

**Histon-Lysin-Demethylase 1A
(KDM1A)-unabhängige Wirkung des
KDM1A-Inhibitors SP2509 auf akute
myeloische Leukämie-, Ewing-Sarkom-
und Prostatakarzinomzellen**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades**

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Miriam Agnes Zimmermann
geboren am 23. Oktober 1993 in Mellrichstadt**

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Paul-Gerhardt Schlegel, Leiter der Pädiatrischen Onkologie, Hämatologie und Stammzelltransplantation der Universitäts-Kinderklinik Würzburg
2. Prof. Dr. med. James Friderich Beck, Direktor der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Jena
3. Prof. Dr. med. Ingo Müller, Ärztlicher Leiter der Sektion für Pädiatrische Stammzelltransplantation und Immunologie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf

Datum der öffentlichen Verteidigung: 03.12.2018

Datum der Ärztlichen Prüfung: 26.11.2019

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht:

Sonnemann J, Zimmermann M, Marx C, Ebert F, Becker S, Lauterjung M-L, Beck JF. LSD1-independent effects of the LSD1 inhibitor SP2509 in cancer cells. *British Journal of Haematology* 2017, zur Veröffentlichung angenommen, DOI: 10.1111/bjh.14983.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	9
2. Einleitung	11
2.1. Epigenetische Grundlagen	11
2.2. Histon-Lysin-Demethylasen	11
2.2.1. LSD-Familie	12
2.2.2. Jumonji C-Familie	14
2.2.3. Bedeutung der Histon-Lysin-Demethylase KDM1A bei der Kanzerogenese	15
2.2.3.1. Bedeutung der KDM1A bei Leukämien	16
2.2.3.2. Bedeutung der KDM1A beim Ewing-Sarkom	17
2.2.3.3. Bedeutung der KDM1A beim Prostatakarzinom	18
2.3 Inhibitoren der Histon-Lysin-Demethylase KDM1A	19
2.3.1. SP2509	19
2.3.2. ORY-1001	20
2.3.3. GSK2879552	20
2.3.4. Tranylcypromin	21
2.4. Akute myeloische Leukämie	21
2.4.1. Epidemiologie	21
2.4.2. Ätiologie und Formen	22
2.4.3. Risikofaktoren	22
2.4.4. Symptome	22
2.4.5. Diagnostik	23
2.4.6. Therapie	24
2.4.7. Prognose	25
2.5. Ewing-Sarkom	25
2.5.1. Epidemiologie	25
2.5.2. Ätiologie und Formen	25
2.5.3. Risikofaktoren	26
2.5.4. Symptome	26
2.5.5. Diagnostik	26
2.5.6. Therapie	27
2.5.7. Prognose	28

2.6. Prostatakarzinom	28
2.6.1. Epidemiologie.....	28
2.6.2. Ätiologie und Formen	28
2.6.3. Risikofaktoren	29
2.6.4. Symptome	29
2.6.5. Diagnostik	29
2.6.6. Therapie	29
2.6.7. Prognose	30
3. Ziel der Arbeit	31
4. Methodik	32
4.1. Material	32
4.1.1. Geräte und Arbeitsmittel	32
4.1.2. Zelllinien	33
4.1.2.1. MOLM-13.....	33
4.1.2.2. THP-1	34
4.1.2.3. SK-ES-1.....	34
4.1.2.4. A673	34
4.1.2.5. PC-3	34
4.1.2.6. DU-145	35
4.1.2.7. HAP1	35
4.1.2.8. HAP1-KDM1A.....	35
4.1.2.9. Reagenzien für die Zellkultur.....	35
4.1.3. Reagenzien	36
4.2. Methoden	37
4.2.1. Zellkultivierung	37
4.2.1.1. Auftauen und Kultivieren der Zellen	37
4.2.1.2. Zellpassage	37
4.2.1.3. Ermittlung der Zellzahl und Vitalität	38
4.2.1.4. Erhaltung der Zellkultur	38
4.2.2. Aussäen der Zellen	39
4.2.3. Wirkstoffbehandlung	39
4.2.4. Durchflusszytometrie.....	40
4.2.4.1. Mitochondriales Membranpotential und Zelltod	41
4.2.4.2. Kompensation.....	41

