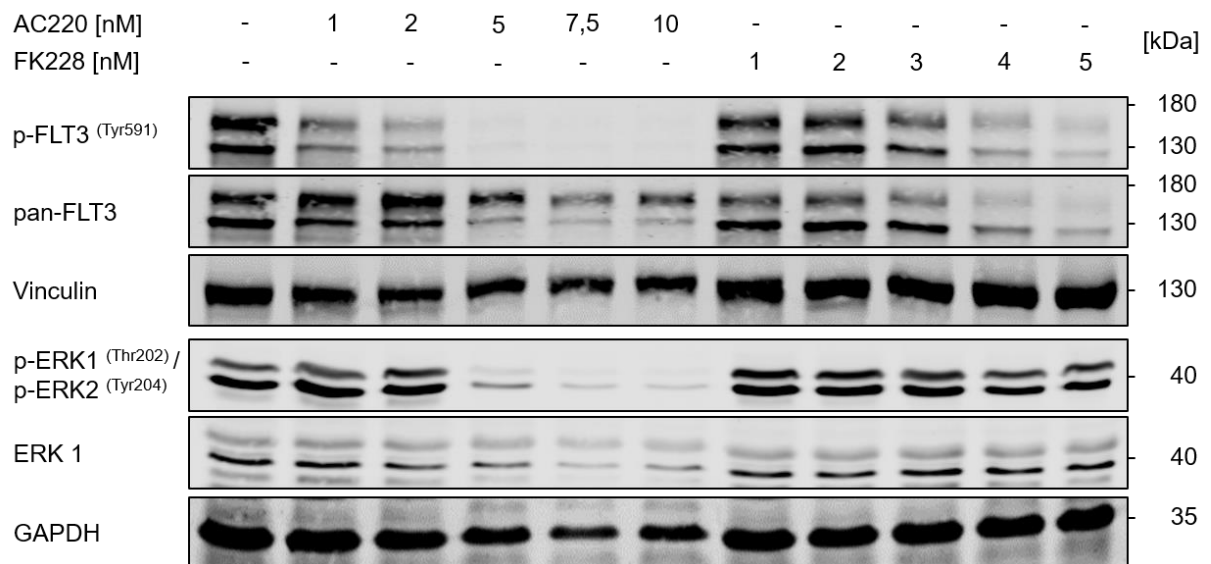


Abbildung E: Western-Blot-Analyse von Markern der FLT3-Signalkaskade in MV4-11 Zellen nach 24 h

Einzelbehandlung mit AC220 und FK228. Gezeigt sind p-FLT3^(Tyr591), pan-FLT3, p-ERK1^(Thr202) / p-ERK2^(Tyr204) und ERK1. Als Ladekontrolle diente Vinculin und GAPDH.

