
AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
INNERE MEDIZIN III
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOMODULATORISCHEN
THERAPIE DER
AKUTEN MYELOISCHEN LEUKÄMIE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

vorgelegt von Tim Johannes Steinberg
geboren am 21.03.1992 in Fürth

Regensburg, 2019

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
INNERE MEDIZIN III
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOMODULATORISCHEN
THERAPIE DER
AKUTEN MYELOISCHEN LEUKÄMIE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

vorgelegt von Tim Johannes Steinberg
geboren am 21.03.1992 in Fürth

Regensburg, 2019

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: PD Dr. Simone Thomas

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Jonathan Jantsch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.09.2019

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract	6
2. Einleitung	8
2.1 Die Myelopoese	8
2.1.1 Beschreibung der Myelopoese	8
2.1.2 Regulation der Myelopoese	10
2.1.3 Eigenschaften von Granulozyten und Monozyten	11
2.2 Die akute myeloische Leukämie	12
2.2.1 Klinische Merkmale der akuten myeloischen Leukämie	12
2.2.2 Zytomorphologische Merkmale der akuten myeloischen Leukämie	13
2.3 Experimentelle Therapeutika in der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie	14
2.3.1 Kennzeichen von Krebs (engl. <i>hallmarks of cancer</i>)	14
2.3.2 All- <i>trans</i> -Retinsäure (ATRA)	15
2.3.3 5-Azacytidin (AZA)	18
2.3.4 Pioglitazon (PGZ)	20
2.3.5 Möglicher Wirkmechanismus von All- <i>trans</i> -Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin	22
3. Materialien und Methoden	24
3.1 Materialien	24
3.1.1 Geräte, Programme und Laborausrüstung	24
3.1.2 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien	27
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien	30
3.1.4 Medien und Zusätze	33
3.1.5 Puffer, Lösungen und Färbungen	34
3.1.6 Zytokine	35
3.1.7 Antikörper	36
3.1.8 Zellen	37
3.1.9 Desinfektions- und Reinigungsmittel	37
3.2 Methoden	38
3.2.1 Akute myeloische Leukämie Zelllinien	38
3.2.2 Zellkulturmodell für Zelllinien (Vorversuche)	39
3.2.3 Zellkulturmodell für Zelllinien und akute myeloische Leukämie Blasten (Hauptversuche)	40
3.2.4 Versuchsprotokoll der Untersuchung von akute myeloische Leukämie Blasten an Tag 0	41
3.2.5 Zellisolierung aus peripherem Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation	41
3.2.6 Generierung von unreifen, dendritischen Zellen aus Peripheren Blut Mononukleären Zellen	42
3.2.7 Durchflusszytometrie	43

3.2.8 Zellmorphologische Untersuchung mittels Zytospin-Zentrifugation und Pappenheim-Färbung	45
3.2.9 Transformation kompetenter JM-109 Bakterien mit grünfluoreszierendem Protein.....	46
3.2.10 Phagozytose-Test	47
3.2.11 Nitroblautetrazoliumchlorid-Test (Nitro-Test)	48
3.2.12 Statistische Auswertung.....	48
4. Ergebnisse	49
4.1 Festlegung der Versuchsbedingungen für die Hauptversuche	49
4.1.1 Konzentrationsabhängige Effekte von <i>All-trans</i> -Retinsäure und Pioglitazon.....	49
4.1.2 Versuchsprotokoll für die Hauptversuche	55
4.2 Auswirkungen der Behandlung mit <i>All-trans</i>-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf akute myeloische Leukämie Zelllinien	57
4.2.1 Auswirkungen der Behandlung mit <i>All-trans</i> -Retinsäure bzw. <i>All-trans</i> -Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf Zellwachstum und Apoptoserate von akute myeloische Leukämie Zelllinien	57
4.2.2 Auswirkungen der Behandlung mit <i>All-trans</i> -Retinsäure bzw. <i>All-trans</i> -Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf Zelldifferenzierung von akute myeloische Leukämie Zelllinien	59
4.3 Auswirkungen der Behandlung mit <i>All-trans</i>-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf akute myeloische Leukämie Blasten	62
4.3.1 Auswirkungen des Zytokinmilieus auf Zellwachstum und Differenzierung von akute myeloische Leukämie Blasten	62
4.3.2 Auswirkungen der Behandlung mit <i>All-trans</i> -Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf Zellwachstum und Apoptoserate von akute myeloische Leukämie Blasten.....	63
4.3.3 Auswirkungen der Behandlung mit <i>All-trans</i> -Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf Oberflächenmolekülexpression von akute myeloische Leukämie Blasten.....	66
4.3.4 Auswirkungen der Behandlung mit <i>All-trans</i> -Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf die Zytomorphologie von akute myeloische Leukämie Blasten.....	68
4.3.5 Auswirkungen der Behandlung mit <i>All-trans</i> -Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf funktionelle Merkmale von akute myeloische Leukämie Blasten.....	71
5. Diskussion	78
5.1 Auswirkung der Behandlung mit <i>All-trans</i>-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf Zellwachstum und Apoptoserate von akute myeloische Leukämie Zellen	78
5.1.1 Auswirkung der Behandlung mit <i>All-trans</i> -Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf Zellwachstum und Apoptoserate der AML Zelllinien THP-1, KG-1 und KG-1a	78
5.1.2 Auswirkung der Behandlung mit <i>All-trans</i> -Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf Zellwachstum und Apoptoserate von primären akute myeloische Leukämie Blasten	79

5.2 Auswirkung der Behandlung mit All-<i>trans</i>-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf die Differenzierung von akute myeloische Leukämie Zellen.....	81
5.2.1 Auswirkung der Behandlung mit All- <i>trans</i> -Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf die Differenzierung der AML Zelllinien THP-1, KG-1 und KG-1a.....	81
5.2.2 Auswirkung der Behandlung mit All- <i>trans</i> -Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf die Differenzierung von akute myeloische Leukämie Blasten in der Durchflusszytometrie	83
5.2.3 Auswirkung der Behandlung mit All- <i>trans</i> -Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf die Differenzierung von akute myeloische Leukämie Blasten in der Zytomorphologie und in Funktionstests	84
5.3 Genetische Aspekte bei der Therapie mit All-<i>trans</i>-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin	85
5.4 Mechanistische Untersuchungen	86
5.5 Erforschung weiterer Substanzen.....	86
5.6 Verbesserungen des Zellkulturmodells	87
6. Schlussfolgerungen und Ausblick.....	89
7. Zitatregister	90
8. Abkürzungsverzeichnis.....	105
9. Abbildungsverzeichnis	111
10. Tabellenverzeichnis	112
11. Lebenslauf	113
12. Danksagung.....	115

1. Abstract

Die akute myeloische Leukämie (engl. *acute myeloid leukemia*; AML) ist eine rasch progrediente, maligne Erkrankung des Knochenmarks¹. Betroffen sind überwiegend Erwachsene, 80% der Erkrankten sind älter als 65 Jahre^{2,3}. Unter der Therapie bestehend aus Chemotherapie und allogener Stammzelltransplantation (engl. *haematopoietic stem cell transplantation*; HSCT) beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate bei jüngeren Patienten (< 60 Jahre) 30-40% und bei älteren Patienten (> 60 Jahre) 5-15%^{1,4,5}. Eine Sonderstellung nimmt die akute Promyelozytenleukämie (engl. *acute promyelocytic leukemia*; APL) als Unterform der AML ein. APL Zellen können mit dem Medikament All-*trans*-Retinsäure (engl. *all-trans-retinoic acid*; ATRA) zur Differenzierung gebracht werden. Mit der Standardtherapie bestehend aus ATRA und Chemotherapeutika oder Arsentrioxid können APL Patienten in 75-80% der Fälle langfristig geheilt werden^{1,6,7}. Bei anderen Formen der AML ist ATRA allerdings wenig wirksam⁸. Insgesamt haben sich Therapie und Prognose der AML in den letzten 50 Jahren verbessert^{1,5}. Jedoch ist die Prognose bei älteren Patienten, deren Erkrankung chemotherapierefraktär ist, oder die aufgrund von Komorbiditäten nicht mehr für eine intensive Chemotherapie in Betracht kommen, weiterhin schlecht^{5,9}. Dies macht die Erforschung neuer Therapien notwendig.

Die vorliegende Arbeit basiert auf der Beobachtung von Thomas *et al.*, dass ATRA in Kombination mit dem Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptor γ Agonisten (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor γ* ; PPAR- γ) Pioglitazon (engl. *pioglitazone*; PGZ) und der hypomethylierenden Substanz 5-Azacytidin (engl. *5-azacytidine*; AZA) bei älteren, therapierefraktären Patienten eine komplette Remission der AML induzieren kann¹⁰. Bei zytomorphologischen Untersuchungen von Blutproben dieser Patienten fielen im peripheren Blut vermehrt reife Granulozyten auf¹⁰. In diesen Zellen konnten spezifische Mutationen der ursprünglichen AML Blasten nachgewiesen werden¹⁰. AML Blasten zeigen in der Regel zytomorphologisch Ähnlichkeit mit unreifen hämatopoetischen Stammzellen¹¹. Der Nachweis von Tumorzellen mit Ausreifungszeichen legte den Schluss nahe, dass durch die Kombinationstherapie APA (ATRA + PGZ + AZA) eine Differenzierung der Blasten zu reiferen, myeloischen Zellen (Granulozyten) induziert worden war¹⁰. Immunsuppression und Infektneigung durch Knochenmarksinfiltration¹¹ und zytostatische Therapeutika wie 5-Azacytidin¹² oder Cytarabin¹² tragen wesentlich zur Mortalität von AML Patienten bei¹³⁻¹⁵. Mit der Ausdifferenzierung von AML Blasten zu funktionsfähigen Immunzellen könnte man dem entgegenwirken.

In dieser Arbeit wurden anhand von *in vitro* Modellen die Auswirkungen der Medikamentenkombination APA auf primäre AML Zellen von Patienten untersucht. Es sollte herausgefunden werden, ob und wie intensiv die Behandlung zur Zytoreduktion oder auch Ausdifferenzierung von Blasten führt. Die behandelten Zellen wurden zytomorphologisch und durchflusszytometrisch auf Merkmale ihrer Differenzierung hin untersucht. Im Hinblick darauf, dass man sich durch APA die Entwicklung funktionsfähiger Immunzellen erhoffte, wurden auch die funktionellen Eigenschaften (Fähigkeit zur Phagozytose, Fähigkeit zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies) der AML Zellen betrachtet.

Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von AML Blasten mit APA sowohl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p = 0,01$), als auch im Vergleich zur ATRA-Monotherapie ($p = 0,04$) zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl führt. Entsprechend war der Anteil Annexin V⁺ Zellen als Maß der Apoptoserate gegenüber der unbehandelten Kontrolle nach APA-Behandlung signifikant erhöht ($p = 0,005$). Der Anteil zytomorphologisch differenzierter, myeloischer Zellen war nach APA-Behandlung signifikant höher als in der unbehandelten Kontrolle ($p = 0,02$). Analog hierzu konnte eine signifikant erhöhte Phagozytosefähigkeit im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,02$), sowie eine vermehrte ROS-Bildung (engl. *reactive oxygen species*; reaktive Sauerstoffspezies) ($p = 0,02$) nachgewiesen werden. Somit kann durch die Behandlung von primären AML Blasten mit APA *in vitro* sowohl eine Zytoreduktion als auch eine Ausreifung zu funktionsfähigen Immunzellen erreicht werden.

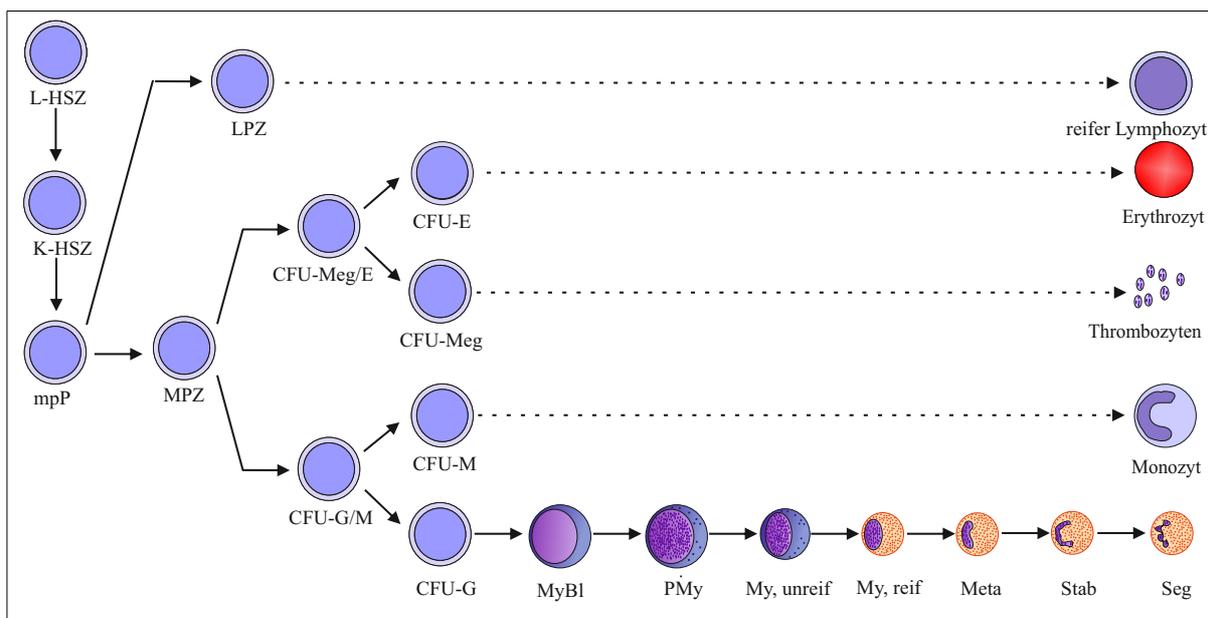
2. Einleitung

2.1 Die Myelopoese

2.1.1 Beschreibung der Myelopoese

Die Myelopoese ist der Teil der Hämatopoese, der ausschließlich im Knochenmark stattfindet¹⁶. Sie umfasst die Granulopoese, Monopoese, Erythropoese und Thrombopoese¹⁶. Alle Zellen dieser Entwicklungsreihen stammen von multipotenten, hämatopoetischen Stammzellen ab¹⁶. Während ihrer Entwicklung verlieren die Blutzellen zunehmend die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und ihre Differenzierungsmöglichkeiten werden eingeschränkt¹⁶. Die beiden wichtigsten Immunzellen der Myelopoese, Monozyten und Granulozyten, gehen aus koloniebildenden Einheiten für Monozyten/Granulozyten (engl. *colony-forming-unit granulocyte/monocyte*; CFU-GM) hervor¹⁶. Über mehrere Zwischenstufen entwickeln sich aus CFU-GM reife Monozyten, die ins periphere Blut abgegeben werden¹⁷. Granulozytenvorläufer entwickeln mit zunehmendem Differenzierungsgrad spezifische Granula, sie werden kleiner und ihre Kernform verändert sich von rund über oval bis mehrfach gelappt¹⁶. Die einzelnen Zwischenschritte der Granulopoese und Monopoese sind in **Abbildung 1a** dargestellt. Im Knochenmarkausstrich sind lediglich die verschiedenen Stufen der Granulopoese unterscheidbar, während dies bei multipotenten Stammzellen, CFUs und den Zwischenstufen der Monopoese nicht sicher möglich ist (**Abbildung 1b,c**)^{16,17}.

a



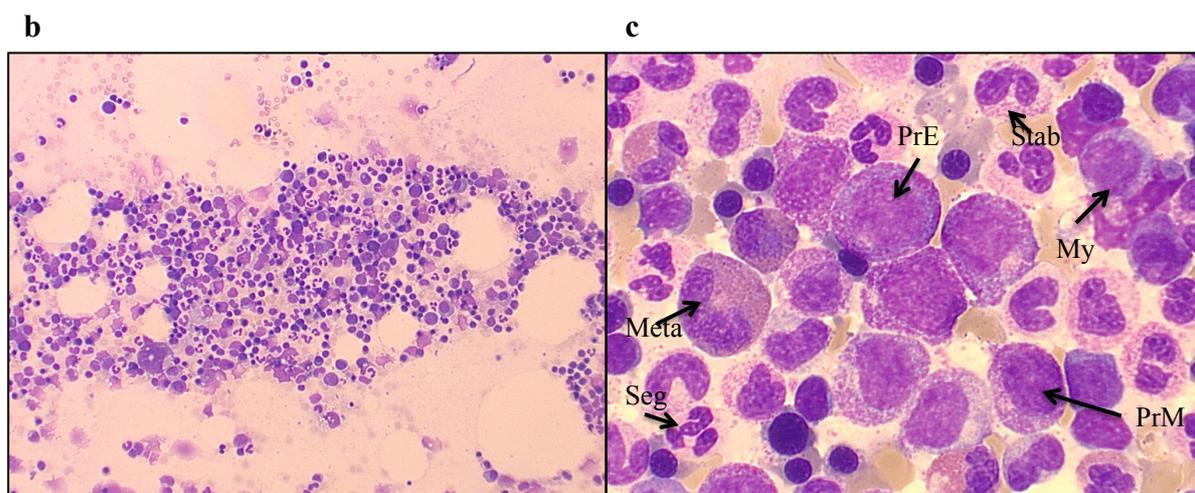


Abbildung 1: Die Myelopoese. (a) Die verschiedenen Stufen der Hämatopoese (schematisch; Erythropoese, Thrombopoese und Lymphopoese lediglich angedeutet). Angelehnt an Renate Lüllmann-Rauch, Taschenbuch der Histologie, 3. Auflage, S. 281 ff., Georg Thieme Verlag, 2009¹⁶. (b) Knochenmarksausstrich eines gesunden Erwachsenen. Vergrößerung 100fach. (c) Knochenmarksausstrich eines gesunden Erwachsenen. Vergrößerung 630fach. CFU-G/M: koloniebildende Einheit für Granulozyten/Monozyten; CFU-Meg/E: koloniebildende Einheit für Megakaryozyten/Erythrozyten; K-HSZ: Kurzzeit hämatopoetische Stammzelle; L-HSZ: Langzeit hämatopoetische Stammzelle; LPZ: Lymphatische Progenitorzelle; Meta: Metamyelozyt; mpP: multipotente Progenitorzelle; MPZ: Myeloische Progenitorzelle; My: Myelozyt; MyBl: Myeloblast; PMy: Promyelozyt; PrE: Proerythroblast; Seg: Segmentkerniger Granulozyt; Stab: Stabkerniger Granulozyt. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Evelyn Orsó, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum Regensburg.

Mit Hilfe von Zytomorphologie-Präparaten wurde in dieser Arbeit die Differenzierung von AML Zellen beurteilt. Es wurden dazu insbesondere die gut erkennbaren, morphologischen Veränderungen der Granulopoese herangezogen (d.h. Kernlappung, Zytoplasmahelligkeit, Kern-Plasma-Relation und Granularität).

Neben mikroskopischen Ausreifungszeichen können auch Oberflächenmoleküle wie CD11b (engl. *cluster of differentiation 11b*; etwa: Unterscheidungsgruppe 11b)¹⁸ zur genaueren Unterscheidung der einzelnen Zellarten und Reifungsstufen untersucht werden¹⁹. Dies erfolgt im klinischen Alltag mit Hilfe der Durchflusszytometrie (engl. *fluorescence-activated cell sorting*; FACS)¹¹. Sowohl auf die Methodik als auch auf die in dieser Arbeit betrachteten Oberflächenmarker wird an anderer Stelle genauer eingegangen (siehe **Abschnitt 3.2.7 & Tabelle 1**).

2.1.2 Regulation der Myelopoese

2.1.2.1 Zelluläre und humorale Regulationsmechanismen

Die Regulation der Myelopoese erfolgt durch Knochenmark-Stromazellen und lösliche Signalmoleküle^{16,20}. Stromazellen steuern über direkte Zellkontakte und durch Freisetzung zahlreicher Zytokine Zellproliferation, Differenzierungswege, Stammzellerneuerung und schließlich die Ausschwemmung reifer Zellen^{16,21}. Daneben sind einige extramedullär produzierte Zytokine, wie Thrombopoietin aus der Leber, an der Stimulation der Myelopoese beteiligt¹⁶. Wichtige Zytokine für die Entwicklung von Granulozyten und Monozyten aus multipotenten Vorläuferzellen sind Interleukin 1 (engl. *interleukin 1*; IL-1), IL-3, IL-6, Granulozyten/Monozyten koloniestimulierender Faktor (engl. *granulocyte/monocyte colony-stimulating-factor*; GM-CSF), Granulozyten koloniestimulierender Faktor (engl. *granulocyte colony-stimulating-factor*; G-CSF), Monozyten koloniestimulierender Faktor (engl. *monocyte colony-stimulating-factor*; M-CSF) und Stammzellfaktor (engl. *stem-cell factor*; SCF)²².

2.1.2.2 Transkriptionelle Regulationsmechanismen

Zahlreiche Transkriptionsfaktoren sind an der Regulation der Granulo- und Monozytopoese beteiligt²³. Zwei wichtige Transkriptionsfaktoren in der Myelopoese sind PU.1 und CCAAT/Verstärker-Bindungsprotein α (engl. *CCAAT/enhancer-binding protein alpha*; C/EBP α)²³.

PU.1 reguliert unter anderem die Expression von CD11b und von Rezeptoren für verschiedene Zytokine und CSFs^{24,25}. CD11b ist ein typischer Oberflächenmarker für Granulozyten und Monozyten^{18,26}. Hohe Expressionslevel von PU.1 führen in myeloischen Vorläuferzellen zur Ausdifferenzierung von Monozyten und Granulozyten, wohingegen niedrige PU.1-Expressionslevel zur Bildung von Megakaryozyten und Erythrozyten führen²⁷. Auch die Induktion der Differenzierung von AML Zelllinien (HL-60, MOLM-14, NB-4, THP-1) durch Behandlung mit ATRA korreliert mit dem Expressionslevel von PU.1²⁸.

Hohe Expressionslevel von C/EBP α führen bei myeloischen Vorläuferzellen zur vermehrten Bildung von granulozytenspezifischen G-CSF Rezeptoren, Granulaproteinen und zur Entwicklung eines granulozytären Phänotyps²⁹. Bei monozytären Vorläuferzellen wird C/EBP α hingegen wenig exprimiert²⁹. Die Behandlung der AML Zelllinie THP-1 mit ATRA führt zu einer verstärkten Expression von C/EBP α ²⁶, welches wiederum die Expression von PU.1 positiv beeinflusst^{30,31,32}. C/EBP α kann so auch via PU.1 zur Ausdifferenzierung von AML Zellen beitragen^{30,31,32}. Gleichzeitig kommt es bei verstärkter Expression von C/EBP α zu einer Verminderung des zellulären Myelozytomatose Onkogens (engl. *cellular myelocytomatosis oncogene*; c-Myc)²⁶, einem proliferationsfördernden Transkriptionsfaktor

und Inhibitor der Zellzyklusprogression in der G1-Phase³³. Dies wird als eine Erklärung für die Proliferationsinhibition bei AML Zellen unter ATRA-Behandlung angeführt²⁶. Auch die Interaktion von C/EBP α mit dem Zellzyklusprotein E2F könnte zur Hemmung des Wachstums von AML Blasten beitragen³⁴.

Anhand von C/EBP α und PU.1 ist hier exemplarisch gezeigt, wie komplex das Regulationssystem der Myelopoese ist, in das man in dieser Arbeit mit ATRA und weiteren Substanzen einzugreifen versucht²³. In **Abschnitt 2.3** sind die einzelnen Medikamente sowie mögliche Synergieeffekte dargestellt.

2.1.3 Eigenschaften von Granulozyten und Monozyten

Monozyten und Granulozyten sind Teile des angeborenen Immunsystems³⁵. Dieses dient der frühzeitigen Abwehr von Pathogenen mit humoralen und zellulären Mitteln³⁵. Als wichtigste zelluläre Vertreter erkennen Monozyten und Granulozyten fremde Antigene (engl. *pathogen-associated molecular pattern*; PAMP) mit Pathogen-Erkennungsrezeptoren (engl. *pathogen recognition receptor*; PRR)³⁵. Beispiele hierfür sind Toll-ähnliche Rezeptoren (engl. *Toll-like receptor*; TLR)³⁵ oder Nukleotidbindende Oligomerisationsdomäne-ähnliche Rezeptoren (engl. *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor*; NOD-like receptor)³⁶. Durch die Bindung von PAMPs an PRRs werden Monozyten und Granulozyten aktiviert und beginnen mit der Phagozytose und der Sekretion von Zytokinen³⁵. Nach ihrer Aktivierung schütten Granulozyten zudem verschiedene Granulainhaltsstoffe (Proteasen, Kollagenasen, Lysozym, Lactoferrin) aus³⁷.

Bei der Phagozytose werden Partikel (Erreger, Zelldedritus) in Form von Phagosomen in das Zytoplasma von Immunzellen aufgenommen. Diese fusionieren mit Lysosomen zu Phagolysosomen, in denen die Fremdmaterialien durch zahlreiche Enzyme abgebaut werden³⁸. Neben den oben genannten PRRs sind zahlreiche weitere Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle für die Phagozytose von Bedeutung. Dazu gehört CD11b, welches im FACS als Marker unter anderem für Makrophagen und Granulozyten gemessen werden kann^{18,26}.

Neben der Phagozytose dient auch die Bildung und Freisetzung von ROS der Beseitigung von Krankheitserregern^{39,40}. Diese werden unter anderem von der Nicotinamidadenindinukleotidphosphathydrid-Oxidase (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydride oxidase*; NADPH-Oxidase) in Phagolysosomen produziert^{39,40}. Beispiele für ROS sind Superoxidanionen (O₂⁻), Hydroxylradikale (\bullet OH) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂)³⁹. ROS sind chemisch instabil und reagieren mit Proteinen,

Membranlipiden und Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid*; DNA)⁴¹. Diese Moleküle werden hierbei zerstört⁴¹.

Phagozytose und ROS-Bildung können quantitativ gemessen werden. Dadurch konnten in dieser Arbeit Rückschlüsse auf die immunologische Funktionsfähigkeit von AML Zellen gezogen werden.

2.2 Die akute myeloische Leukämie

2.2.1 Klinische Merkmale der akuten myeloischen Leukämie

Die akute myeloische Leukämie ist eine maligne Erkrankung des Knochenmarks mit einer jährlichen Inzidenz von 3,7 auf 100.000 Einwohner¹. Es sind hauptsächlich ältere Menschen betroffen^{2,3}. Ätiopathogenetisch handelt es sich bei der AML um die Entartung einer frühen Vorläuferzelle der myeloischen Linie⁴². Die Krankheit ist durch einen Blastenanteil von mindestens 20% im Knochenmark definiert^{4,11}. In Folge der raschen Ausbreitung der entarteten Zellen kommt es zu einer Verdrängung der gesunden Hämatopoese im Knochenmark¹. Der daraus resultierende Mangel an Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten führt unbehandelt bei nahezu 100% aller Patienten innerhalb eines Jahres zum Tod¹. Unter heutiger Standardtherapie liegt die 5-Jahres-Überlebensrate abhängig von Alter und Komorbiditäten der Patienten zwischen 5% und 40%⁵. Die Einteilung erfolgt nach der WHO-Klassifikation anhand zytogenetischer, molekulargenetischer und morphologischer Merkmale^{1,43}. Eine weitere Untergliederung ist anhand zytomorphologischer Merkmale mit der Französisch-Amerikanisch-Britischen Klassifikation (engl. *French-American-British classification*; FAB-Klassifikation) in acht Gruppen (M0 bis M7) möglich⁴⁴. Nach der Diagnosestellung sollte unmittelbar eine Therapie eingeleitet werden, da bereits eine Verzögerung von fünf Tagen zu einer Prognoseverschlechterung führen kann⁴⁵. Die Therapie der AML erfolgt in hämatoonkologischen Zentren und gliedert sich für chemotherapiefähige Patienten in eine Induktionschemotherapie und eine Postremissionstherapie, die wiederum in Konsolidierungstherapie und Erhaltungstherapie unterteilt wird¹. Ziel der Induktionschemotherapie ist die komplette Remission (engl. *complete remission*; CR) der Erkrankung¹. Diese ist definiert als eine Suppression der Blasten im Knochenmark auf unter 5% bei gleichzeitig erhaltener, gesunder Hämatopoese (neutrophile Granulozyten im peripheren Blut > 1000/ μ l; Thrombozyten > 100.000/ μ l)¹. Dazu werden jeweils hohe Dosen eines Anthrazyklins (z.B. Daunorubicin 60mg/m² für drei Tage) in Kombination mit dem Pyrimidin-Antagonisten Cytarabin (z.B. 100-200mg/m² kontinuierlich über sieben Tage) verabreicht¹. Eine Ausnahme stellt die APL dar (M3 nach FAB Klassifikation), die mit

ATRA in Kombination mit Chemotherapie oder Arsentrioxid therapiert wird und so in 75-80% geheilt werden kann^{1,6,46}. Durch die auf die Induktionstherapie folgende Postremissionstherapie soll bei jedem AML Patienten die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs gesenkt werden¹. In Abhängigkeit vom Allgemeinzustand des Patienten, dem Risikoprofil der AML und der Verfügbarkeit eines geeigneten Spenders wird mit einer allogenen Stammzelltransplantation oder einer Chemotherapie mit hochdosiertem Cytarabin weiter behandelt¹. Patienten mit einem Krankheitsrezidiv können mit einer erneuten Intensivchemotherapie und allogener Stammzelltransplantation therapiert werden¹. Die genannten Therapiestrategien gelten vor allem für jüngere Patienten (< 60 Jahre) und für ältere Patienten (> 60 Jahre) ohne Komorbiditäten¹. Für ältere, komorbide Patienten müssen Induktions- und Postremissionschemotherapie unter Berücksichtigung des Allgemeinzustandes durchgeführt werden¹. Teilweise ist nur noch eine palliative Therapie möglich. Diese umfasst eine Behandlung mit 5-Azacytidin oder 5-Aza-2'-Deoxycytidin (engl. *5-aza-2'-deoxycytidine*; Syn. *decitabine*; DAC), die bestmögliche, unterstützende Behandlung (engl. *best supportive care*; BSC) oder auch eine niedrigdosierte, zytoreduktive Behandlung mit Cytarabin¹. Insgesamt ist die Prognose der AML bei älteren Patienten^{1,47} und solchen mit therapierefraktären Erkrankungen¹ schlecht und macht weitere, intensive Forschung nötig.

2.2.2 Zytomorphologische Merkmale der akuten myeloischen Leukämie

AML Zellen sind sich unkontrolliert teilende, unreife, myeloische Zellen¹¹. Je nach Subgruppe behalten die Zellen eine gewisse Fähigkeit zur Differenzierung, die jedoch in der Regel nicht die Ausbildung funktionsfähiger, myeloischer Blutzellen (z.B. Granulozyten) erlaubt¹¹. Morphologisch zeichnen sich die AML Blasten durch einen frühen Reifungsstopp aus. Zytomorphologische Merkmale der AML sind bei jedem FAB-Subtyp große Zellkerne, fein verteiltes Chromatin und ein schmaler Zytoplasmasaum¹¹ (**Abbildung 2**). Die verschiedenen Unterformen der AML können mit Hilfe zytomorphologischer Merkmale, zytochemischer Methoden (Myeloperoxidase- und Esterase-Reaktion) sowie der Immunphänotypisierung im FACS klassifiziert werden^{1,11,43,44}. Reifungszeichen wie Kernlappung und geringe Kern-Plasma-Relation sind untypisch für die meisten AML Zellen¹¹.

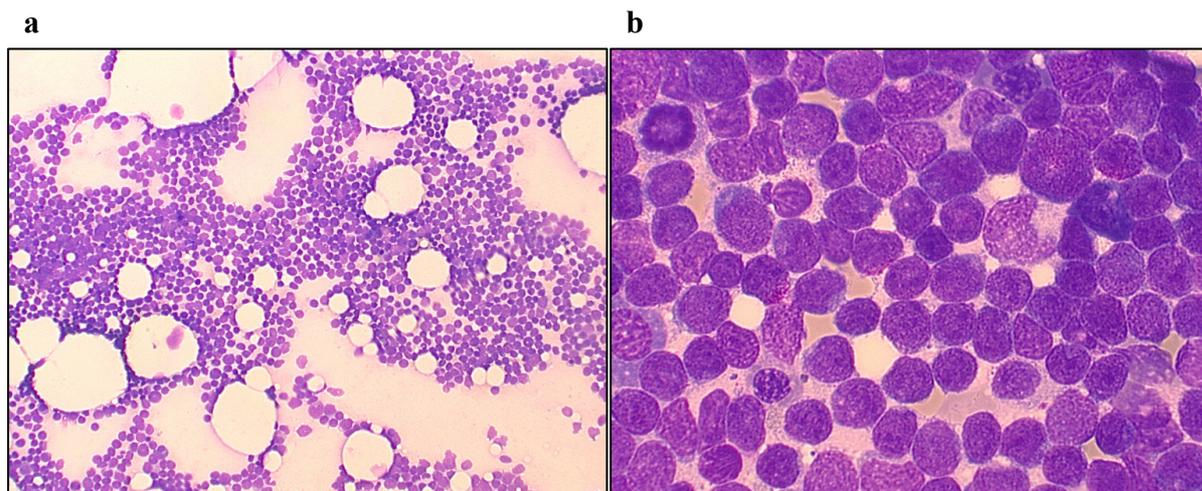


Abbildung 2: Knochenmarksausstrich eines Patienten mit AML. Pappenheim-Färbung. Gezeigt sind Blasten ohne Granula und mit schmalen Zytoplasmasaum. **(a)** Vergrößerung 100fach. **(b)** Vergrößerung 630fach. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Evelyn Orsó, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum Regensburg.

2.3 Experimentelle Therapeutika in der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie

2.3.1 Kennzeichen von Krebs (engl. *hallmarks of cancer*)

Ein Therapieansatz bei der Behandlung der AML ergibt sich aus den sogenannten Kennzeichen von Krebs (engl. *hallmarks of cancer*) nach Hanahan und Weinberg⁴⁸. Demnach liegen der Tumorentwicklung bei jedem Tumor grundlegende Prozesse, sogenannte *hallmarks*, zugrunde. Diese umfassen unter anderem die Enthemmung proliferationsfördernder Signalwege, die Immortalisierung von Tumorzellen und hohe Mutationsraten (**Abbildung 3**). In diesem Modell wird angenommen, dass die Beeinflussung einzelner Signalwege mit gezielten Therapien (engl. *targeted therapies*) häufig zur Resistenzentwicklung der Tumorzellen, beispielsweise durch Mutationen oder Überaktivierung verwandter Signalwege, führt⁴⁸. So kann eine Förderung der Apoptoserate von Tumorzellen durch eine gesteigerte Mitoserate kompensiert werden⁴⁸. Nach Hanahan und Weinberg sollte daher der Versuch unternommen werden, auf therapeutischer Ebene mehrere *hallmarks* gleichzeitig zu beeinflussen, um die Kompensationsmöglichkeiten des Tumors einzuschränken. Dies könnte unter anderem durch die simultane Beeinflussung der Transkription mehrerer Gene im Rahmen einer biomodulatorischen, differenzierungsfördernden Behandlung geschehen. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, dieses Ziel mit Hilfe der Medikamentenkombination APA bei AML Zellen zu erreichen. Darüber hinaus könnte es durch die Beeinflussung grundlegender

Differenzierungssignalwege mittels PGZ und ATRA (siehe **Abschnitt 2.3.2** und **Abschnitt 2.3.4**) möglich sein, ein breiteres Spektrum von AML Subtypen gleichermaßen zu behandeln. Im Folgenden wird auf die einzelnen Substanzen und ihre Wirkungsweise näher eingegangen.

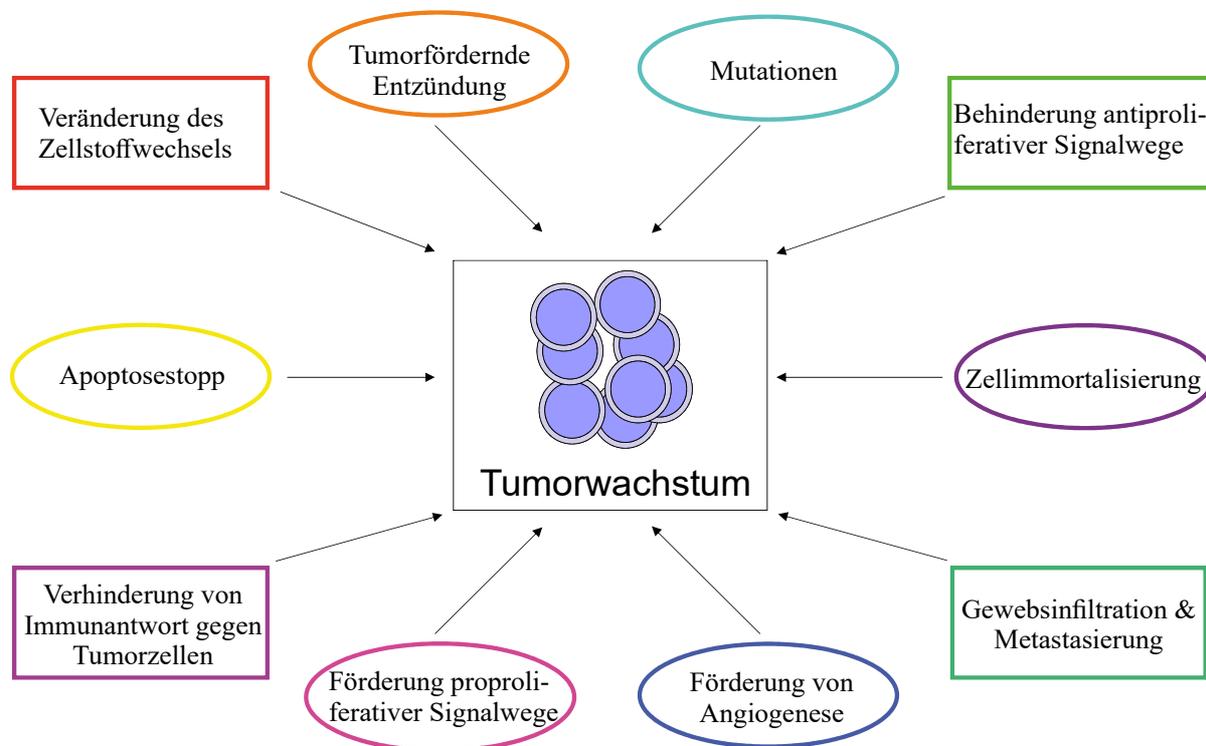


Abbildung 3: Hallmarks of cancer. Verschiedene hallmarks tragen zur Entstehung und Progression von Tumoren bei. Mit Hilfe der Medikamentenkombination APA wurde in dieser Arbeit versucht, auf transkriptioneller Ebene mehrere hallmarks bei AML Zellen zu beeinflussen⁴⁸.