4.2.4.3. Vorbereitung und Durchführung der FACS-Analyse	42
4.2.5. AlamarBlue®-Assay	43
5. Ergebnisse	44
5.1. MOLM-13.....	44
5.2. THP-1	46
5.3. SK-ES-1	47
5.4. A673	49
5.5. DU-145	50
5.6. PC-3.....	52
5.7. HAP1 und HAP1-KDM1A	53
6. Diskussion	57
7. Schlussfolgerung.....	63
8. Literatur- und Quellenverzeichnis.....	65
9. Anhang	71
9.1. Danksagung.....	73
9.2. Lebenslauf	74
9.3. Ehrenwörtliche Erklärung.....	74

Abkürzungsverzeichnis

$\Delta\psi_m$	mitochondriales Membranpotential
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APL	akute Promyelozytenleukämie
ATRA	<i>all-trans</i> -Retinsäure
BRD	Bundesrepublik Deutschland
CSL	<i>DNA-binding protein LAG-1</i>
D-LDH	Laktat-Dehydrogenase
DiOC ₆ (3)	3'3-Dihexyloxacarbocyaniniodid
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT1	DNA-Methyltransferase 1
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFS	ereignisfreies Überleben
ELL	Elongationsfaktor RNA Polymerase II
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fe ²⁺	Eisen
FKS	fetales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
GO	Glucose-Oxidase
i. p.	intraperitoneal
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IL411	<i>Interleukin-4-induced gene 1</i>
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
KDM	Histon-Lysin-Demethylase
KMT	Histon-Lysin-Methyltransferase
LPAR6	<i>lysophosphatidic acid receptor 6</i>
MAO	Monoaminoxidase
miRNA	<i>micro</i> Ribonukleinsäure
MLL	<i>mixed-lineage leukemia</i>

MYPT1	<i>myosin phosphatase target subunit 1</i>
NPM1	Nucleophosmin 1
NuRD	Nucleosom-Remodeling und Histondeacetylase
OS	Gesamtüberleben (<i>overall survival</i>)
p. o.	per os
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI	Propidiumiodid
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
pTEFb	<i>positive transcription elongation factor</i>
PXN	fokalen Adhäsionsadapterproteinen
RPMI	Zellkulturmedium, am Roswell Park Memorial Institute entwickelt
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
shRNA	<i>small hairpin</i> Ribonukleinsäure
siRNA	<i>small interfering</i> Ribonukleinsäure
SSC	<i>side scatter</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
VEGF-A	<i>vaskulär endothelialen growth factor</i>

1. Zusammenfassung

In der aktuellen Krebsforschung hat sich herauskristallisiert, dass epigenetische Veränderungen einen wesentlichen Anteil an neoplastischen Transformationen haben. In die Epigenetik eingreifende Enzyme sind mithin potentiell aussichtsreiche neue Angriffspunkte in der Therapie von Krebserkrankungen. Eine erst kürzlich identifizierte Gruppe epigenetisch wirkender Enzyme sind die Histon-Lysin-Demethylasen, die Histone wie auch Nicht-Histon-Proteine demethylieren. Jüngere Forschungsergebnisse weisen dabei auf eine besondere Bedeutung der Histon-Lysin-Demethylase 1A (KDM1A) hin. Diese ist u. a. Teil von transkriptionsregulierenden Komplexen, welche mit Zelldifferenzierung und Karzinogenese assoziiert sind, und stellt somit einen interessanten Ansatzpunkt der Therapie von Tumorleiden dar. Inhibitoren der KDM1A, welche sich bereits jeweils in Phase 1-Studien zur Behandlung von akuter myeloischer Leukämie (AML) und von kleinzelligem Lungenkarzinom (SCLC) befinden, sind Tranylcypromin, ORY-1001 und GSK2879552. Ein weiterer KDM1A-Hemmstoff, dessen klinische Testung bevorsteht, ist SP2509.