Abb. F

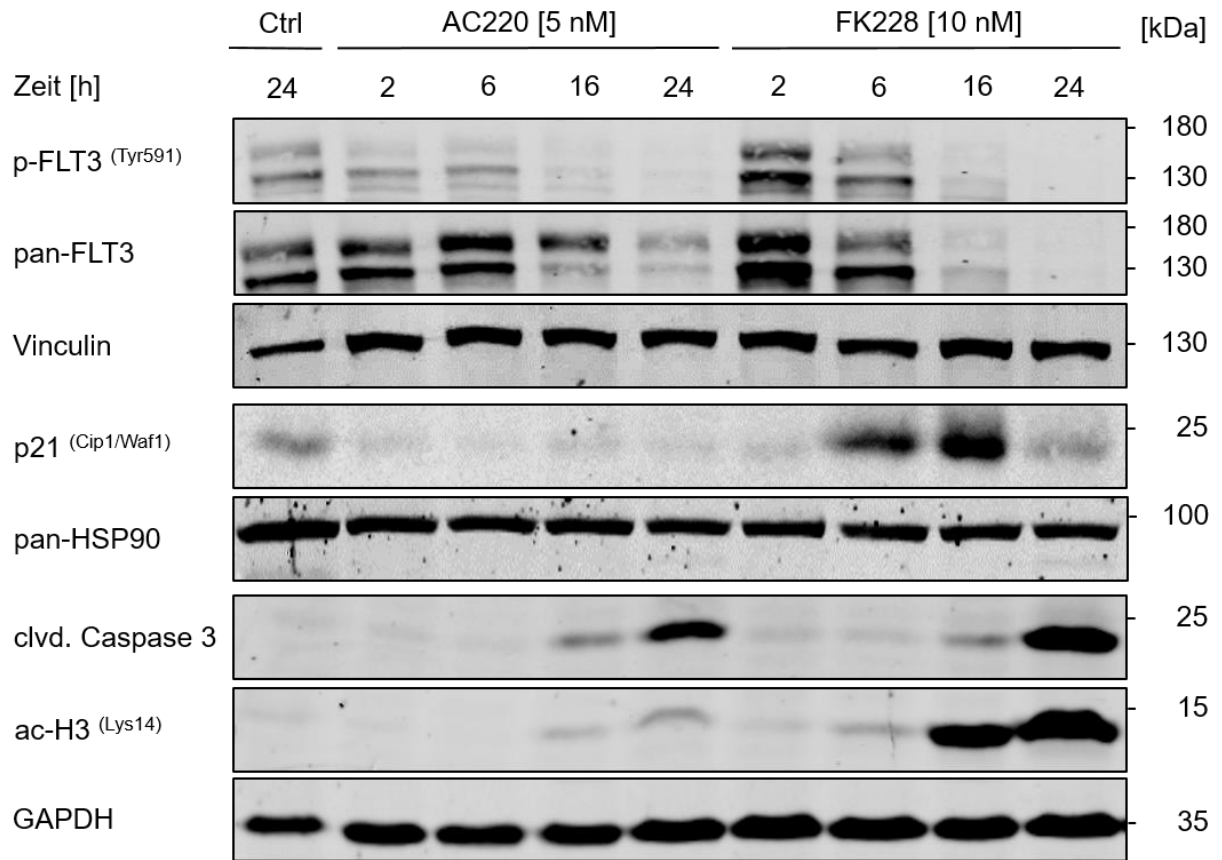


Abbildung F: Western-Blot-Analyse von Markern der FLT3-Signalkaskade, des Zellzyklus, der Apoptose und der Wirksamkeit des HDACi FK228

Die Expression der oben aufgeführten Proteine wurde nach 2 h, nach 6 h, nach 16 h und nach 24 h als Einzelbehandlung untersucht. Als Ladekontrolle wurden Vinculin, pan-HSP90 und GAPDH verwendet.