2.3.2 All-trans-Retinsäure (ATRA)

2.3.2.1 Wirkmechanismus von All-trans-Retinsäure

ATRA ist ein im Körper natürlich vorkommender Bestandteil des Vitamin A-Metabolismus⁴⁹. Die nukleären Bindungsstellen für ATRA werden als Retinsäurerezeptoren (engl. *retinoic acid receptor*; RAR) bezeichnet⁵⁰. Liegen RARs frei vor, inhibieren sie die Transkription ihrer Zielgene durch Bindung von Korepressoren⁸. Werden RARs durch ATRA aktiviert, so bilden sie ein Heterodimer mit Retinoid X Rezeptoren (engl. *retinoid X receptor*; RXR)⁵¹. Der Komplex aus ATRA und RAR/RXR rekrutiert Koaktivatoren und bewirkt die Dekondensierung der DNA im Bereich spezifischer Bindungsstellen, sogenannte RAR-empfindlicher Bereiche (engl. *RAR-responsive element*; RARE)^{8,50}. Dies führt zur vermehrten Transkription von Genen in der direkten Umgebung von RAREs^{8,50}. Die Transkriptionsprodukte dieser Gene sind unter anderem an Differenzierungsprozessen und der Embryonalentwicklung beteiligt^{8,50}. Außerdem hat ATRA auch schnelle, nicht-genomische

Effekte durch Beeinflussung von Signaltransduktionsproteinen über zellmembrangebundene RARs⁸.

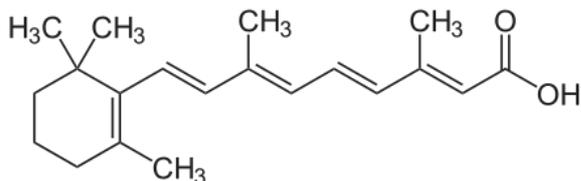


Abbildung 4: Chemische Struktur von ATRA⁵².

2.3.2.2 Wirkung von All-*trans*-Retinsäure bei der akuten Promyelozytenleukämie

Als Mono- oder Kombinationstherapie mit Arsentrioxid oder Chemotherapie führt die Behandlung mit ATRA bei APL Patienten in 90% zur kompletten Remission⁴⁶. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Leukozyten, die nach initialer ATRA-Therapie von APL Patienten im peripheren Blut gefunden werden, von AML Blasten abstammen und Immunfunktionen besitzen⁵³.

Die Entstehung der APL beruht in 98% der Fälle auf der krankheitsspezifischen Translokation t(15;17)^{54,55}. Diese führt zur Bildung eines Fusionsproteins bestehend aus RAR α und dem Promyelozytenleukämie-Protein (engl. *promyelocyte leukemia protein*; PML)^{54,55}. PML ist ein nukleäres Protein, welches natürlicherweise in Immunzellen und myeloischen Vorläuferzellen exprimiert wird^{56,57}. In unterschiedlichen Isoformen ist PML an zahlreichen Prozessen, wie beispielsweise Apoptose und Zelldifferenzierung, beteiligt⁵⁸. Das Fusionsprotein PML-RAR α fungiert jedoch als onkogener Transkriptionsfaktor, führt zu Differenzierungsverlust und schließlich zur Entstehung einer APL^{54,55}. Bei geringer Konzentration des physiologischen RAR-Agonisten ATRA bindet PML-RAR α Korepressoren und Histondeacetylasen⁵⁰. Der entstandene Proteinkomplex hemmt wahrscheinlich die Differenzierungsgene, die unter der Kontrolle von RAR stehen⁵⁰. Neben der Differenzierungshemmung wirkt PML-RAR α antiapoptotisch und führt zu vermehrter Zelladhäsion^{59,60}.

Bei hohen, therapeutischen Konzentrationen von ATRA wird der Retinsäurerezeptor-Anteil von PML-RAR α aktiviert, Koaktivatoren werden gebunden und die Transkription von Differenzierungs- und Tumorsuppressorgenen wird induziert⁵⁰. Zu den aktivierten Genen gehören auch jene, die für die Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF kodieren⁸. Beide Proteine sind essenziell für die Myelopoese²². ATRA trägt weiterhin zur verstärkten Degradation von PML-RAR α ^{61,62} bei. Es gibt Hinweise darauf, dass ATRA seine differenzierungsinduzierende Wirkung außerdem über die gesteigerte Expression der Transkriptionsfaktoren Interferonregulierender Faktor 1 (engl. *interferon regulatory factor 1*; IRF-1)^{63,64}, PU.1²⁸, C/EBP α , C/EBP ϵ ^{53,65} und des Enzyms Peptidylargininindesaminase 4 (engl.

peptidylargininedesaminase 4; PAD4)⁶⁶ entfaltet. Parallel dazu führt ATRA durch Beeinflussung verschiedener Signalmoleküle, wie c-Myc²⁶, hyperphosphoryliertem Retinoblastom-Protein (engl. *retinoblastoma protein*; Rb)^{67,68} und dem Transkriptionsfaktor E2F1^{26,34} zu Proliferationshemmung und zur Verlängerung der G1-Phase des Zellzyklus. ATRA führt somit über verschiedene Signal- und Transkriptionswege zur Redifferenzierung und Wachstumshemmung bei der APL.

Seltene Nebenwirkung der ATRA-Therapie bei APL Patienten ist das ATRA-Differenzierungs-Syndrom (engl. *all-trans-retinoic acid differentiation syndrome*; ATRA-DS)⁶⁹⁻⁷¹. Hierbei können unter ATRA-Behandlung Fieber, periphere Ödeme, Lungeninfiltrate, Pleuraergüsse, Hypotension und akutes Nierenversagen auftreten⁶⁹⁻⁷¹. Das Auftreten des ATRA-DS bei APL Patienten geht mit erhöhter Mortalität und Morbidität einher⁷⁰.

2.3.2.3 Wirkung von All-trans-Retinsäure bei der non-M3 akuten myeloischen Leukämie

Der klinische Therapieerfolg der Behandlung mit ATRA bei den meisten AML, die nicht zur M3-Subklasse gehören (non-APL-AML), ist sowohl als Monotherapie als auch als Kombinationstherapie mit Cytarabin gering^{8,72,73}. Die mangelhafte Wirksamkeit von ATRA wurde lange Zeit auf das Fehlen des Fusionsproteins PML-RAR α in non-APL-AML zurückgeführt⁵². Allerdings ist ATRA in bestimmten AML, die PML-RAR α nicht exprimieren, wirksam. Ein Beispiel hierfür ist die AML Zelllinie HL-60^{74,75}. Auch bei der non-APL-AML Zelllinie THP-1 (FAB-Klasse M5)^{76,77} wird die Phagozytosefähigkeit und die Expression des Differenzierungsmarkers CD11b⁷⁸ durch die Behandlung mit ATRA gesteigert⁶⁷. Die geringe, klinische Wirksamkeit von ATRA in non-APL-AML wird daher mittlerweile eher auf andere Störungen im ATRA-Signalweg zurückgeführt^{52,79}. In non-APL-AML findet man häufig hypermethylierte Promotoren von RAR-Genen wie RAR β 2, die somit weniger stark transkribiert werden^{52,80,81}. Dadurch werden die Retinsäurerezeptoren vermindert gebildet und der ATRA-Signalweg inhibiert⁸⁰. Die Hypermethylierung einzelner Gene kann teilweise auf spezifische Onkoproteine wie dem Fusionsprotein aus *acute myeloid leukemia 1 protein* (AML1; Syn.: RUNX1) und *Runt-related transcription factor 1 translocation partner 1* (RUNX1T1; Syn.: ETO) AML1-ETO zurückgeführt werden⁸⁰. Weitere epigenetische Modifizierungen, wie verminderte Histon-H3-Acetylierung und Lysin-4-Methylierung, könnten zur Therapieresistenz beitragen^{52,79}. Schließlich scheinen auch direkte Interaktionen von Onkoproteinen wie AML1-ETO⁸⁰ und *meningeoma (disrupted in*

balanced translocation) *1 - translocation-Ets-leukemia virus* (MN1-TEL)⁸² mit RARs die Wirksamkeit von ATRA bei non-APL-AML zu beeinträchtigen.

Das Wissen um diese Vorgänge führte zur Entwicklung eines Ansatzes, der auf der Kombination von ATRA und hypomethylierenden Substanzen wie AZA beruht. Hierdurch soll die Transkription von RARs gesteigert und die Wirkung von ATRA verstärkt werden²⁶.

Andere Kombinationstherapien von ATRA und genregulatorischen Substanzen wie G-CSF⁸³, Leber X Rezeptor Agonisten (engl. *liver X receptor*; LXR)⁸⁴, Mitogenaktivierte Kinase Inhibitoren (engl. *mitogen-activated protein kinase*; MAP-Kinase)⁸⁵, Glykogensynthasekinase 3 Inhibitoren (engl. *glycogen synthase kinase 3*; GSK-3)⁷⁸ und vielen weiteren wurden teilweise erfolgreich *in vitro* getestet. Es zeigte sich, dass ATRA sehr wohl Differenzierungsprozesse in vielen non-APL-AML fördern kann, sofern es mit anderen, zum Teil transkriptionsaktivierenden Substanzen kombiniert wird. In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit die Gabe von AZA und PGZ die Wirksamkeit von ATRA bei non-APL-AML Zellen verbessern kann.

2.3.3 5-Azacytidin (AZA)

2.3.3.1 Wirkmechanismus von 5-Azacytidin

Das Nukleosidanalogen AZA zählt zur Gruppe der DNA-Methyltransferase Inhibitoren (engl. *DNA-methyltransferase inhibitor*; DNMTI)⁸⁶. Dieses Therapeutikum wird primär zur Behandlung von myelodysplastischen Syndromen (engl. *myelodysplastic syndromes*; MDS) eingesetzt^{88,89}. Es wird auch zur Zytoreduktion bei multimorbiden AML Patienten und bei AML Patienten mit geringen Heilungschancen aufgrund ungünstiger Zytogenetik verwendet¹. AZA wirkt hypomethylierend^{86,90,91}. Als Pyrimidinanalogen wird AZA anstatt von Cytidin in die DNA eingebaut und kann dort DNA-Methyltransferasen (engl. *DNA-methyltransferase*; DNMT) hemmen⁸⁶. Es gibt unterschiedliche Angaben darüber, ob AZA die DNMTs auch direkt hemmt⁹²⁻⁹⁴. Die Demethylierung wirkt der Hyper- und Fehlmethylierung von Differenzierungs- und Tumorsuppressorgenen (z.B. *c/EBPδ*⁹⁵), die bei AML regelmäßig auftritt^{90,96-98}, entgegen⁹³. Zahlreiche weitere Effekte der DNMTIs sind beschrieben. Dies sind unter anderem die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen^{99,100}, die Beeinflussung von Telomerasen^{99,100} und die verstärkte Proteinexpression durch Beeinflussung von Histondeacetylasen¹⁰¹.

Die genomischen Effekte von AZA treten bereits bei niedrigeren Konzentrationen (< 1 µmol/l; 1 µmol/l = 1 µM) ein^{93,94}. Bei höheren Konzentrationen wirkt die Substanz zudem direkt proapoptotisch und zytoreduktiv^{93,99,100,102}.

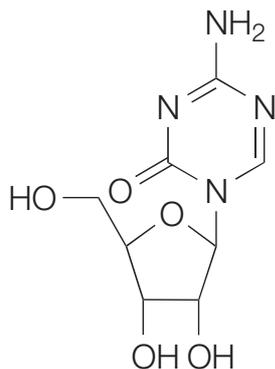


Abbildung 5: Chemische Struktur von AZA⁸⁶.

2.3.3.2 Wirkung von 5-Azacytidin bei myelodysplastischen Syndromen und der akuten myeloischen Leukämie

Im Vergleich zur rein supportiven Therapie erhöht die Behandlung mit AZA bei MDS das mediane Überleben von 13 Monaten auf 21 Monate, senkt die Progressionsrate zur AML von 38% auf 15% und erhöht die Lebensqualität¹⁰³. Die AML zeigt eine enge Verwandtschaft mit den MDS¹⁰⁴ und kann aus ihnen hervorgehen^{4,103,104}. Aufgrund der Ähnlichkeit dieser beiden Erkrankungen ist es nicht verwunderlich, dass die Therapie mit AZA auch bei älteren AML Patienten (≥ 65 Jahre) in 27,8% der Fälle eine komplette Remission induziert¹². Die 1-Jahres Überlebensrate bei diesen AML Patienten beträgt 46,5% verglichen mit 34,2% bei einer konventionellen Therapie (konventionelle Chemotherapie, niedrigdosiertes Cytarabin oder BSC)¹². Im Vergleich zur konventionellen Therapie ist AZA zudem besser verträglich¹². Die Prognose der AML unter Therapie mit AZA ist hauptsächlich abhängig vom Blastenanteil im Knochenmark vor Therapiebeginn, nicht aber von Zytogenetik, FAB-Klasse, Krankheitsstadium, Anzahl vorheriger Chemotherapien und Stammzelltransplantationen⁹.

Zu den häufigsten Nebenwirkungen der Therapie mit 5-Azacytidin bzw. konventioneller Chemotherapie gehören Übelkeit (27,1% bzw. 42,9%), Neutropenie (19,9% bzw. 31,0%) und Thrombopenie (17,4% bzw. 21,4%)¹².

2.3.3.3 Wirkung von 5-Azacytidin + All-trans-Retinsäure bei der akuter myeloischer Leukämie

Bei der APL wird der Differenzierungseffekt der ATRA-Therapie durch Hinzunahme von AZA verstärkt²⁶. APL Zellen exprimieren regelhaft das Protein PML-RAR α , das als onkogener Transkriptionsfaktor Differenzierung und Apoptose hemmt (siehe **Abschnitt 2.3.2.2**)^{54,55}. In Anwesenheit von PML-RAR α kommt es zur Hypermethylierung und zur Hemmung der Expression von Tumorsuppressorproteinen, wie beispielsweise RAR β ^{52,80,81}. An diesem Prozess sind auch DNMTs beteiligt⁸¹. DNMTs können der Hypermethylierung

von RARs durch PML-RAR α bei APL Zellen entgegenwirken und so die Wirksamkeit von ATRA verbessern⁸¹.

Auch bei non-APL-AML ist die DNA im Bereich von Tumorsuppressor- und Differenzierungsgenen hypermethyliert^{95,97}. AZA vermindert die Hypermethylierung betroffener Differenzierungsgene¹⁰⁵. In der Folge werden verstärkt Retinsäurerezeptoren exprimiert¹⁰⁵ und dadurch die Wirksamkeit von ATRA auch bei non-APL-AML verbessert²⁶. Fujiki *et al.* beobachteten, dass die Expression des differenzierungsfördernden Transkriptionsfaktors C/EBP α durch Kombination von ATRA und AZA auch unabhängig vom Methylierungsstatus des zugehörigen Gens bei der AML Zelllinie THP-1 gesteigert wird²⁶. Die genauen Mechanismen der Wirkverstärkung von ATRA durch AZA bei non-APL-AML sind daher noch nicht klar und erfordern weitere Untersuchungen²⁶.

2.3.4 Pioglitazon (PGZ)

2.3.4.1 Wirkmechanismus von Pioglitazon

PGZ gehört zu den Glitazonen (Thiazolidindionen) und wurde ursprünglich zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 zugelassen^{106,107,108}. Bei Diabetikern fördern Glitazone die Fettgewebsdifferenzierung und mindern die Insulinresistenz von Muskel- und Fettgewebe^{106,107,108}. Die Substanzen vermitteln ihre Wirkung über den nukleären Transkriptionsfaktor PPAR γ ^{107,109,110}. In aktiviertem Zustand bildet PPAR γ ein Heterodimer mit RXR und bindet weitere Koaktivatoren^{109,110}. Der Proteinkomplex bindet daraufhin an Peroxisomen Proliferator empfindliche Bereiche (*engl. peroxisome proliferator responsive element*; PPRE) der DNA^{109,110} und wirkt dort als Transkriptionsfaktor¹¹⁰. Die genaue Wirkung einzelner endogener und exogener PPAR γ -Agonisten variiert von Substanz zu Substanz und hängt zudem von den spezifischen Koaktivatoren ab¹¹⁰. Es wurden auch vielfach Hinweise auf PPAR γ -unabhängige Effekte von PPAR γ -Agonisten bei verschiedenen Zelltypen gefunden, deren genaue Mechanismen unbekannt sind^{111–113}.

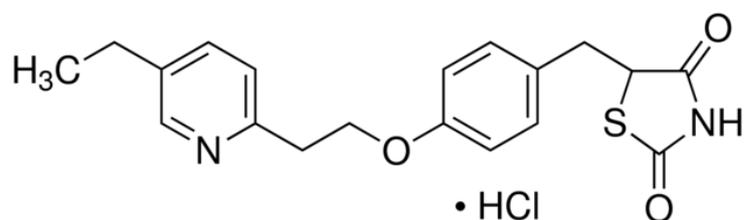


Abbildung 6: Chemische Struktur von PGZ-Hydrochlorid¹¹⁴.

2.3.4.2 Wirkung von Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ - Agonisten bei hämatopoetischen Zellen und der akuter myeloischer Leukämie

PPAR γ -Agonisten haben sowohl bei gesunden hämatopoetischen Zellen als auch bei AML Blasten differenzierungsfördernde Effekte.

PPAR γ ist an der Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen (engl. *dendritic cell*; DC)¹¹⁵ und von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu Langerhans-Zellen beteiligt¹¹⁶. Allerdings ist PPAR γ nicht für alle Differenzierungsprozesse obligat. Die Entwicklung von Monozyten aus hämatopoetischen Stammzellen ist auch in Abwesenheit von PPAR γ möglich¹¹⁷. PPAR γ moduliert darüber hinaus die Immunfunktion ausdifferenzierter myeloischer Zellen¹¹⁵⁻¹²⁰. So werden Aktivierung und Zytokinproduktion von Makrophagen durch PPAR γ beispielsweise gehemmt^{122,123}.

Der Einsatz von PPAR γ -Agonisten führt zur Differenzierung von AML Blasten und induziert gleichzeitig Apoptose¹²⁴. Bei der Leukämiezelllinie HL-60 bewirkt die Aktivierung von PPAR γ /RXR α eine Differenzierung hin zu Monozyten/Makrophagen und Schaumzellen¹²⁵. Boyd *et al.* beschrieben, dass PPAR γ -Agonisten *in vitro* und *in vivo* bei non-APL-AML durch Beeinflussung von Adipozyten im Knochenmark zur Regenerierung der normalen Myelopoese beitragen können¹²⁶. PPAR γ -Aktivierung durch PGZ wirkt in hohen Konzentrationen (100-300 μ M) auch zytotoxisch auf myeloische Leukämie-Zelllinien (z.B. K562, HL-60), während die gesunde Hämatopoese nur gering beeinflusst wird¹¹¹.

Es gilt zu beachten, dass es durchaus Unterschiede in Bezug auf die Wirkung zwischen einzelnen PPAR γ -Agonisten gibt^{110,124}. Nicht in allen in diesem Abschnitt genannten Studien wurde PGZ zur Stimulation von PPAR γ verwendet. Aufgrund des gemeinsamen Wirkmechanismus dieser Substanzen ist es daher naheliegend, aber nicht nachgewiesen, dass die oben beschriebenen Effekte auch für PGZ zu erwarten sind.

Bekannte Nebenwirkungen der Therapie mit PGZ bei Patientin mit Diabetes mellitus Typ 2 sind Gewichtszunahme, Ödeme, Osteoporose und kardiale Dekompensation bei kardial vorerkrankten Patienten¹²⁷.

2.3.4.3 Wirkung von Pioglitazon + All-*trans*-Retinsäure bei der akuten myeloischen Leukämie

In der Zusammenschau der oben genannten Forschungsergebnisse kann gefolgert werden, dass sowohl PPAR γ -Agonisten als auch ATRA die Differenzierung und Funktion von entarteten, myeloischen Zellen beeinflussen (siehe **Abschnitt 2.3.2**). In der APL Zelllinie NB-4 kann PGZ die Proliferation hemmen, führt aber nicht zur Differenzierung. Erst durch die kombinierte Gabe mit ATRA kann auch eine Differenzierung induziert werden, die die

der Monotherapie mit ATRA übertrifft^{128,129}. Es gibt allerdings auch gegenläufige Berichte dahingehend, dass die Differenzierung von THP-1 Zellen durch Behandlung mit ATRA von PPAR γ -Agonisten gehemmt wird¹³⁰. Dieser Widerspruch beruht möglicherweise darauf, dass NB-4 Zellen das APL-typische Fusionsprotein PML-RAR α exprimieren¹³¹. Dieses Protein unterdrückt unter anderem Gene, die von PPAR γ kontrolliert werden¹²⁹. Durch die Gabe von ATRA wird die Gensuppression durch PML-RAR α gehemmt (siehe **Abschnitt 2.3.2.2**) und PPAR γ -Agonisten können möglicherweise besser an ihren Zielgenen wirken. Bei non-APL-AML spielen eventuell andere, noch nicht erforschte, Beeinträchtigungen des PPAR γ -Signalwegs eine Rolle. Insgesamt liegen zu diesem Zeitpunkt wenige Daten zur gemeinsamen Wirkung von ATRA und PGZ bei non-APL-AML vor. Ausschlaggebend für die Anwendung von PGZ in Kombination mit ATRA und AZA war die in **Abschnitt 2.3.4.2** beschriebene Wirkung auf Zellwachstum und Differenzierung von AML Zellen.

2.3.5 Möglicher Wirkmechanismus von All-trans-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin

Abbildung 7 fasst nochmals zusammen, wie die Substanzen ATRA, PGZ und AZA zusammenwirken könnten. AZA wirkt hypomethylierend und dekondensiert die DNA, sodass PGZ und ATRA in den Komplexen mit ihren jeweiligen Rezeptoren an ihre Zielbereiche binden können (PPRE, RARE). Dadurch sollen vermehrt Transkriptionsprodukte gebildet werden, die die Differenzierung der Blasten zu reiferen, myeloischen Zellen bewirken.

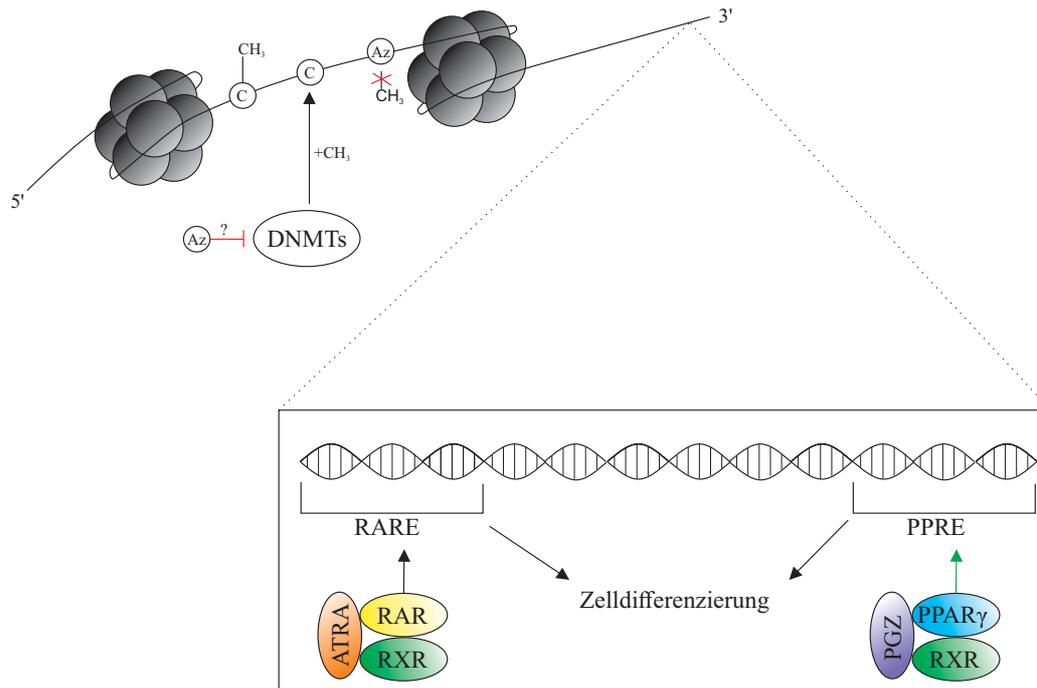


Abbildung 7: Modell zur Wirkungsweise von APA bei der Behandlung der AML. AZA soll vorbereitend für ATRA und PGZ wirken, indem es die DNA durch Hypomethylierung dekondensiert. Diese Demethylierung erfolgt einerseits durch den Einbau der "falschen" Base 5-Azacytidin statt Cytosin in die DNA. Andererseits werden DNMTs möglicherweise auch direkt gehemmt. An die dekondensierte DNA können Komplexe aus ATRA bzw. PGZ, den jeweiligen Rezeptoren und Koaktivatoren binden (Koaktivatoren nicht dargestellt) und die Expression von Differenzierungsproteinen fördern. CH₃: Methylgruppe; C: Cytosin; Az: 5-Azacytidin^{50,102,109}.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte, Programme und Laborausüstung

Abzug Typ TAN120	Prutscher Laboratory Systems GmbH, Neudörfel, AUT
Autoklaven	
- Varioklav Dampfsterilisator Typ 75S	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, D
- Varioklav Dampfsterilisator Typ La-VA.MCS A-0381 98	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, D
BD FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, D
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, D
CellQuest Pro Software für BD FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, D
Computer Power Mac G4 zur FACS-Bedienung	Apple Inc., Cupertino, USA
Digitales pH-Meter Typ 646	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, D
Eismaschinen:	
- AF 20	Scotsman Ice Systems Inc., Vernon Hills, USA
- AF 80	Scotsman Ice Systems Inc., Vernon Hills, USA
Emax Precision microplate reader Gerät zum Auslesen von ELISA-Platten	Molecular Devices LLC., San Jose, USA
FlowJo Software zur Auswertung von FACS-Ergebnissen. Version 10.0.8 für Mac OS X.	FlowJo LCC., Ashland, USA
Gefahrenstoffflagenschrank FWF 90	SAP GmbH, Gründau, D
Graphpad Prism 6-8	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Heizblock ThermoTop®	Eppendorf AG, Hamburg, D
Inkubationsschrank Heracell 240i CO2 Incubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Klimakammern:	
- Kühlkammer H1.2, KA01.KR	Kälte-Schübl GmbH, Regensburg, D

- Wärmekammer H1.2, SO01.BR	Kälte-Schübl GmbH, Regensburg, D
Kühlschränke	
- CNP 3913 Index 21E/001	Liebherr-International AG, Bulle, CH
- Forma 900 Series	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
- -86°C Freezer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Magnetrührer	
- MR Hei-Standard	Heidolph Instruments GmbH und Co. KG, Schwabach, D
- MR Hei-Mix L	Heidolph Instruments GmbH und Co. KG, Schwabach, D
Mikroskope:	
- Axiovert 40C	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
- Primo Vert	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
- Laborlux S	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
- Leica DMLB Typ 020-519.511	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, D
Mikroskopkamera Color Video Camera Modell MC-3289	Horn Imaging GmbH, Aalen, D
Mikrowelle MW 2235 CB	Bomann GmbH, Kempen, D
Milli-Q Q-Pod [®] Reinstwasseraufbereitungsanlage	Merck Millipore, Billerica, USA
Mini Laboratory Pump VP86	VWR International LLC., Radnor, USA
Netzteil NG-P700 II für Mikroskopkamera	Horn Imaging GmbH, Aalen, D
Photometer-Drucker DPU-414 Thermal Printer	Seiko Instruments GmbH, Neu- Isenburg, D
Pipetten:	
- Research Plus 10µl, 100µl, 200µl, 10000µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
- Reference 200µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
- ErgoOne 10µl, 100µl, 200µl, 10000µl	Starlab International GmbH, Hamburg, D

- Pipetboy 2	Integra Biosciences AG, Hudson, USA
- Pipetboy acu	Integra Biosciences AG, Hudson, USA
Präzisionswaage KERN PCB3500g, 0,01g	Kern und Sohn GmbH, Balingen, D
Rotoren	
- TX-750 Swinging Bucket Rotor (für Heraeus Megafuge 40R)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
- TX-400 Swinging Bucket Rotor (für Heraeus Megafuge 16R)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Schüttelgerät Typ 3017	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D
Sterilbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Stickstofftanks:	
Chronos 100 N ₂ -Tank	Messer Austria GmbH, Gumpoldskirchen, AUT
MVE HEco Series 800-190 N ₂ -Tank	Chart Industries Inc., Canton, USA
XL-180 N ₂ -Nachfülltank	Taylor-Wharton International LLC., Minnetonka, USA
Spülmaschine Compact Desinfektor G 7783 CD	Miele & Cie. KG, Gütersloh, D
ThermoMixer C	Eppendorf AG, Hamburg, D
Vacuum Gas Pump	VWR International LLC., Radnor, USA
Vortex-Geräte	
- Vortex Genie 2 TM	Bender und Hobein AG, Zürich, CH
- Vortex VV3	VWR International LLC., Radnor, USA
- Mono-Mixer	Sarstedt AG und Co, Nümbrecht, D
Wärmebad Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D

Zentrifugen:

- Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
- Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
- Zentrifuge 5424 R	Eppendorf AG, Hamburg, D
- Microzentrifuge	Starlab International GmbH, Hamburg, D
- Shandon Cytospin 3 Cytozentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

3.1.2 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

Abdeckplatte PS, hohes Profil 9mm,	Greiner Bio One GmbH Kremsmünster, AT
Agarplatten mit 100µg/ml Ampicillin	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg, Regensburg, D
Anatomische Pinzette 130mm und 200mm	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
Cellstar Polypropylen Röhren 15ml und 50ml	Greiner Bio One GmbH, Kremsmünster, AT
Cryo-Gloves Middle-Arm	Tempshield Inc., Mount Desert, USA
Cryo-Safe™ -1°C Freeze Controller	Bel-Art Products, Wayne, USA
Deckgläser für Hämatocytozometer, plan geschliffen 20mm x 26mm #4	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Deckgläser 24mm x 60mm #1	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Discardit™ II Spritze 10ml	BD Biosciences, Heidelberg, D
Eppendorf-Cup Ständer	eBioscience Inc., San Diego, USA
EZ Single Zytotunnel® with white filter cards. Träger für Zytospins	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
FACS-Tubes	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA

Filter Top Zellkultur-Flaschen T25, T75 und T125	Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, AT
Handzähler mit Haltering, zur Stückzählung bis 9.999	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, D
Kryoetiketten 28x12mm für Eppendorf-Cups	Scienova GmbH, Jena, D
Laborflaschen 250ml / 500ml	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
Löffelspatel 210mm	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
Magnetrührstäbchen Standard-Satz	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, D
Magnetstab-Entferner aus PTFE 250 mm	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, D
Messzylinder 100ml Braunbrand	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim, D
Messzylinder 500ml aus Polypropylen	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
Minisart RC 15, steril, Spritzenvorsatzfilter	VWR International LLC., Radnor, USA
Multi Screen Filter Plates	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Multiwellplatten 6 well, 12 well, 24 well, 48 well, 96 well Rundboden	Greiner Bio One GmbH Kremsmünster, AT
Nalgene® Unwire Racks für FACS Tubes / 15ml Tubes / 50ml Tubes	VWR International LLC., Radnor, USA
Nitrilhandschuhe S, M und L	Kimberly-Clark Corporation, Dallas, USA
Objektträger 76 x 26 x 1mm beidseitiges Mattfeld	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D
Perfusion 50ml Syringe, Luer-Lok™ Tip 14Gx1 1/4"	BD Biosciences, Heidelberg, D
Petrischalen P10	Greiner Bio One GmbH Kremsmünster, AT
Petriturn-M ^{plus} Ausplattierhilfe	Schütt Biotec GmbH, Göttingen, D
Photometer Küvette 220 – 1600nm	Eppendorf AG, Hamburg, D

pH Indikatorstäbchen pH-Fix 6,0-7,7	Macherey-Nagel GmbH und Co. KG, Düren, D
pH-Indikatorstäbchen pH 6,5-10	Merck KGaA, Darmstadt, D
Pre-Separation Filters (30µm)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Pipette 5ml, 10ml, 25ml und 50ml	Greiner Bio One GmbH, Kremsmünster, AT
Pipettenspitzen graduiert 10µl, 200µl, 1000µl	Starlab International GmbH, Hamburg, D
Pipettenspitzen Nachfüllsystem graduiert 10µl, 100µl	Starlab International GmbH, Hamburg, D
Pulverspatel 150mm / 185mm	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
Pulvertrichter 80mm / 100mm aus Polypropylen	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
Roti-Tape-Markierband-Sortiment	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
Safety-Multifly [®] -Needle	Sarstedt AG und Co, Nümbrecht, D
Safe Lock Tubes 0,5ml, 1,5ml biopur	Eppendorf AG, Hamburg, D
Safe Lock Tubes 0,2ml, 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Safe Seal Tips Professional 10 µl, steril	Biozym Scientific GmbH, Hessisch-Oldendorf, D
Schott Becherglas 1000ml	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim, D
Schott Erlenmeyer Kolben 100ml / 250ml	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim, D
Shandon Cytoträger Nr. 59910051/M	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Sterican-Kanülen 0,4x25 mm 27G*1LL und 1,5LL	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Stericup [®] Sterilfiltereinheiten	Merck KGaA, Darmstadt, D
Sterilindikatorband für Dampfsterilisation	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D

Sterilindikatorband für Heißluftsterilisation	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
Tip One Filter Tip 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000µl	Starlab International GmbH, Hamburg, D
Transfer-Pipette 3,5ml	Sarstedt AG und Co, Nümbrecht, D
Versa Touch Handschuhe S, M und L	Ansell, Yarra City, AUS
Whatman™ Folded Filters 150mm diameter	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB
Wägebüchse 170mm	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
Wägeschälchen 100ml / 250 ml	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
Zählkammern:	
- Neubauer improved depth 0,1mm	Paul Marienfeld GmbH, Lauda- Königshofen, D
- Zählkammer Neubauer improved brightline depth 0,1mm	Paul Marienfeld GmbH, Lauda- Königshofen, D
- Zählkammer Neubauer brightline depth 0,1mm	LO Laboroptik Ltd., Lancing, UK
Zellkulturschale P10 und P15	Greiner Bio One GmbH, Kremsmünster, AT
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien	
2-Propanol 70 Volumenprozent	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
5-Azacytidin ≥ 98%	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Ampicillin Natriumsalz ≥ 99 % für die Molekularbiologie und Biochemie	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
Ampuwa® Spüllösung Plastipur® (Aqua destillata)	Fresenius SE & Co. KGaA, Bad Homburg, D
Annexin V Binding Buffer, 10X concentrate	BD Biosciences, Heidelberg, D
Calciumchlorid-Dihydrat pro analysi	Merck KGaA, Darmstadt, D

Calciumchlorid-Dihydrat Cellpure® $\geq 99\%$	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
Certipur® Buffer Solution	Merck KGaA, Darmstadt, D
Dextran from <i>Leuconostoc species pluralis</i> (spp.) 31392-50G, molar weight 450,000-650,000 g/mol	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO), BioScience-Grade	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate-buffered saline</i> ; PBS)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Essigsäure $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
FACS Clean Solution	BD Biosciences, Heidelberg, D
FACS Flow Sheath Fluid	BD Biosciences, Heidelberg, D
FACS™ Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg, D
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg, D
Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung für die Mikro- skopie	Merck KGaA, Darmstadt, D
Glycerol for molecular biology $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Hank's Balanced Salt Solution H6648 (HBSS), modified with NaHCO ₃ , w/o phenol red, CaCl ₂ , MgSO ₄ , liquid sterile-filtered, suitable for cell culture	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Hefeextrakt, Pulver für die Bakteriologie	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
Heparin 25.000 IU/5ml (internationale Einheiten; engl. <i>international units</i> ; IU)	Rotexmedica GmbH Arzneimittel- werk, Trittau, D
Heparin-Natrium 25.000 IU/5ml	Ratiopharm GmbH, Ulm, D
Humanserum (HS)	Fünf freiwillige Spender aus der Arbeitsgruppe Thomas, Regens- burg, D. Gewonnen durch Dichtegradientenzentrifugation.
Kaliumacetat $> 99\%$ CELLPURE®	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D

Kaliumchlorid > 99% CELLPURE®	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
Kaliumhydroxid, $\geq 85\%$, $K_2CO_3 \leq 2,0\%$	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Magnesiumchlorid > 98,5%, wasserfrei	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
Mangan(II)-chlorid-tetrahydrat $\geq 98\%$	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
May-Grünwalds Eosin-Methylenblaulösung modifiziert für die Mikroskopie	Merck KGaA, Darmstadt, D
Methanol gradient grade for liquid chromatography	Merck KGaA, Darmstadt, D
Milli-Q Reinstwasser	hergestellt mit Milli-Q Q-Pod® Reinstwasseraufbereitungsanlage
MOPS-Natriumsalz (3-(N-Morpholino)-propansulfon- säure Natriumsalz) $\geq 98\%$	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit	Lonza Group AG, Basel, CH
Natriumazid ReagentPlus® $\geq 99,5\%$	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Natriumhydroxid Pellets	VWR International LLC., Radnor, USA
Natriumhydroxid Pellets	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumchlorid $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat $\geq 99,5\%$ Blotting-Grade	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
Nitrotetrazolium Blue Chlorid (NBT)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
N,N-Dimethylformamid $\geq 99,5\%$ zur Synthese	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
Paraformaldehyde, reagent grade, crystalline	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Pancoll human for cell culture. Gradient für Dichtezentrifugation	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D

Phorbol-12-myristat-13-acetate >99% (PMA)	Sigma-Alderich Corporation, St. Louis, USA
pGEM4Z eGFP Plasmid	PD. Dr. Nils Schaft, Universitätsklinikum Erlangen, Erlangen
Pioglitazon-Hydrochlorid \geq 98%	Sigma-Alderich Corporation, St. Louis, USA
Retinsäure (ATRA) \geq 98%	Sigma-Alderich Corporation, St. Louis, USA
Rinderalbumin 22%	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Shandon Xylene Substitute	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Trypan blue 0,5% in physiological saline	Biochrom GmbH, Berlin, D
Trypsin-EDTA (1X) 0,05%	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
3.1.4 Medien und Zusätze	
AIM V Medium	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Beta-Mercaptoethanol 50mmol/l (1000x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
DMEM High-Glc	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, D (selbstständig 1 Stunde bei 54° C hitzeinaktiviert)
Hepes Buffer (1M)	Sigma-Alderich Corporation, St. Louis, USA
Humanserum (HS), gering bis nicht lipämisch, zu gleichen Teilen verschiedene Blutgruppen	Bayerisches Rotes Kreuz, München, D (selbstständig 1 Stunde bei 54°C hitzeinaktiviert)

L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
MEM Natriumpyruvat 100mM	Sigma-Alderich Corporation, St. Louis, USA
MEM Vitamin Solution	Sigma-Alderich Corporation, St. Louis, USA
Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (1X) (RPMI Medium)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
OptiMem	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Penicillin Streptomycin (10,000 U/mL)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

3.1.5 Puffer, Lösungen und Färbungen

Annexin Bindungspuffer:	Annexin Binding Buffer 10X concentrate (10%) + Aqua destillata (90%)
Dextranlösung:	Aqua destillata, 0,9% NaCl, 3% Dextran from <i>Leuconostoc spp.</i>
Waschpuffer (pH = 6,88):	Aqua destillata, 15% Certipur [®] Buffer Solution
Erythrozyten-Lysepuffer:	Aqua destillata, 10% FACS [™] Lysing Solution
FACS-Fixierungspuffer:	PBS, 10% Paraformaldehyd,
Giensa-Färbelösung:	Certipur [®] Buffer Solution, 25% Giensas Azur-Eosin- Methylenblaulösung, filtriert
lysogeny broth medium (LB-Medium):	10g NaCl, 5g Hefeextrakt, 10g Trypton in 900ml Aqua destillata. pH-Einstellung mittels 10mol/l Natriumhydroxid. Aufgefüllt auf Gesamtvolumen 1000ml mit Aqua destillata. Autoklaviert.