Die Arbeitsgruppe des onkologischen Labors der Kinderklinik des Universitätsklinikums Jena befasst sich seit einiger Zeit mit diesen Inhibitoren. Hierbei wurden auffällige Inkongruenzen bei deren Wirkungen verzeichnet: Die KDM1A-Inhibitoren ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin zeigten keine bis geringe Wirkung auf die Zelltodrate und den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ während bei der Anwendung von SP2509 ein starker toxischer Effekt auf die Krebszellen beobachtet wurde. Da alle Wirkstoffe dasselbe Enzym hemmen, kamen erste Zweifel daran auf, dass der stark zytotoxische Effekt von SP2509 aus der KDM1A-Hemmung resultiert. In dieser Arbeit sollte darum geklärt werden, ob die Wirkung von SP2509 von der KDM1A-Inhibition abhängt. Hierfür wurden die vier Inhibitoren SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin an Prostatakarzinomzellen (DU-145, PC-3), AML-Zellen (MOLM-13, THP-1), Ewing-Sarkomzellen (SK-ES-1, A673) und einer KDM1A-Knockout-Zelllinie hinsichtlich ihrer Wirkung auf den Zelltod und des Verlustes von $\Delta\psi_m$ durchflusszytometrisch untersucht und verglichen. Zudem wurde die Zellviabilität mithilfe des Zytotoxizitätsassay AlamarBlue[®] bestimmt.

Die Ergebnisse der Versuche bestätigen die starke Wirkung von SP2509 bezüglich der Induktion von Zelltod, dem Verlust von $\Delta\psi_m$ und der Veränderung der

Zellviabilität an AML- und Ewing-Sarkomzellen. Im Gegensatz dazu hatten GSK2879552 und Tranylcypromin bei allen vier Zelllinien keine Wirkung auf den Zelltod und $\Delta\psi_m$, ORY-1001 nur bei der höchsten eingesetzten Konzentration bei THP-1- und A673-Zellen. Die Wirkung aller verwendeten KDM1A-Inhibitoren auf Prostatakarzinomzellen war gering.

Um die Diskrepanz zwischen der starken Wirkung von SP2509 im Vergleich zur schwachen der anderen Inhibitoren noch weiter zu evaluieren, wurden Versuche mit KDM1A-Knockout- und deren parentalen Zellen durchgeführt. Hierbei zeigten beide Zelllinien auf die Behandlung mit SP2509 beinahe identische Ergebnisse bezüglich Zelltod, Verlust von $\Delta\psi_m$ und Zellviabilität. Dies bestätigt, dass die zytotoxische Wirkung von SP2509 nicht aus der KDM1A-Hemmung resultiert, sondern der Wirkstoff noch andere zytotoxische Effekte haben muss, welche weiterer Forschung bedürfen.

2. Einleitung

2.1. Epigenetische Grundlagen

Jede Zelle eines Organismus besteht aus demselben genetischen Material, trotzdem sind nicht alle Zellen gleich. Sie unterscheiden sich in der biologischen Funktion, physikalischen Charakteristika und in der Fähigkeit der Integration von Umwelteinflüssen auf zellulärer Ebene. Diese Unterschiede entstehen vor allem durch epigenetische Modifikationen. Das sind Veränderungen wie DNA-Methylierungen, nicht-kodierende miRNAs und kovalente Histonmodifikationen, welche die Chromatinstruktur verändern. Zu den Histonmodifikationen zählt man u. a. Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung verschiedener Aminosäurereste (Arrowsmith et al. 2012). Diese posttranslationalen Modifikationen sind dynamische, reversible Prozesse, die physiologisch vorhanden sind, allerdings auch zur Aktivierung bestimmter Onkogene bzw. zur Unterdrückung einiger Tumorsuppressorgene führen können und so zur Entstehung von Krebs beitragen. Tumorleiden, metabolische und neuropsychologische Erkrankungen sowie Entzündungsreaktionen wurden bisher damit in Verbindung gebracht. Aufgrund der Reversibilität der Modifizierungen sind diese therapeutisch sehr interessant. Histon-Deacetylaseinhibitoren sind bereits zur Therapie von hämatologischen Krebserkrankungen im klinischen Einsatz (Arrowsmith et al. 2012, Sharma et al. 2010).