Abb. G

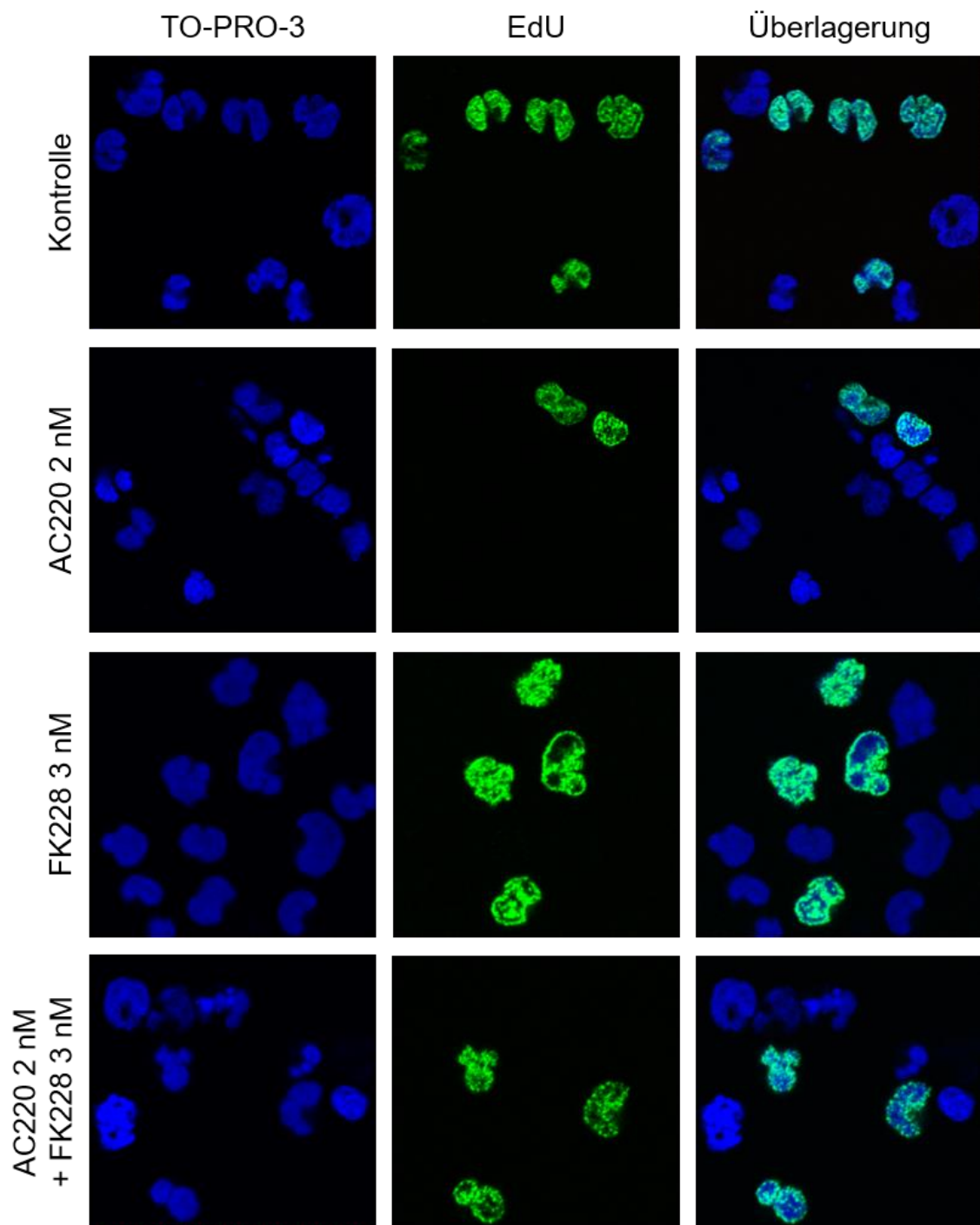


Abbildung G: Quantitative exemplarische Darstellung der einzelnen Kanäle der Immunfluoreszenzfärbung mit EdU in MV4-11 Zellen

Die Veranschaulichung des Verhältnisses von EdU-positiven Zellen zu ungefärbten, EdU-negativen Zellen bezieht sich auf eine Zellzahl von 100. Die Zellen wurden 16 h mit AC220 und/oder FK228 behandelt; n = 2.

Abb. H

Ausgangswert	Vergleichswert	Signifikanz
AC220 1 nM	AC220 1 nM + FK228 2 nM	ns
FK228 2 nM	AC220 1 nM + FK228 2 nM	ns
AC220 1 nM	AC220 1 nM + FK228 3 nM	ns
FK228 3 nM	AC220 1 nM + FK228 3 nM	ns
AC220 2 nM	AC220 2 nM + FK228 2 nM	ns
FK228 2 nM	AC220 2 nM + FK228 2 nM	ns
AC220 2 nM	AC220 2 nM + FK228 3 nM	ns
FK228 3 nM	AC220 2 nM + FK228 3 nM	ns
AC220 3 nM	AC220 3 nM + FK228 2 nM	ns
FK228 2 nM	AC220 3 nM + FK228 2 nM	ns
AC220 3 nM	AC220 3 nM + FK228 3 nM	ns
FK228 3 nM	AC220 3 nM + FK228 3 nM	ns
AC220 5 nM	AC220 5 nM + FK228 2 nM	ns
FK228 2 nM	AC220 5 nM + FK228 2 nM	**
AC220 5 nM	AC220 5 nM + FK228 3 nM	ns
FK228 3 nM	AC220 5 nM + FK228 3 nM	*