Nitro-Inkubationslösung	AIM V Medium, 10% hitzeinaktiviertes HS, 1mg/ml NBT, 200ng/ml PMA
Phagozytose-Inkubationslösung	77% HBSS, 13% PBS, 10% nicht hitzeinaktiviertes HS, 1mM CaCl ₂ , 0,5mM MgCl ₂
Trypanblaufärbelösung:	Aqua destillata, 25% Trypan blue 0,5% in physiological Saline

3.1.6 Zytokine

Humanes, rekombinantes G-CSF (Nivestim 30 Millionen Einheiten/ml Ursprungskonzentration)	Hospira Inc., Lake Forest, USA
Humanes, rekombinantes GM-CSF 1000 IU/ μ l Ursprungskonzentration	Bayer AG, Leverkusen, D
Humanes, rekombinantes IL-1 β 10 μ g/ml Ursprungskonzentration	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Humanes, rekombinantes IL-4 500 IU/ml Ursprungskonzentration	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Humanes, rekombinantes IL-6 1.000.000 IU/ml Ursprungskonzentration	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Humanes, rekombinantes Prostaglandin E ₂ 1 μ g/ml Ursprungskonzentration	Sigma-Aldrich [®] Life Science, St. Louis, USA
Humanes, rekombinantes SCF 100 μ g	PeptoTech Inc., Rocky Hill, USA
Humaner, rekombinanter Tumornekrosefaktor α 10 μ g/ml Ursprungskonzentration	PromoCell GmbH, Heidelberg, D

3.1.7 Antikörper

humanes Ziel-Epitop	Flourochrom	Hersteller
Annexin V	FITC	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD4	FITC	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD11b	APC	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD11c	APC	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD14	FITC	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD14	PE	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD15	FITC	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD15	PE	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD33	APC	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD33	PE	BioLegend, San Diego, USA
CD34	PE	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD45	FITC	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD45RA	PE	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD80	FITC	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD83	FITC	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD86	FITC	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD117	APC	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD274	APC	BD Biosciences, Heidelberg, D
HLA-ABC	PE	BD Biosciences, Heidelberg, D
HLA-DR	PE	BD Biosciences, Heidelberg, D
Isotyp IgG ₁	APC	BD Biosciences, Heidelberg, D
Isotyp IgG ₁	PE	BD Biosciences, Heidelberg, D
Isotyp IgG ₁	FITC	BD Biosciences, Heidelberg, D
Isotyp IgG _{2a}	FITC	BD Biosciences, Heidelberg, D
Isotyp IgG _{2a}	PE	BD Biosciences, Heidelberg, D
Isotyp IgG _{2a}	PE	eBioscience Inc., San Diego, USA
Isotyp IgG _{2b}	PE	BD Biosciences, Heidelberg, D
Isotyp IgM	PE	BD Biosciences, Heidelberg, D

3.1.8 Zellen

Escherichia coli K12 JM-109

New England Biolabs GmbH,
Ipswich, USA

KG-1 AML Zelllinie

freundlicherweise zur Verfügung
gestellt von Prof. Michael Rehli,
Universitätsklinikum Regensburg,
Regensburg, D

KG-1a AML Zelllinie

freundlicherweise zur Verfügung
gestellt von Prof. Michael Rehli,
Universitätsklinikum Regensburg,
Regensburg, D

Makrophagen

freundlicherweise zur Verfügung
gestellt von Jakob Bösch,
Arbeitsgruppe Kreutz,
Universitätsklinikum Regensburg

Periphere Blutzellen

Fünf freiwillige Spender aus der
Arbeitsgruppe Thomas, Regens-
burg, D

THP-1 AML Zelllinie

freundlicherweise zur Verfügung
gestellt von Prof. Michael Rehli,
Universitätsklinikum Regensburg,
Regensburg, D

Primäre AML Blasten (BB007, UKR101, UKR109,
UKR 110, UKR111, UKR128, UKR135, UKR144,
UKR147, UKR151)

Patienten mit Erstdiagnose AML
und >70% Blastenanteil im peri-
pheren Blut nach schriftlicher
Einwilligung in Übereinstimmung
mit der Deklaration von Helsinki
und nach Genehmigung durch die
Ethikkommission der Universität
Regensburg, Regensburg, D

3.1.9 Desinfektions- und Reinigungsmittel

Abwurf BD Sharps Container

BD Biosciences, Heidelberg, D

Desinfektionstücher Desco Wipes	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld, D
Händedesinfektionslösung Mucasept-A [®]	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, D
Incidin [®] Plus	Ecolab [®] Inc., St. Paul, USA
Softasept [®] N farblos, Hautdesinfektionsmittel	B Braun Melsungen AG, Melsungen, D

3.2 Methoden

3.2.1 Akute myeloische Leukämie Zelllinien

3.2.1.1 Die verwendeten Zelllinien

Für die Versuche in dieser Arbeit wurden die AML Zelllinien KG-1, KG-1a und THP-1 verwendet. Diese wurden freundlicherweise von Prof. Michael Rehli vom Universitätsklinikum Regensburg zur Verfügung gestellt.

THP-1 Zellen sind monozytär differenzierte AML Zellen, die der FAB-Klasse M5 zugeordnet werden^{76,77}. Die Zellen exprimieren einzelne Differenzierungsmarker myeloischer Zellen (CD11b(-), CD15(+))¹³². Nach Zugabe von ATRA differenzieren THP-1 Zellen zu adhären, phagozytierenden Makrophagen¹³³.

Die Zelllinie KG-1 stammt von einem Patienten mit Erythroleukämie. Lichtmikroskopisch handelt es sich vor allem um Myeloblasten und Promyelozyten¹³⁴. 2% der Zellen sind auch reifzellige Monozyten und Granulozyten. Die zytochemischen Eigenschaften der Zellen entsprechen denen einer mittelgradig bis gut differenzierten AML¹³⁴. KG-1 Zellen exprimieren CD15¹³⁵. Für KG-1 ist aufgrund der Pleiomorphie der Zellpopulation keine FAB-Klassifikation angegeben⁷⁷. KG-1 Zellen können durch ATRA zu CD11b⁺ neutrophilen Granulozyten differenziert werden¹³⁶.

KG-1a Zellen sind wenig differenzierte Abkömmlinge der KG-1 Zelllinie, die sich im Rahmen der Passagierung von KG-1 Zellen spontan entwickelten¹³⁷. KG-1 und KG-1a weisen die gleichen zytogenetischen Merkmale auf¹³⁷. Allerdings sind KG-1a zytomorphologisch unreifer (vorwiegend Promyeloblasten), exprimieren weniger für Immunfunktionen bedeutsame Fc-Rezeptoren (engl. *fragment crystallisable receptor*) und zeigen geringere Phagozytosefähigkeit als KG-1¹³⁷. Sie werden daher als sehr unreife AML Zellen bezeichnet¹³⁷. KG-1a Zellen können durch ATRA nicht zur Differenzierung gebracht werden^{28,138}.

3.2.1.2 Kulturbedingungen der Dauerkultur von Zelllinien

Für die ersten Experimente dieser Arbeit wurden die AML Zelllinien KG-1, KG-1a und THP-1 im Zellkulturmodell gezüchtet. Die Zellen wurden für die Dauerkultur in einer Dichte von 0,5 Millionen Zellen pro Milliliter in 15ml Nährmedium aufgenommen und in T75 Zellkulturflaschen ausgesät. Das Medium bestand aus RPMI Medium (+ L-Glutamin), 1,2% Penicillin/Streptomycin, 3% HEPES Puffer und 10% FCS. Die Kulturen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 93% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zweimal pro Woche wurde die Zelldichte bestimmt. Dazu wurden 20µl Zellsuspension mit 20µl Trypanblaufärbelösung gemischt. Hiervon wurden 20µl zur Befüllung einer Neubauer-Zählkammer eingesetzt und 32 Felder mit dem Lichtmikroskop ausgezählt. Tote bzw. kranke Zellen erschienen in der Färbung blau, pyknotisch oder auch granuliert und wurden nicht gezählt. Die so bestimmte Zellzahl multipliziert mit dem Faktor 1000 entsprach der Zellzahl pro Milliliter in der Zellsuspension (Zelldichte). Durch Verdünnung mit frischem Medium und Verwerfen überschüssiger Zellen wurden die ursprünglichen Kulturbedingungen (15ml x 0,5 Millionen Zellen pro Milliliter) zweimal wöchentlich wieder eingestellt.

3.2.2 Zellkulturmodell für Zelllinien (Vorversuche)

Eingangs wurden verschiedene Medikamentenkonzentrationen an AML Zelllinien getestet (Vorversuche; Kulturbedingungen hierfür siehe **Abschnitt 3.2.2**). In den darauffolgenden Hauptversuchen wurden AML Zelllinien und primäre AML Blasten von Patienten unter veränderten Kulturbedingungen auf die Wirkung von APA hin untersucht (Kulturbedingungen hierfür siehe **Abschnitt 3.2.3**).

Für die ersten Untersuchungen zu den Auswirkungen der Behandlung mit APA auf AML Zelllinien wurden die KG-1, KG-1a und THP-1 Zellen in 12-Well Platten in 3ml RPMI Medium (10% FCS, 1,2 % Penicillin/Streptomycin, 3% HEPES Puffer) in einer Dichte von 117.000 Zellen/ml ausgesät. Die Chemotherapeutika waren in DMSO gelöst und wurden initial in Konzentrationen eingesetzt, wie sie aus der Literatur bekannt waren. So wurde ATRA in einer Konzentration von 1µM eingesetzt^{26,139}. Dies entspricht etwa der Plasmakonzentration von ATRA bei APL-Patienten unter Therapie¹⁴⁰. Für PPAR γ -Agonisten wurden in der Literatur verschiedene Konzentrationen zwischen 1µM und 300µM verwendet^{111,113,116,128}. Für die Vorversuche wurde für PGZ die Konzentration 1µM gewählt. Im Verlauf der Vorversuche wurden weitere Konzentrationen von ATRA (0,1µM) und PGZ (5µM, 10µM, 50µM) getestet. Da für die Substanz AZA neben den gewünschten biomodulatorischen auch zytotoxische Effekte insbesondere bei höheren Konzentrationen

bekannt sind, wurde AZA in einer niedrigen Konzentration von $0,1\mu\text{M}$ verwendet^{93,102}. Außerdem wurde AZA aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit und entsprechend dem Chemotherapieregime der individuellen Heilversuche mit APA an fünf Patienten von Thomas *et al.* bis einschließlich Tag 6 täglich zugesetzt¹⁰. ATRA und PGZ wurden nur einmalig an Tag 0 zugegeben. Die Zellen wurden im Brutschrank (37°C , 5% CO_2 , 93% Luftfeuchtigkeit) inkubiert und in der Regel an den Tagen 3, 5 und 7 untersucht. Da insbesondere THP-1 Zellen starke Adhäsion am Boden der Kulturgefäße zeigten, wurden alle Zellen für die Versuche 20min auf Eis inkubiert und mit kaltem PBS gelöst.

3.2.3 Zellkulturmodell für Zelllinien und akute myeloische Leukämie Blasten

(Hauptversuche)

Für die Hauptversuche wurden neben AML Zelllinien auch primäre Blasten von AML Patienten verwendet, die im Rahmen eines positiven Ethikvotums und in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki hierzu ihr schriftliches Einverständnis gegeben hatten. Die Blasten wurden zuvor mittels Dichtegradientenzentrifugation aus dem peripheren Blut der Patienten angereichert (siehe **Abschnitt 3.2.5**) und bis zur Verwendung eingefroren. Für die Versuche mussten die AML Blasten stets frisch aufgetaut werden. Die Zellen wurden direkt nach dem Auftauen in 24-Well Platten mit 2ml AIM V Medium (10% hitzeinaktiviertes HS, 50ng/ml SCF, 50ng/ml G-CSF) in einer Dichte von 500.000 Zellen/ml ausgesät und im Brutschrank (37°C , 5% CO_2 , 93% Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Die Zytokine SCF und G-CSF wurden zugesetzt, um das Absterben der AML Blasten zu verhindern und die Zellen zum Wachstum zu stimulieren. Beide Zytokine sind am Aufbau des physiologischen Mikromilieus des Knochenmarks beteiligt und fördern das Zellüberleben (SCF)^{141,142} bzw. die Differenzierung von myeloischen Zellen (G-CSF)¹⁴³. Die Zytokinkonzentrationen wurden in Vorversuchen ermittelt und sind gleichzeitig angelehnt an Literaturangaben¹⁴⁴.

Auf Basis der Vorversuche an AML Zelllinien wurde ein angepasstes Behandlungsschema verwendet. Die verwendeten Konzentrationen waren: ATRA $1\mu\text{M}$; AZA $0,1\mu\text{M}$; PGZ $5\mu\text{M}$. AZA wurde weiterhin bis einschließlich Tag 6 täglich zugegeben. An Tag 7 erfolgte eine erneute Zugabe von ATRA und PGZ in den Konzentrationen $1\mu\text{M}$ bzw. $5\mu\text{M}$. Das Medium wurde gewechselt bzw. die Zellen auf neue 24-Well Platten aufgeteilt, sobald es verbraucht war (Indikatorumschlag nach gelb) oder die lichtmikroskopisch ermittelte Zelldichte zu hoch war. Generell erfolgte an den Tagen 4, 7 und 11 jeweils ein halber Mediumwechsel. Hierzu wurde ohne Resuspension 1ml Medium aus jeder Vertiefung der 24-Well Platten

abgenommen und durch frisches Medium mit Zytokinen und Therapeutika ersetzt. Die Experimente fanden an den Tagen 7 und 14 statt.

Im Rahmen der Hauptversuche wurden auch die drei Zelllinien THP-1, KG-1 und KG-1a untersucht. Die Kulturbedingungen waren mit denen für AML Blasten identisch. Auf die Zugabe von G-CSF und SCF wurde hier jedoch verzichtet.

3.2.4 Versuchsprotokoll der Untersuchung von akute myeloische Leukämie Blasten an Tag 0

Alle AML Patientenproben, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden 12 Stunden nach dem Auftauen bezüglich Oberflächenmolekülexpression, Zytomorphologie, Phagozytosefähigkeit und Fähigkeit zur ROS-Bildung untersucht. Die Zellen wurden hierzu direkt nach dem Auftauen in 24-Well Platten mit 2ml AIM V Medium (10% hitzeinaktiviertes HS) in einer Dichte von 500.000 Zellen/ml ausgesät. Ein Teil der Zellen erhielt zusätzlich 50ng/ml SCF und 50ng/ml G-CSF, während in der Kontrollprobe keine Zytokine zugegeben wurden. Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 93% Luftfeuchtigkeit) wurden die oben genannten Untersuchungen durchgeführt. Ziel war es zu prüfen, inwieweit das Zytokinmilieu die untersuchten Eigenschaften und Merkmale beeinflusste und dadurch zur Verzerrung der Ergebnisse der Hauptversuche führte.

3.2.5 Zellisolierung aus peripherem Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation

In dieser Arbeit wurden funktionelle Tests von AML Zellen zum Nachweis von Phagozytose-Fähigkeit und ROS-Bildung neu etabliert. Hierfür waren Positivkontrollen notwendig. Es wurden Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen verwendet. Makrophagen wurden freundlicherweise von Herrn Jakob Bösch aus der Arbeitsgruppe Kreutz am Universitätsklinikum Regensburg zur Verfügung gestellt.

Zur Gewinnung von Granulozyten und DCs wurden zunächst Mononukleäre Zellen (*engl. peripheral blood mononuclear cell*; PBMC) durch Dichtegradientenzentrifugation aus peripherem Blut isoliert. Durch anschließende Aufreinigung der PBMCs konnten Granulozyten isoliert werden. Dendritische Zellen wurden durch Zugabe von Zytokinen aus PBMCs entwickelt (siehe **Abschnitt 3.2.6**). Als weiteres Produkt der Dichtegradientenzentrifugation wurde Humanserum gewonnen, welches nicht hintzeinaktiviert wurde und so für den Phagozytose-Test verwendet werden konnte (siehe **Abschnitt 3.2.10**).

Für die Dichtegradientenzentrifugation wurde venöses, heparinisertes Blut von gesunden Spendern aus der Arbeitsgruppe Thomas gewonnen und 1:2 mit PBS verdünnt. Jeweils 15ml Pancoll'sche Lösung wurden in 50ml Röhrchen vorgelegt und mit 30ml der Blutverdünnung vorsichtig überschichtet. Anschließend wurden die Röhrchen bei 2.200 Umdrehungen pro Minute (engl. *revolutions per minute*; rpm) ($G_{\text{mittel}} = 752g$) für 20min unter Abschaltung der Zentrifugenbremse zentrifugiert. Die Blutbestandteile bandierten gemäß ihrer Dichte und konnten so getrennt gewonnen werden. Je nach Bedarf wurden nicht hitzeinaktiviertes HS und PBMCs abgenommen und weiterverwendet.

Zur weiteren Aufreinigung der Granulozyten aus PBMCs erfolgte eine Verdünnung in 25ml HBSS ohne Mg/Ca und 25ml Dextranlösung (3% *Dextran from Leuconostoc spp.*). Durch ihre höhere Dichte sanken die Erythrozyten über die Zeit schneller ab, sodass sich die Granulozyten nach ca. 20min mit dem HBSS-Überstand abpipettieren ließen. Danach wurde die Zellsuspension bei 1.500rpm ($G_{\text{mittel}} = 350g$) für 5min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Durch Zugabe von 4ml Erythrozyten-Lysepuffer (10% *FACSTM Lysing Solution*, 37°C) wurden verbliebene Erythrozyten lysiert. Die Lyse wurde nach 2 min durch Zugabe von 10ml HBSS gestoppt. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (1.500rpm, $G_{\text{mittel}} = 350g$, 5min) und Verwerfen des Überstandes verblieben die Granulozyten als Pellet. Die Zellen wurden in AIM V Medium mit 10% hitzeinaktiviertem HS resuspendiert, gezählt und direkt verwendet. Aufgrund der Kurzlebigkeit von Granulozyten außerhalb des Körpers konnten diese nicht kultiviert oder eingefroren werden.

3.2.6 Generierung von unreifen, dendritischen Zellen aus Peripheren Blut

Mononukleären Zellen

Für die Generierung unreifer DCs wurden frisch isolierte oder aufgetaute PBMCs in einer Zahl von 20 bis 30 Millionen pro Vertiefung auf einer 6-Well-Platte ausgesät. Pro Vertiefung wurden 3ml AIM V Medium mit 1% hitzeinaktiviertem HS verwendet. Die Zellen adhärten über einen Zeitraum von 60-90 Minuten im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 93% Luftfeuchtigkeit). Überschüssige Zellen wurden abgenommen und die Vertiefungen mit PBS nachgewaschen. Nach Zugabe von je 3ml AIM V Medium mit 1% hitzeinaktiviertem HS folgte eine Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 93% Luftfeuchtigkeit). An den Tagen 1 und 3 wurden pro Vertiefung 3000 IU IL-4 und 2400 IU GM-CSF zugegeben. Nach insgesamt 5 Tagen konnten unreife DCs mit kaltem PBS abgelöst und für Versuche verwendet bzw. für spätere Versuche eingefroren werden.

3.2.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, um heterogene Zellpopulationen anhand ihrer Autofluoreszenz und Zellgröße sowie der Expression von Oberflächenmarkern auf ihre Zusammensetzung hin zu untersuchen und zu sortieren. Für die Untersuchung werden Zellen durch eine sehr dünne Kapillare geführt. Hierdurch werden die in der Probe enthaltenen Zellen tröpfchenweise aufgeteilt und können so einzeln untersucht werden. Die Zellen passieren einen Laser, welcher senkrecht durch den Flüssigkeitsstrom strahlt. Zwei Detektoren messen an dieser Stelle das relativ zum Laser seitwärts gestreute (engl. *side scatter*) und geradeaus gebeugte Licht (engl. *forward scatter*). Das Ausmaß des seitwärts gestreuten Lichts gibt Auskunft über die morphologische Homogenität der Zellen, das geradeaus gebeugte Licht über die Größe der Zellen. Durch diese Methoden können die einzelnen Zellpopulationen des Blutes grob differenziert und ihr Verhältnis zueinander bestimmt werden. Mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper und weiterer Laser-Detektor-Systeme können bestimmte Oberflächenproteine der Zellen nachgewiesen werden. Dadurch ist es möglich, Apoptoserate, Differenzierung und vieles mehr zu bestimmen¹⁴⁵.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsmuster bestimmter Oberflächenmoleküle von AML Zelllinien und primären AML Blasten nach Behandlung mit APA untersucht. Dazu wurden jeweils 150.000 Zellen in FACS-Gefäße überführt, mit 1ml PBS verdünnt und abzentrifugiert (1.500rpm, $G_{\text{mittel}} = 350g$, 5min). Nach Verwerfen des Überstandes wurde die in Vorversuchen ermittelte, optimale Menge der entsprechenden Antikörper zugegeben, gemischt und im Dunkeln für 20min inkubiert. In den Hauptversuchen wurden Isotypenfärbungen für jede einzelne Probe durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend mit 1ml PBS gewaschen, abzentrifugiert (1.500rpm, $G_{\text{mittel}} = 350g$, 5min) und der Überstand erneut verworfen. Für die FACS Analyse wurden die Zellen in 300µl PBS resuspendiert. Die Messung selbst erfolgte mit dem Gerät FACSCalibur und dem Programm CellQuest Pro nach den empfohlenen Messvorschriften. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJo. Die Ergebnisse wurden in Form der relativen, mittleren Fluoreszenzintensität (engl. *relative median fluorescence intensity*; rMFI) angegeben. Die rMFI ergab sich aus der MFI einer Probe und der MFI einer Kontrolle (Leerprobe, DMSO, Isotyp): $rMFI = \frac{MFI_{\text{Probe}}}{MFI_{\text{Kontrolle}}}$. Für Nachmessungen konnten die AML Zellen nach der Antikörperfärbung auch abzentrifugiert (1.500rpm, $G_{\text{mittel}} = 350g$, 5min), in 300µl FACS-Fixierungspuffer (10% Paraformaldehyd) suspendiert und bei 4°C gelagert werden.

Bei einigen Versuchen wurde auch eine Annexin V Färbung durchgeführt. Dazu wurden im Unterschied zu den anderen Färbungen nach dem ersten Zentrifugationsschritt 100µl

kalziumhaltiger Annexin Bindungspuffer (10% *Annexin Binding Buffer 10X*) und 3µl Annexin V FITC zugegeben. Statt eines zweiten Zentrifugationsschrittes wurden nach 20min weitere 200µl des Puffers zugegeben. Die FACS-Messung musste aufgrund der Möglichkeit unspezifischer Bindungen direkt im Anschluss an die Färbung erfolgen.

In **Tabelle 1** sind die in dieser Arbeit verwendeten Oberflächenmarker aufgezählt und ihr Expressionsort sowie ihre Funktion dargestellt.

Bezeichnung	Expressionsort	Funktion
CD11b ^{18,146-150}	Myelozyten, Metamyelozyten, reife Granulozyten, monozytäre Vorläuferzellen, Makrophagen, Natürliche Killerzellen	Transmembranrezeptor für Lipopolysaccharide und doppelsträngige DNA.
CD14 ¹⁵¹	Monozyten, Makrophagen	Transmembranrezeptor für Lipopolysaccharide.
CD15 ^{152,150}	neutrophile Granulozyten, Vorstufen der Granulopoese	Bestandteil von Glykoproteinen und Proteoglykanen. Mediator für Phagozytose und Zelladhäsion.
CD33 ^{150,153,154}	Vorstufen der Granulopoese und Monozytopoese, weniger auf reifen Zellen, 90% der AML Blasten	Gehört zur Familie der SIGLECs und dient eventuell der Regulation von Immunantworten.
CD34 ¹⁵⁵	hämatopoetische Stammzellen	Genaue Funktion unbekannt. Möglicherweise beteiligt an Zelladhäsion.
CD80 ^{156,157}	APCs, B-Zellen	Kostimulatorisches Molekül zur T-Zell-Aktivierung.
CD83 ¹⁵⁷⁻¹⁵⁹	DCs, B-Zellen, Langerhans Zellen Lymphozyten	Gehört zur Immunglobulin-Superfamilie. Beteiligt an der Regulation der Antigenpräsentation.
CD86 ^{156,157}	APCs, B-Zellen,	Kostimulatorisches Molekül zur T-Zell-

	Monozyten, DCs	Aktivierung.
CD117 (Syn. c-kit) 157,160,161	hämatopoetische Vorläuferzellen, 80% der AML Blasten	SCF-Rezeptor. Protoonkogen mit verschiedenen <i>Gain-of-function</i> Mutationen (z.B. AML, Gastrointestinaler Stromatumor).
CD274 (Syn. PD-L1) 162-168	Monozyten, DCs, Natürliche Killerzellen, B-Zellen, T-Zellen Tumorzellen (z.B. AML, Hepatozelluläres Karzinom, Ovarial- karzinom)	Ligand von PD-1 auf aktivierten T- und B-Zellen. Vermindert dort Effektorfunktionen, induziert Apoptose sowie die Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen. Wichtig für die Immuntoleranz. Unterdrückung der T-Zell-Aktivität gegen Tumorzellen.
HLA-ABC ¹⁶⁹	alle kernhaltigen Körperzellen	MHC-Klasse I Molekül. Präsentation von intrazellulären Peptiden gegenüber CD8 ⁺ T-Lymphozyten. Wichtig für die Immunantwort gegen Viren.
HLA-DR ¹⁶⁹	APCs, DCs, Makrophagen, B-Zellen	MHC-Klasse II Molekül. Präsentation von körperfremden Peptiden gegenüber CD4 ⁺ T-Helfer-Zellen. Induktion einer gezielten Immunantwort.
Phosphatidyl- serin ^{170,171}	Apoptotische Zellen	Bindet das physiologisch vorkommende Molekül Annexin V. Annexin V FITC wird zum Nachweis apoptotischer Zellen im FACS genutzt.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten FACS-Marker. APC: Antigenpräsentierende Zelle, engl. *antigen-presenting cell*; HLA: humanes Leukozytenantigen, engl. *human leucocyte antigen*; MHC: Haupthistokompatibilitätskomplex, engl. *major histocompatibility complex*; PD-1: Programmierter Zelltod 1, engl. *programmed cell death 1*; PD-L1: Programmierter Zelltod 1 Ligand 1, engl. *programmed cell death 1 ligand 1*; SIGLEC: Sialinsäure-bindendes, immunglobulinähnliches Lektin, engl. *sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin*; TCR: T-Zell Rezeptor, engl. *T-cell receptor*.

3.2.8 Zellmorphologische Untersuchung mittels Zytopspin-Zentrifugation und Pappenheim-Färbung

Um die Differenzierung von AML Zelllinien und AML Blasten zytomorphologisch beurteilen zu können, wurden Pappenheim-Färbungen durchgeführt. Es wurden je 100.000 Zellen in FACS-Röhrchen mit 1ml PBS suspendiert und abzentrifugiert (1.500rpm, $G_{\text{mittel}} = 350g$,

5min). Der Überstand wurde verworfen und der restliche Pufferrücklauf zusätzlich mit einer Pipette abgenommen. Danach wurden die Zellen in 100µl PBS resuspendiert. Um eine bessere Zellhaftung am Objektträger zu erzielen, wurde je ein Tropfen Rinderserumalbumin zugegeben. 50µl der Zellsuspension wurden dann in einen Zytofunnel eingebracht und dieser bei 1200rpm ($G_{\text{mittel}} = 163g$) 10min in der Shandon Zytospin 3 Zentrifuge zentrifugiert. Dadurch wurden die Zellen auf einem Punkt des in den Zytofunnel eingespannten Objektträgers konzentriert. Nach einer Trocknungsphase von 5min erfolgte eine klassische Pappenheim-Anfärbung. Die Objektträger wurden 3min in May-Grünwalds Eosin-Methylenblaulösung modifiziert für die Mikroskopie und anschließend 13min in Giemsa-Färbelösung (25% Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung für die Mikroskopie) gefärbt. Überschüssige Färbelösung wurde mit einem dreiminütigen Bad in Waschpuffer (15% Certipur® Buffer Solution) entfernt. Nach Trocknung der Objektträger konnten die Zellen zytomorphologisch im Mikroskop untersucht werden. Fotografien wurden mit Hilfe des Leica DMLB Lichtmikroskops Typ 020-519.511 und der Color Video Camera Modell MC-3289 von Horn Imaging GmbH angefertigt. Anhand vorher festgelegter Kriterien (d.h. Kernlappung, Zytoplasmahelligkeit, Kern-Plasma-Relation und Granularität) wurden je 200 Zellen durch zwei Personen verblindet und unabhängig voneinander ausgezählt und der Anteil differenzierter Zellen bestimmt.

3.2.9 Transformation kompetenter JM-109 Bakterien mit grünfluoreszierendem Protein

Neben der Untersuchung von Oberflächenmolekülen und der Zytomorphologie wurden funktionelle Tests für die Beurteilung der Differenzierung von AML Zellen eingesetzt. Einer dieser Tests diente zur Untersuchung der Fähigkeit, Bakterien zu binden bzw. zu phagozytieren.

Im ersten Schritt wurden Bakterien mit dem Plasmid pGEM4Z-eGFP transformiert. Dieses kodiert die Gene für das grün fluoreszierende Protein (engl. *green fluorescent protein*; GFP) und für eine bakterielle Ampicillin-Resistenz. Das Plasmid wurde freundlicherweise von PD Dr. Niels Schaft von der Universitätsklinik Erlangen zur Verfügung gestellt. Für die Transformation standen in der Arbeitsgruppe kompetente Bakterien des *Escherichia coli* Stamms JM-109 zur Verfügung.

100µl aufgetaute Bakterienlösung und 0,25µg Plasmid wurden vorsichtig vermischt und 30min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Temperaturschock von 45 Sekunden bei 42°C im Thermoblock. Die Bakterien wurden danach in 1ml antibiotikafreies LB-Medium überführt und 40min auf einer Schüttelplatte (280rpm) in einer Wärmekammer (37°C) expandiert. Zum

Abschluss wurden 50µl der Bakterienlösung auf einer ampicillinhaltigen Agarplatte (100µg/ml Ampicillin) ausplattiert und 10 bis 14 Stunden bei 37°C bebrütet. In dieser Zeit bildeten sich isolierbare, einzeln stehende Bakterienkolonien. Die Lagerung der fertig bebrüteten Agarplatten erfolgte im Kühlschrank bei 4°C. Um stets frisch transformierte Bakterien verwenden zu können, wurde die Transformation alle 14 Tage wiederholt.

3.2.10 Phagozytose-Test

Die Etablierung dieses Verfahrens erfolgte in Anlehnung an Literaturangaben^{172,173}. Der Versuchsaufbau wurde anhand eigener Versuchsergebnisse modifiziert.

Einzelne Klone von mit pGEM4Z-eGFP transformierten *Escherichia coli* Bakterien (siehe **Abschnitt 3.2.9**) wurden von ampicillinhaltigen Agar isoliert und in einem 100ml Erlenmeyer-Kolben in 25ml LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin aufgenommen. Die Bakterien wurden 10 bis 12 Stunden in einer Wärmekammer bei 37°C auf einem Schüttelgerät (280rpm) kultiviert. Anschließend wurden 500µl Bakteriensuspension in 49,5ml frischen LB-Mediums (100µg/ml Ampicillin) überführt. Die Bakteriensuspension wurde bis zu einer optischen Dichte (engl. *optical density*; OD) von 0,65-0,85 ($\lambda = 600\text{nm}$)¹⁷³ bei 37°C auf einem Schüttelgerät (280rpm) bebrütet. Danach wurden die Bakterien bei 1.500rpm ($G_{\text{mittel}} = 350\text{g}$) 10min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Bakterien wurden in 2ml Phagozytose-Inkubationslösung (77% HBSS, 13% PBS, 10% nicht hitzeinaktiviertes HS, 1mM CaCl_2 , 0,5mM MgCl_2) resuspendiert und 30min bei 37°C auf einem Schüttelgerät (280rpm) inkubiert. Das Humanserum war zuvor mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen worden (siehe **Abschnitt 3.2.5**), war nicht hitzeinaktiviert und diente zur Opsonierung der Bakterien¹⁷⁴. Mittels optischer Densitometrie und der Formel Zelldichte $\approx \text{OD}_{600\text{nm}} \times 8 \times 10^8 \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$ wurde nach Ablauf der Inkubationszeit die Bakterienzahl pro Milliliter bestimmt^{175,176}. Jeweils 6,25 Millionen Bakterien und 250.000 der zu untersuchenden AML Zellen wurden in einer 24-Well Platte in insgesamt 1ml Phagozytose-Inkubationslösung gegeben. Dies entsprach einer Menge von 25 Bakterien pro AML Zelle. Die Inkubation erfolgte für 10min im Brutschrank (37°C, 5% CO_2 , 93% Luftfeuchtigkeit). Daraufhin wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt, 1ml PBS hinzugefügt, abzentrifugiert (1.500rpm, $G_{\text{mittel}} = 350\text{g}$, 5min) und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde insgesamt viermal nacheinander durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift wurden 300µl PBS zugegeben und die Zellen mit dem Gerät FACSCalibur auf die Aufnahme bzw. Bindung von GFP-markierten Bakterien hin untersucht. Für die Auswertung wurde die rMFI einer Probe relativ zur Leerprobe berechnet.

3.2.11 Nitroblautetrazoliumchlorid-Test (Nitro-Test)

Als weitere Untersuchungsmethode für die funktionellen Eigenschaften von AML Zellen wurde der Nitro-Test zum Nachweis von ROS verwendet. Für die Bestimmung der Versuchsparameter wurden sowohl Literaturangaben als auch Ergebnisse aus eigenen Vorversuchen verwendet^{130,177,178}.