2.2. Histon-Lysin-Demethylasen

Die Histon-Methyltransferasen (KMT) und -Demethylasen (KDM) sind epigenetische Modulatoren, die den Methylierungsgrad an Lysin- und Argininresten verändern (Tian et al. 2013). Lysinreste können mono-, di- und trimethyliert werden, Argininreste nur mono- und dimethyliert. Da Methyllysine neutral geladen sind, bleibt die Chromatinstruktur unverändert. So führt allein ein anderer Methylierungsstatus nicht zu einer Transkriptionsveränderung. Vielmehr dienen die Methylgruppen als Bindungsstellen für Proteine, die Regulatorproteine rekrutieren oder das Nukleosom komprimieren. Hieraus wiederum kann eine veränderte Transkription mit

Krankheitsentstehung folgen (Arrowsmith et al. 2012, Hojfeldt et al. 2013). Entscheidend ist auch der Aminosäurerest an dem der Methylierungsgrad modifiziert wird. Eine Trimethylierung (Me₃) an Lysin (K) 4 des Histons H3 (H3K4Me₃) führt beispielsweise zu einer Transkriptionsaktivierung, während diese an Lysin 9 desselben Histons (H3K9Me₃) zur Repression des Genpromoters führt (Florea et al. 2011).

Die KDM1A, auch LSD1, AOF 2, KIAA0601 und BHC 110 genannt, ist die als erstes entdeckte Lysin-Demethylase. Durch sie wurde die Hypothese widerlegt, dass Histon-Methylierungen irreversibel seien (Wigle und Copeland 2013, Hojfeldt et al. 2013). Sie katalysiert die Demethylierung mono- und dimethylierter Lysinreste am Lysin 4 und 9 des Histons H3 (H3K4Me₁, H3K4Me₂, H3K9Me₁ und H3K9Me₂). Inzwischen werden zwei große Familien der KDMs unterschieden, nämlich die Flavin-abhängige LSD-Familie und die Fe²⁺- und α -Ketoglutarat-abhängige JumonjiC-Familie. KDMs können neben Histonen auch andere Proteine demethylieren.

2.2.1. LSD-Familie

Zur LSD (lysine specific demethylase)-Familie gehören die beiden Lysin-spezifischen Demethylasen KDM1A und KDM1B (auch LSD2 oder AOF1 genannt). KDM1A katalysiert die Demethylierung von H3K4 und H3K9, KDM1B nur von H3K4. Das katalytische Zentrum beider Enzyme wird durch eine Aminooxidase-ähnliche Domäne gebildet (Hojfeldt et al. 2013). Die Bindung mit dem basischen N-Terminus des Histons ist durch die saure Oberfläche der Substratbindungstasche möglich (Chen et al. 2006). Für die Reaktion wird zudem der Cofaktor Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) als Elektronenüberträger benötigt (Arrowsmith et al. 2012). Da hier nur ein Elektronenpaar verfügbar ist, können KDM1A und -1B nur mono- und dimethylierte Lysinreste demethylieren (Chen et al. 2006). Die FAD-bindende Subdomäne zeigt große Ähnlichkeit mit der von anderen Aminooxidasen, die Substrat-bindende Domäne ist allerdings sehr viel größer als bei anderen FAD-abhängigen Enzymen. Bei der Substraterkennung kommt der Ladung des N-terminalen Histonschwanzes und dessen Länge eine Schlüsselrolle zu. Kovalente Histomodifikationen an benachbarten Peptidresten, die die Ladung des Histonendes beeinflussen, werden von der KDM1A erkannt. Ist der Lysinrest neutral geladen, beispielsweise durch Acetylierung, sinkt die Affinität der KDM1A zur Aminosäure. Ist

diese negativ geladen, wird das Enzym komplett suprimiert. Zudem muss die Aminosäuresequenz eine ausreichende Länge haben, um gebunden werden zu können. Kommt es dann zur Substratbindung, werden mono- und dimethylierte Lysinreste mit gleicher Wirkstärke demethyliert (Forneris et al. 2005).