Abb. I

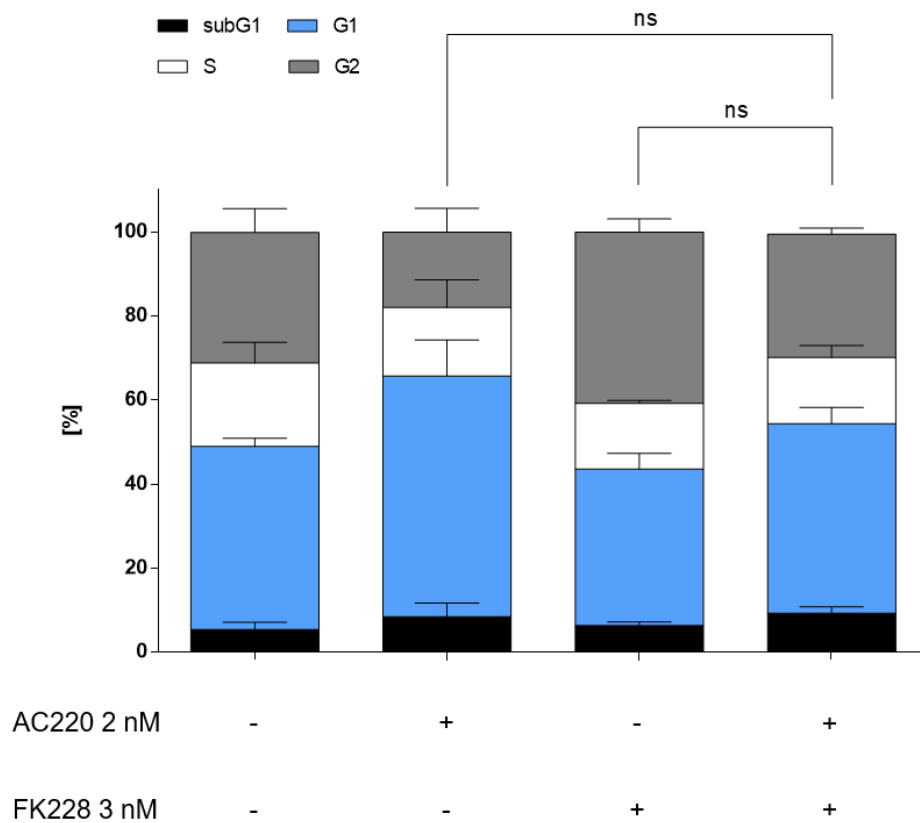


Abb. J



Abbildungen H-J: Verschiedene Darstellungen der Signifikanz des Synergismus auf die einzelne sowie kombinierte Gabe von AC220 und FK228 in MV4-11 Zellen nach 16 h Behandlung; n = 3

(H) Tabellarische Aufführung der Signifikanz interessierender Mengen von AC220 und FK228 in Einzelbehandlung im Vergleich zur Kombination bezogen auf die subG1-Population, jeweils nach 16 h Behandlung. Abb. I stellt eine Passage der Tabelle beispielhaft dar. *Two way ANOVA*; $p < 0,05$; $n = 3 + SD$; Bonferroni *multiple comparison test*; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (I) Quantitative Darstellung der Zellzyklusverteilung der Zelllinie MV4-11. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte anhand einer PI-Färbung. Beispielhafte Darstellung der Signifikanz der subG1-Population nach 16 h Behandlung, basierend auf Abb. H. Dargestellt ist eine zuvor, nach 24 h, ermittelte attraktive Kombinationsbehandlungsmenge. *Two way ANOVA*; $p < 0,05$; $n = 3 + SD$; Bonferroni *multiple comparison test*. (J) Die Abbildung wurde mittels des Programmes Combeneffit erstellt und basiert auf den quantitativen Daten der Abb. 15-A. Dargestellt werden die Mittelwerte des Synergismus bzw. Antagonismus sowie die Standardabweichung.