Es wurden 500.000 zu untersuchende Zellen in einer 24-Well-Platte in 500µl Nitro-Inkubationslösung (AIM V Medium, 10% hitzeinaktiviertes HS, 1mg/ml Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT), 200ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)) suspendiert. Für die Negativkontrolle wurden 500.000 Zellen in 449µl AIM V mit 10% hitzeinaktiviertem HS und 51µl destilliertem Wasser (Lösungsmittel von NBT) ohne NBT oder PMA inkubiert. Das PMA diente der unspezifischen Stimulation der Zellen^{179,180} und wurde auch von anderen Arbeitsgruppen für Nitro-Tests verwendet^{130,178,180}. Die 24-Well-Platte wurde dann 90min im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 93% Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Durch die Reaktion von ROS mit NBT wurde letzteres oxidiert. So kam es zu einem intrazellulären Farbumschlag von gelb nach blau. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 0,5ml PBS gelöst und in 1,5ml Eppendorf-Gefäßen abzentrifugiert (1500rpm, $G_{\text{mittel}} = 350g$, 5min). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 400µl PBS mit drei Tropfen Rinderserumalbumin resuspendiert. Jeweils 100µl der Zellsuspension wurden mit Hilfe eines Zytofunnels in der Shandon Zytospin 3 Zentrifuge bei 1200rpm ($G_{\text{mittel}} = 163g$) 10min auf Zytospin-Objektträger zentrifugiert. Die Objektträger wurden an der Luft getrocknet. Fotografien wurden mit Hilfe des Leica DMLB Lichtmikroskops Typ 020-519.511 und der *Color Video Camera* Modell MC-3289 von Horn Imaging GmbH angefertigt. Der Anteil Nitro⁺ Zellen wurde durch Handzählung von 200 Zellen verblindet und unabhängig voneinander von zwei Personen bestimmt¹⁷⁸.

3.2.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Friedman-Tests (nicht-parametrisch, gepaart) und des Dunn'schen multiplen Vergleichstests. Unterschiede wurden ab $p < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet. Wenn nicht anderes angegeben, handelt es sich bei den dargestellten Ergebnissen stets um Einzelwertbestimmungen.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirksamkeit der Medikamentenkombination *All-trans*-Retinsäure, Pioglitazon und 5-Azacytidin bei AML Zellen *in vitro* untersucht werden. Basierend auf klinischen Beobachtungen bei AML Patienten unter APA-Therapie wurden zytoreduktive und differenzierungsfördernde Effekte der Dreifachkombination erwartet¹⁰. Die zytoreduktive Wirkung wurde anhand von Veränderungen der Zelldichte und der Annexin V-Bindungsfähigkeit (als quantitativer Marker für Apoptose)^{170,171} erfasst. Zur Bestimmung von Differenzierungseffekten wurden Oberflächenmoleküle im FACS, zytomorphologische Veränderungen im Zytospin und funktionelle Eigenschaften in Phagozytose- und Nitro-Test untersucht. Als Untersuchungsmaterial dienten AML Zelllinien und primäre AML Blasten von Patienten.

In Vorversuchen an AML Zelllinien wurden verschiedene Medikamentenkombinationen und -konzentrationen untersucht. Anhand dieser Ergebnisse wurden die genauen Versuchsbedingungen der Hauptversuche festgelegt. In den Hauptversuchen wurden drei AML Zelllinien (THP-1, KG-1, KG-1a) und primäre AML Blasten von zehn Patienten mit den oben genannten Untersuchungsmethoden auf die Auswirkungen der APA-Behandlung hin untersucht.

4.1 Festlegung der Versuchsbedingungen für die Hauptversuche

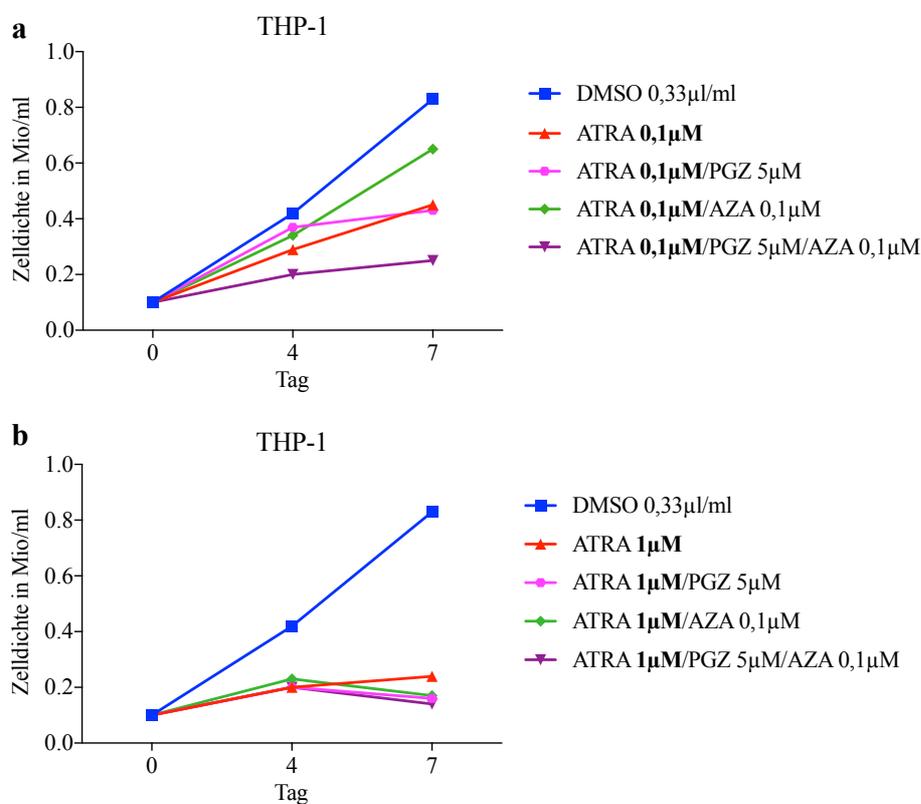
4.1.1 Konzentrationsabhängige Effekte von *All-trans*-Retinsäure und Pioglitazon

Die beiden erwarteten Hauptwirkungen von ATRA und PGZ waren die Einschränkung des Zellwachstums und die Induktion von Differenzierung. In Vorversuchen an AML Zelllinien wurde unter anderem untersucht, inwieweit diese Effekte bei den Einzelsubstanzen von deren Konzentrationen abhängig sind. Auf Basis dieser Ergebnisse und bekannter, pharmakokinetischer Eigenschaften der Therapeutika *in vivo* wurden die Medikamentenkonzentrationen für die Hauptversuche festgelegt. Die Konzentration von AZA wurde aufgrund der vorbeschriebenen Toxizität bei hohen Konzentrationen für die Hauptversuche orientiert an Literaturangaben bei 0,1 µM belassen^{93,102}.

4.1.1.1 Konzentrationsabhängige Effekte von *All-trans*-Retinsäure

Zur Bestimmung der optimalen ATRA-Konzentration wurde die Substanz in den Konzentrationen 0,1 µM und 1 µM an THP-1 und KG-1 Zelllinien getestet. Als Kontrolle wurden die Zellen auch mit DMSO, dem Lösungsmittel aller Therapeutika, in der Konzentration 0,33 µl/ml kultiviert und untersucht.

Zur Untersuchung der konzentrationsabhängigen Auswirkung der Behandlung mit ATRA auf das Zellwachstum von AML Zelllinien wurde die Zelldichte bei THP-1 Zellen und der Anteil Annexin V⁺ Zellen bei KG-1 Zellen an den Tagen 4 und 7 betrachtet. Bei höherer ATRA-Konzentration (1 μ M) waren an Tag 7 bei allen Proben (ATRA, ATRA+PGZ, APA) weniger THP-1 Zellen vorhanden als in den Proben mit 0,1 μ M ATRA (**Abbildung 8a,b**). Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in der Messung der Annexin V-Bindungsfähigkeit im FACS als Maß für die Apoptoserate wieder. Bei KG-1 Zellen war der Anteil Annexin V⁺ Zellen in den Proben mit einer ATRA-Konzentration von 1 μ M höher als in den Proben mit 0,1 μ M ATRA (**Abbildung 8c**). Somit wirkte ATRA bei AML Zelllinien in höherer Konzentration stärker zytoreduktiv und induzierte verstärkt Apoptose.



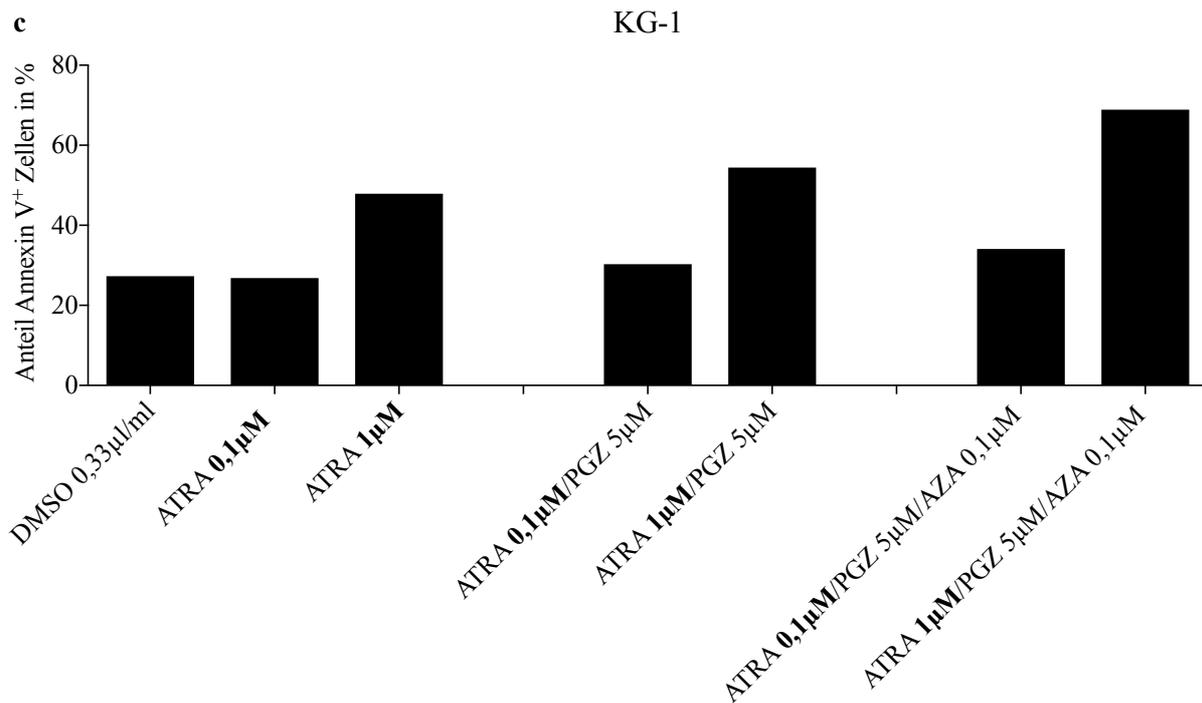


Abbildung 8: Konzentrationsabhängige Wirkung der Behandlung mit ATRA auf Zellwachstum und Apoptoserate bei THP-1 und KG-1 Zellen. (a, b) Zelldichte von THP-1 bis Tag 7 der Behandlung mit unterschiedlichen ATRA-Konzentrationen. Die Zelldichte bezeichnet die endgültige Zellzahl einer Probe am Messtag geteilt durch die ursprünglich an Tag 0 eingesetzte Mediummenge. Auf diese Weise wird rechnerisch kompensiert, dass für die einzelnen Proben unterschiedlich viele Zellen angesetzt wurden. (c) Anteil Annexin V⁺ KG-1 Zellen an Tag 7 der Behandlung mit unterschiedlichen ATRA-Konzentrationen.

Die Ausreifung von THP-1 und KG-1 Zellen unter ATRA-Behandlung wurde anhand der CD11b-Expression⁷⁸ im FACS und anhand von zytomorphologischen Veränderungen gemessen. Bei alleiniger Zugabe von ATRA fand sich kein Zusammenhang zwischen höherer Konzentration des Medikaments und der CD11b-Expression in beiden Zelllinien (**Abbildung 9a**, nur THP-1 dargestellt). Bei gleichzeitiger Applikation von PGZ und ATRA stieg die Expression von CD11b mit zunehmender ATRA-Konzentration bei THP-1 leicht an (**Abbildung 9a**). Ähnlich wie bei ATRA-Monotherapie war auch bei der Dreifachtherapie mit APA die CD11b-Expression unabhängig von der gewählten ATRA-Konzentration (**Abbildung 9a**).

In einem weiteren Experiment wurden zytomorphologische Untersuchungen von KG-1 und THP-1 Zellen an Tag 7 der Behandlung mit ATRA 0,1µM und 1µM durchgeführt. Dabei wurden sowohl die Monotherapie als auch die Kombinationstherapien ATRA+PGZ und APA betrachtet. Bei allen Proben wurden bei höherer ATRA-Konzentration mehr Zellen mit Differenzierungszeichen gefunden. **Abbildungen 9b/c** zeigen exemplarisch die zytomorphologischen Bilder von KG-1 an Tag 7 der APA-Behandlung mit verschiedenen

ATRA-Konzentrationen. Bei höherer ATRA-Konzentration wurden mehr AML Zellen mit Kernlappung und hellem Zytoplasma gefunden. Nebenbefundlich fielen bei höherer ATRA-Konzentration auch mehr Apoptosefiguren als Zeichen vermehrten Zellsterbens auf.

In der Zusammenschau der Ergebnisse aus FACS und Zytomorphologie konnte festgestellt werden, dass ATRA bei einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ trendmäßig eine stärkere Differenzierung induzierte als bei einer Konzentration von $0,1\mu\text{M}$.

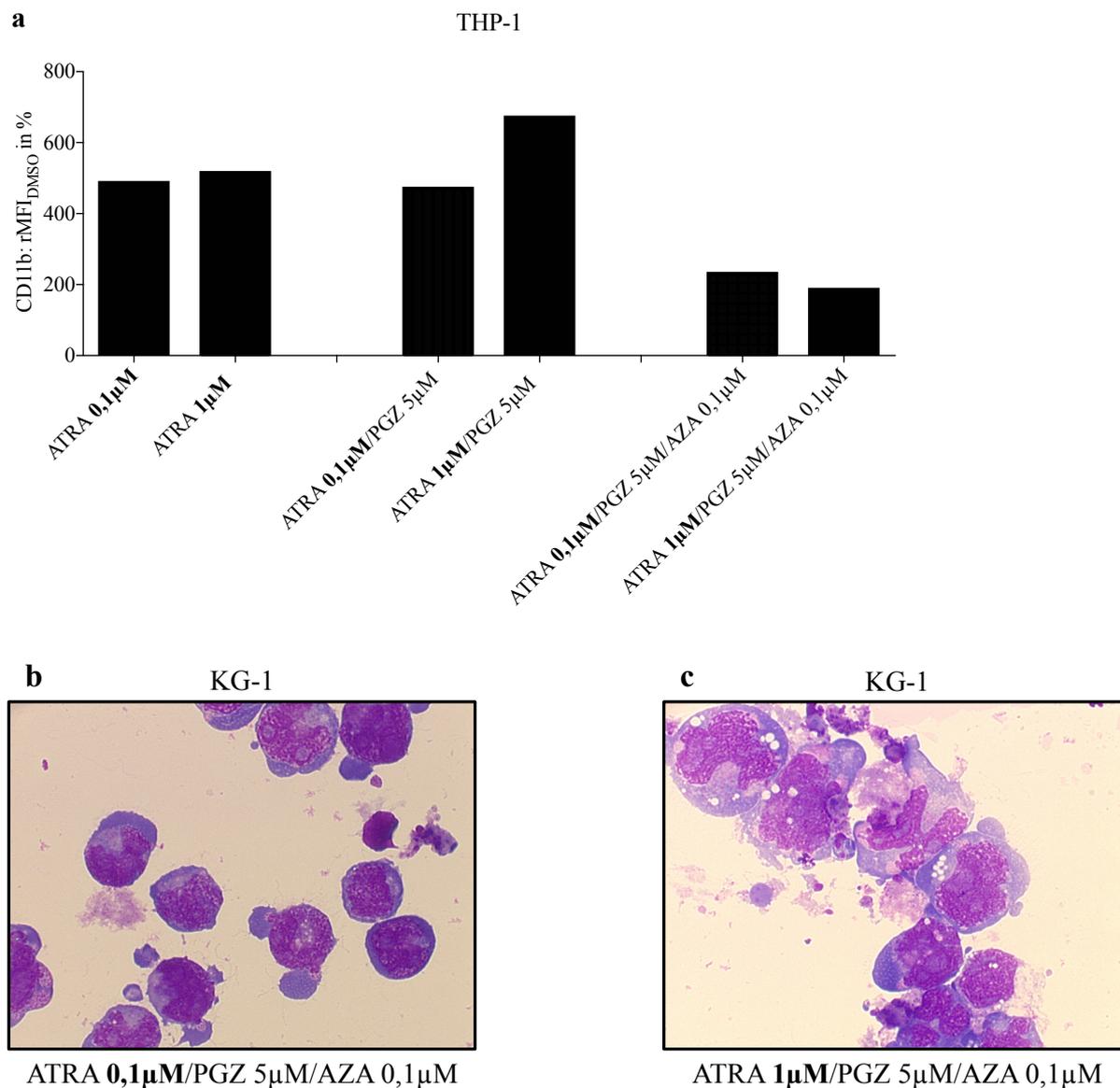


Abbildung 9: Konzentrationsabhängige Wirkung der Behandlung mit ATRA auf Differenzierung von THP-1 und KG-1 Zellen. (a) CD11b-Expression von THP-1 Zellen an Tag 7 der Behandlung mit ATRA in verschiedenen Konzentrationen. Die rMFI ist hier relativ zur DMSO-Kontrolle angegeben. (b) Zytomorphologie von KG-1 Zellen an Tag 7 der Behandlung mit ATRA ($0,1\mu\text{M}$) + PGZ ($5\mu\text{M}$) + AZA ($0,1\mu\text{M}$). Vergrößerung 630fach. (c) Zytomorphologie von KG-1 Zellen an Tag 7 der Behandlung mit ATRA ($1\mu\text{M}$) + PGZ ($5\mu\text{M}$) + AZA ($0,1\mu\text{M}$). Vergrößerung 630fach.

Pharmakokinetische Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen hatten gezeigt, dass auch die Plasmakonzentration von ATRA bei APL Patienten unter Standardtherapie bei ca. $1\mu\text{M}$ liegt¹⁴⁰. Somit wurde die Konzentration von ATRA für die Hauptversuche auf $1\mu\text{M}$ festgelegt.

4.1.1.2 Konzentrationsabhängige Effekte von Pioglitazon

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration von PGZ *in vitro* wurde die Substanz in den Konzentrationen $1\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ und $50\mu\text{M}$ an THP-1 Zellen getestet.

Die konzentrationsabhängige Wirkung der Behandlung mit PGZ auf das Zellwachstum von THP-1 Zellen wurde mittels Zellzählung bestimmt. Weder in der Monotherapie mit PGZ, noch in der Kombinationstherapie APA war die Zelldichte abhängig von der PGZ-Konzentration (**Abbildung 10**, nur Monotherapie dargestellt).

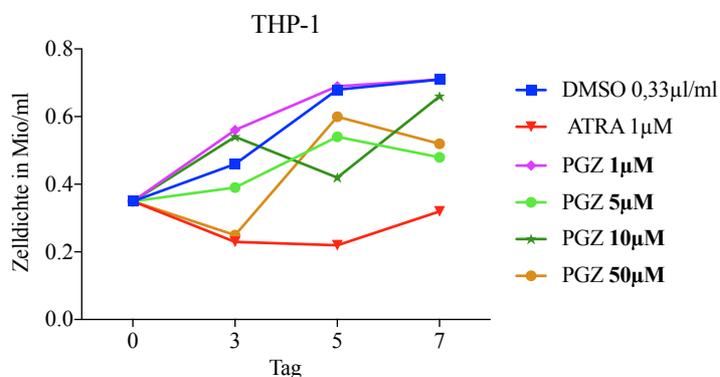


Abbildung 10: Konzentrationsabhängige Wirkung der Behandlung mit PGZ auf das Zellwachstum von THP-1 Zellen. Zelldichte von THP-1 Zellen nach Behandlung mit PGZ in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zu ATRA $1\mu\text{M}$. Die Zelldichte bezeichnet die endgültige Zellzahl einer Probe am Messtag geteilt durch die ursprünglich an Tag 0 eingesetzte Mediummenge.

Für die Beurteilung der Differenzierung von THP-1 Zellen nach Behandlung mit PGZ wurde erneut die CD11b-Expression im FACS gemessen. In der PGZ-Monotherapie (**Abbildung 11a**) und als Bestandteil der Kombinationstherapie APA (**Abbildung 11b**) war die CD11b-Expression nach Behandlung mit PGZ $5\mu\text{M}$ höher als nach Behandlung mit PGZ $1\mu\text{M}$. Bei noch höheren PGZ-Konzentrationen ($10\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$) stieg die CD11b-Expression jedoch in der Mono- und Kombinationstherapie nicht weiter an. Lediglich in der Kombinationstherapie ATRA/PGZ wurde bei Behandlung mit PGZ $10\mu\text{M}$ ein geringer Vorteil gegenüber der Behandlung mit PGZ $5\mu\text{M}$ gezeigt.

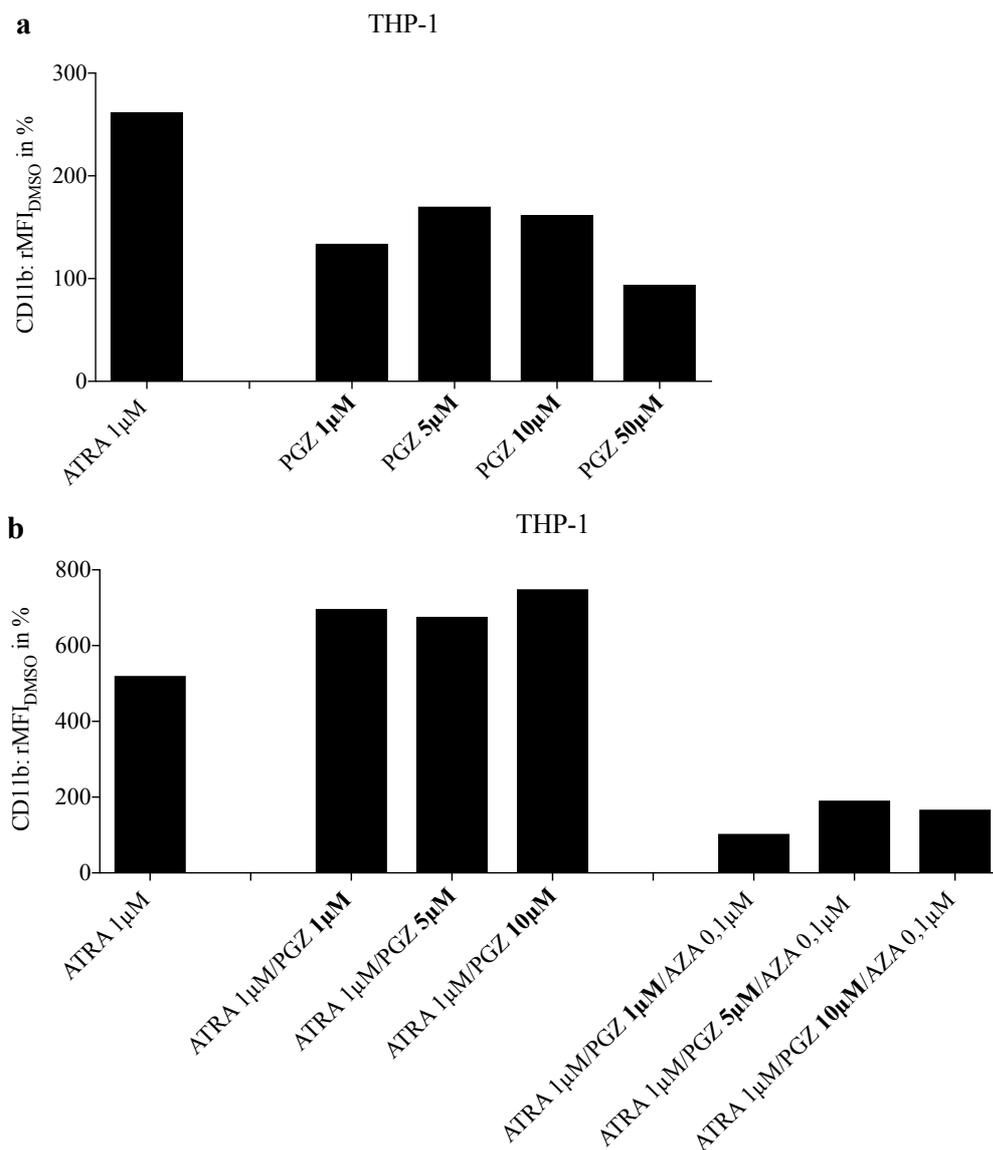


Abbildung 11: Konzentrationsabhängige Wirkung der Behandlung mit PGZ auf Differenzierung von THP-1 Zellen. (a) CD11b-Expression von THP-1 Zellen an Tag 7 der Behandlung mit PGZ in verschiedenen Konzentrationen. Die rMFI ist hier relativ zur DMSO-Kontrolle angegeben. (b) CD11b-Expression von THP-1 Zellen an Tag 7 der Behandlung mit ATRA+PGZ bzw. APA bei verschiedenen PGZ-Konzentrationen. Die rMFI ist relativ zur DMSO-Kontrolle angegeben.

Die Serumkonzentration von PGZ mit gängiger Dosierung von 30mg pro Tag liegt laut Literaturangaben bei ca. $3\mu\text{M}$ ¹⁸¹. Da bei der Behandlung von THP-1 Zellen mit APA PGZ 5µM gegenüber PGZ 1µM leicht überlegen war und höhere Konzentrationen keine eindeutig bessere Wirksamkeit zeigten, wurde die Konzentration 5µM für die weiteren Versuche gewählt.

4.1.2 Versuchsprotokoll für die Hauptversuche

Anhand der Ergebnisse der Vorversuche wurde ein Versuchsablauf für die Hauptversuche festgelegt. Hierfür wurden als Untersuchungsmaterialien drei AML Zelllinien (THP-1, KG-1, KG-1a) und primäre AML Blasten von zehn Patienten genutzt. In **Tabelle 2** sind die Krankheitscharakteristika der untersuchten Patientenproben dargestellt.

AML	FAB	Leukozytenzahl [in 1000/ μ l]/ Blastenanteil im peripheren Blut [%]	Molekulargenetik	Zytogenetik
UKR101	M4	160/90	FLT3-ITD(+), IDH-MUT(-)	46, XY
UKR109	NU	43/86	IDH-MUT(-)	46,XX del(7), t(7;11), dupl(11)
UKR110	M5	56/90	NPM1-MUT(+), IDH-MUT(-)	46, XY
UKR111	M2	51/96	C/EBP-MUT(+), IDH-MUT(-)	46, XY
UKR128	M4	44/93	NU	NU
UKR135	M2	32/70	FLT3-ITD(+), NPM1-MUT(+)	NU
UKR144	NU	41/80	FLT3-ITD(+), NPM1-MUT(+), IDH-MUT(-)	NU
UKR147	NU	167/86	FLT3-ITD(+), NPM1-MUT(-), MLL-PTD(-), IDH-MUT(-), RUNX-MUT(-), FLT3-TKD(-)	46 X del(X), del(18)
UKR151	M0	88/90	FLT3-ITD(+), NPM1-MUT(+), MLL-PTD(-), Bcr-Abl(-), p53(-), FLT3-TKD(-)	46, XX
BB007	M2	>30/92	FLT3-ITD(+), NPM1-MUT(-), MLL-PTD(-)	46, XY

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten AML Proben. NU: nicht untersucht; Für die Erklärungen der Abkürzungen der einzelnen Mutationen siehe das Abkürzungsverzeichnis im Anhang.

Für jeden Hauptversuch wurden vier Proben einer Zelllinie bzw. einer Patientenprobe mit den in **Abschnitt 3.2.3** genannten Kulturbedingungen kultiviert. Bei den AML Zelllinien wurde auf die Zugabe von Zytokinen verzichtet.

Probe 1: Leerprobe (ausschließlich Medium und Zytokine)

Probe 2: zusätzlich DMSO 0,33µl/ml

Probe 3: zusätzlich ATRA 1µM

Probe 4: zusätzlich ATRA 1µM + PGZ 5µM + AZA 0,1µM

Leerprobe, DMSO und ATRA waren Kontrollen. DMSO war das Lösungsmittel, in dem alle Medikamente gelöst waren. Die ATRA Monotherapie hatte in Vorversuchen an AML Zelllinien stärkere differenzierungsfördernde Eigenschaften als AZA Monotherapie und PGZ Monotherapie gezeigt (Ergebnisse nicht dargestellt). Um einen Behandlungsvorteil von APA gegenüber ATRA nachweisen zu können, wurde auch die ATRA-Monotherapie als Kontrolle mit untersucht. PGZ alleine hatte in den Vorversuchen bei der Konzentration 5µM nur einen geringen Effekt auf Differenzierung und Zellwachstum von AML Zellen im Vergleich zu ATRA gezeigt (siehe **Abbildungen 10 & 11**). AZA (0,1 µM) hatte in der Monotherapie keine differenzierungsfördernden Effekte gezeigt (Ergebnisse nicht dargestellt). Auf Proben mit Monotherapie PGZ bzw. AZA wurde daher verzichtet.

An den Tagen 7 und 14 wurden alle Proben hinsichtlich der vermuteten Wirkung der Behandlung mit APA untersucht. Um die Toxizität der Medikamentenkombination zu erfassen, wurden die Zelldichte in den Proben sowie der Anteil Annexin V⁺ Zellen bestimmt. Zur Quantifizierung der Differenzierung wurden morphologische (Zytospin), molekulare (FACS) sowie funktionelle Untersuchungen (Phagozytose-Test, Nitro-Test) durchgeführt (**Abbildung 12**).

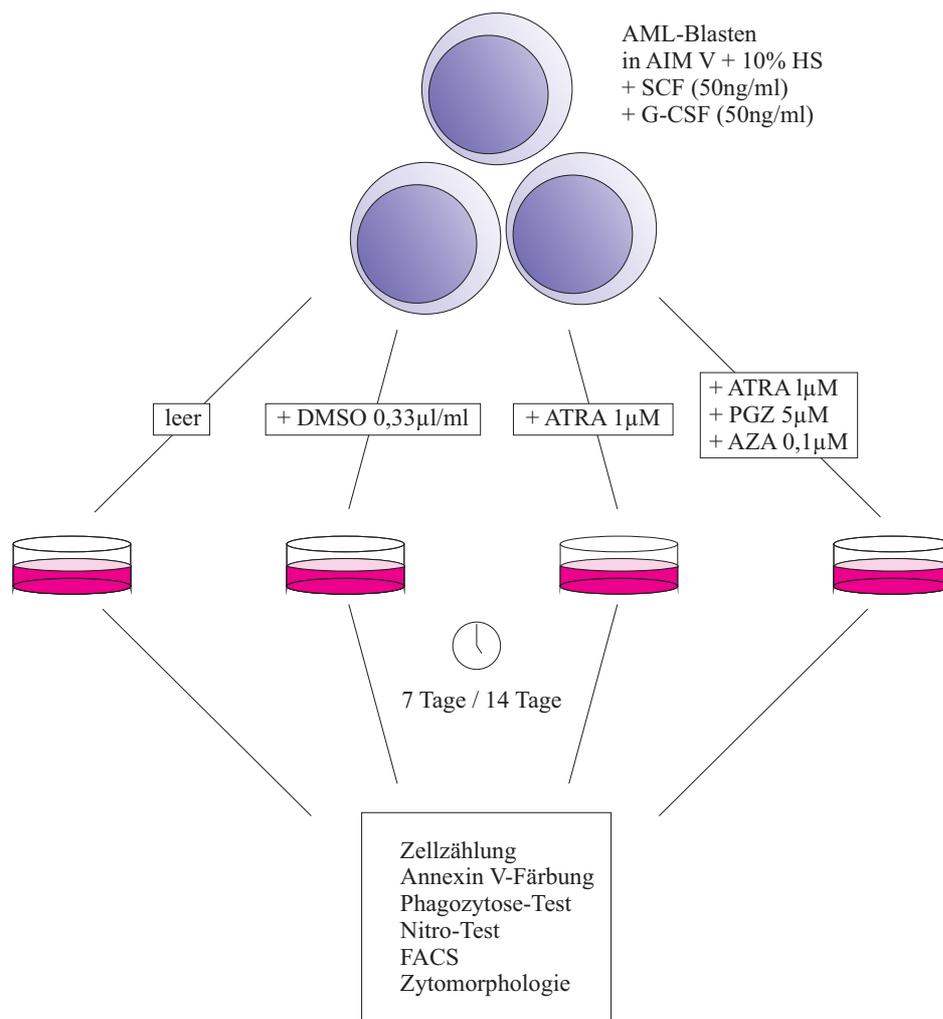


Abbildung 12: Versuchsaufbau der Hauptversuche. Es ist zu beachten, dass bei AML Zelllinien auf die Zugabe von Zytokinen verzichtet wurde.

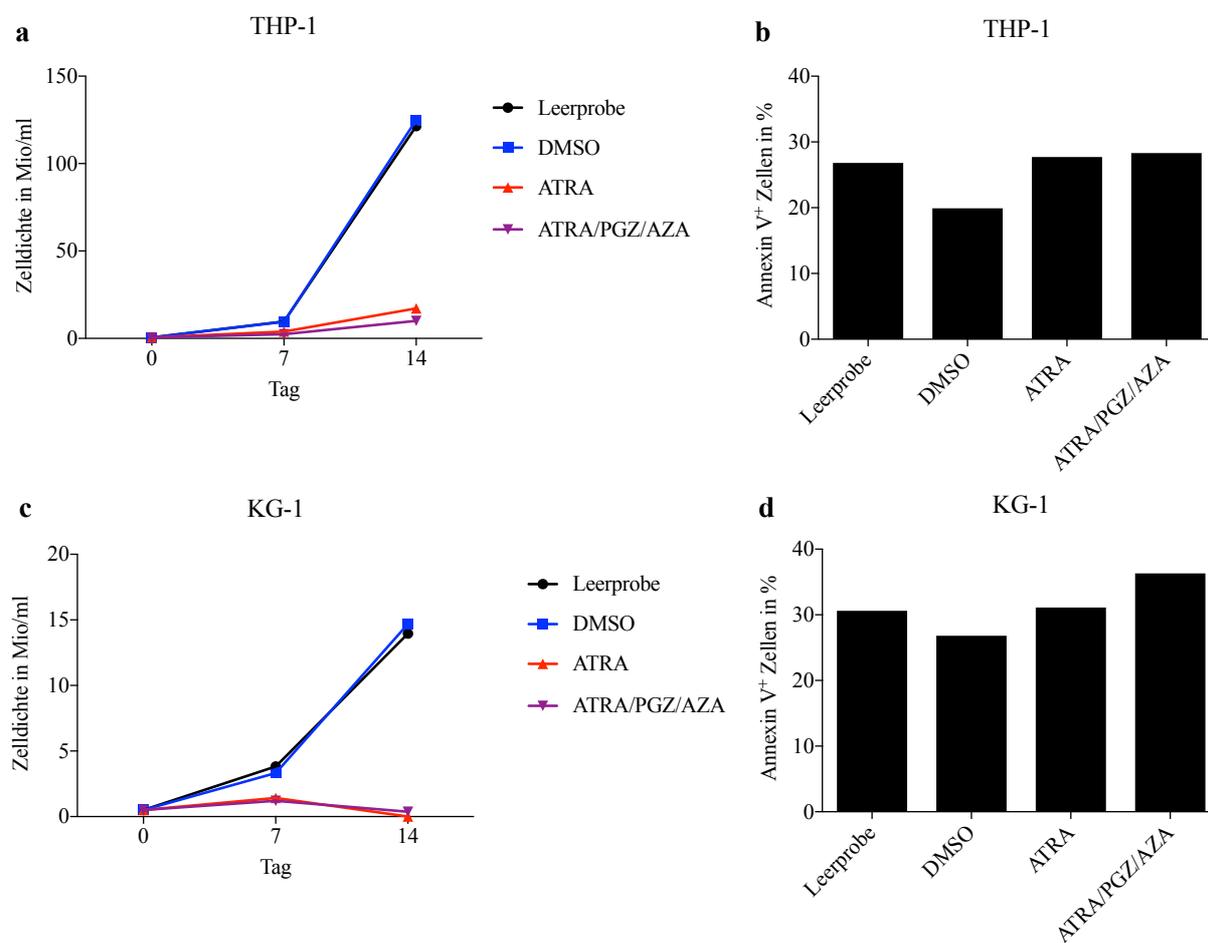
4.2 Auswirkungen der Behandlung mit *All-trans*-Retinsäure + Pioglitazon 5-Azacytidin auf akute myeloische Leukämie Zelllinien

4.2.1 Auswirkungen der Behandlung mit *All-trans*-Retinsäure bzw. *All-trans*-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf Zellwachstum und Apoptoserate von akute myeloische Leukämie Zelllinien

Eine wesentliche, erwartete Wirkung der Behandlung mit APA auf AML Zellen war eine Zytoreduktion. Hierzu wurden die Zelllinien THP-1, KG-1 und KG-1a entsprechend dem oben genannten Schema behandelt und anschließend die Zelldichte bestimmt. Bei allen drei Zelllinien zeigte sich nach ATRA-Behandlung stets eine Verringerung der Zelldichte im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle bzw. der Leerprobe (**Abbildung 13a, c, e**). Nur bei den sehr entdifferenzierten KG-1a Zellen konnte die zytoreduktive Wirkung von ATRA noch durch APA geringfügig übertroffen werden (**Abbildung 13e**). Somit konnte gezeigt werden,

dass APA zytoreduktive Eigenschaften bei AML Zelllinien besitzt, die zu einem großen Teil auf die Wirkung von ATRA zurückzuführen sind.