Zudem haben die beiden Demethylasen die SWIRM-Domäne (auch SWI3, RSC8 and Moira genannt), die einzigartig für Chromatin-assoziierte Proteine ist und Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht. Somit können Komplexe gebildet werden (Forneris et al. 2007). Die katalytische Aktivität der Enzyme kann hiermit durch Interaktionspartner beeinflusst werden. Beispielsweise kann die KDM1A über die SWIRM-Domäne zusammen mit dem Androgen-Rezeptor interagieren. Es wird vermutet, dass die Veränderung der Substratspezifität durch die Interaktion dieser Domäne kontrolliert wird. Als weitere Substrate wurden Nicht-Histon-Proteine entdeckt, wie beispielsweise die Transkriptionsfaktoren p53 und E2F1, sowie die DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) (Hojfeldt et al. 2013), MYPT1 und STAT3 (Theisen et al. 2016). p53 wird durch die KDM1A demethyliert und kann in diesem monomethylierten Zustand nicht mit dem Koaktivator 53BP1 interagieren, somit wird die Apoptose verhindert. Durch Beeinflussung der Proteinstabilität von E2F1 kann die KDM1A auch in Tumorzellen ohne p53 den Zellschaden-induzierten Zelltod verhindern. Ein KDM1A-Knockout in embryonalen Zellen zeigte zudem eine starke Verminderung der DNMT1 und fehlende DNA-Methylierungen (Amente et al. 2013, Theisen et al. 2016).

Da keine Ähnlichkeit der Sequenzen zwischen den demethylierten Histonen und Nicht-Histon-Proteinen besteht und trotzdem eine große Spezifität der KDMs für die jeweiligen Histonden vorhanden ist, wird stark vermutet, dass die Nicht-Histon-Demethylierungen nur mit Interaktionspartnern möglich sind (Hojfeldt et al. 2013).

Um Weiteres über die biologische Funktion der einzelnen Histon-Lysin-Demethylasen zu erfahren, wurde das Verhalten und die Entwicklung bei charakteristischen Knockout-Mäusen evaluiert. Hierbei wurde herausgefunden, dass die KDM1A für die Gastrulation der Embryonalentwicklung wichtig ist. Eine Depletion in dem Enzym ist embryonal letal (Wang et al. 2009), ebenso die Deletion der KDM1B (Ciccione et al. 2009). Von der KDM1A existieren vier Isoformen mit jeweils unterschiedlichen Histon-Demethylierungsaktivitäten und verschiedenen Affinitäten zu CoREST (Wada et al. 2015).

2.2.2. Jumonji C-Familie

Die zweite Gruppe, die Jumonji C-Familie, der KDMs sind charakterisiert durch ihre katalytische Jumonji C (JMJC)-Domäne. Diese Domäne wurde bisher in 31 humanen Proteinen entdeckt, 17 davon zeigen eine Histon-demetylierende Aktivität (Hojfeldt et al. 2013). Sie bindet Fe^{2+} und α -Ketoglutarat, was sie als Cofaktoren benötigt (Krishnan und Trievel 2013). Diese reagieren mit Dioxygen und bilden so ein hochaktives Oxoferryl-Intermediat, welches die ζ -Methylgruppe der methylierten Lysin-Substrate hydroxyliert. Das entstehende Lysylhalbaminal ist instabil und zerbricht. Hierdurch wird der Stickstoff von der Methylgruppe entfernt, welche nun in der Formaldehydform vorliegt. Eine Demethylierung von Mono-, Di- und Trimethylierung ist jetzt möglich. So können Enzyme der Jumonji C-Familie, im Gegensatz zu der LSD-Familie, auch Trimethylierungen auflösen.

Bisher sind sieben Subfamilien bekannt, die Histone und andere Proteine an unterschiedlichen Lysinresten von verschiedenen Histonen demethylieren (Hojfeldt et al. 2013). Einzelne Jumonji C-Enzyme demethylieren auch Argininreste von Histonen und anderen Proteinen (Chang et al. 2007).