Abb. K

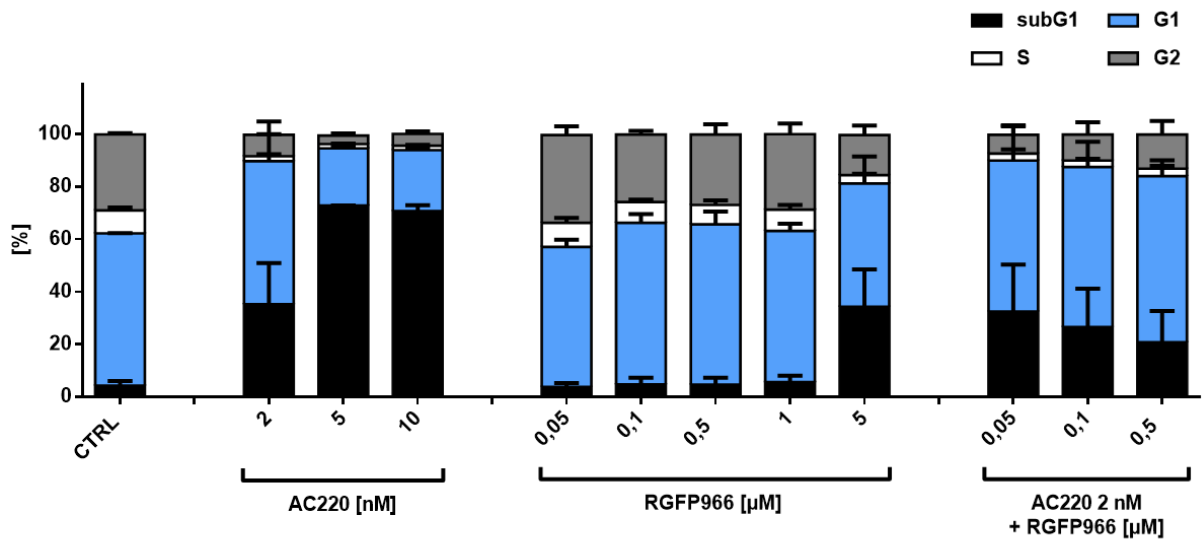
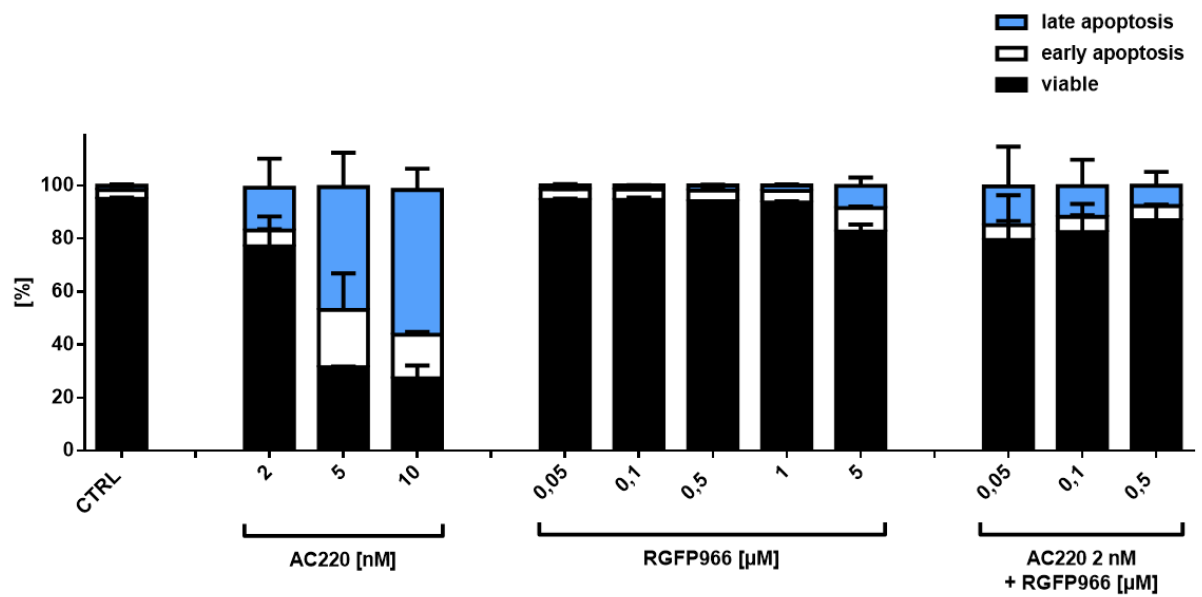


Abb. L



Abbildungen K und L: Quantitative Darstellung der durch Durchflusszytometrie ermittelten zellulären Reaktionen der MV4-11 Zellen nach 24 h mit AC220 und RGFP966 in Einzel- und/oder Kombinationsbehandlung als Dosisreihe; n = 2

(K) Darstellung der Zellzyklusverteilung mittels PI-Färbung. (L) Darstellung der Apoptoserate der Zellen durch Anfärben mit PI und fluoreszenz gekoppelten Annexin V.