Die beobachtete Zytoreduktion könnte sowohl durch die Inhibition der Proliferation als auch durch die Förderung von Apoptose zu erklären sein. Zur Unterscheidung wurden die Zellen hinsichtlich der Induktion von Apoptose mittels Annexin V-Färbung untersucht. Die Apoptoserate in der ATRA-Probe war gegenüber der Leerprobe (THP-1, KG-1) bzw. gegenüber der DMSO-Kontrolle (KG-1a) kaum erhöht (**Abbildung 13b, d, f**). In den APA-Proben konnte bei KG-1 und KG-1a eine gesteigerte Apoptoserate gegenüber allen drei Kontrollen nachgewiesen werden.



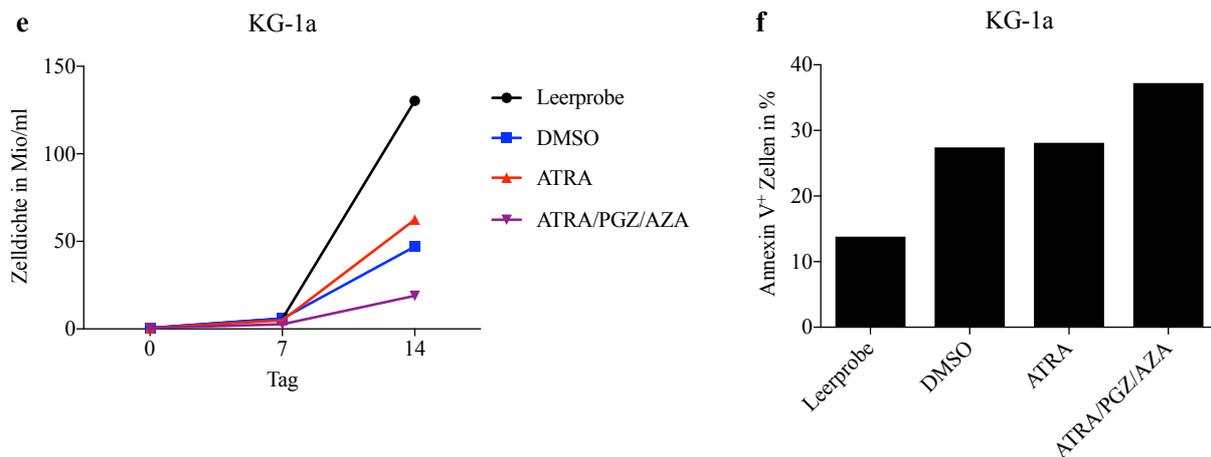


Abbildung 13: Auswirkung der Behandlung mit ATRA bzw. APA auf Zelldichte und Apoptoserate von THP-1, KG-1 und KG-1a Zellen. (a) Zelldichte von THP-1 Zellen bis Tag 14 der Behandlung. (b) Anteil Annexin V⁺ THP-1 Zellen an Tag 14 der Behandlung. (c) Zelldichte von KG-1 Zellen bis Tag 14 der Behandlung. (d) Anteil Annexin V⁺ KG-1 Zellen an Tag 14 der Behandlung. (e) Zelldichte von KG-1a Zellen bis Tag 14 der Behandlung. (f) Anteil Annexin V⁺ KG-1a Zellen an Tag 14 der Behandlung. Die Zelldichte bezeichnet die endgültige Zellzahl einer Probe am Messtag geteilt durch die ursprünglich an Tag 0 eingesetzte Mediummenge.

4.2.2 Auswirkungen der Behandlung mit All-trans-Retinsäure bzw. All-trans-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf Zelldifferenzierung von akute myeloische Leukämie Zelllinien

Zur Untersuchung der Ausreifung von AML Zelllinien unter APA-Behandlung wurden diese Zellen mittels FACS (CD11b, CD15, CD33, CD34, CD80, CD83, CD86, CD117, HLA-DR), Mikroskopie (Zytomorphologie) und Phagozytose-Test untersucht.

Wie in der Literatur beschrieben, wurde bei KG-1 (FAB-Klasse nicht spezifiziert)^{77,134,136} und THP-1 (FAB-Klasse M5)^{76,133,136} die Expression von Differenzierungsmarkern (z.B. CD11b) durch die Behandlung mit ATRA gesteigert (**Abbildung 14**). Ebenso analog zu Literaturangaben^{28,138} war bei KG-1a Zellen (FAB-Klasse nicht spezifiziert)¹³⁷ keine veränderte CD11b-Expression nach Behandlung mit ATRA nach zu weisen. Somit konnte hier mit der FACS Analyse gezeigt werden, dass ATRA auf Ebene der FACS Marker bei zwei von drei untersuchten Zelllinien Differenzierung induzieren kann.

Die Wirksamkeit von ATRA konnte durch APA im Bezug auf die CD11b Expression lediglich bei THP-1 Zellen an Tag 14 übertroffen werden (**Abbildung 14a**). Bei KG-1a und KG-1 Zellen war APA nicht effektiver als die ATRA-Monotherapie (**Abbildung 14b,c**). In Bezug auf die Expression von Oberflächenmolekülen bei drei AML Zelllinien war APA somit nur wenig wirksamer als ATRA. Bei den restlichen, verwendeten FACS-Markern war bei den

AML Zelllinien kein einheitliches Expressionsmuster nach Behandlung mit ATRA bzw. APA zu erkennen.

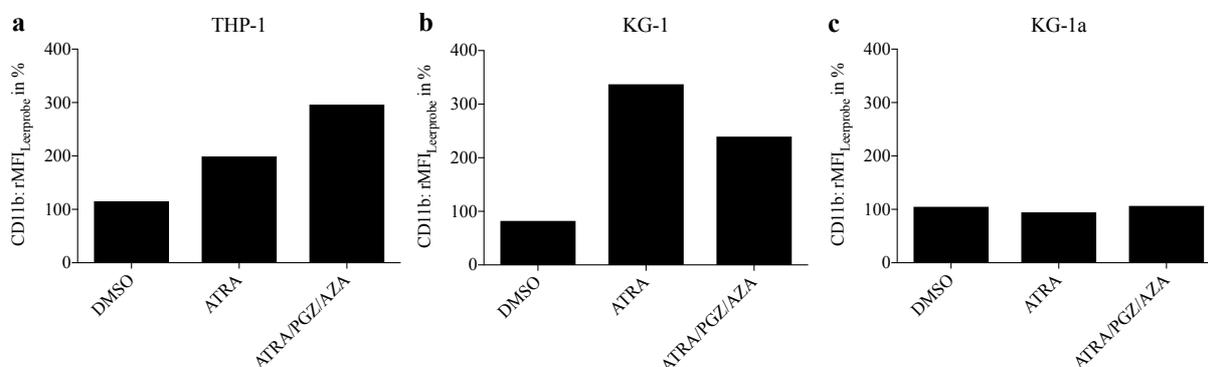


Abbildung 14: Auswirkung der Behandlung mit ATRA bzw. APA auf CD11b-Expression von THP-1, KG-1 und KG-1a Zellen. (a) CD11b Expression von THP-1 Zellen an Tag 14 der Behandlung. (b) CD11b Expression von KG-1 Zellen an Tag 14 der Behandlung. (c) CD11b Expression von KG-1a Zellen an Tag 14 der Behandlung. Die rMFI ist hier relativ zur Leerprobe angegeben.

Als weiterer Indikator für Differenzierung wurden die zytomorphologischen Veränderungen der AML Zelllinien herangezogen. Hier zeigten THP-1 und KG-1 Zellen an den Tagen 7 und 14 vermehrte Differenzierungszeichen in der ATRA-Probe und in der APA-Probe. Die Zellen entwickelten ein helleres Zytoplasma und verstärkte Kernlappung (**Abbildung 15**). Die Wirkung von APA übertraf die von ATRA bei THP-1 und KG-1. Eine genaue Auszählung des Anteils differenzierter Zellen erfolgte hier nicht. Bei KG-1a war kein Behandlungsvorteil von APA gegenüber ATRA nachzuweisen. Aus diesen Experimenten kann abgeleitet werden, dass die Behandlung mit APA im Vergleich zur Monotherapie mit ATRA bei zwei von drei untersuchten Zelllinien verstärkte zytomorphologische Veränderungen im Sinne der Zelldifferenzierung induzierte.

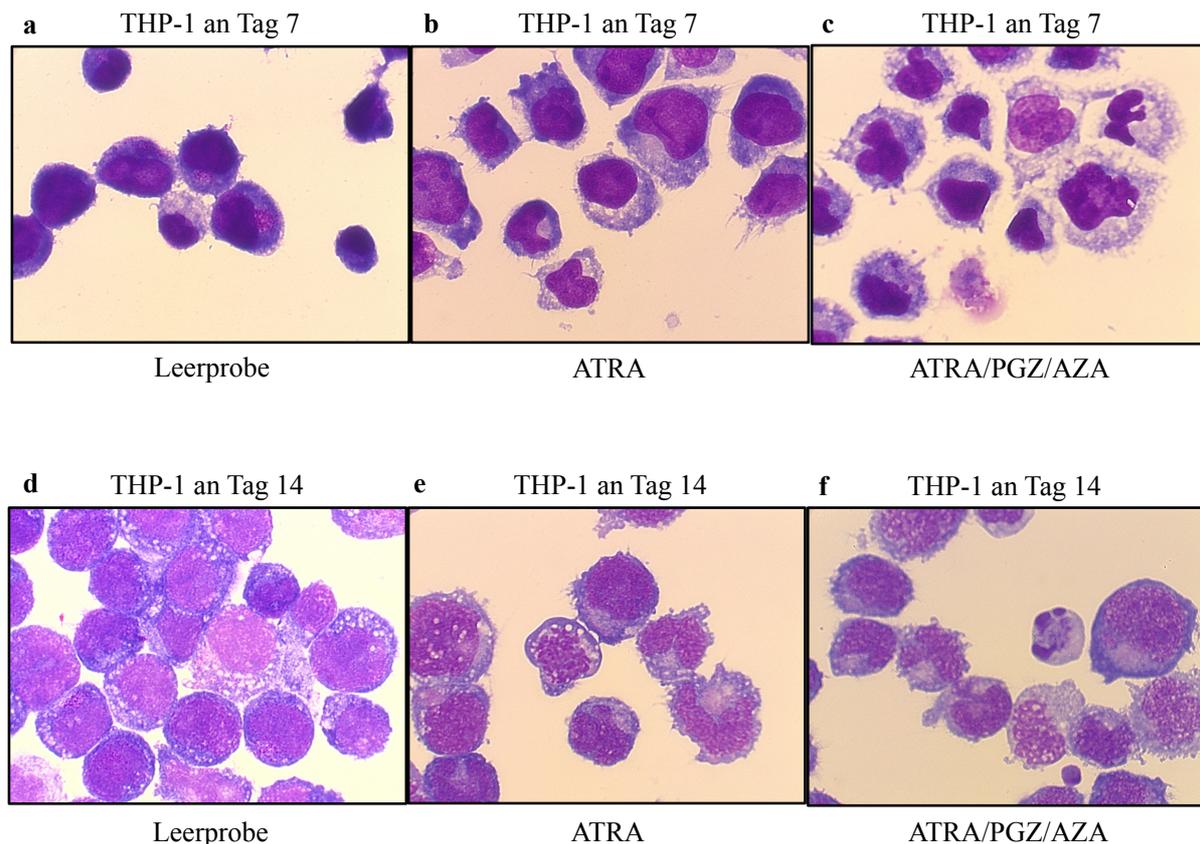


Abbildung 15: Auswirkung der Behandlung mit ATRA bzw. APA auf zytomorphologische Differenzierung bei THP-1 Zellen. (a) THP-1 Zellen an Tag 7 ohne Behandlung. Vergrößerung 630fach. (b) THP-1 Zellen an Tag 7 der Behandlung mit ATRA $1\mu\text{M}$. Vergrößerung 630fach. (c) THP-1 Zellen an Tag 7 der Behandlung mit ATRA $1\mu\text{M}$ + PGZ $5\mu\text{M}$ + AZA $0,1\mu\text{M}$. Vergrößerung 630fach. (d) THP-1 Zellen an Tag 14 ohne Behandlung. Vergrößerung 630fach. (e) THP-1 Zellen an Tag 14 der Behandlung mit ATRA $1\mu\text{M}$. Vergrößerung 630fach. (f) THP-1 Zellen an Tag 14 der Behandlung mit ATRA $1\mu\text{M}$ + PGZ $5\mu\text{M}$ + AZA $0,1\mu\text{M}$. Vergrößerung 630fach.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die APA-Behandlung gegenüber der Monotherapie mit ATRA eine vermehrte Phagozytose-Aktivität der Zellen bewirkte. Die ATRA-Behandlung führte lediglich bei KG-1 zu einem höheren Anteil GFP^+ Zellen im Vergleich zu den Kontrollen, wohingegen sich bei den beiden anderen Zelllinien diesbezüglich kein Effekt zeigte. Ein Vorteil der Behandlung mit APA gegenüber der ATRA-Monotherapie konnte in Bezug auf die Phagozytosefähigkeit für keine der Zelllinien nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die APA-Behandlung von AML Zelllinien den Differenzierungseffekt der ATRA-Monotherapie nur in geringem Maß übertrifft. Im Vordergrund stehen hierbei die zytomorphologischen Effekte. Die Auswirkungen auf differenzierungsassoziierte Oberflächenmoleküle sind eher gering, ein funktioneller

Zugewinn bei Behandlung mit APA gegenüber ATRA in Bezug auf die Phagozytose-Aktivität der Zelllinien konnte nicht beobachtet werden.

4.3 Auswirkungen der Behandlung mit All-*trans*-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf akute myeloische Leukämie Blasten

4.3.1 Auswirkungen des Zytokinmilieus auf Zellwachstum und Differenzierung von akute myeloische Leukämie Blasten

SCF und G-CSF wurden im Zellkulturmodell mit AML Blasten verwendet, um deren Wachstum anzuregen. Es ist bekannt, dass SCF und G-CSF auch Einfluss auf die Differenzierung gesunder Zellen haben¹⁴¹⁻¹⁴³. Daher sollten die Auswirkungen des Zytokinmilieus auf die Differenzierung von AML Blasten gemessen werden. Hierzu wurden die primären AML Blasten aufgetaut und je eine Probe 12 Stunden mit SCF und G-CSF und eine Probe 12 Stunden ohne Zytokine kultiviert. (**Abbildung 16**). Danach wurden die Zellen gezählt, die Oberflächenmarker im FACS analysiert, die Phagozytose-Aktivität der Zellen überprüft und die ROS-Bildung im Nitro-Test gemessen. Die Ergebnisse der Proben mit und ohne Zytokinzusatz wurden verglichen.

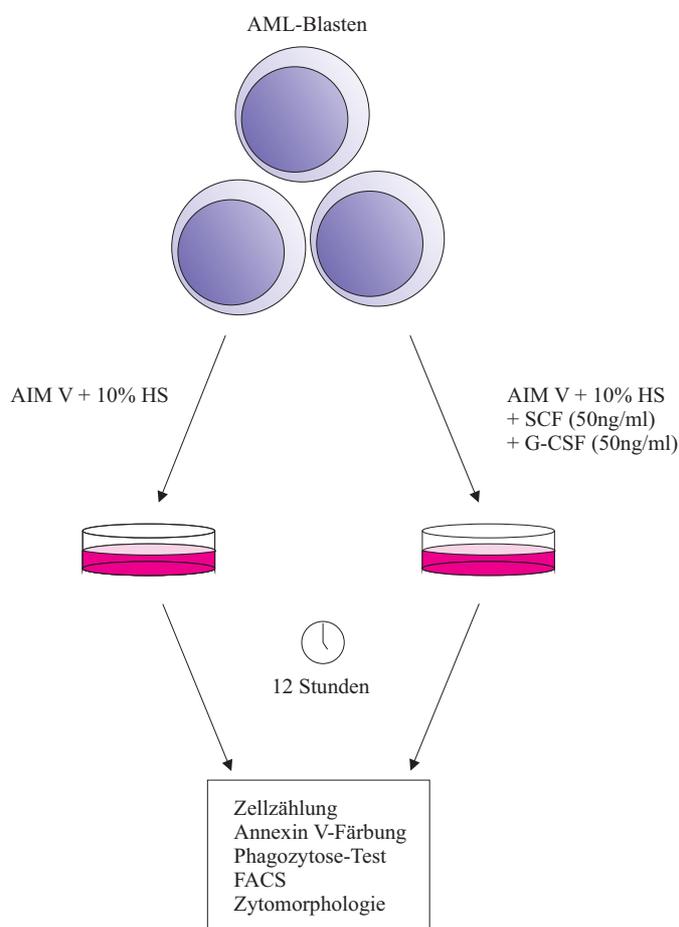


Abbildung 16: Versuchsaufbau zur Ermittlung der Auswirkungen des Zytokinmilieus auf AML Blasten.

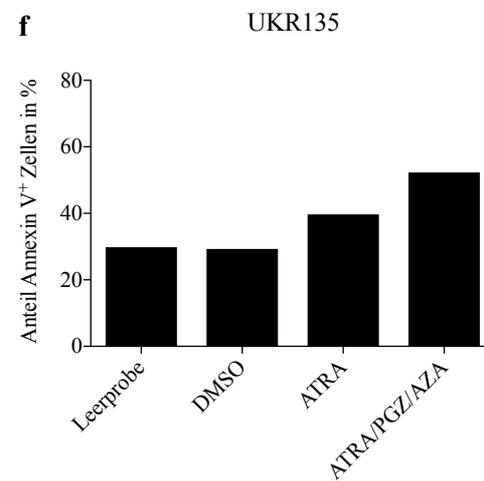
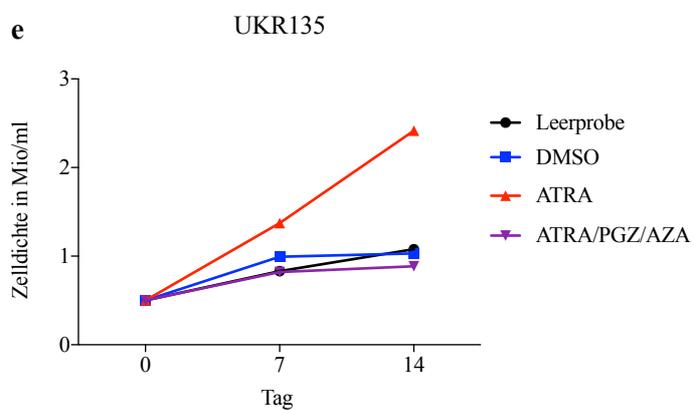
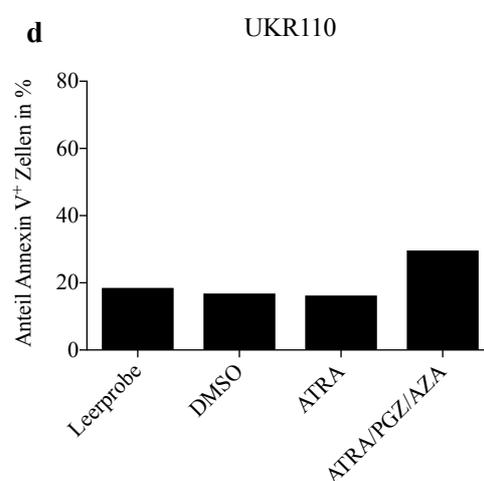
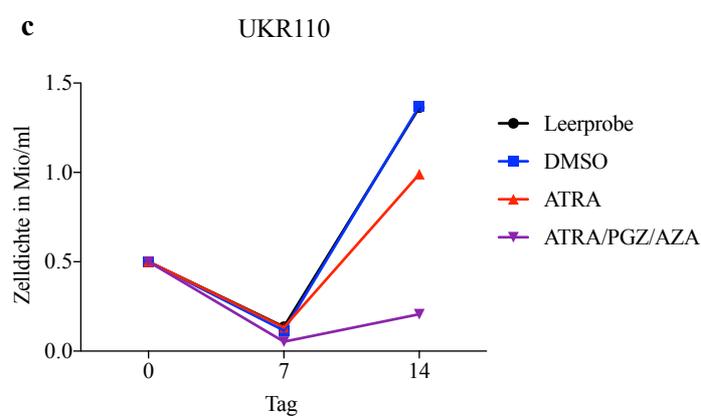
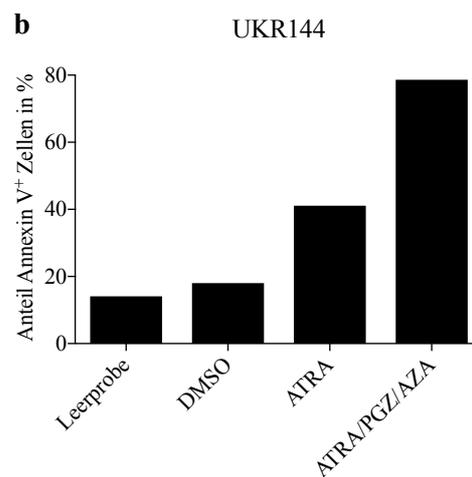
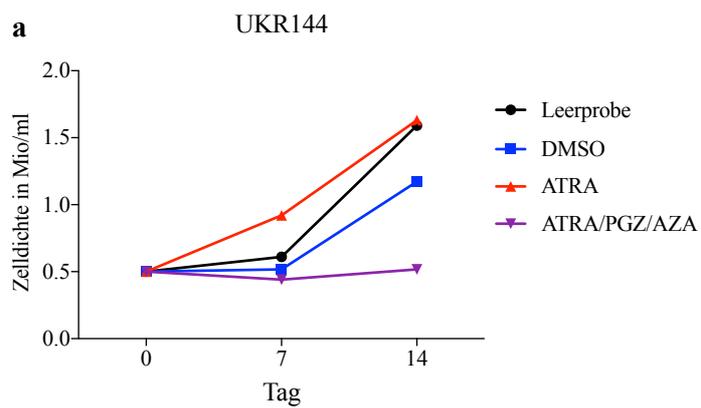
In den Proben mit Zytokinen war bei den meisten AML erwartungsgemäß die Zelldichte höher als in den Proben ohne Zytokine. Die Expression von CD117 (SCF-Rezeptor) sank bei jeder AML in der Probe mit Zytokinen, wahrscheinlich im Sinne einer negativen Rückkopplung durch die Anwesenheit des CD117-Liganden SCF^{38,160,161} (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Expression anderer Oberflächenmoleküle (CD11b, CD15, CD33, CD34, CD274, HLA-DR, HLA-ABC), sowie die Ergebnisse der funktionellen Tests unterschieden sich jeweils nur bei wenigen AML zwischen den beiden Proben. Dabei war kein eindeutiges Muster fest zu stellen. Das Zytokinmilieu hatte unterschiedliche Auswirkungen auf verschiedene AML. Grundlage hierfür sind möglicherweise genetische und proteomische Prädispositionen der Patientenproben.

In den Hauptversuchen wurde in allen vier Proben jeweils die gleiche Menge an Zytokinen zugegeben. Dadurch wurden mögliche Verzerrungen durch die oben genannten Effekte vermieden. Es muss in Anbetracht dieser Ergebnisse jedoch bedacht werden, dass nicht nur die zugesetzten Medikamente, sondern auch die verwendeten Zytokine Einfluss auf die Differenzierung und das Zellwachstum der AML Blasten gehabt haben können.

4.3.2 Auswirkungen der Behandlung mit All-trans-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf Zellwachstum und Apoptoserate von akute myeloische Leukämie Blasten

Die primären AML Blasten der zehn Patienten wurden an den Tagen 7 und 14 der Behandlung bezüglich ihrer Zelldichte und ihrer Apoptoserate (anhand der Annexin V-Bindung) untersucht. Damit sollte die Auswirkung der Behandlung mit APA auf das Zellwachstum der Blasten relativ zu den Kontrollen ATRA, DMSO und Leerprobe bestimmt werden. Die Annexin V-Färbung sollte bei der Unterscheidung von proapoptotischen und antiproliferativen Effekten der Behandlung helfen.

In sieben von zehn Patientenproben war die Zelldichte nach Behandlung mit APA jeweils geringer als in den Kontrollen. Dies ist in **Abbildung 17a/c** beispielhaft an den Proben UK110 und UKR144 gezeigt. Bei einer der drei verbliebenen Patientenproben (UKR128) zeigte die APA-Probe eine ähnlich hohe Zelldichte wie die ATRA-Probe. In den restlichen beiden Patientenproben (UKR111, UKR135) war die Zelldichte in der ATRA-Probe höher als bei der DMSO-Kontrolle und der Leerprobe (**Abbildung 17e/g**). Der Anteil Annexin V⁺ Zellen war in acht von zehn Patientenproben nach Behandlung mit APA größer als in den Kontrollen. Dies ist hier beispielhaft an UKR110, UKR135 und UKR144 gezeigt (**Abbildungen 17b/d/f**).



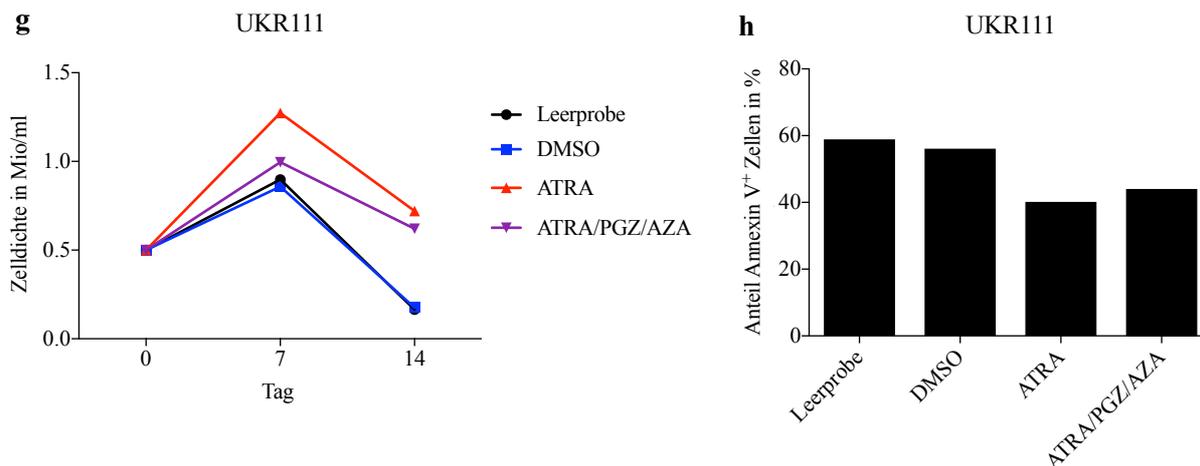


Abbildung 17: Auswirkung der Behandlung mit APA auf Zellwachstum und Apoptoserate bei ausgewählten AML Proben. (a) Zelldichte von UKR144 bis Tag 14. **(b)** Anteil Annexin V⁺ Zellen bei UKR 144 an Tag 14. **(c)** Zelldichte von UKR110 bis Tag 14. **(d)** Anteil Annexin V⁺ Zellen bei UKR 110 an Tag 14. **(e)** Zelldichte von UKR135 bis Tag 14. **(f)** Anteil Annexin V⁺ Zellen bei UKR 135 an Tag 14. **(g)** Zelldichte von UKR111 bis Tag 14. **(h)** Anteil Annexin V⁺ Zellen bei UKR 111 an Tag 14. Die Zelldichte bezeichnet die endgültige Zellzahl einer Probe am Messtag geteilt durch die ursprünglich an Tag 0 eingesetzte Mediummenge.

Abbildung 18 fasst die Ergebnisse der zehn AML Proben an Tag 14 zusammen. Da die absolute Zelldichte und der Anteil Annexin V⁺ Zellen bis Tag 14 in verschiedenen AML sehr unterschiedlich waren, wurden beide Messwerte zur besseren Vergleichbarkeit im Verhältnis zur jeweiligen Leerprobe angegeben (sogenannte relative Zelldichte & relativer Anteil Annexin V⁺ Zellen).

Bei der Kombinationstherapie APA (Median 35,5%) konnte eine signifikante Reduktion der relativen Zelldichte gegenüber der DMSO-Kontrolle (Median 95,6%, $p = 0,01$) und auch gegenüber der ATRA-Monotherapie (Median 87,6%, $p = 0,04$) nachgewiesen werden.

Analog hierzu stieg der relative Anteil Annexin V⁺ Zellen nach APA-Behandlung (Median 146,0%) nicht signifikant gegenüber der ATRA-Monotherapie (Median 126,4%, $p = 0,08$) und signifikant gegenüber der DMSO-Kontrolle (Median 99,5%, $p = 0,005$).

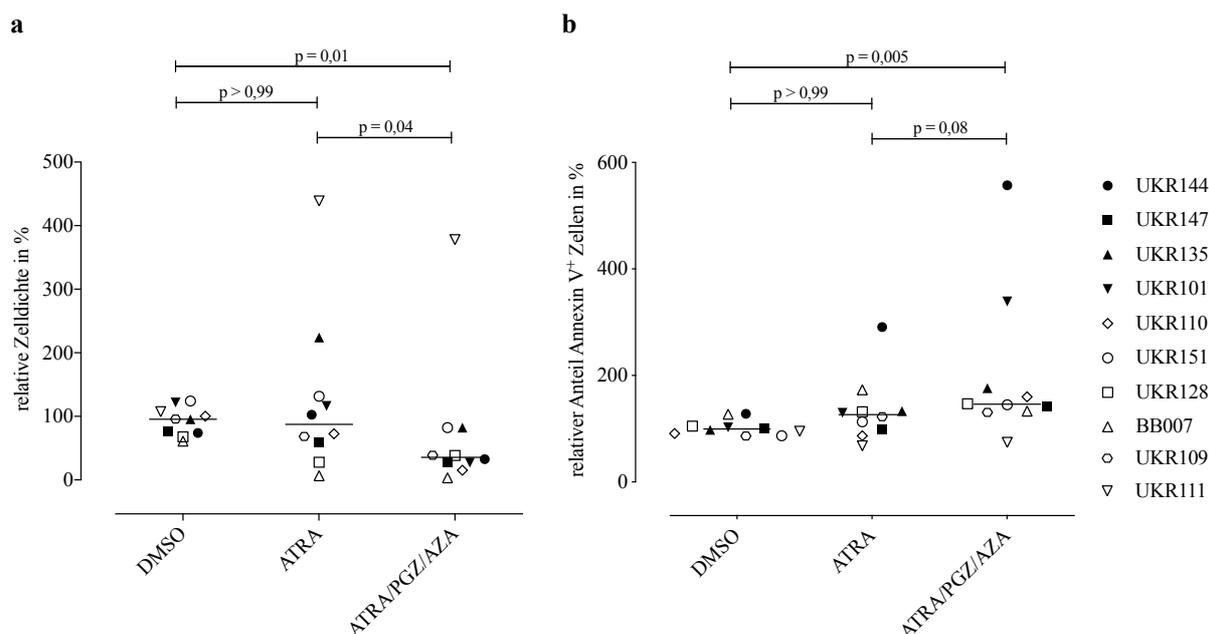


Abbildung 18: Auswirkung der Behandlung mit APA auf Zelldichte und Apoptoserate bei zehn AML Proben an Tag 14. (a) Relative Zelldichte der AML Blasten an Tag 14. Die relative Zelldichte entspricht der absoluten Zelldichte in einer Probe geteilt durch die Zelldichte in der jeweiligen Leerprobe. **(b)** Apoptoserate der AML Blasten an Tag 14 gemessen an dem Anteil Annexin V⁺ Zellen. Der relative Anteil Annexin V⁺ Zellen entspricht dem Anteil Annexin V⁺ Zellen in einer Probe geteilt durch den Anteil Annexin V⁺ Zellen in der jeweiligen Leerprobe. Die horizontalen Linien markieren den jeweiligen Median.

4.3.3 Auswirkungen der Behandlung mit All-trans-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf Oberflächenmolekülexpression von akute myeloische Leukämie Blasten

Die erhoffte Differenzierung der AML Blasten unter APA-Behandlung wurde unter anderem anhand der Expression von Oberflächenmolekülen gemessen. Mit der in **Tabelle 1** dargestellten Auswahl von FACS-Antikörpern war es möglich, die Expression zahlreicher Oberflächenmoleküle quantitativ zu messen. Dazu gehörten Marker der granulozytären (CD11b, CD15), monozytären (CD11b) oder dendritischen Differenzierung (CD83), Marker für die Fähigkeit zur Antigenpräsentation (CD80, CD86, HLA-DR, HLA-ABC), Marker des Differenzierungsgrades (CD34, CD117) und Marker für immunregulatorische Funktion (CD274). In den Hauptversuchen wurden diese FACS-Marker simultan gemessen.

Bei sieben von zehn Patientenproben konnte an Tag 14 der APA-Behandlung eine erhöhte Expression von CD11b gemessen an der rMFI relativ zur Leeprobe nachgewiesen werden (**Abbildung 19**). Gemittelt über alle zehn Proben war die CD11b Expression nach Behandlung mit APA (Median 155,5%) gegenüber der ATRA-Monotherapie nicht signifikant (Median 120,1%; $p = 0,35$) und gegenüber der DMSO-Kontrolle signifikant erhöht (Median 92,15%; $p = 0,04$).

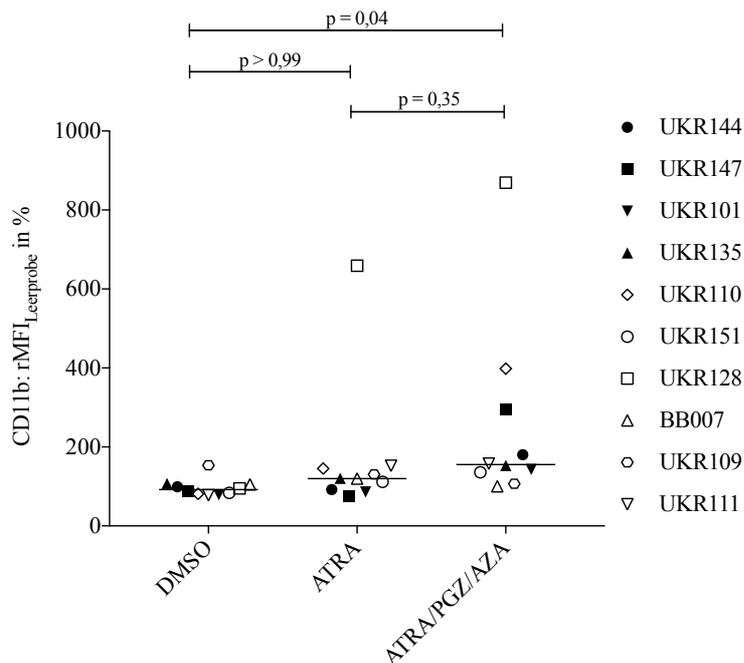
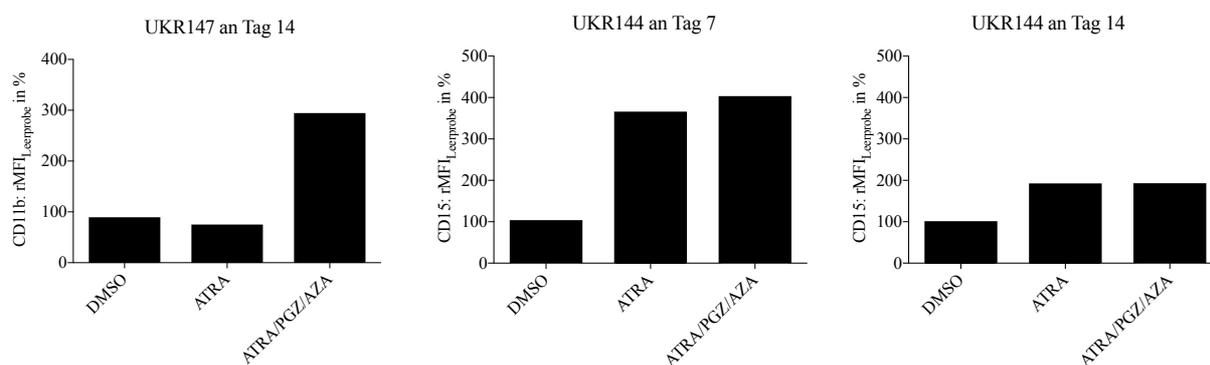


Abbildung 19: Auswirkung der Behandlung mit APA auf CD11b-Expression von zehn AML Proben an Tag 14. Die rMFI ist hier relativ zur Leerprobe angegeben. Die horizontalen Linien markieren den jeweiligen Median.

Nur in Einzelfällen waren andere Differenzierungsmarker nach APA-Behandlung gegenüber den Kontrollen erhöht (CD15, CD80, CD83, CD86, HLA-ABC, HLA-DR) bzw. Immunregulations- und Stammzellmarker erniedrigt (CD117, CD274, CD34). Die Expressionsmuster unterschieden sich jeweils von AML zu AML und auch innerhalb einer AML in Bezug auf die Messzeitpunkte (Tag 7, Tag 14). Teilweise wurden an Tag 7 einzelne Marker in der APA-Probe vermehrt exprimiert und an Tag 14 nicht. In **Abbildung 20** sind ausgewählte FACS Ergebnisse von unterschiedlichen AML Proben dargestellt. Demgegenüber stehen nicht dargestellte FACS Ergebnisse, bei denen sich keine Unterschiede in der ATRA bzw. APA-Probe gegenüber der DMSO-Kontrolle fanden. (siehe hierzu **Tabelle 3**).