Auch für diese KDM-Familie wurden, zur Erforschung der biologischen Funktion, Experimente mit Knockout-Mäusen durchgeführt. Hierbei wurde beispielsweise herausgefunden, dass die KDM2B an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt ist (Fukuda et al. 2011), die KDM6A für die Herzentwicklung (Lee et al. 2012) und die KDM3B für das Wachstum benötigt wird (Liu et al. 2015). KDM4B und 4C sind bedeutend für die Stammzellfunktion und -differenzierung (Das et al. 2014, Loh et al. 2007). KDM4A-Knockout-Mäuse zeigten kardiale Anomalien. Eine Hochregulierung des Enzyms führte zu hypertropher Kardiomyopathie (Zhang et al. 2011). Dies sind einige von vielen Ergebnissen von Experimenten bei denen KDMs depletiert wurden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Deletionen größtenteils zu embryonaler oder perinataler Letalität führen (Kooistra und Helin 2012). Die Jumonji C-Enzyme sind an der Zellentwicklung, dem Verlauf des Zellzyklus, an der Transkriptionsregulation, der Stilllegung von Genen, der Erhaltung des Heterochromatinstatus und der X-chromosomalen Inaktivierung beteiligt (Cloos et al. 2008).

2.2.3. Bedeutung der Histon-Lysin-Demethylase KDM1A bei der Kanzerogenese

Krebs entsteht u. a. durch irreversible genetische Mutationen, welche zur Aktivierung von Onkogenen oder Inaktivierung von Tumor-Suppressorgenen führen. Ebenso kann eine veränderte Expression epigenetischer Regulatorproteine und Histone zur Krebsentstehung führen (Arrowsmith et al. 2012). Die KDM1A wurde als erste Histon-Demethylase im Jahre 2004 entdeckt (Shi et al. 2004). Eine Überexpression der KDM1A wurde bisher bei Prostatakarzinomen, undifferentiertem malignen Neuroblastom, Östrogen-Rezeptor-negativem Brustkrebs, Leukämien, Lungenkarzinomen und kolorektalen Karzinomen nachgewiesen (Hojfeldt et al. 2013, Sorna et al. 2013). Mit einer schlechten Prognose geht die KDM1A-Überexpression bei Prostata-, Brustkrebs und akuter myeloischer Leukämie (AML) einher (Wada et al. 2015, Fiskus et al. 2014).

Die KDM1A agiert als multifunktionelle Einheit in verschiedenen Komplexen, die Histone verändern können (Rudolph et al. 2013). Je nach Bindungspartner ändert sich die Substratspezifität und die Funktion. Die KDM1A kann sowohl transkriptionsaktivierend wie auch -reprimierend wirken (Metzger et al. 2005, Shi et al. 2003).

Die folgende Tabelle zeigt die Funktionen der Komplexe, in der die KDM1A agiert (Fu et. al. 2017):

Komplex	Funktion
<i>Repression:</i>	
NuRD	Nukleosomremodelling
TLX	Proliferationsregulierung von neuronalen Stammzellen
CtBP-CoREST	Unterdrückung der Wachstumshormonexpression in der Hypophyse
Core-BRAF35	Repression von neuronal-spezifischen Genen in nicht-neuronalen Geweben
HOTAIR/PRC2	Stillegung von HOX-Genen

<i>Aktivierung:</i>	
spLSD1/1	Kontrolle von Replikation, Imprinting und Heterochromatinausbreitung
AR	Aktivierung AR-abhängiger Gene
ER α	Aktivierung ER α -abhängiger Gene

2.2.3.1. Bedeutung der KDM1A bei Leukämien

Die KDM1A ist essentiell für das Selbsterneuerungspotential und die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen, wie in einem Experiment mit Knockout-Mäusen herausgefunden wurde (Kerenyi et al. 2013). Ein Knockdown der KDM1A im hämatopoetischen System führt zu einer beeinträchtigten Reifung der Blutzellen und einer Expansion undifferenzierter hämatopoetischer Stammzellen (Sprussel et al. 2012). Eine Überexpression der kürzesten Isoform der KDM1A führt zur Hochregulation der HoxA2-A10-Gene. Dies ist prädisponierend für eine leukämische Transformation. In gesunden hämatopoetischen Stammzellen ist die KDM1A nur schwach ausgeprägt, während bei vielen Leukämiezellen eine Überexpression vorhanden ist (Wada et al. 2015).