Abb. M

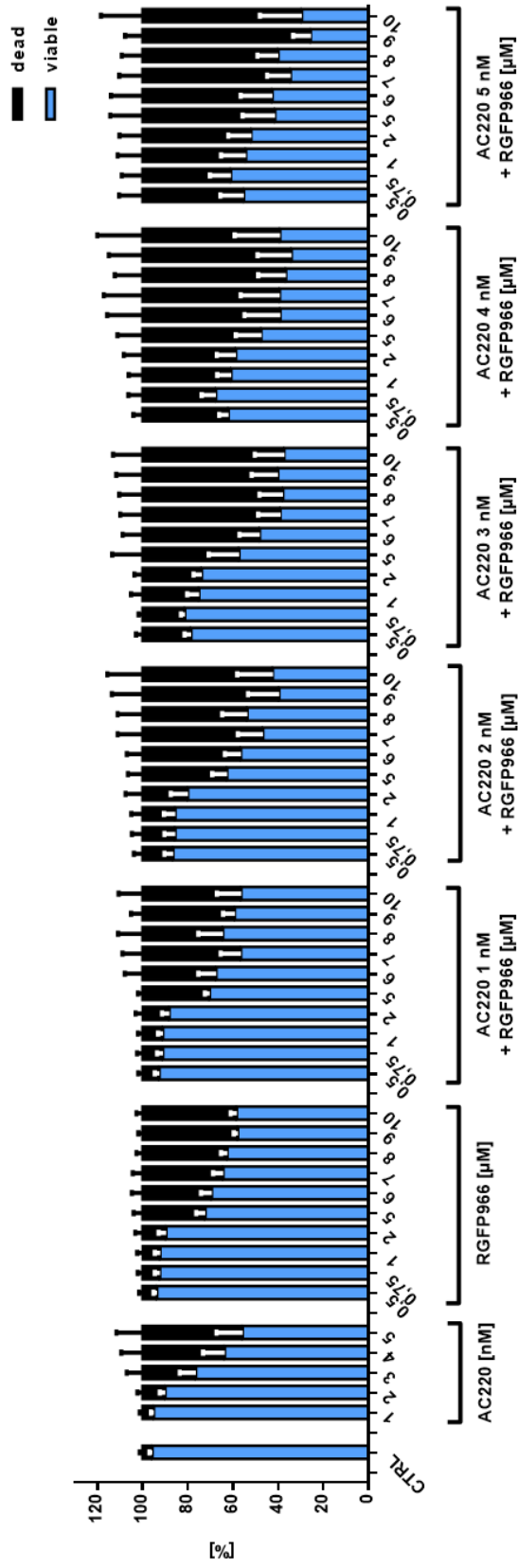