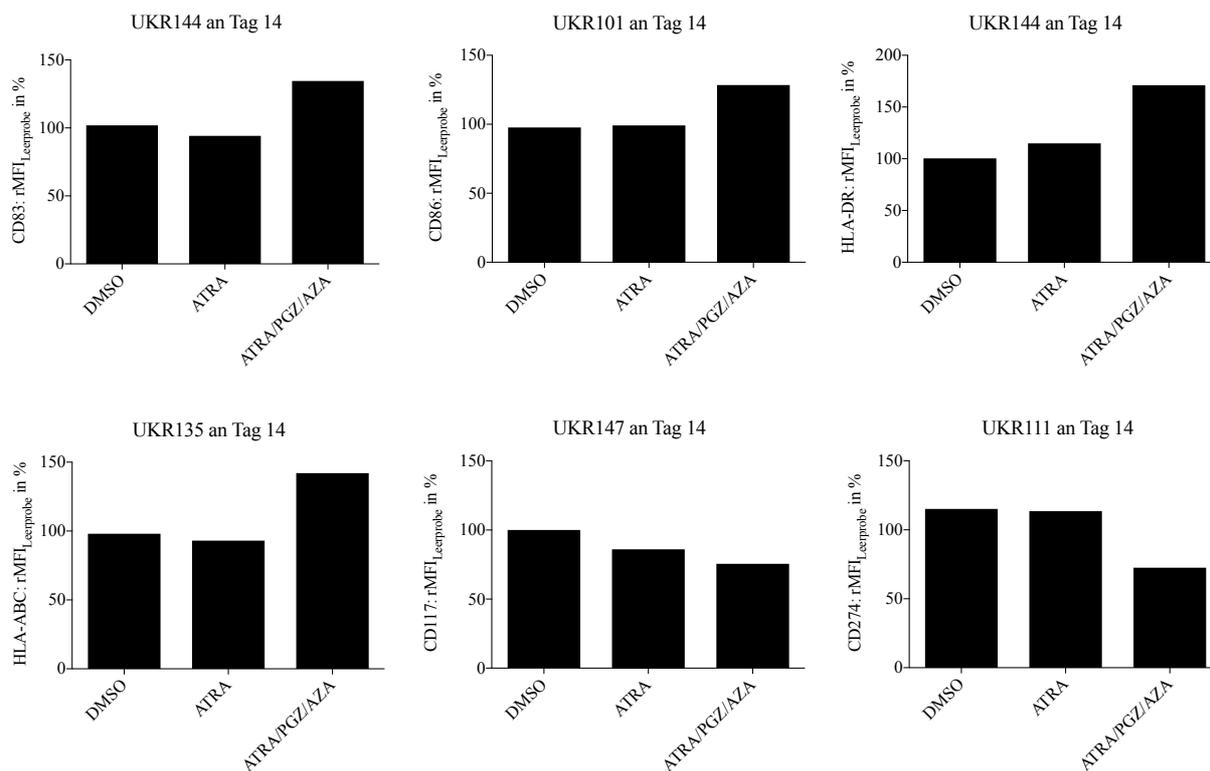


Abbildung 20: Auswirkung der Behandlung mit APA auf die Expression von ausgewählten Oberflächenmolekülen bei ausgewählten AML Proben. Es sind einzelne Beispiele aus den Hauptversuchen mit primären AML Blasten gezeigt. Die dargestellten Ergebnisse unterscheiden sich bezüglich AML Probe, Messzeitpunkt und betrachtetem Oberflächenmarker (siehe jeweilige Beschriftung). Die rMFI ist relativ zur Leerprobe angegeben.

4.3.4 Auswirkungen der Behandlung mit *All-trans*-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf die Zytomorphologie von akute myeloische Leukämie Blasten

Zur weiteren Untersuchung der Differenzierung von AML Blasten durch Behandlung mit APA wurden zytomorphologische Präparate von jeder Probe an Tag 7 und 14 angefertigt. Um die zytomorphologische Auswertung zu objektivieren, wurde der Anteil differenzierter Zellen von zwei Personen anhand festgelegter Differenzierungsmerkmale (Kernlappung, Granulierung, Zytoplasmahelligkeit) verblindet ausgezählt. Da die gemessenen Unterschiede zwischen den einzelnen Proben an Tag 14 größer waren als an Tag 7, wird im Folgenden ausschließlich auf die Ergebnisse von Tag 14 eingegangen. Die Messungen an beiden Tagen waren in der Regel kongruent.

4.3.4.1 Zytomorphologische Veränderungen der Probe UKR147 nach Behandlung mit *All-trans*-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin

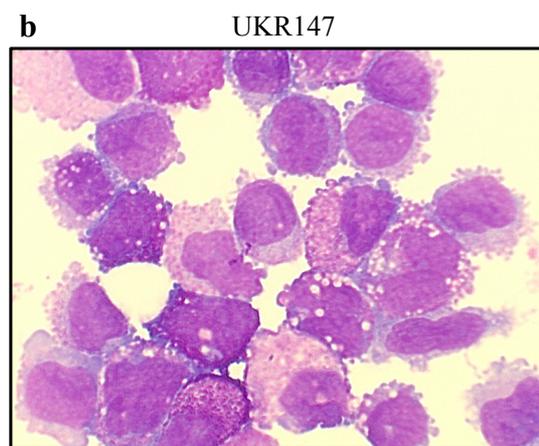
Zur Veranschaulichung der ausgewerteten Differenzierungseffekte zeigt **Abbildung 21** zytomorphologische Präparate aus den Versuchen an UKR147. Ohne Behandlung hatten die Zellen an Tag 14 einen blastären Phänotyp mit dunklem Zytoplasma und großem, einfach-

gelapptem Kern (**Abbildung 21a**). Nach DMSO-Behandlung waren die Zellen abgesehen von einigen großen, hellen Zellen ähnlich konfiguriert (**Abbildung 21b**). DMSO hatte also kaum Einfluss auf die zytomorphologische Differenzierung. In der ATRA-Probe fanden sich neben Blasten auch granulozytär differenzierte Zellen, erkennbar an ihrem sehr hellen Zytoplasma und dem verkleinerten, ein- bis mehrfach gelappten Kern (**Abbildung 21c**). In der APA-Probe waren überwiegend kleine, granulozytäre Zellen neben immer noch vorhandenen Blasten zu erkennen (**Abbildung 21d**). Die Zytospin Aufnahmen von UKR147 zeigen beispielhaft, wie sich Differenzierungseffekte der Behandlung mit APA zytomorphologisch zeigen konnten. Die Differenzierungsmerkmale unterschieden sich allerdings zwischen den einzelnen AML Proben. In einigen Fällen standen Kernlappung und Zytoplasmahelligkeit, in anderen eher Granulierung im Vordergrund.

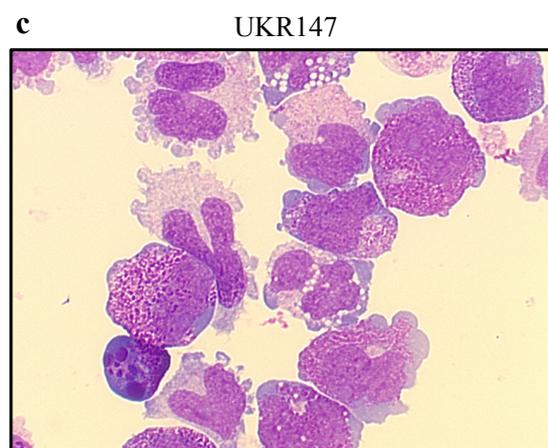
Für die hier dargestellte Probe UKR147 zeigte sich, dass der ausgezählte Anteil differenzierter Zellen in der APA-Probe am höchsten war (**Abbildung 21e**).



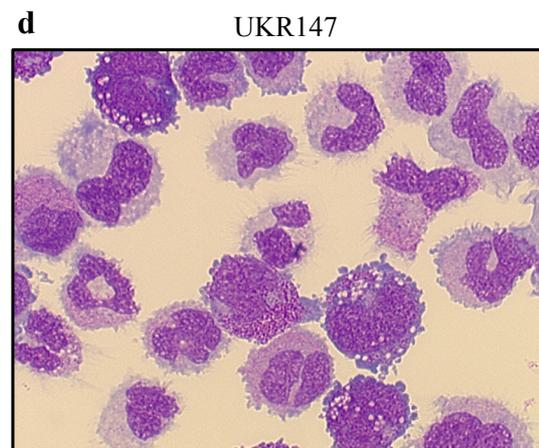
Leerprobe



DMSO



ATRA



ATRA/PGZ/AZA

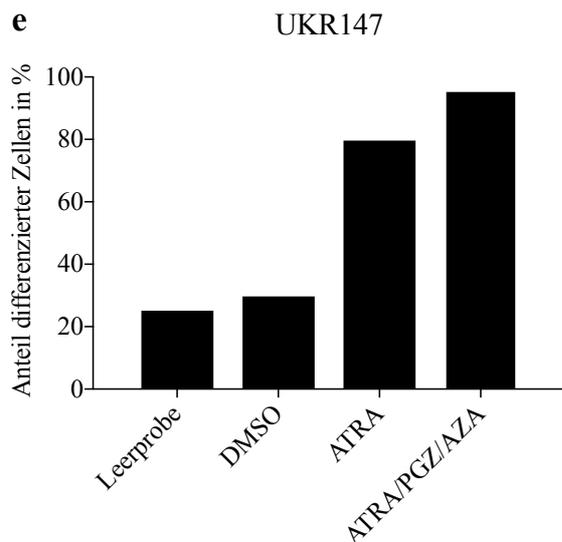


Abbildung 21: Auswirkung der Behandlung mit APA auf die zytomorphologische Differenzierung von UKR147 an Tag 14. (a-d) Zytomorphologische Präparate von UKR147 an Tag 14 der Behandlung mit APA. Vergrößerung 630fach. (e) Absoluter Anteil differenzierter Zellen bei UKR147 an Tag 14 der Behandlung mit APA.

4.3.4.2 Zusammenfassung zytomorphologischer Veränderungen bei primären AML

Blasten

Im Folgenden ist eine Übersicht über die Ergebnisse der zytomorphologischen Untersuchungen von acht der zehn AML Proben dargestellt. Zwei der AML Proben konnten in Bezug auf Zytomorphologie nicht ausgewertet werden, da zu viele Zellen bis Tag 14 abgestorben waren (UKR109, UKR111).

Bei vier der acht verbliebenen AML Proben (UKR144, UKR147, UKR101, UKR135) wurde ein deutlich höherer Anteil differenzierter Zellen in der APA-Probe verglichen mit den Kontrollen gezählt. Die anderen vier AML Proben (UKR110, UKR128, UKR151, BB007) zeigten keine sicheren Unterschiede zwischen APA und den Kontrollen. In **Abbildung 22** ist der Anteil differenzierter Zellen relativ zur Leerprobe für die acht Proben dargestellt. Dies hat den Grund, dass die absoluten Anteile zytomorphologisch differenzierter Zellen bei den verschiedenen AML Proben an Tag 14 sehr unterschiedlich waren und durch Berechnung der relativen Anteile in Relation gesetzt werden konnten. Die vier AML mit zytomorphologischer Differenzierung sind durch ausgefüllte Symbole (■,▲...) gekennzeichnet, um sie von den AML ohne sicheres Therapieansprechen (□, Δ...) abzugrenzen.

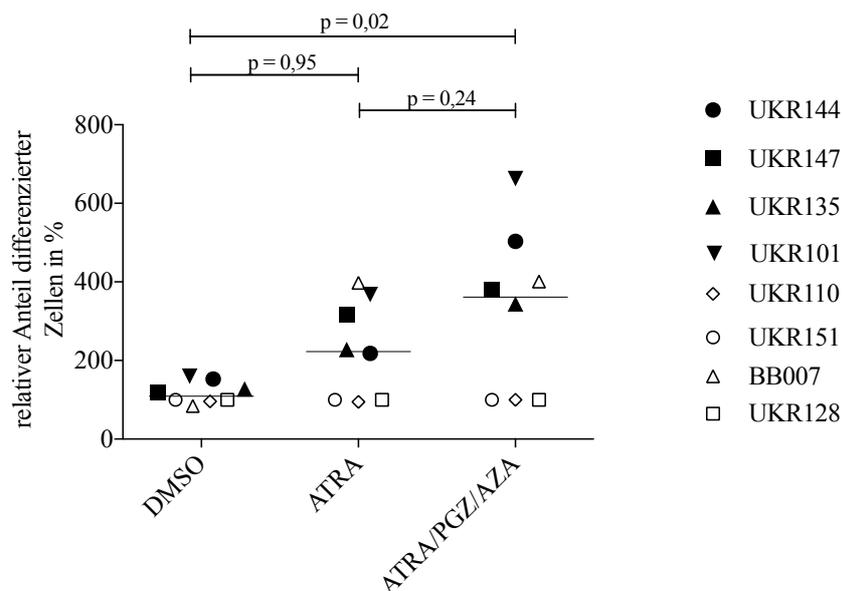


Abbildung 22: Auswirkung der Behandlung mit APA auf zytomorphologische Differenzierung von acht AML Proben an Tag 14. Relativer Anteil zytomorphologisch differenzierter Zellen bei allen acht AML Proben, bei denen eine Auswertung an Tag 14 möglich war. Der Anteil differenzierter Zellen bei den Proben DMSO, ATRA und ATRA/PGZ/AZA ist jeweils relativ zum Anteil differenzierter Zellen in der Leerprobe angegeben. Die vier AML mit zytomorphologischer Differenzierung sind durch ausgefüllte Symbole (■, ▲...) gekennzeichnet, um sie von den AML ohne sicheres Therapieansprechen (□, △...) abzugrenzen. Die horizontalen Linien markieren den jeweiligen Median.

Der Anteil zytomorphologisch differenzierter Zellen relativ zur Leerprobe an Tag 14 war nach APA-Behandlung (Median 361,5%) signifikant höher als in der DMSO-Kontrolle (Median 109,0%, $p = 0,02$). Auch gegenüber der ATRA-Monotherapie war der Anteil zytomorphologisch differenzierter Zellen nach APA-Behandlung gegenüber der DMSO-Kontrolle erhöht, wenn auch nicht signifikant (Median: 223,0%, $p = 0,24$). Somit konnte mit Hilfe von APA zytomorphologische Differenzierung bei primären AML Blasten, vor allem hin zu granulozytären Formen, induziert werden.

4.3.5 Auswirkungen der Behandlung mit All-trans-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf funktionelle Merkmale von akute myeloische Leukämie Blasten

4.3.5.1 Auswirkungen der Behandlung mit All-trans-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf funktionelle Merkmale der Proben UKR 101 und UKR110

Zur Erfüllung ihrer immunologischen Aufgaben verfügen myeloische Zellen über funktionelle Eigenschaften wie Phagozytose³⁸ und Bildung toxischer Metabolite wie ROS^{39,40}. Mit Hilfe quantitativer Tests (Nitro-Test und Phagozytose-Test) sollten die AML Zellen auch

dahingehend untersucht werden, ob sich diese Eigenschaften durch Behandlung mit APA verbessern ließen.

In Bezug auf die funktionelle Differenzierung konnten drei AML Proben nicht ausgewertet werden (UKR128, UKR 109, UKR111), da an Tag 14 zu wenige, vitale Zellen vorhanden waren, um die Tests durchzuführen. Von den verbliebenen sieben AML zeigten vier (UKR101, UKR135, UKR144, UKR147) in der APA-Probe an Tag 14 mehr zytomorphologisch differenzierte Zellen, mehr Phagozytosefähigkeit und mehr ROS-Bildung als in den Kontrollen. Die restlichen drei der sieben AML (UKR101, UKR151, BB007) differenzierten sich unter APA-Behandlung weder in zytomorphologischer, noch in funktioneller Hinsicht. In **Abbildung 23** sind die Ergebnisse von Nitro-Test und Phagozytose-Test an Tag 14 bei jeweils einer AML mit Therapieansprechen (UKR101) und einer AML mit Therapieresistenz (UKR110) gezeigt.

In **Abbildung 23a/b** sind die Ergebnisse der Auszählungen der Nitro-Tests bei UKR 101 und UKR110 dargestellt. Bei UKR101 stieg der Anteil Nitro⁺ Zellen nach Behandlung mit APA gegenüber den Kontrollen an, wohingegen bei UKR110 kein Unterschied festgestellt werden konnte. In **Abbildung 23c/d** sind am Beispiel von UKR101 Nitro-Zytospins gezeigt, wie sie zur Auswertung des Nitro-Tests verwendet wurden. Nitro⁺ Zellen stellten sich lichtmikroskopisch schwarz und Nitro⁻ Zellen durchscheinend dar. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Auszählung (**Abbildung 23a**) sieht man in der APA-Probe einen wesentlich höheren Anteil Nitro⁺ Zellen als in der Leerprobe. In **Abbildung 23e/f** sind die Ergebnisse der Phagozytose-Tests von UKR101 und UKR110 dargestellt. Hier zeigte sich passend zu den Ergebnissen der jeweiligen Nitro-Tests nur bei UKR101 ein Anstieg der rMFI(GFP) nach Behandlung mit APA im Vergleich zu den Kontrollen.

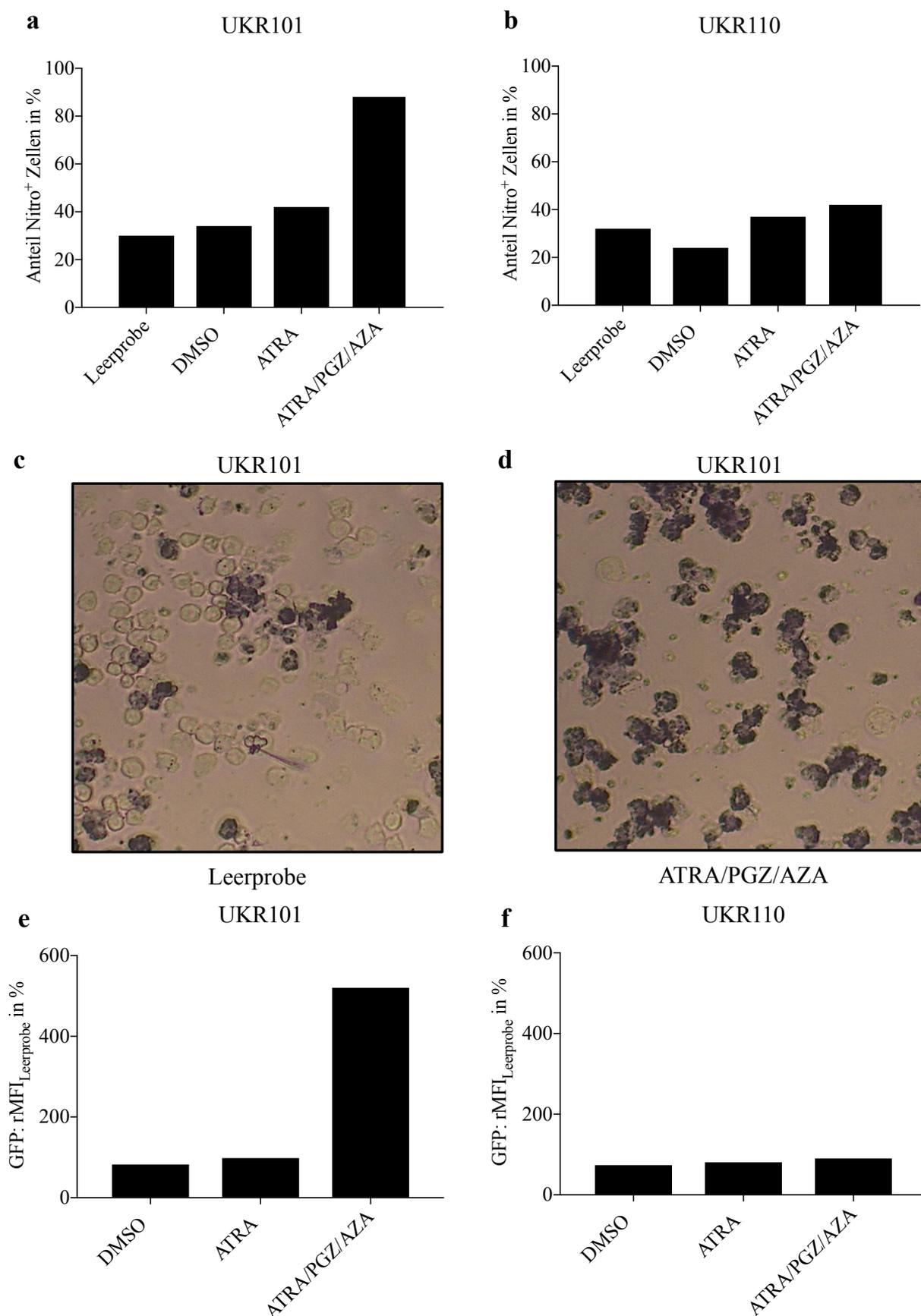


Abbildung 23: Auswirkung der Behandlung mit APA auf die Entwicklung funktioneller Eigenschaften bei UKR101 und UKR110 an Tag 14. (a) Anteil Nitro⁺ Zellen bei UKR101 an Tag 14 in %. **(b)** Anteil Nitro⁺ Zellen bei UKR110 an Tag 14 in %. **(c, d)** Darstellung von Nitro-Zytospins, wie sie für die Auszählung von

Nitro⁺ Zellen verwendet wurden. Vergrößerung 200fach. Nitro⁺ Zellen färbten sich schwarz, Nitro⁻ Zellen stellten sich durchscheinend dar. Hier: UKR101 an Tag 14 ohne Behandlung (c) und an Tag 14 der Behandlung mit APA (d). (e) Ergebnis des Phagozytose-Tests von UKR101 an Tag 14. Die rMFI(GFP) ist hier relativ zur Leerprobe angegeben. (f) Ergebnis des Phagozytose-Tests von UKR110 an Tag 14. Die rMFI(GFP) ist hier relativ zur Leerprobe angegeben.

4.3.5.2 Zusammenfassung der Auswirkungen der Behandlung mit All-*trans*-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf funktionelle Merkmale von sieben AML Proben

Abbildung 24 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse von Phagozytose- und Nitro-Test für die sieben untersuchten AML Proben. Der absolute Anteil GFP⁺ bzw. Nitro⁺ Zellen an Tag 14 schwankte erheblich. Um die Ergebnisse vergleichbar zu machen, wurden die Messwerte aus den einzelnen Proben relativ zur Leerprobe angegeben.

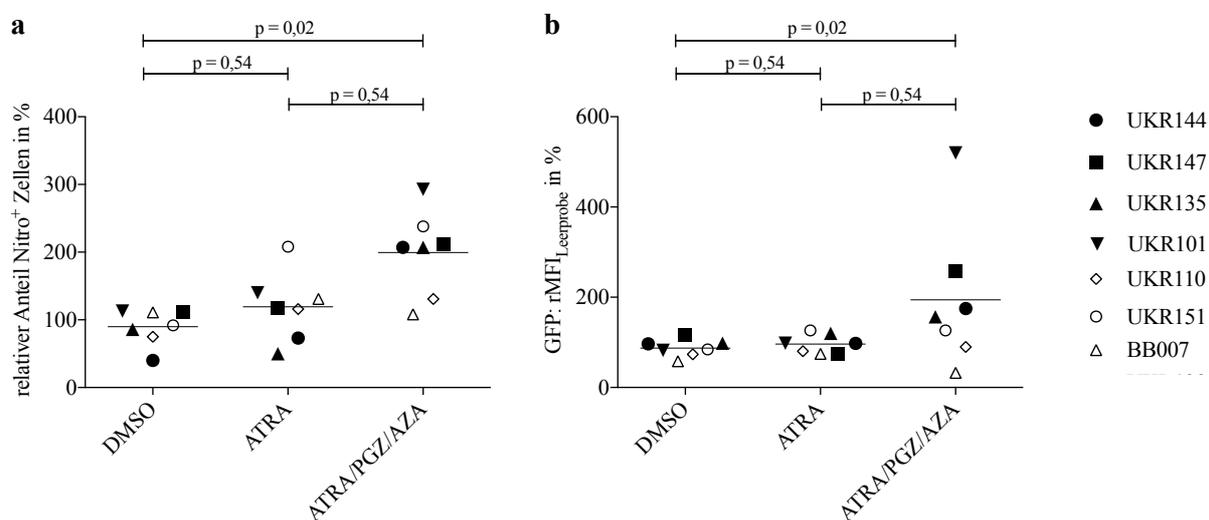


Abbildung 24: Auswirkung der Behandlung mit APA auf die Entwicklung funktioneller Eigenschaften bei sieben AML Proben. (a) ROS-Bildung an Tag 14 von allen sieben AML, bei denen eine Auswertung an Tag 14 möglich war. Der Anteil Nitro⁺ Zellen bei den Proben DMSO, ATRA und ATRA/PGZ/AZA ist jeweils relativ zum Anteil Nitro⁺ Zellen in der Leerprobe angegeben. (b) Phagozytosefähigkeit an Tag 14 von allen sieben AML, bei denen eine Auswertung an Tag 14 möglich war. Die rMFI von GFP bei den Proben DMSO, ATRA und ATRA/PGZ/AZA ist jeweils relativ zur Leerprobe angegeben. Die AML mit zytomorphologischer und funktioneller Differenzierung nach Behandlung mit APA sind durch ausgefüllte Symbole (■, ▲, ...) gekennzeichnet, um sie von den AML ohne sicheres Therapieansprechen (□, △, ...) abzugrenzen. Die horizontalen Linien markieren den jeweiligen Median.

Der Anteil Nitro⁺ Zellen relativ zur Leerprobe konnte bei den sieben untersuchten Proben durch Behandlung mit APA (Median 207,0%) signifikant gegenüber der DMSO-Kontrolle (Median 92,0%, $p = 0,02$) und nicht signifikant gegenüber der ATRA-Monotherapie (Median 118,0%, $p = 0,54$) erhöht werden.

Analog hierzu stieg im Phagozytostest die rMFI(GFP) relativ zur Leerprobe nach APA-Behandlung (Median 156,6%) nicht signifikant gegenüber der ATRA-Monotherapie (Median 97,8%, $p = 0,54$) und signifikant gegenüber der DMSO-Kontrolle (Median 84,4%, $p = 0,02$).

Die Ergebnisse zeigen zusammengefasst, dass die APA-Behandlung in einigen Fällen zur Ausbildung funktionell aktiver Zellen führen konnte. Allerdings traf dies nicht auf alle AML in gleicher Weise zu, sodass auch hier individuelle Unterschiede im Ansprechen sichtbar wurden.

In **Tabelle 3** sind für alle untersuchten Patientenproben die Ergebnisse von Zellzählung, FACS, Zytomorphologie und funktionellen Tests an Tag 14 der Behandlung mit APA dargestellt. Hierfür wurden die Ergebnisse der jeweiligen APA-Proben in Relation zur Leerprobe gesetzt.

	UKR101	UKR109	UKR110	UKR111	UKR128	UKR135	UKR144	UKR147	UKR151	BB007
Zelldichte	27,3%	38,8%	15,2%	37,8%	38,4%	82,2%	32,6%	27,6%	82,2%	3,3%
Annexin V ⁺	54,5%	88,9%	29,6%	44,0%	89,8%	52,3%	78,6%	39,0%	55,1%	50,6%
	(339%)	(131%)	(160%)	(75%)	(147%)	(176%)	(557%)	(142%)	(145%)	(133%)
Zytomorphologische Differenzierung	43,1%	k.E.	51,0%	k.E.	k.E.	89,7%	19,1%	95,2%	0,0%	34,1%
	(663%)		(100%)			(344%)	(503%)	(379%)	(100%)	(401%)
ROS-Produktion	88%	k.E.	42%	k.E.	k.E.	29%	31%	36%	31%	39%
	(293%)		(131%)			(207%)	(207%)	(212%)	(238%)	(108%)
rMFI _{Leerprobe} GFP	520,2%	k.E.	90,0%	k.E.	k.E.	156,6%	174,9%	258,2%	126,7%	32,6%
rMFI _{Leerprobe} CD11b	143,0%	107,0%	398,1%	157,8%	869,3%	153,1%	180,5%	294,2%	136,1%	100,5%
rMFI _{Leerprobe} CD15	74,5%	k.E.	140,9%	41,5%	102,9%	98,0%	193,2%	242,5%	148,8%	120,5%
rMFI _{Leerprobe} CD33	159,3%	k.E.	47,6%	k.E.	161,7%	103,4%	149,2%	62,4%	120,2%	87,8%
rMFI _{Leerprobe} CD34	116,9%	k.E.	118,0%	k.E.	705,5%	123,0%	124,8%	103,5%	123,8%	91,5%
rMFI _{Leerprobe} CD80	115,9%	k.E.	121,3%	124,1%	213,4%	127,2%	145,3%	100,8%	124,2%	99,3%
rMFI _{Leerprobe} CD83	121,3%	k.E.	114,5%	k.E.	215,5%	117,0%	134,6%	84,6%	129,9%	96,5%
rMFI _{Leerprobe} CD86	128,5%	k.E.	112,1%	147,0%	178,3%	102,3%	221,6%	71,8%	87,3%	94,9%
rMFI _{Leerprobe} CD117	114,9%	k.E.	120,4%	132,3%	283,7%	91,0%	389,1%	75,5%	140,0%	81,4%
rMFI _{Leerprobe} CD274	161,1%	k.E.	89,8%	72,5%	k.E.	k.E.	k.E.	k.E.	180,0%	k.E.
rMFI _{Leerprobe} HLA-ABC	103,9%	k.E.	78,0%	137,2%	k.E.	142,0%	k.E.	k.E.	335,7%	k.E.
rMFI _{Leerprobe} HLA-DR	123,8%	k.E.	117,2%	204,5%	339,4%	151,0%	171,1%	71,1%	126,3%	130,3%

Tabelle 3: Übersicht über die Auswirkung der Behandlung mit APA an Tag 14 bei zehn AML Proben. Zelldichte: Zelldichte an Tag 14 der Behandlung mit APA relativ zur Zelldichte in der Leerprobe. **Annexin V:** Absoluter Anteil Annexin V⁺ Zellen an Tag 14 der Behandlung mit APA. In Klammern ist der Anteil Annexin V⁺ Zellen nach APA-

Behandlung relativ zur Leerprobe angegeben. **Zytomorphologische Differenzierung:** Absoluter Anteil zytomorphologisch differenzierter Zellen an Tag 14 der Behandlung mit APA. In Klammern ist der Anteil zytomorphologisch differenzierter Zellen nach APA-Behandlung relativ zur Leerprobe angegeben. **ROS-Produktion:** Absoluter Anteil Nitro⁺ Zellen an Tag 14 der Behandlung mit APA. In Klammern ist der Anteil Nitro⁺ Zellen nach APA-Behandlung relativ zur Leerprobe angegeben. **Phagozytose:** Die rMFI von GFP in der APA-Probe ist relativ zur Leerprobe angegeben.. k.E.: kein Ergebnis – aus verschiedenen Gründen (z.B. zu geringer Anteil vitaler Zellen in den Proben) liegen hier keine Ergebnisse vor.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten die bereits in einzelnen Patienten beobachteten Wirkungen einer Behandlung mit APA, Zytoreduktion und Differenzierungsinduktion, in primären AML Blasten *in vitro* bestätigt werden. Im Folgenden werden die einzelnen Ergebnisse diskutiert.

5.1 Auswirkung der Behandlung mit All-*trans*-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf Zellwachstum und Apoptoserate von akute myeloische Leukämie Zellen

5.1.1 Auswirkung der Behandlung mit All-*trans*-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf Zellwachstum und Apoptoserate der AML Zelllinien THP-1, KG-1 und KG-1a

Zur Beurteilung der Auswirkung der Behandlung mit APA auf die Zellproliferation wurden Zelllinien und primäre AML Blasten hinsichtlich ihrer Wachstums- und Apoptoserate untersucht. Bei allen drei Zelllinien (KG-1a, THP-1, KG-1) konnte für ATRA an Tag 14 eine verringerte Zelldichte im Vergleich zu den Kontrollen (Leerprobe, DMSO) gezeigt werden. Nur für KG-1a Zellen konnte nachgewiesen werden, dass APA bezüglich der Zellzahl stärker zytoreduktiv wirkt als ATRA in der Monotherapie. Bei den Zelllinien THP-1 und KG-1 zeigte sich schon nach alleiniger Behandlung mit ATRA eine starke Zellzahlreduktion, sodass dieser Effekt möglicherweise durch APA nicht weiter übertroffen werden konnte.

Die Zelllinien reagierten mit unterschiedlicher Kinetik auf die Behandlung mit ATRA bzw. APA. Bei THP-1 und KG-1 Zellen waren an Tag 7 des Hauptversuches noch viele Zellen in der APA-Probe vital, allerdings 74% (THP-1) bzw. 69% (KG-1) weniger als in der jeweiligen Leerprobe. An Tag 14 erhöhte sich der Unterschied sogar auf 92% (THP-1) bzw. 97% (KG-1). KG-1a Zellen reagierten erst später und in geringerem Ausmaß als THP-1 und KG-1 Zellen (53% Verlust gegenüber der Leerprobe an Tag 7 und 86% an Tag 14).

Bemerkenswert ist, dass die untersuchten Zelllinien hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen ATRA-Konzentrationen ein unterschiedliches Verhalten zeigten. THP-1 Zellen wurden bereits bei einer ATRA-Konzentration von 0,1µM in ihrem Wachstum eingeschränkt. Bei einer ATRA Konzentration von 1µM war die Zelldichte bei THP-1 Zellen unabhängig von den dazu kombinierten Substanzen in allen Proben ähnlich niedrig (**Abbildung 8a/b**). Demgegenüber zeigten KG-1 Zellen unter Behandlung mit 0,1µM ATRA in Mono- oder Kombinationstherapie kein eingeschränktes Wachstum im Vergleich zur DMSO Kontrolle. Erst bei der höheren ATRA-Konzentration von 1µM war das Zellwachstum gegenüber DMSO eingeschränkt und der Anteil Annexin V⁺ Zellen höher

(**Abbildung 8c**, Zelldichte nicht dargestellt). Daraus kann man ableiten, dass es wahrscheinlich nicht eine Konzentration von ATRA gibt, die bei allen Zelllinien, respektive primären AML Blasten, eine gleich gute Wirkung erzielt. Dies bezieht sich wahrscheinlich auch auf den Effekt von ATRA in Kombination mit PGZ und AZA.

Zur Unterscheidung antiproliferativer von proapoptotischen Effekten der Behandlung mit APA wurden Annexin V-Messungen im FACS durchgeführt. Bereits die Monotherapie mit ATRA hatte bei allen Zelllinien eine deutliche Reduktion der Zelldichte im Vergleich zur Leerprobe und DMSO-Kontrolle bewirkt. Im Gegensatz dazu war die Apoptoserate in der ATRA-Probe gegenüber der Leerprobe (THP-1, KG-1) bzw. gegenüber der DMSO-Kontrolle (KG-1a) nicht erhöht (**Abbildung 13b, d, f**). Es kann abgeleitet werden, dass bei der alleinigen Behandlung mit ATRA die Verringerung der Zelldichte nicht auf eine erhöhte Apoptoserate zurückzuführen war, sondern möglicherweise antiproliferative Effekte eine Rolle spielten. Bei KG-1 und KG-1a Zellen war die Apoptoserate in der APA-Probe gegenüber der ATRA-Probe erhöht. Die Behandlung mit APA induzierte folglich bei zwei von drei Zelllinien vermehrt Apoptose. Die zytoreduktive Wirkung der Behandlung mit APA bei AML Zelllinien ist somit am ehesten auf die Kombination von antiproliferativen Effekten von ATRA und apoptosefördernden Effekten der Dreifachkombination zurückzuführen.

5.1.2 Auswirkung der Behandlung mit All-trans-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf Zellwachstum und Apoptoserate von primären akute myeloische Leukämie Blasten

Die Zelldichte der zehn AML Proben war an Tag 14 der APA-Behandlung signifikant niedriger als in der DMSO-Kontrolle. Dies korreliert mit den bisherigen, klinischen Beobachtungen bei AML Patienten mit APA-Behandlung¹⁰. Hier war spätestens nach dem zweiten Zyklus APA eine Reduktion der Leukozytenzahl im peripheren Blut um mehr als 50% des Ausgangswertes nachgewiesen worden¹⁰.

Anders als bei den untersuchten AML Zelllinien war die zytoreduktive Wirkung von ATRA in der Monotherapie bei primären AML Blasten gegenüber DMSO und der Leerprobe kaum erhöht. Es ergaben sich hier keine Hinweise auf zytoreduktive bzw. antiproliferative Effekte der Behandlung mit ATRA in der Monotherapie. Erst in der Kombinationstherapie APA konnte eine signifikante Reduktion der relativen Zelldichte gegenüber der DMSO-Kontrolle nachgewiesen werden. Entsprechend war der Anteil Annexin V⁺ nach Behandlung mit APA gegenüber der DMSO Kontrolle signifikant erhöht. Die in der Mehrheit der AML beobachtete Zytoreduktion ist damit wie bei den AML Zelllinien zumindest teilweise auf die Induktion von Apoptose durch APA zurückzuführen. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass neben der

Förderung von Apoptose auch eine Proliferationsinhibition durch Behandlung mit APA bei primären AML Blasten zur Zytoreduktion beiträgt.

Bei UKR128 waren ATRA und APA in etwa gleich wirksam mit einer um 65% geringeren Zelldichte als in der Leerprobe. Hier hatte die Dreifachtherapie keinen Mehreffekt gegenüber der ATRA-Monotherapie.

Bei den AML Proben UKR111 und UKR135 wirkten ATRA-Monotherapie und APA nicht stärker zytoreduktiv als die DMSO-Kontrolle. Bei beiden AML Proben war die Zelldichte in der ATRA-Monotherapie an Tag 14 sogar höher als bei den Kontrollen (Leerprobe, DMSO) und der Kombinationstherapie APA. Am deutlichsten zeigte sich dies bei UKR135. Man könnte hier argumentieren, dass ATRA bei UKR135 proproliferativ wirkte und starkes Zellwachstum bedingte. Auffällig ist, dass UKR135 unter allen untersuchten AML Proben diejenige mit dem geringsten Blastenanteil (70%) war. Es ist möglich, dass ATRA auch oder sogar insbesondere auf gesunde Zellen proproliferativ wirkt und das Ergebnis in der Probe UKR135 daher verzerrt war. Die genauen Auswirkungen beim vorliegenden Experiment lassen sich aber im Hinblick auf die unbekannte Zellverunreinigung bei UKR135 nicht abschätzen. In der APA-Probe von UKR135 konkurrierten möglicherweise der wachstumsfördernde Effekt von ATRA und der wachstumshemmende Effekt der Dreifachtherapie APA. Diese Theorie wird gestützt durch die Tatsache, dass man in der APA-Probe den größten Anteil Annexin V⁺ Zellen unter allen Proben der UKR135 fand (**Abbildung 17f**). Auch bei UKR111 könnte man argumentieren, dass ATRA die Zellproliferation förderte. Hier war die Apoptoserate in den Proben ATRA und APA sogar geringer als in der Leerprobe und in der DMSO-Kontrolle, sodass ATRA hier hemmend auf die Apoptose gewirkt zu haben scheint. In Zusammenschau der Ergebnisse von UKR135 und UKR111 ist anzunehmen, dass ATRA in Mono- und Kombinationstherapie unter bislang unbekanntem Voraussetzungen auch proliferationsfördernd und apoptosehemmend wirken kann.

Der genaue Mechanismus des Zusammenspiels von ATRA, PGZ und AZA in Bezug auf die Reduktion der Zelldichte ist unklar. Betrachtet man die zytoreduktive Wirkung der Substanzen in der jeweiligen Monotherapie gemessen an der Zelldichte, so war ATRA in den Vorversuchen am stärksten wirksam. Im Vergleich zu ATRA hatten AZA 0,1µM und PGZ 5µM nur einen geringen Effekt (siehe **Abbildung 10**, Ergebnisse für AZA nicht dargestellt.). Für die Substanz AZA war zuvor sogar absichtlich eine geringere Konzentration gewählt worden, um die Zytotoxizität zugunsten der biomodulatorischen Wirkung zu verringern (siehe

Abschnitt 3.2.2)^{93,102}. Ein rein additiver Effekt der Dreifachtherapie ist somit wahrscheinlich zur Erklärung der signifikant geringeren Zelldichte bei primären Blasten nach Behandlung mit APA gegenüber ATRA nicht ausreichend. Es kann ein multiplikativer Effekt angenommen werden. Dieser könnte unter anderem mit der beobachteten, zytomorphologischen Differenzierung zu granulozytären Zellen zusammenhängen: Reife, myeloische Zellen sind nicht nur durch zytomorphologische und funktionelle Merkmale gekennzeichnet, sondern haben nach Abschluss der Reifung auch eine kurze Lebensdauer von 5,4 Tagen *in vivo*¹⁸². Eine ausreichend vollständige Differenzierung durch APA könnte durch die Verkürzung der Lebensdauer von AML Zellen zur Zytoreduktion beitragen.

Nicht alle AML Proben zeigten nach Behandlung mit APA eine deutliche Zytoreduktion gegenüber der DMSO-Kontrolle. Bei UKR111 und UKR135 schien ATRA sogar proliferationsfördernd und apoptosehemmend zu wirken. Auch bei Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zur Wirksamkeit des RAR/RXR-Agonisten Bexaroten an primären AML Blasten von Patienten wurden Unterschiede in der Wirksamkeit im Bezug auf die Zellzahlreduktion gefunden²⁸. Dies wirft die Frage auf, welche Einflussfaktoren für die Wirksamkeit von RAR/RXR-Agonisten im Allgemeinen und der Medikamentenkombination APA im Speziellen eine Rolle spielen. Möglicherweise hängt der zytoreduktive Effekt von ATRA bzw. APA von genetischen und proteomischen Voraussetzungen der behandelten AML ab. An der Wirkung von ATRA sind unter anderem C/EBP α und das PU.1 beteiligt^{26,28,34}. Mutationen der zugehörigen Gene oder Veränderungen an angeschlossenen Signalkaskaden könnten den Effekt von ATRA verstärken oder vermindern. Zu genetischen Einflussfaktoren auf die Wirksamkeit der Dreifachtherapie APA liegen bisher kaum Daten vor. Weitere Untersuchungen auch im Hinblick auf genetische Voraussetzungen für die zytoreduktive Wirkung der Behandlung mit APA müssen noch durchgeführt werden.

5.2 Auswirkung der Behandlung mit All-*trans*-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf die Differenzierung von akute myeloische Leukämie Zellen

5.2.1 Auswirkung der Behandlung mit All-*trans*-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf die Differenzierung der AML Zelllinien THP-1, KG-1 und KG-1a

Bei zwei der drei untersuchten Zelllinien konnte durch ATRA-Monotherapie Differenzierung induziert werden, die anhand des Markers CD11b und vor allem anhand der Zytomorphologie erfasst wurde. Nur für THP-1 konnte jedoch an Tag 14 auf Ebene der Oberflächenmoleküle (CD11b) ein Behandlungsvorteil von APA gegenüber ATRA nachgewiesen werden. Zytomorphologisch vermehrte Differenzierung in der APA-Probe fand man neben THP-1

auch bei KG-1 Zellen. Die Phagozytose-Fähigkeit veränderte sich bei APA im Vergleich zu ATRA in keinem Versuch an den Zelllinien. Demgegenüber stellte sich der Mehreffekt von APA bei den Versuchen an primären AML Blasten wesentlich deutlicher dar. Dies zeigt, dass Zelllinien, wie sie regelhaft in der Erforschung der AML eingesetzt werden^{67,101,136}, möglicherweise nur eingeschränkt als Modell für die AML verwendet werden können. Eine Erklärung für den geringen Vorteil von APA bei Zelllinien ist, dass bereits die ATRA-Monotherapie einen sehr starken Differenzierungseffekt bei diesen Zellen hat. Eine stärkere Differenzierung über den Effekt von ATRA hinaus ist möglicherweise nur noch schwer möglich und stellt sich daher nur schwach in der Zytomorphologie dar. Eine Erklärung für die insgesamt geringe Mehrwirkung von APA bei AML Zelllinien könnte ebenso das Fehlen von Zytokinen in den Versuchen sein. In den Experimenten an primären AML Blasten wurden G-CSF und SCF zur Förderung des Zellwachstums genutzt. Da AML Zelllinien auch ohne Zytokine in der Zellkultur ausreichend proliferieren, wurden hier keine Zytokine zugesetzt. In einem nicht dargestellten Teilexperiment konnte durch Zugabe von G-CSF die CD11b-Expression bei THP-1 Zellen an den Tagen 7 und 14 gesteigert werden. Andere Arbeitsgruppen haben nachgewiesen, dass sich ATRA und G-CSF synergistisch zur Differenzierung von APL-Zellen führen⁸³. Das Fehlen des physiologischen Zytokinmilieus könnte die Wirkung von APA bei Zelllinien negativ beeinträchtigt haben.

Im Widerspruch zu Ergebnissen von Chen *et al.*¹⁸³ wurde die Phagozytosefähigkeit durch ATRA bei THP-1 Zellen nicht verbessert. Sowohl das Grundprinzip des Phagozytose-Tests als auch die gemessene Phagozytosefähigkeit von unbehandelten THP-1 Zellen (ca. 40%) waren bei den Versuchen dieser Arbeit und Experimenten von Chen *et al.* ähnlich. Unterschiede bestanden in der Wahl des Mediums (hier: AIM V mit 10% hitzeinaktiviertes HS; Chen *et al.*: RPMI Medium mit 10% FCS), ATRA-Konzentration (hier: 1 μ M; Chen *et al.*: 0,01 μ M) und der Messzeitpunkte (hier: Tag 7 & 14; Chen *et al.*: Tag 1 & 3). Es ist unklar, ob dies einen Einfluss gehabt haben könnte. Ein systematischer Fehler im Sinne eines wenig sensitiven Phagozytose-Tests ist unwahrscheinlich, da der Test sowohl bei frisch gewonnenen Granulozyten in Vorversuchen (Ergebnisse nicht gezeigt) als auch bei primären AML Blasten in den Hauptversuchen positive Ergebnisse erbrachte.

Insgesamt konnte bei den Zelllinien nur im Hinblick auf die Zytoreduktion ein Vorteil von APA gegenüber ATRA gezeigt werden. Die differenzierungsfördernden Effekte auf Ebene der Oberflächenmoleküle, der Zytomorphologie und der Phagozytose waren gering.

5.2.2 Auswirkung der Behandlung mit All-trans-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf die Differenzierung von akute myeloische Leukämie Blasten in der Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie konnte bei primären AML Blasten nur für CD11b ein statistisch signifikanter Anstieg der Expression nach APA-Behandlung gegenüber der DMSO-Kontrolle gezeigt werden. Hinsichtlich der anderen Oberflächenmarker konnte kein einheitliches Differenzierungsmuster identifiziert werden. Bei verschiedenen AML Proben konnten Marker für Granulozyten (CD15), DCs (CD83) und allgemein APCs (CD80, CD86, HLA-DR, HLA-ABC) vermehrt in der APA-Probe im Vergleich zu den Kontrollen DMSO und ATRA nachgewiesen werden. Einzelne AML zeigten zu unterschiedlichen Messzeitpunkten verschiedene Expressionsmuster (siehe die Expression von CD15 bei UKR144 in **Abbildung 20**). Den Unterschieden zwischen den Messungen an den Tagen 7 und Tag 14 könnte ein fortschreitender Differenzierungsprozess zu Grunde liegen. Auch in der physiologischen Hämatopoese gibt es stadienspezifische Oberflächenmoleküle, die insbesondere am Anfang der Entwicklung (z.B. CD34¹⁵⁵) oder bei reifen Zellen (CD11b¹⁴⁷⁻¹⁴⁹) vorkommen. Durch die Behandlung mit APA wird ein Differenzierungsprozess angestoßen, bei dem sich das Expressionsmuster der Zellen möglicherweise ständig verändert. Momentaufnahmen mit FACS-Analysen an den Tagen 7 und 14 können diesen Prozess nur teilweise abbilden. Für eine genauere Beurteilung müssten in nachfolgenden Experimenten die Messungen in deutlich engeren Abständen erfolgen.

Die Unterschiede in der Oberflächenmolekülexpression zwischen den einzelnen AML Proben sind erklärbar durch die *a priori* verschiedenen AML Phäno- und Genotypen. Die verwendeten AML wurden verschiedenen FAB-Klassen zugeordnet. Unter den untersuchten AML Proben hatten einige beispielsweise bereits eine myelomonozytäre Vordifferenzierung (UKR110: FAB-Klasse M5), wohingegen andere nur leichte Ausreifungszeichen zeigten (UKR135: FAB-Klasse M2). Die Pleiomorphie der verschiedenen AML wurde in den Experimenten an Tag 0 nachgewiesen und betraf FACS-Marker, Zytomorphologie und Immunfunktion (Ergebnisse nicht gezeigt). Somit besaßen die verwendeten AML sehr unterschiedliche genetische und proteomische Voraussetzungen. Entsprechend vielfältig war auch die gemessene Expression von Oberflächenmolekülen nach Behandlung mit ATRA und APA an den Tagen 7 und 14.

Eine weitere Erklärung für die Unterschiede in den FACS-Analysen könnte sein, dass APA ein relativ unspezifisches Differenzierungssignal induziert. Zahlreiche Gene stehen unter der Regulation des ATRA-Rezeptors RAR und des PGZ-Rezeptors PPAR γ (siehe **Abschnitte**

2.3.2 & 2.3.4). Die genauen Auswirkungen der Interaktionen dieser Transkriptionsfaktoren zusammen mit der unspezifischen Hypomethylierung durch AZA sind unklar. In einem zudem von genetischen Aberrationen beeinträchtigten Differenzierungsprozess ist wahrscheinlich kein einheitliches Expressionsmuster zu erwarten. Außerdem war das Zellkulturmodell in Bezug auf einige Parameter unphysiologisch. Zahlreiche physiologisch beteiligte Zytokine und Zell-Zellkontakte, die für eine eindeutige Differenzierungsrichtung hilfreich oder sogar notwendig gewesen sein könnten^{20,184}, fehlten.

Ungeachtet dieser Polymorphie würde man eine Korrelation zwischen Oberflächenexpressionsmuster und funktioneller Aktivität erwarten. So ist beispielsweise CD11b an Phagozytose beteiligt¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Drei der vier durch die Behandlung mit APA funktionell differenzierten AML Proben exprimierten an Tag 14 auch vermehrt CD11b in der APA-Probe (UKR135, UKR144, UKR147). Die vierte dieser AML (UKR101) zeigte im FACS ebenfalls ein leichtes Ansprechen in Form von vermehrter CD86- und HLA-DR-Expression. Umgekehrt zeigte sich jedoch auch bei AML, die keine verbesserte Phagozytose nach APA-Behandlung aufwiesen (z.B. UKR128), eine erhöhte Expression von CD11b. Es ist möglich, dass bei UK128 *a priori* genetische Mutationen vorlagen, die den komplexen Prozess der Phagozytose ungeachtet der CD11b Expression behinderten. Insgesamt bestand in den Experimenten kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Oberflächenmolekülexpression und Funktion.

5.2.3 Auswirkung der Behandlung mit All-trans-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin auf die Differenzierung von akute myeloische Leukämie Blasten in der Zytomorphologie und in Funktionstests

Zytomorphologische Differenzierung und funktionelle Aktivität (Nitro-Test, Phagozytose-Test) standen bei den untersuchten, primären AML Blasten in engem Zusammenhang. Die vier AML, die in der APA-Probe mehr ROS produzierten und stärker phagozytierten als in den Kontrollen, zeigten auch einen erhöhten Anteil zytomorphologisch differenzierter Zellen (UKR101, UKR135, UKR144, UKR147). Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Zellen mit granulozytärem Phänotyp, die unter den gezeigten Bedingungen entstanden sind, auch funktionell aktiv waren. Dies war eine der wesentlichen Hypothesen, die in dieser Arbeit untersucht werden sollte. Es ist folglich möglich, dass auch die Granulozyten funktionell aktiv waren, die bei individuellen Heilversuchen im peripheren Blut von Patientin unter APA-Therapie gefunden wurden¹⁰. Um dies zu beweisen, müsste man aus peripherem Blut eines mit APA therapierten Patienten Blasten vor Therapie und Leukozyten nach Therapie

isolieren, um diese funktionellen Tests zu unterziehen. Sollten die dort entstandenen Granulozyten die gleichen Mutationen wie die Ursprungsblasten tragen, jedoch funktionell aktiver sein, wäre dies ein weiterer Hinweis dafür, dass sich unter Therapie mit APA *in vivo* funktionsfähige Granulozyten aus AML Blasten entwickeln können.

APL-Patienten unter ATRA-Therapie haben ein geringeres Risiko für septisch verlaufende Infektionskrankheiten als non-APL-AML Patienten unter Standardchemotherapie¹⁸⁵. Dies kann auf die Ausdifferenzierung maligner Zellen zu funktionsfähigen Immunzellen zurückgeführt werden⁵³. Möglicherweise tragen die durch die Behandlung mit APA aus non-APL-AML Zellen entstandenen Granulozyten *in vivo* zur Stärkung der Immunabwehr insbesondere gegen bakterielle Erreger bei. Opportunistische Infektionen, wie sie bei Immunsuppression durch Knochenmarksinfiltration der AML und Chemotherapie häufig sind, würden so abgemildert oder vermieden werden^{12,13,15}.

Allerdings haben nicht alle AML so positiv auf ATRA reagiert. Drei von sieben untersuchten AML zeigten kein Ansprechen auf die APA-Behandlung (BB007, UKR110, UKR151). In wie weit die Therapiekombination aus niedrig-dosiertem AZA, PGZ und ATRA in einem größeren Patientenkollektiv Wirksamkeit zeigt, wird derzeit in einer randomisierten, kontrollierten Phase II Studie bei Patienten mit chemotherapierefraktärer AML untersucht (siehe **Abschnitt 6**).

5.3 Genetische Aspekte bei der Therapie mit All-*trans*-Retinsäure + Pioglitazon + 5-Azacytidin

Für die Monotherapie mit ATRA ist bereits bekannt, dass sie insbesondere beim Genotyp NPM1-Mutation ohne FLT3-ITD sowie bei MLL-AF9-Fusion⁺ AML wirksam ist^{26,186}. Daneben ist eine komplexe Zytogenetik ein negativer Prädiktor für das Ansprechen auf die Therapie¹⁸⁶. Kürzlich wurde ein positiver Zusammenhang zwischen einer vermehrten Expression des Transkriptionsfaktors *ecotropic virus integration site 1 protein homolog* (EVI-1) und der ATRA-Ansprechrage hergestellt¹⁸⁷. Mutationen wie die AML/ETO-Fusion oder SALL-4-Überexpression (*engl. Sal-like protein 4*; etwa: Sal ähnliches Protein 4) behindern die Wirkung von ATRA^{80,139}. Auch die Wirksamkeit von hypomethylierenden Substanzen wie AZA ist abhängig von genetischen Merkmalen der AML, beispielsweise dem Vorliegen einer Isocitratdehydrogenase-Mutation (*engl. isocitratdehydrogenase*; IDH)¹⁸⁸.

In den bisher veröffentlichten Daten zur Therapie von fünf Patienten mit APA wurden keine NPM1-Mutationen, zwei FLT3-ITD Mutationen und drei Fälle mit komplexen zytogenetischen Aberrationen beschrieben. Daraus lässt sich im Hinblick auf die oben

genannten Literaturangaben keine definitive Tendenz ableiten. Sicherlich ist jedoch eine Probengröße von fünf zu klein, um statistisch gesicherte Aussagen zu treffen.

In der vorliegenden Arbeit sprachen vier AML Proben hinsichtlich der Induktion von Differenzierung eindeutig auf die Behandlung mit APA an. Davon trugen drei eine NPM1-Mutation und vier eine FLT3-ITD-Translokation. Allerdings kamen beide genetischen Veränderungen auch bei AML ohne Therapieansprechen vor. Die EVI1-Expression wurde nicht untersucht. Die Dominanz der FLT3-ITD-Mutation steht im Kontrast zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die ein Therapieansprechen auf ATRA vor allem bei FLT3-ITD⁻ AML gefunden haben¹⁸⁶ oder keinen Zusammenhang zwischen FLT3-Mutationsstatus und Therapieansprechen auf ATRA feststellen konnten¹⁸⁹. In dieser Arbeit ist die Probengröße ebenfalls zu klein, um definitive Aussagen zu genetischen Prädiktoren für das Therapieansprechen zu machen.

5.4 Mechanistische Untersuchungen

Zur Beurteilung der genauen Interaktion der drei Medikamente ATRA, AZA und PGZ könnten Untersuchungen auf molekularer Ebene durchgeführt werden. Neben AZA hat auch ATRA bei non-APL-AML Einfluss auf den Methylierungsstatus der DNA¹⁹⁰. Methylierungsanalysen des Genoms von AML Zellen vor und nach APA-Behandlung könnten Aufschluss darüber geben, wie sich die Epigenetik durch die Kombination beider Medikamente verändert. Auch die transkriptionelle Regulation der Myelopoese ist mit entscheidend für die Pathogenese der AML²³. In diesem Zusammenhang ist eine Messung der Expression von RAR, RXR und PPAR γ interessant. In gesonderten Experimenten könnte festgestellt werden, inwieweit sich die Anwesenheit von ATRA auf die Expression von PPAR γ , bzw. die Anwesenheit von PGZ auf die Expression von RAR und RXR auswirkt. Zum Zweck einer pathomechanistischen Aufklärung könnten auch weitere Transkriptionsfaktoren untersucht werden, die mit ATRA in Verbindung stehen. Dazu gehören die bereits erwähnten Proteine PU.1 und C/EBP α . Ein Mangel dieser Faktoren behindert eventuell die Wirkung von APA^{26,28}. Ein *mRNA sequencing* könnte die Auswirkung von APA auf das gesamte Transkriptionsmuster der AML darstellen. Dadurch könnten neue Wirkmechanismen oder auch Angriffspunkte für weitere Medikamente aufgedeckt werden.

5.5 Erforschung weiterer Substanzen

Im Rahmen weiterer Untersuchungen kann auch die Wirksamkeit verwandter Substanzen ermittelt werden. Eine Möglichkeit besteht in der Verwendung des bereits angesprochenen

RXR-Agonisten Bexaroten. Diese Substanz wurde auch in einigen Experimenten der vorliegenden Arbeit an Zelllinien getestet. In nicht dargestellten Versuchen waren die Effekte von ATRA und Bexaroten auf AML Zellen ähnlich. Auch klinisch ist Bexaroten bisher in Einzelfällen bei der Behandlung von non-APL-AML wirksam¹⁹¹. Darüber hinaus könnte die Entwicklung RAR-isotypenspezifischer Agonisten die Wirksamkeit von APA verbessern. ATRA stellt einen relativ unspezifischen Stimulus für die drei RAR-Isoformen RAR α , RAR β und RAR γ dar⁵². Demgegenüber stehen spezifische Funktionen der einzelnen Isoformen bezüglich Differenzierung und Tumorsuppression^{50,52,192,193}. Die weitere Erforschung der einzelnen RARs und RXRs (RXR α , RXR β , RXR γ) sowie die Suche nach spezifischen Liganden könnten die Therapieoptionen bei AML Patienten weiter verbessern.

Weiterhin gibt es neben AZA mehrere, potentiell geeignete DNMTIs. Es wurde bereits nachgewiesen, dass verschiedene DNMTIs sich in Bezug auf ihre Zielgene unterscheiden¹⁹⁴. Die Wahl eines anderen DNMTI könnte im komplexen Wirkmechanismus der Dreifachtherapie mit ATRA und PGZ besser wirksam sein. Mögliche Substanzen für solche Untersuchungen sind DAC¹⁰⁵, Zebularin¹⁹⁴ und Guadecitabin¹⁹⁵.

Zur Gruppe der PPAR γ -Agonisten gehören zahlreiche Substanzen wie 15-deoxy- Δ 12,14-Prostaglandin J₂¹²⁴, 2-Cyano-3,12-dioxooleane-1,9-dien-28-säure (CDDO)^{124,129} oder Rosiglitazon¹²⁴. Auch hier könnte die Verwendung einer anderen Substanz als PGZ die Wirksamkeit der Dreifachtherapie mit ATRA und AZA verbessern.

5.6 Verbesserungen des Zellkulturmodells

Wenngleich in den Experimenten dieser Arbeit im Zellkulturmodell G-CSF und SCF verwendet wurden, um das Knochenmarkmilieu in Kultur nachzustellen, könnten die Versuchsbedingungen noch verbessert werden. Wie eingangs erwähnt ist die physiologische Regulation der Myelopoese äußerst komplex und hängt von zahlreichen weiteren Mediatoren ab^{19,23}. So könnten beispielsweise IL-3, IL-6 oder Thrombopoietin zu einer Verbesserung des Kulturmodells beitragen¹⁴⁴. Hierbei muss auch beachtet werden, dass die genauen Konzentrationen der beteiligten Zytokine im Mikromilieu des Knochenmarks kaum bekannt sind. Durch zu hoch gewählte Konzentrationen könnte es im *in vitro* Modell zu Verzerrungen kommen. In dieser Arbeit wurde bereits nachgewiesen, dass die Zytokine auch ohne die eingesetzten Substanzen bereits innerhalb von 12 Stunden Auswirkungen auf die Expression von Oberflächenmolekülen haben.

Neben löslichen Faktoren sind auch Zellkontakte zu Knochenmark-Stromazellen ein wichtiger Regulationsmechanismus der Myelopoese¹⁸⁴. Es gibt experimentelle Ansätze, das

Knochenmarksmilieu in Form eines Kokulturmodells aus Knochenmark-Stromazellen und AML Blasten nachzustellen¹⁹⁶. Durch die Untersuchung der APA-Behandlung in einem solchen Zellkulturmodell könnte der Wirkungsnachweis bei einem größeren Teil der AML möglich sein.

Auch die Versuchsdauer könnte verlängert werden. Alle beteiligten Substanzen wirken auf Transkriptionsebene und es ist somit anzunehmen, dass ihre Effekte verzögert eintreten. Die genaue Wirklatenz dieser Medikamente in Kombination muss noch erforscht werden. Die deutlichsten Unterschiede zwischen APA und den Kontrollen waren erst an Tag 14 erkennbar. Einige Zelllinien hatten auch zu diesem Zeitpunkt noch eine gute Vitalität (**Abbildung 18a**), sodass längere Versuche in Einzelfällen möglich sind. Langzeitversuche würden auch eher dem Therapiekonzept der klinischen Studie von Thomas *et al.* mit mehreren Zyklen APA entsprechen¹⁰.

Schließlich könnten die *in vivo* Effekte bei AML Patienten unter Therapie mit APA ermittelt werden. Unter Verwendung der bereits etablierten Tests und FACS-Marker könnten Zellen von Patienten vor und nach Therapie untersucht werden.

6. Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Kombinationstherapie APA bei einem Teil von non-APL-AML zur Ausdifferenzierung der Blasten *in vitro* führen konnte. APA wirkte außerdem gemittelt über alle zehn AML Proben zytoreduktiv. Für die zytomorphologisch differenzierten Zellen konnte gezeigt werden, dass sie funktionell aktiv sind. Das bedeutet, dass APA die Leukozytenzahl erniedrigt und gleichzeitig zur Bildung funktionsfähiger Immunzellen führen kann. Somit konnten die in der klinischen Anwendung erkannten Wirkungen in einem Teil der AML *in vitro* bestätigt werden. Durch Behandlung mit APA konnten verschiedene AML Subtypen erfolgreich behandelt werden.

Wie bereits oben beschrieben können weitere *in vitro* Untersuchungen mehr Aufschluss über die genaue Wirkungsweise der Medikamentenkombination APA geben. Auch die Erforschung weiterer, ähnlicher Substanzen ist möglich.

Da nicht jede AML auf die Behandlung mit APA *in vitro* angesprochen hat, müssen weitere Untersuchungen folgen, um Prädiktoren für die Wirksamkeit von APA zu identifizieren. Unter anderem dazu dient die geplante multizentrische klinische Studie (AMLSG 26-16 / AML-ViVA / NCT02942758), in der die Wirksamkeit der Kombination aus niedrig-dosiertem AZA, PGZ und ATRA im randomisierten Vergleich zu standard-dosiertem AZA getestet werden soll. Bei der geplanten Fallzahl von 38 Patienten im experimentellen Arm können womöglich sicherere Aussagen zu genetischen Prädiktoren für das Ansprechen auf APA gemacht werden. Die Verträglichkeit von APA bei den klinischen Heilversuchen von Thomas *et al.* war verglichen mit konventionellen Chemotherapieregimen gut. Bei allen Patienten, die in diesem Rahmen mit APA behandelt wurden, traten jedoch hämatotoxische Nebenwirkungen (Neutropenie, Thrombopenie, Anämie) auf. In der geplanten klinischen Studie können die Nebenwirkungen unter APA-Therapie mit denen unter Standardtherapie mit AZA bei einer größeren Stichprobengröße verglichen werden. Schwere Nebenwirkungen wie das ATRA Differenzierungs-Syndrom, welches bei ATRA-Therapie der APL selten auftritt^{69,70}, könnten allerdings therapiebegrenzend sein.

Folglich sind noch viele weitere Untersuchungen nötig, um die Sicherheit und Wirksamkeit von APA zu beurteilen. Die klinischen Heilversuche von Thomas *et al.* und die *in vitro* Versuche in dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Dreifachtherapie aus All-*trans*-Retinsäure, Pioglitazon und 5-Azacytidin in Zukunft eine mögliche Therapie für ältere und komorbide Patienten mit akuter myeloischer Leukämie werden könnte.

7. Zitatregister

1. Röllig, C. *et al.* Akute Myeloische Leukämie (AML) Leitlinie. *DGHO Dtsch. Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkol. e.V.* (2018). at <https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/aml>
2. NCI's Division of Cancer Control and Population Sciences [Internet]. Surveillance Research Program. *Age-adjusted SEER Incidence Rates by age at diagnosis/death. All sites, all races, both sexes. 1975-2012 (SEER 9)* (2012). at <http://seer.cancer.gov/faststats/selections.php?series=cancer>
3. Juliusson, G. *et al.* Age and acute myeloid leukemia : real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood* **113**, 4179–4187 (2009).
4. Herold, G. Herold Innere Medizin. 95 ff. (2017).
5. Döhner, H., Weisdorf, D. J. & Bloomfield, C. D. Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1136–52 (2015).
6. Wörmann, B. *et al.* Akute Promyelozyten Leukämie (APL) Leitlinie. *DGHO Dtsch. Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkol. e.V. Alexanderplatz* (2018). at www.onkopedia.com
7. Chim, C. *et al.* All-trans retinoic acid (ATRA) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL). *Hematol Oncol.* **14(3)**, 147–154 (1996).
8. Schenk, T., Stengel, S. & Zelent, a. Unlocking the potential of retinoic acid in anticancer therapy. *Br. J. Cancer* **111**, 2039–2045 (2014).
9. Ivanoff, S. *et al.* 5-Azacytidine treatment for relapsed or refractory acute myeloid leukemia after intensive chemotherapy. *Am. J. Hematol.* **88**, 601–605 (2013).
10. Thomas, S. *et al.* Biomodulatory therapy induces complete molecular remission in chemorefractory acute myeloid leukemia. *Haematologica* **100**, e4-6 (2015).
11. Foucar, K., Reichard, K. & Czuchlewski, D. in *Bone Marrow Pathology* 376–431 (American Society for Clinical Pathology press, 2010).
12. Dombret, H. *et al.* International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. *Blood* **126**, 291–299 (2015).
13. Mussai, F. *et al.* Acute myeloid leukemia creates an arginase-dependent immunosuppressive microenvironment. *Blood* **122**, 749–758 (2013).
14. cellpharm STADA Arzneimittel. *Fachinformation (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels/SPC) ARA-cell.* (2014). at

- <<http://fachinformation.srz.de/pdf/cellpharm/ara-cell100mgmlkonzentrat.pdf>>
15. Döhner, H. *et al.* Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **115**, 453–474 (2010).
 16. Renate Lüllman-Rauch. *Taschenbuch der Histologie*. (Georg Thieme Verlag, 2009).
 17. Speckmann, E.-J., Hescheler, J. & Köhling, R. *Physiologie*. (Elsevier GmbH, 2008).
 18. Zhou, H. *et al.* CD11b/CD18 (Mac-1) is a novel surface receptor for extracellular double-stranded RNA to mediate cellular inflammatory responses. *J. Immunol.* **190**, 115–125 (2013).
 19. Edvardsson, L., Dykes, J., Olsson, M. L. & Olofsson, T. Clonogenicity, gene expression and phenotype during neutrophil versus erythroid differentiation of cytokine-stimulated CD34+ human marrow in vitro. *Br. J. Haematol.* **127**, 451–463 (2004).
 20. Zhang, C. C. & Lodish, H. F. *Cytokines regulating hematopoietic stem cell function. Current opinion in hematology* **15**, (2008).
 21. Dexter, T. M. Stromal cell associated haemopoiesis. *J. Cell. Physiol. Suppl.* **1**, 87–94 (1982).
 22. Rassow, J., Hauser, K., Netzger, R. & Deutzman, R. in *Duale Reihe Biochemie* 645 ff. (Georg Thieme Verlag, 2012).
 23. Friedman, A. D. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* **21**, 3377–3390 (2002).
 24. Zhang, D. E. *et al.* Function of PU.1 (Spi-1), C/EBP, and AML1 in early myelopoiesis: regulation of multiple myeloid CSF receptor promoters. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **211**, 137–147 (1996).
 25. Pahl, H. L. *et al.* The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter. *J. Biol. Chem.* **268**, 5014–5020 (1993).
 26. Fujiki, A. *et al.* All-trans retinoic acid combined with 5-Aza-2'-deoxycytidine induces C/EBPalpha expression and growth inhibition in MLL-AF9-positive leukemic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **428**, 216–223 (2012).
 27. Nutt, S. L., Metcalf, D., D'Amico, A., Polli, M. & Wu, L. Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. *J. Exp. Med.* **201**, 221–231 (2005).
 28. Sanchez, P. V, Glantz, S. T., Scotland, S., Kasner, M. T. & Carroll, M. Induced differentiation of acute myeloid leukemia cells by activation of retinoid X and liver X

- receptors. *Leukemia* **28**, 749–760 (2014).
29. Radomska, H. S. *et al.* CCAAT/Enhancer Binding Protein α is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4301–4314 (1998).
 30. Gombart, A. F. *et al.* Regulation of neutrophil and eosinophil secondary granule gene expression by transcription factors C/EBP ϵ and PU.1. *Blood* **101**, 3265–73 (2003).
 31. Kummalue, T. & Friedman, A. D. Cross-talk between regulators of myeloid development: C/EBP α binds and activates the promoter of the PU.1 gene. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 464–470 (2003).
 32. Hashimoto, K. *et al.* C/EBP α inactivation in FAK-overexpressed HL-60 cells impairs cell differentiation. *Cell. Signal.* **18**, 955–63 (2006).
 33. Wang, D., D’Costa, J., Civin, C. I. & Friedman, A. D. C/EBP α directs monocytic commitment of primary myeloid progenitors. *Blood* **108**, 1223–1229 (2006).
 34. Wang, Q.-F., Cleaves, R., Kummalue, T., Nerlov, C. & Friedman, A. D. Cell cycle inhibition mediated by the outer surface of the C/EBP α basic region is required but not sufficient for granulopoiesis. *Oncogene* **22**, 2548–2557 (2003).
 35. Murphy, K., Weaver, C., Mowat, A., Berg, L. & Chaplin, D. *Janeway’s Immunobiology*. (Garland Science, Taylor & Francis Group LLC, 2016).
 36. Kim, Y. K., Shin, J.-S. & Nahm, M. H. NOD-like receptors in infection, immunity, and diseases. *Yonsei Med. J.* **57**, 5–14 (2016).
 37. Falloon, J. & Gallin, J. I. Neutrophil granules in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **77**, 653–662 (1986).
 38. Murphy, K., Weaver, C., Mowat, A., Berg, L. & Chaplin, D. *Janeway’s Immunobiology*. (Garland Science, Taylor & Francis Group LLC, 2016).
 39. Murphy, K., Weaver, C., Mowat, A., Berg, L. & Chaplin, D. *Janeway’s Immunobiology*. (Garland Science, Taylor & Francis Group LLC, 2016).
 40. Hong, C.-W. Current Understanding in Neutrophil Differentiation and Heterogeneity. *Immune Netw.* **17**, 298 (2017).
 41. Schieber, M. & Chandel, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* **24**, R453–R462 (2014).
 42. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**, 730–737 (1997).
 43. Vardiman, J. W. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the

- hematopoietic and lymphoid tissues: An overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem. Biol. Interact.* **184**, 16–20 (2010).
44. Bennett, J. M. *et al.* Proposed Revised Criteria for the Classification of Acute Myeloid Leukemia. *Ann. Intern. Med.* **103**, 620–625 (1985).
 45. Sekeres, M. A. *et al.* Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. *Blood* **113**, 28–36 (2009).
 46. Lo-Coco, F. *et al.* Retinoic Acid and Arsenic Trioxide for Acute Promyelocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **369**, 111–121 (2013).
 47. Juliusson, G. *et al.* Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood* **113**, 4179–4187 (2009).
 48. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
 49. Rassow, J., Hauser, K., Netzger, R. & Deutzman, R. in *Duale Reihe Biochemie* 275 ff. (Georg Thieme Verlag, 2012).
 50. Altucci, L. & Gronemeyer, H. The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 181–193 (2001).
 51. Glass, C. K. & Ogawa, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 44–55 (2006).
 52. Petrie, K., Zelent, A. & Waxman, S. Differentiation therapy of acute myeloid leukemia: past, present and future. *Curr. Opin. Hematol.* **16**, 84–91 (2009).
 53. Melnick, a & Licht, J. D. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* **93**, 3167–3215 (1999).
 54. Sirulnik, A., Melnick, A., Zelent, A. & Licht, J. D. Molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia and APL variants. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **16**, 387–408 (2003).
 55. Grignani, F. *et al.* The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RAR alpha fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. *Cell* **74**, 423–431 (1993).
 56. Terris, B. *et al.* PML nuclear bodies are general targets for inflammation and cell proliferation PML nuclear bodies are general targets for inflammation and cell proliferation. *Cancer Res.* **55**, 1590–1597 (1995).
 57. Nason-Burchenal, K. *et al.* Interferon Augments PML and PML/RARa Expression in

- Normal Myeloid and Acute Promyelocytic Cells and Cooperates With. *Blood* **88**, 3926–3936 (1996).
58. Nisole, S., Maroui, M. A., Mascle, X. H., Aubry, M. & Chelbi-Alix, M. K. Differential roles of PML isoforms. *Front. Oncol.* **3**, 1–17 (2013).
 59. Grignani, F. *et al.* The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RAR alpha fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. *Cell* **74**, 423–431 (1993).
 60. Taraboletti, G. *et al.* Effect of all trans-retinoic acid (ATRA) on the adhesive and motility properties of acute promyelocytic leukemia cells. *Int. J. Cancer* **70**, 72–77 (1997).
 61. Nasr, R. *et al.* Eradication of acute promyelocytic leukemia-initiating cells through PML-RARA degradation. *Nat. Med.* **14**, 1333–1342 (2008).
 62. Zhu, J. *et al.* Retinoic acid induces proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and oncogenic RARalpha fusion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 14807–14812 (1999).
 63. Tanaka, N. *et al.* Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1. *Cell* **77**, 829–839 (1994).
 64. Matikainen, S., Ronni, T., Hurme, M., Pine, R. & Julkunen, I. Retinoic acid activates interferon regulatory factor-1 gene expression in myeloid cells. *Blood* **88**, 114–123 (1996).
 65. Chih, D. Y., Chumakov, A. M., Park, D. J., Silla, A. G. & Koeffler, H. P. Modulation of mRNA Expression of a novel human myeloid-selective CCAAT/Enhancer binding protein gene (C/EBPε). *Blood* **90**, 2987–2994 (1997).
 66. Song, G. *et al.* A novel PAD4/SOX4/PU.1 signaling pathway is involved in the committed differentiation of acute promyelocytic leukemia cells into granulocytic cells. *Oncotarget* **7**, 3144–3157 (2015).
 67. Chen, Q. & Ross, a. C. Retinoic acid regulates cell cycle progression and cell differentiation in human monocytic THP-1 cells. *Exp. Cell Res.* **297**, 68–81 (2004).
 68. Brooks, S. C., Kazmer, S., Levin, A. A. & Yen, A. Myeloid differentiation and retinoblastoma phosphorylation changes in HL-60 cells induced by retinoic acid receptor- and retinoid X receptor-selective retinoic acid analogs. *Blood* **87**, 227–237 (1996).
 69. DiNardo, C. D. *et al.* Differentiation syndrome in non-M3 acute myeloid leukemia treated with the retinoid X receptor agonist bexarotene. *Med. Oncol.* **25**, 299–302