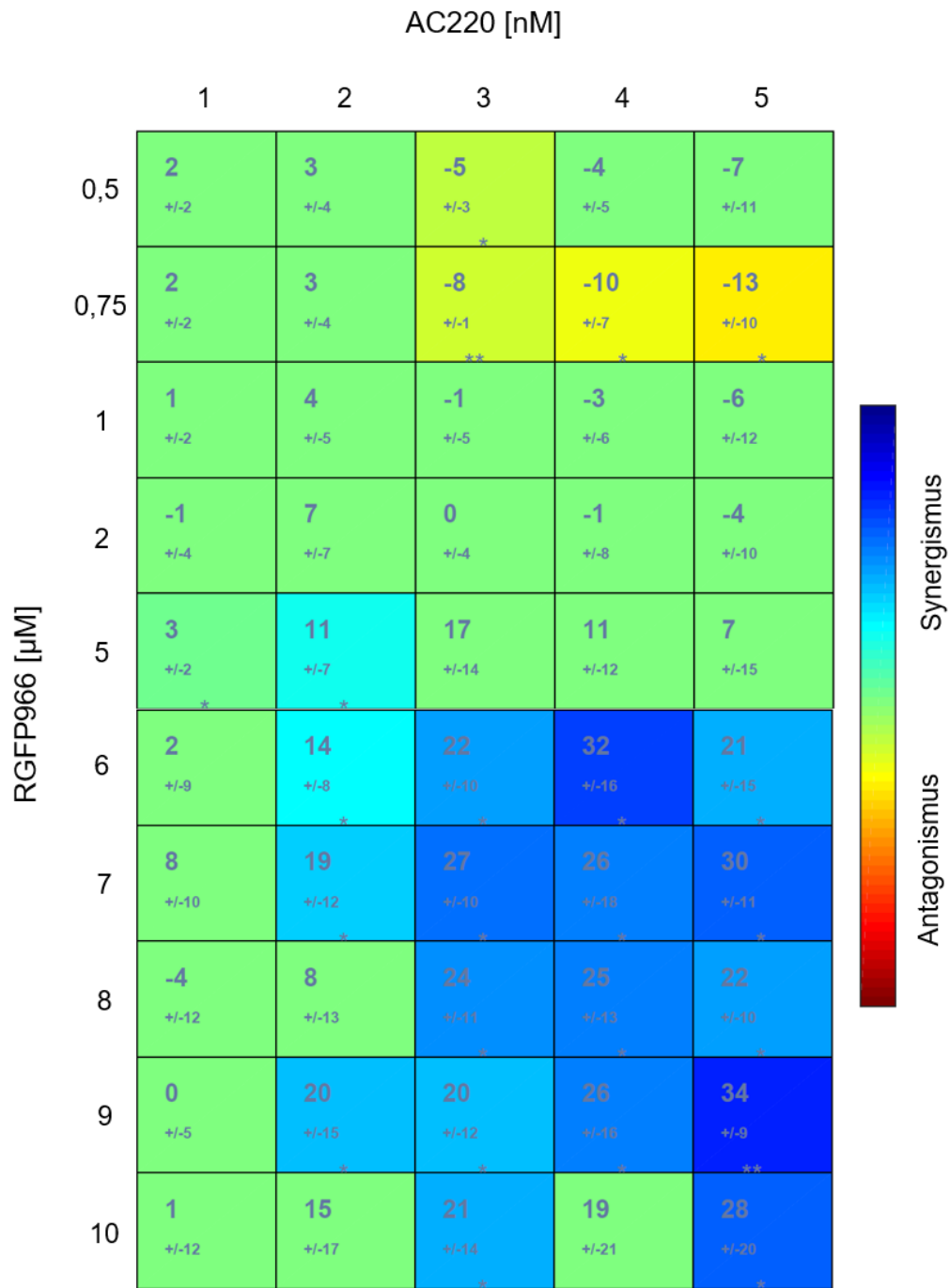


Abb. N



Abbildungen M und N: Zelluläre Reaktionen auf kombinierte Behandlungen aus FLT3i AC220 mit HDAC3i RGFP966 in MV4-11 Zellen nach 24 h; n = 5

(M) Die Zellen wurden mit den zuvor genannten Inhibitoren einzeln und kombiniert behandelt. Zur Färbung wurde DAPI verwendet. Die Proben wurden über Durchflusszytometrie gemessen. Die *Viability*-Anteile sind prozentual dargestellt. Das Balkendiagramm wurde mittels GraphPad Prism 6 erstellt. (N) Die Abbildung wurde mit dem Programm Combenefit erstellt und basiert auf Abb. M. Dargestellt werden die Mittelwerte des Synergismus bzw. Antagonismus sowie die Standardabweichung.

Abb. O

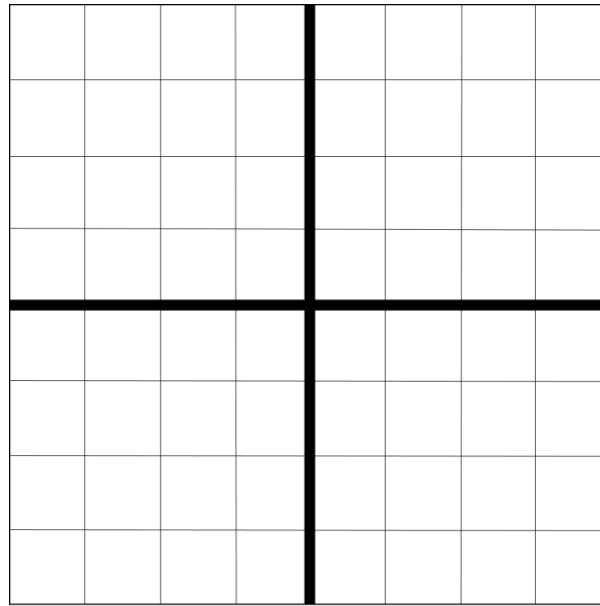


Abbildung O: Vereinfachte Darstellung einer Neubauer-Zählkammer

Die Zählkammer ist in 4 Quadranten eingeteilt, welche wiederum aus 4 x 4 quadratischen Feldern bestehen; Quelle: eigene Darstellung.

Abb. P

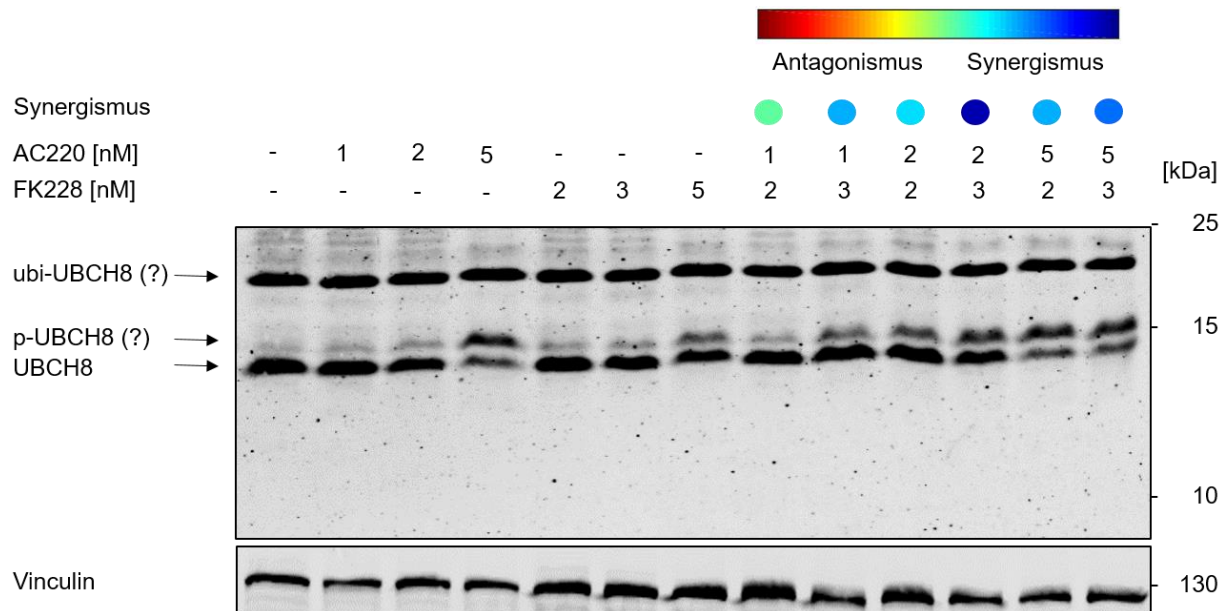


Abbildung P: Western-Blot-Analyse der entstandenen Doppelbande von UBCH8 nach Behandlung von MV4-11 Zellen mit AC220 und/oder FK228 für 24 h

Angezeigt sind UBCH8 und dessen potentielle phosphorylierte (p-) und ubiquitinylierte (ubi-) Formen. Als Ladekontrolle wurden Vinculin verwendet. Die farbliche Darstellung der pharmakologischen Interaktion beider Inhibitoren basiert auf Abb. 6-E.

Danksagung

Lebenslauf