- (2008).
70. Montesinos, P. *et al.* Differentiation syndrome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline chemotherapy: characteristics, outcome and prognostic factors. *Blood* **113**, 775–783 (2009).
 71. Frankel, S. R., Eardley, A., Lauwers, G., Weiss, M. & Warrell, R. P. The ‘retinoic acid syndrome’ in acute promyelocytic leukemia. *Ann. Intern. Med.* **117**, 292–296 (1992).
 72. Milligan, D. W., Wheatley, K., Littlewood, T., Craig, J. I. O. & Burnett, A. K. Fludarabine and cytosine are less effective than standard ADE chemotherapy in high-risk acute myeloid leukemia, and addition of G-CSF and ATRA are not beneficial: Results of the MRC AML-HR randomized trial. *Blood* **107**, 4614–4622 (2006).
 73. Burnett, A. K. *et al.* A comparison of low-dose cytarabine and hydroxyurea with or without all-trans retinoic acid for acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome in patients not considered fit for intensive treatment. *Cancer* **109**, 1114–1124 (2007).
 74. Lee, K.-H. *et al.* Differential gene expression in retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells, NB4 and HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**, 1125–1133 (2002).
 75. Breitman, T. R., Selonick, S. E. & Collins, S. J. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 2936–2940 (1980).
 76. Tsuchiya, S. *et al.* Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* **26**, 171–176 (1980).
 77. Quentmeier, H. *et al.* Cell line OCI/AML3 bears exon-12 NPM gene mutation-A and cytoplasmic expression of nucleophosmin. *Leukemia* **19**, 1760–1767 (2005).
 78. Gupta, K. *et al.* GSK3 is a regulator of RAR-mediated differentiation. *Leukemia* **26**, 1277–1285 (2012).
 79. Glasow, A. *et al.* DNA methylation-independent loss of RARA gene expression in acute myeloid leukemia. *Blood* **111**, 2374–2377 (2008).
 80. Fazi, F. *et al.* Heterochromatic gene repression of the retinoic acid pathway in acute myeloid leukemia. *Blood* **109**, 4432–4440 (2007).
 81. Di Croce, L. *et al.* Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science (80-.)*. **295**, 1079–1082 (2002).
 82. van Wely, K. H. M. *et al.* The MN1-TEL myeloid leukemia-associated fusion protein

- has a dominant-negative effect on RAR-RXR-mediated transcription. *Oncogene* **26**, 5733–5740 (2007).
83. Matsui, W. *et al.* Requirement for myeloid growth factors in the differentiation of acute promyelocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **128**, 853–862 (2005).
84. Sanchez, P. V, Glantz, S. T., Scotland, S., Kasner, M. T. & Carroll, M. Induced differentiation of acute myeloid leukemia cells by activation of retinoid X and liver X receptors. *Leukemia* **28**, 749–760 (2014).
85. Milella, M. *et al.* Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Invest.* **108**, 851–859 (2001).
86. Issa, J.-P. J., Kantarjian, H. M. & Kirkpatrick, P. Azacitidine. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 275–276 (2005).
87. Hofmann, W.-K. *et al.* Leitlinien zur Diagnostik und Therapie der Myelodysplastischen Syndrome der DGHO. (2013).
88. Wörmann, B., Hofmann, W.-K., Platzbecker, U. & Götze, K. Myelodysplastische Syndrome (MDS) Leitlinie. *DGHO Dtsch. Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkol. e.V.* (2018).
89. Issa, J.-P. Optimizing therapy with methylation inhibitors in myelodysplastic syndromes: dose, duration, and patient selection. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2**, S24–S29 (2005).
90. Stresemann, C., Bokelmann, I., Mahlkecht, U. & Lyko, F. Azacytidine causes complex DNA methylation responses in myeloid leukemia. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 2998–3005 (2008).
91. Ley, T. J. *et al.* 5-Azacytidine Selectively Increases γ -Globin Synthesis in a Patient with β^+ Thalassemia. *N. Engl. J. Med.* **307**, 1469–1475 (1982).
92. Ghoshal, K. *et al.* 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4727–4741 (2005).
93. Stresemann, C., Brueckner, B., Musch, T., Stopper, H. & Lyko, F. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res.* **66**, 2794–2800 (2006).
94. Hollenbach, P. W. *et al.* A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. *PLoS One* **5**, e9001 (2010).
95. Agrawal, S. *et al.* The C/EBPdelta tumor suppressor is silenced by hypermethylation

- in acute myeloid leukemia. *Blood* **109**, 3895–3906 (2007).
96. Jones, P. A. & Baylin, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 415–428 (2002).
 97. Mehdipour, P., Santoro, F. & Minucci, S. Epigenetic alterations in acute myeloid leukemias. *FEBS J.* **282**, 1786–1800 (2015).
 98. Plass, C., Oakes, C., Blum, W. & Marcucci, G. Epigenetics in Acute Myeloid Leukemia. *Semin. Oncol.* **35**, 378–387 (2008).
 99. Zhang, X., Li, B., Jonge, N. De, Björkholm, M. & Xu, D. The DNA methylation inhibitor induces telomere dysfunction and apoptosis of leukemia cells that is attenuated by telomerase over-expression. *Oncotarget* **6**, 4888–4900 (2015).
 100. Kiziltepe, T. *et al.* 5-Azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces ATR-mediated DNA double-strand break responses, apoptosis, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin and bortezomib against multiple myeloma cells. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 1718–1727 (2007).
 101. Scott, S. A. *et al.* 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) can relieve p21WAF1 repression in human acute myeloid leukemia by a mechanism involving release of histone deacetylase 1 (HDAC1) without requiring p21WAF1 promoter demethylation. *Leuk. Res.* **30**, 69–76 (2006).
 102. Nervi, C., De Marinis, E. & Codacci-Pisanelli, G. Epigenetic treatment of solid tumours: a review of clinical trials. *Clin. Epigenetics* **7**, 127 (2015).
 103. Silverman, L. R. *et al.* Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J. Clin. Oncol.* **20**, 2429–2440 (2002).
 104. Rossi, G., Pelizzari, A. M., Bellotti, D., Tonelli, M. & Barlati, S. Cytogenetic analogy between myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia of elderly patients. *Leukemia* **14**, 636–641 (2000).
 105. Xiang, L., Wang, R., Wei, J. & Cen, J. Retinoic acid receptor- β gene reexpression and biological activity in SHI-1 cells after combined treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine and all- trans retinoic acid. *Acta Haematol.* **133**, 279–286 (2015).
 106. Takeda Pharmaceutical. Fachinformation Actos 45mg Tabletten Pioglitazon.
 107. Gilles, P. S. & Dun, C. J. Pioglitazone. *Drugs* **60**, 333–343 (2000).
 108. Lehmann, J. M. *et al.* An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). *J. Biol. Chem.* **270**, 12953–12956 (1995).

109. Koeffler, H. P. Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ and Cancers. *Clin. Cancer Res.* **9**, 1–9 (2003).
110. Corton, C. J., Anderson, S. P. & Stauber, A. Central role of peroxisome proliferator-activates receptors in the actions of peroxisome proliferators. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicology* **40**, 491–518 (2000).
111. Saiki, M. *et al.* Pioglitazone inhibits the growth of human leukemia cell lines and primary leukemia cells while sparing normal hematopoietic stem cells. *Int. J. Oncol.* **29**, 437–443 (2006).
112. Chawla, A. *et al.* PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat. Med.* **7**, 48–52 (2001).
113. Chaffer, C. L., Thomas, D. M., Thompson, E. W. & Williams, E. D. PPAR γ -independent induction of growth arrest and apoptosis in prostate and bladder carcinoma. *BioMed Cent. Cancer* 1–12 (2006). doi:10.1186/1471-2407-6-53
114. Sigma Alderich GmbH. Pioglitazone hydrochloride Produktinformation. at <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/e6910?lang=de®ion=DE>
115. Szatmari, I. *et al.* Activation of PPARgamma specifies a dendritic cell subtype capable of enhanced induction of iNKT cell expansion. *Immunity* **21**, 95–106 (2004).
116. Bonetti, M. I. *et al.* Rosiglitazone promotes the differentiation of Langerhans cells and inhibits that of other dendritic cell types from CD133 positive hematopoietic precursors. *Histol. Histopathol.* **29**, 323–332 (2014).
117. Moore, K. J. *et al.* The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat. Med.* **7**, 41–47 (2001).
118. Bailey, S. T. & Ghosh, S. 'PPAR'ting ways with inflammation. *Nat. Immunol.* **6**, 966–967 (2005).
119. Nencioni, A. *et al.* Dendritic cell immunogenicity is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Immunol.* **169**, 1228–1235 (2002).
120. Rotondo, D. & Davidson, J. Prostaglandin and PPAR control of immune cell function. *Immunology* **105**, 20–22 (2002).
121. Zhang, X. & Young, H. A. PPAR and immune system - what do we know? *Int. Immunopharmacol.* **2**, 1029–1044 (2002).
122. Ricote, M., Li, A. C., Willson, T. M., Kelly, C. J. & Glass, C. K. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **391**, 79–82 (1998).
123. Jiang, C., Ting, A. T. & Seed, B. PPARgamma agonists inhibit production of monocyte

- inflammatory cytokine. *Nature* **391**, 82–86 (1998).
124. Konopleva, M. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor ligands are potent inducers of differentiation and apoptosis in leukemias. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 1249–1262 (2004).
 125. Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J. G. A., Thomazy, V. A. & Evans, R. M. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* **93**, 241–252 (1998).
 126. Boyd, A. L. *et al.* Acute myeloid leukaemia disrupts endogenous myelo-erythropoiesis by compromising the adipocyte bone marrow niche. *Nat. Cell Biol.* **19**, 1336–1347 (2017).
 127. Shah, P. & Mudaliar, S. Pioglitazone: side effect and safety profile. *Expert Opin. Drug Saf.* **9**, 347–354 (2010).
 128. Yasugi, E. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands stimulate myeloid differentiation and lipogenesis in human leukemia NB4 cells. *Dev. Growth Differ.* **48**, 177–188 (2006).
 129. Tabe, Y. *et al.* PPAR γ -active triterpenoid CDDO enhances ATRA-induced differentiation in APL. *Cancer Biol. Ther.* **6**, 1967–1977 (2007).
 130. Ding, Q., Jin, T., Wang, Z. & Chen, Y. Catalase potentiates retinoic acid-induced THP-1 monocyte differentiation into macrophage through inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 1568–1576 (2007).
 131. Testa, U. *et al.* PML/RARalpha+ U937 mutant and NB4 cell lines: retinoic acid restores the monocytic differentiation response to vitamin D3. *Cancer Res.* **54**, 4508–4515 (1994).
 132. Mittar, D., Paramban, R. & McIntyre, C. Flow Cytometry and high-content imaging to identify markers of monocyte-macrophage differentiation. *BD Biosci.* (2011). doi:papers3://publication/uuid/05466CA5-7EF6-409B-8CA3-30840B508BB3
 133. Mehta, K. & Lopez-Berestein, G. Expression of tissue transglutaminase in cultured monocytic leukemia (THP-1) cells during differentiation. *Cancer Res.* **46**, 1388–1395 (1986).
 134. Koefler, H. P. & Golde, D. W. Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science* **200**, 1153–1154 (1978).
 135. Furley, A. J. *et al.* Divergent molecular phenotypes of KG1 and KG1a myeloid cell lines. *Blood* **68**, 1101–1107 (1986).
 136. Drach, J., Lopez-Berestein, G., McQueen, T., Andreeff, M. & Mehta, K. Induction of

- differentiation in myeloid leukemia cell lines and acute promyelocytic leukemia cells by liposomal all-trans-retinoic acid. *Cancer Res.* **53**, 2100–2104 (1993).
137. Koefler, H. P., Billing, R., Lusic, A. J. & Sparkes, R. An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1). *Bloodjournal* **56**, 265–273 (1980).
 138. Tagliafico, E. *et al.* Identification of a molecular signature predictive of sensitivity to differentiation induction in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **20**, 1751–1758 (2006).
 139. Liu, L. *et al.* Knockdown of SALL4 enhances all-trans retinoic acid-induced cellular differentiation in acute myeloid leukemia cells. *J. Biol. Chem.* **290**, 10599–609 (2015).
 140. Muindi, J. R. F. *et al.* Clinical pharmacology of oral all-trans retinoic acid in patients with acute promyelocytic leukemia. *Cancer Res.* **52**, 2138–2142 (1992).
 141. Keller, J. R., Ortiz, M. & Ruscetti, F. W. Steel factor (c-kit ligand) promotes the survival of hematopoietic stem/progenitor cells in the absence of cell division. *Blood* **86**, 1757–1764 (1995).
 142. Ogawa, M. *et al.* Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.* **174**, 63–71 (1991).
 143. Metcalf, D. The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Science (80-)*. **229**, 16–22 (1985).
 144. Klco, J. M. *et al.* Genomic impact of transient low-dose decitabine treatment on primary AML cells. *Blood* **121**, 1633–1643 (2013).
 145. Giva, A. L. Flow Cytometry: An Introduction. *Flow Cytom. Protoc. Methods Mol. Biol. (Methods Protoc.* **699**, 1–29 (2011).
 146. Kansas, G., Muirhead, M. & Dailey, M. Expression of the CD11b/CD18, Leukocyte Adhesion Molecule 1, and CD44 Adhesion Molecules during normal myeloid and erythroid differentiation in humans. *Blood* **76**, 2483–2492 (1990).
 147. Zhou, H. *et al.* CD11b/CD18 (Mac-1) Is a Novel Surface Receptor for Extracellular Double-Stranded RNA To Mediate Cellular Inflammatory Responses. *J. Immunol.* **190**, 115–125 (2012).
 148. Beller, D. I., Springer, R. A. & Schreiber, R. D. Anti-Mac-1 selectivity inhibits the mouse and human type three complement receptor. *J. Exp. Med.* **156**, 1000–1009 (1982).
 149. Wright, S. D. & Jong, M. T. C. Adhesion-promoting receptors on human macrophages recognize Escherichia Coli by binding to lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **164**, 1876–1888 (1986).

150. Elghetany, M. T. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells, Mol. Dis.* **28**, 260–274 (2002).
151. Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. & Mathison, J. C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science (80-.)*. **249**, 1431–1433 (1990).
152. Kerr, M. A. & Stocks, S. C. The role of CD15-(Le^x)-related carbohydrates in neutrophil adhesion. *Histochem. J.* **24**, 811–826 (1992).
153. Crocker, P. R. & Varki, A. Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends Immunol.* **22**, 337–342 (2001).
154. De Propriis, M. S. *et al.* High CD33 expression levels in acute myeloid leukemia cells carrying the nucleophosmin (NPM1) mutation. *Haematologica* **96**, 1548–1551 (2011).
155. Nielsen, J. S. & McNagny, K. M. Novel functions of the CD34 family. *J. Cell Sci.* **121**, 3683–3692 (2008).
156. Peach, R. J. *et al.* Both extracellular immunoglobulin-like domains of CD80 contain residues critical for binding T cell surface receptors CTLA-4 and CD28. *J. Biol. Chem.* **270**, 21181–21187 (1995).
157. Murphy, K., Weaver, C., Mowat, A., Berg, L. & Chaplin, D. *Janeway's Immunobiology*. (Garland Science, Taylor & Francis Group LLC, 2016).
158. Zhou, L. J., Schwarting, R., Smith, H. M. & Tedder, T. F. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J. Immunol.* **149**, 735–742 (1992).
159. Lechmann, M., Berchtold, S., Steinkasserer, A. & Hauber, J. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol.* **23**, 273–275 (2002).
160. Hirota, S. *et al.* Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science (80-.)*. **279**, 577–580 (1998).
161. Ikeda, H. *et al.* Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukemia cells. *Blood* **78**, 2962–2968 (1991).
162. Ishida, M. *et al.* Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol. Lett.* **84**, 57–62 (2002).
163. Agata, Y. *et al.* Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol.* **8**, 765–772 (1996).
164. Chen, J., Jiang, C. C., Jin, L. & Zhang, X. D. Regulation of PD-L1: a novel role of pro-

- survival signalling in cancer. *Ann. Oncol.* **27**, 409–416 (2016).
165. Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. & Honjo, T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* **11**, 141–151 (1999).
166. Gao, Q. *et al.* Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **15**, 971–979 (2009).
167. Hamanishi, J. *et al.* Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 3360–3365 (2007).
168. Krupka, C. *et al.* Blockade of the PD-1/PD-L1 axis augments lysis of AML cells by the CD33/CD3 BiTE antibody construct AMG 330: reversing a T-cell-induced immune escape mechanism. *Leukemia* **30**, 480–491 (2016).
169. Murphy, K., Weaver, C., Mowat, A., Berg, L. & Chaplin, D. *Janeway's Immunobiology*. (Garland Science, Taylor & Francis Group LLC, 2016).
170. Meers, P. & Mealy, T. Phospholipid determinants for annexin V binding sites and the role of tryptophan 187. *Biochemistry* **33**, 5829–5837 (1994).
171. G Koopman, CP Reutelingsperger, GA Kuijten, RM Keehnen, ST Pals, and M. van O. Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. *Bloodjournal* **84**, 1415–1420 (1994).
172. Gille, C., Spring, B., Tewes, L., Poets, C. F. & Orlikowsky, T. A new method to quantify phagocytosis and intracellular degradation using green fluorescent protein-labeled *Escherichia coli*: Comparison of cord blood macrophages and peripheral blood macrophages of healthy adults. *Cytom. Part A* **69**, 152–154 (2006).
173. Palazzolo, A. M., Suquet, C., Konkell, M. E. & Hurst, J. K. Green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* as a selective probe for HOCl generation within neutrophils. *Biochemistry* **44**, 6910–6919 (2005).
174. Moore, M. A. *et al.* Influence of heat inactivation of human serum on the opsonization of *Streptococcus mutans*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **832**, 383–93 (1997).
175. Wang, H., Wang, F. & Wei, D. Impact of oxygen supply on rtPA expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3): ammonia effects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 249–259 (2009).
176. Volkmer, B. & Heinemann, M. Condition-Dependent cell volume and concentration of *Escherichia coli* to facilitate data conversion for systems biology modeling. *PLoS One*

- 6, 1–6 (2011).
177. Serrander, L. *et al.* NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem. J.* **406**, 105–114 (2007).
 178. Wald, D. N. *et al.* Identification of 6-benzylthioinosine as a myeloid leukemia differentiation-inducing compound. *Cancer Res.* **68**, 4369–4376 (2008).
 179. Fällman, M., Andersson, R. & Andersson, T. Signaling properties of CR3 (CD11b/CD18) and CR1 (CD35) in relation to phagocytosis of complement-opsonized particles. *J. Immunol.* **151**, 330–338 (1993).
 180. Barnes, T. C., Anderson, M. E., Edwards, S. W. & Moots, R. J. Neutrophil-derived reactive oxygen species in SSc. *Rheumatology* **51**, 1166–1169 (2012).
 181. Wittayalertpanya, S., Chompootaweep, S. & Thaworn, N. The pharmacokinetics of pioglitazone in Thai healthy subjects. *J. Med. Assoc. Thail.* **89**, 2116–2122 (2006).
 182. Pillay, J. *et al.* In vivo labeling with H₂O₂ reveals a human neutrophil lifespan of 5,4 days. *Blood* **116**, 625–627 (2010).
 183. Chen, Q. & Ross, C. A. Retinoic acid regulates cell cycle progression and cell differentiation in human monocytic THP-1 cells. *Exp. Cell Res.* **297**, 68–81 (2004).
 184. Nagao, T. Significance of bone marrow stromal cells in hematopoiesis and hematological disorders. *Tokai J. Cxperimental Clin. Med.* **20**, 121–130 (1995).
 185. Girmenia, C. *et al.* Infectious complications in patients with acute promyelocytic leukaemia treated with the AIDA regimen. *Leukemia* **17**, 925–930 (2003).
 186. Schlenk, R. F. *et al.* Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukemia. Results from the AMLSG Trial AML HD98B. *Haematologica* **94**, 54–60 (2009).
 187. Verhagen, H. J. M. P. *et al.* Primary acute myeloid leukemia cells with overexpression of EVI-1 are sensitive to all- trans retinoic acid. *Blood* **127**, 458–464 (2016).
 188. Emadi, A. *et al.* Presence of isocitrate dehydrogenase (IDH) mutations may predict clinical response to hypomethylating agents in patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* **124**, 3724 (2014).
 189. Cicconi, L. *et al.* PML-RAR α kinetics and impact of FLT3-ITD mutations in newly diagnosed acute promyelocytic leukaemia treated with ATRA and ATO or ATRA and chemotherapy. *Leukemia* **30**, 1987–1992 (2016).
 190. Miftakhova, R. *et al.* DNA methylation in ATRA-treated leukemia cell lines lacking a PML-RAR chromosome translocation. *Anticancer Res.* **32**, 4715–4722 (2012).
 191. Tsai, D. E. *et al.* Evidence of myeloid differentiation in non-M3 acute myeloid

-
- leukemia treated with the retinoid X receptor agonist bexarotene. *Cancer Biol. Ther.* **6**, 18–21 (2007).
192. Zhu, J. *et al.* Lineage restriction of the RARalpha gene expression in myeloid differentiation. *Bloodjournal* **98**, 2563–2567 (2001).
193. Purton, L. E. *et al.* RARgamma is critical for maintaining a balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *J. Exp. Med.* **203**, 1283–1293 (2006).
194. Flotho, C. *et al.* The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* **23**, 1019–28 (2009).
195. Issa, J. J. *et al.* Safety and tolerability of guadecitabine (SGI-110) in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia: a multicentre, randomised, dose-escalation phase 1 study. *Lancet Oncol.* **16**, 1099–1110 (2015).
196. Ito, S. *et al.* Long term maintenance of myeloid leukemic stem cells cultured with unrelated human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res.* **14**, 95–104 (2015).

8. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Ausdruck	Übersetzung
AML	acute myeloid leukemia	Akute Myeloische Leukämie
AML1	acute myeloid leukemia 1 protein	etwa: Akute Myeloische Leukämie Protein 1
APA	<u>all-trans</u> -retinoic acid + pioglitazone + 5-azacytidine	<u>All-trans</u> -Retinsäure + <u>Pioglitazon</u> + 5- <u>Azacytidin</u>
APC	antigen-presenting cell	Antigenpräsentierende Zelle
APL	acute promyelocytic leukemia	akute Promyelozyten Leukämie
ATRA	all-trans-retinoic acid	All-trans-Retinsäure
AZA	5-azacytidine	5-Azacytidin
Bcr-Abl	breakpoint cluster region-Abelson murin leukemia	-
BSC	best supportive care	bestmögliche, unterstützende Behandlung
c-Myc	cellular myelocytomatosis oncogene	etwa: zelluläres Myelocytomatose Onkogen
C/EBP α/ϵ	CCAAT/enhancer-binding-protein α/ϵ	CCAAT/Verstärker-Bindungsprotein α/ϵ
C/EBP-MUT	CCAAT/enhancer-binding-protein mutation	CCAAT/Verstärker-Bindungsprotein Mutation
CDDO	2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid	2-Cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-carbonsäure
CDX	cluster of differentiation X	etwa: Unterscheidungsgruppe X
CFU	colony-forming-unit	koloniebildende Einheit
CFU-E	colony-forming-unit erythrocyte	koloniebildende Einheit für Erythrozyten
CFU-G	colony-forming-unit granulocyte	koloniebildende Einheit für Granulozyten
CFU-GM	colony-forming-unit granulocyte/monocyte	koloniebildende Einheit für Granulozyten/Monozyten
CFU-M	colony-forming-unit	koloniebildende Einheit für Monozyten

	monocyte	
CFU-Meg	colony-forming-unit megakaryocyte	koloniebildende Einheit für Megakaryozyten
CFU-Meg/E	colony-forming-unit megakaryocyte/erythrocyte	koloniebildende Einheit für Megakaryozyten/Erythrozyten
CR	complete remission	komplette Remission
CSF	colony-stimulating factor	Kolonie stimulierender Faktor
DAC	5-aza-2'-deoxycytidine Syn. decitabine	5-Aza-2'-Deoxycytidin Syn. Decitabin
DC	dendritic cell	Dendritische Zelle
DMSO	dimethylsulfoxide	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
DNMTI	DNA methyltransferase inhibitor	DNA-Methyltransferase-Inhibitor
EV11	ecotropic virus integration site 1 protein homolog	etwa: ekotropische Virusintegrationsstelle 1 Proteinhomolog
FAB	French American British	etwa: Französisch-Amerikanisch-Britisch
FACS	fluorescence activated cell sorting	Durchflusszytometrie
Fc	fragment crystallisable	kristallisierbares Fragment
FCS	fetal calf serum	Fetales Kälberserum
FLT3-ITD	Fms-like tyrosine kinase – internal tandem repeat	etwa: Fms-ähnliche Tyrosinkinase – interne, kurz hintereinander auftretende Wiederholungen
FLT3-TKD	Fms-like tyrosine kinase – tyrosin kinase domain	etwa: Fms-ähnliche Tyrosinkinase – Tyrosinkinasedomäne
G-CSF	granulocyte colony- stimulating factor	Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor
GFP	green fluorescent protein	Grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	granulocyte monocyte colony-stimulating factor	Granulozyten Monozyten Kolonie stimulierender Faktor
GSK-3	glycogen synthase kinase 3	Glykogensynthasekinase 3
HBSS	Hank's balanced salt	Hank's gepufferte Salzlösung

	solution	
HLA	human leukocyte antigen	humanes Leukozytenantigen
HS	human serum	Humanserum
HSCT	haematopoietic stem cell transplantation	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
HSZ	haematopoietic stem cell	Hämatopoetische Stammzelle
IDH	isocytate dehydrogenase	Isocitratdehydrogenase
IDH-MUT	isocytate dehydrogenase mutation	Isocitratdehydrogenasemutation
IL-X	interleukin X	Interleukin X
IRF-1	interferon regulatory factor 1	Interferon Regulationsfaktor 1
IU	international unit	Internationale Einheit
K-HSZ	short-term haematopoietic stem cell	Kurzzeit Hämatopoetische Stammzelle
L-HSZ	long-term haematopoietic stem cell	Langzeit Hämatopoetische Stammzelle
LB-Medium	lysogeny broth medium	etwa: Lysogeny Broth Medium
LPZ	lymphoid progenitor cell	Lymphatische Progenitorzelle
LXR	liver X receptor	Leber X Rezeptor
M-CSF	monocyte colony- stimulating factor	Monozyten Kolonie stimulierender Faktor
MAP-Kinase	mitogen-activated protein kinase	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MDS	myelodysplastic syndromes	Myelodysplastische Syndrome
Meg	megakaryocyte	Megakaryozyt
Meta	metamyelocyte	Metamyelozyt
MHC	major histocompatibility complex	Haupthistokompatibilitätskomplex
MLL-PTD	MLL-partial tandem repeat	etwa: MLL-teilweise, kurz hintereinander auftretende Wiederholungen
MN1-TEL	meningeoma (disrupted in balanced translocation) 1 –	etwa: Meningeom (unterbrochen in balancierter Translokation) 1 –

	translocation-Ets-leukemia virus	Translokation-Ets-Leukämie-Virus
mpP	multipotent progenitor cell	mutipotente Progenitorzelle
MPZ	myeloic progenitor cell	myeloische Progenitorzelle
MUT	mutation	Mutation
My	myelocyte	Myelozyt
MyBl	myeloblast	Myeloblast
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydride	Nicotinamidadenindinukleotidphosphathyrid
NBT	nitro blue tetrazolium	Nitroblau-Tetrazolium
NOD-like receptor	nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor	etwa: Nukleotidbindender Oligomerisationsdomäne ähnlicher Rezeptor
NPM1-MUT	nucleophosmin mutation	Nukleophosminmutation
OD	optical density	Optische Dichte
PAD4	peptidylarginine desaminase 4	Peptidylarginindesaminase 4
PAMP	pathogen-associated molecular pattern	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	phosphate balanced saline	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	etwa: Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PD-1	programmed cell death protein 1	etwa: Programmierter Zelltod Protein 1
PD-L1	programmed cell death protein 1 ligand 1	etwa: Programmierter Zelltod Protein 1 Ligand 1
PGZ	pioglitazone	Pioglitazon
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetate	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PML	promyelocyte leukemia protein	Promyelozytenleukämie Protein
Pmy	promyelocyte	Promyelozyt
PPAR γ	peroxisome proliferator-	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ

	activated receptor γ	
PPRE	peroxisome proliferator-activated receptor response element	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor empfindlicher Bereich
PrE	proerythroblast	Proerythroblast
PRR	pathogen recognition receptor	Pathogen Erkennungsrezeptor
RAR $\alpha/\beta/\gamma$	retinoic acid receptor $\alpha/\beta/\gamma$	Retinsäurerezeptor $\alpha/\beta/\gamma$
RARE	retinoic acid receptor response element	Retinsäurerezeptor empfindlicher Bereich
Rb	retinoblastoma protein	Retinoblastom-Protein
rMFI	relative mean fluorescence intensity	relative mittlere Fluoreszenzintensität
ROS	reactive oxygen species	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	revolutions per minute	Umdrehungen pro Minute
RPMI Medium	Roswell Park Memorial medium	Roswell Park Memorial Institut Medium
RUNX1T1 syn. ETO	Runt-related transcription factor 1 translocation partner 1	etwa: Runt-bezogener Transkriptionsfaktor 1 Translokationspartner 1
RUNX-MUT	Runt-related transcription factor 1 mutation	Runt-bezogener Transkriptionsfaktor 1 Mutation
RXR $\alpha/\beta/\gamma$	retinoid X receptor $\alpha/\beta/\gamma$	Retinoid X Rezeptor $\alpha/\beta/\gamma$
SALL-4	Sal-like protein 4	etwa: Sal-ähnliches Protein 4
SCF	stem cell factor	Stammzellfaktor
Seg	segmented granulocyte	Segmentkerniger Granulozyt
SIGLEC	sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins	etwa: Sialinsäure-bindende Lektine vom Immunglobulintyp
Stab	band form granulocyte	Stabkerniger Granulozyt
TCR	T-cell receptor	T-Zell Rezeptor
TLR	Toll-like receptor	Toll-ähnlicher Rezeptor
TPO	thrombopoietin	Thrombopoietin
WHO	world health organisation	Weltgesundheitsorganisation

w/o
 μM

without
micromole per liter

ohne
Mikromol pro Liter

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Myelopoese	9
Abbildung 2: Knochenmarkausstrich eines Patienten mit AML.	14
Abbildung 3: <i>Hallmarks of cancer</i>	15
Abbildung 4: Chemische Struktur von ATRA.....	16
Abbildung 5: Chemische Struktur von AZA.	19
Abbildung 6: Chemische Struktur von PGZ-Hydrochlorid.	20
Abbildung 7: Modell zur Wirkungsweise von APA bei der Behandlung der AML.....	23
Abbildung 8: Konzentrationsabhängige Wirkung der Behandlung mit ATRA auf Zellwachstum und Apoptoserate bei THP-1 und KG-1 Zellen.....	51
Abbildung 9: Konzentrationsabhängige Wirkung der Behandlung mit ATRA auf Differenzierung von THP-1 und KG-1 Zellen	52
Abbildung 10: Konzentrationsabhängige Wirkung der Behandlung mit PGZ auf das Zellwachstum von THP-1 Zellen.	53
Abbildung 11: Konzentrationsabhängige Wirkung der Behandlung mit PGZ auf Differenzierung von THP-1 Zellen	54
Abbildung 12: Versuchsaufbau der Hauptversuche.....	57
Abbildung 13: Auswirkung der Behandlung mit ATRA bzw. APA auf Zelldichte und Apoptoserate von THP-1, KG-1 und KG-1a Zellen.	59
Abbildung 14: Auswirkung der Behandlung mit ATRA bzw. APA auf CD11b-Expression von THP-1, KG-1 und KG-1a Zellen.....	60
Abbildung 15: Auswirkung der Behandlung mit ATRA bzw. APA auf zytomorphologische Differenzierung bei THP-1 Zellen	61
Abbildung 16: Versuchsaufbau zur Ermittlung der Auswirkungen des Zytokinmilieus auf AML Blasten.	62
Abbildung 17: Auswirkung der Behandlung mit APA auf Zellwachstum und Apoptoserate bei ausgewählten AML Proben	65
Abbildung 18: Auswirkung der Behandlung mit APA auf Zelldichte und Apoptoserate bei zehn AML Proben an Tag 14	66
Abbildung 19: Auswirkung der Behandlung mit APA auf CD11b-Expression von zehn AML Proben an Tag 14.....	67
Abbildung 20: Auswirkung der Behandlung mit APA auf die Expression von ausgewählten Oberflächenmolekülen bei ausgewählten AML Proben	68

Abbildung 21: Auswirkung der Behandlung mit APA auf die zytomorphologische Differenzierung von UKR147 an Tag 14.....	70
Abbildung 22: Auswirkung der Behandlung mit APA auf zytomorphologische Differenzierung von acht AML Proben an Tag 14	71
Abbildung 23: Auswirkung der Behandlung mit APA auf die Entwicklung funktioneller Eigenschaften bei UKR101 und UKR110 an Tag 14	73
Abbildung 24: Auswirkung der Behandlung mit APA auf die Entwicklung funktioneller Eigenschaften bei sieben AML Proben.....	74

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten FACS-Marker.....	45
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten AML Proben.....	55
Tabelle 3: Übersicht über die Auswirkung der Behandlung mit APA an Tag 14 bei zehn AML Proben.....	76

11. Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name: Tim Johannes Steinberg
 Adresse: Bahnhofstraße 18, 93047 Regensburg
 Telefon: +49 176 57883741; +49 941 89962627
 E-Mail: tim.steinberg@medbo.de; tim.steinberg@yahoo.de
 Geburtsdatum & -ort: 21.03.1992, Fürth

Ausbildung

2011 – 2018 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
 08/2013 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, **Note 1,0**
 2015 – 2019 Arbeit an der experimentellen Doktorarbeit "Immunologische Untersuchungen zur biomodulatorischen Therapie der akuten myeloischen Leukämie"
 04/2017 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, **Note 1**
 06/2018 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, **Note 1**

Stipendien

2011-2018 Stipendiat des Max Weber-Programms des Freistaats Bayern
 2015 Promotionsstipendium im Rahmen der DFG geförderten Klinischen Forschergruppe 262
 2017 Auslandsstipendien des Max-Weber Programms für Auslandsaufenthalte in Schottland und Irland (Praktisches Jahr)

Publikationen

11/2018 Klobuch S, Steinberg T, Bruni E, Mirbeth C, Heilmeyer B, Ghibelli L, Herr W, Reichle A and Thomas S. Biomodulatory Treatment With Azacitidine, All-trans Retinoic Acid and Pioglitazone Induces Differentiation of Primary AML Blasts Into Neutrophil Like Cells Capable of ROS Production and Phagocytosis. *Front. Pharmacol.* 9:1380 (2018).

Berufliche Laufbahn

12/2018 - heute

Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für Neurologie der
Universität Regensburg am Bezirksklinikum Regensburg

12. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegen bringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionschrift niemals zustande gekommen wäre.

Mein Dank gilt zunächst Frau PD Dr. Thomas, meiner Doktormutter, für die Betreuung dieser Arbeit, der freundlichen Hilfe und der regelmäßigen, kritischen Diskussion meiner Forschungsergebnisse. Unsere Gespräche haben stets neue Impulse und Ideen erbracht und mich motiviert, meine Forschungsarbeit weiter voran zu treiben.

Weiterhin möchte ich herzlich bei Dr. Sebastian Klobuch, meinem wissenschaftlichen Betreuer, bedanken. Die enge und regelmäßige Betreuung insbesondere während meiner praktischen Arbeit haben mir geholfen, schnell die nötigen Arbeitstechniken zu erlernen. Deine sehr gründliche Arbeitsweise und kritische Denkart waren stets der Maßstab, an dem ich meine eigenen, wissenschaftlichen Fähigkeiten gemessen habe.

Ich danke weiterhin Carina Mirbeth, biologisch-technische Assistentin in der Arbeitsgruppe Thomas, für die viele Zeit, die du mir bei meinen zahlreichen Experimenten geopfert hast. Ohne dich wären insbesondere die umfangreichen Experimente in der Schlussphase meiner Arbeit nicht in dem Maße und in dieser kurzen Zeit möglich gewesen.

Weiterhin möchte ich Frau Mareile Siebörger, Frau Dr. Kathrin Hammon, Frau Dr. Sarah Vatter und Herrn Dr. Michael Zwerger danken, auf deren Hilfe ich stets zählen konnte.

Danken möchte ich auch Frau Dr. Evelyn Orsó, Herrn PD Dr. Nils Schaft, Herrn Dr. Michael Rehli und Herrn Jakob Bösch für die freundlicherweise zur Verfügung gestellten Zellen.

Mein Dank gehört außerdem meinen Mitstudenten, die mich im Rahmen des Studiums begleitet und moralisch unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank aber gilt meinen Vater Prof. Bodo Plachter, der mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglichte und dem ich diese Arbeit widme.