In kultivierten AML-Zellen wird durch die Hemmung der Demethylase die Bindung mit CoREST abgeschwächt. p21, p27 und CCAAT/Enhancer-Binding-Protein können vermehrt nachgewiesen werden. Die H3K4Me2-Methylierung führt zur Induktion der Expression von Genen, die mit der myeloischen Differenzierung assoziiert sind. Durch die KDM1A-Inhibition konnte das Koloniewachstum der AML-Zellen gehemmt werden (Fiskus et al. 2014). Zudem wurde durch die Hemmung in AML-Zellen eine Reaktivierung der all-*trans* retinoic acid (ATRA)-induzierten Differenzierung beobachtet (Hojfeldt et al. 2013). AML-Zellen, die resistent gegen die ATRA-Differenzierungstherapie sind, können durch Hemmung der KDM1A sensibilisiert werden (Schenk et al. 2012). Bei AML-Zellen mit MLL-AF9-Translokation erhält die Demethylase durch Verhinderung von Differenzierung und Apoptose das onkogene Programm aufrecht. Das Enzym ist hier Teil des MLL-Superkomplexes, der mit aktiver Transkription assoziiert wird (Harris et al. 2012). Ebenso ist sie Teil des ELL (*elongation factor RNA polymerase II*)-Komplexes, welcher pTEFb beinhaltet. pTEFb interagiert mit AF9 und AF4, den beiden häufigsten Fusionspartnern bei MLL

(Biswas et al. 2011). Eine Hemmung der KDM1A in menschlichen MLL-AF9-Leukämiezellen induziert Differenzierung (McGrath et al. 2016).

Die akute lymphoblastische T-Zell-Leukämie kann durch eine Mutation in Notch1 der T-Progenitorzellen entstehen. Hierbei führt ein aberrantes, kontinuierlich aktivierendes Signal von Notch1 zur onkogenen Transformation. Der DNA-Bindungsfaktor CSL unterdrückt die Notch-Zielgene in Abwesenheit von Notch, in Anwesenheit von Notch wird CSL zu einem Transkriptionsaktivator und die Proteine werden expremiert. Die KDM1A hat hier eine substratabhängige Wirkung. Wenn Notch nicht vorhanden ist, wirkt sie durch Demethylierung von H3K9Me2 als Coaktivator und die Notch-Zielgene werden kontinuierlich ausgelesen, was zur onkogenen Transformation führt. Inhibitionsversuche der KDM1A in T-ALL-Zellen zeigten eine Hemmung des Zellwachstums. Der Phenotyp der Zellen ähnelte dem von Zellen, bei denen Notch stillgelegt wurde (Amente et al. 2013).

2.2.3.2. Bedeutung der KDM1A beim Ewing-Sarkom

Das Ewing-Sarkom ist in 85 % der Fälle charakterisiert durch das Fusionsgen *EWSR1/FLI1*, welches durch eine chromosomale Translokation t(11;22)(q24;q12) entsteht und das EWS/FLI-Onkoprotein codiert (Theisen et al. 2016). Zudem sind teilweise andere Fusionsproteine in Ewing-Sarkomzellen zu finden wie EWS/ETS und EWS/ERG. EWS/FLI wirkt als Transkriptionsfaktor aktivierend sowie reprimierend und fördert so die Onkogenese (Sankar et al. 2014), u. a. durch Hemmung der mesenchymalen Differenzierung. In Ewing-Sarkomzellen wurden erhöhte Werte der KDM1A gemessen, eine prognostische Aussage kann man anhand des Wertes allerdings bei dieser Krebsart noch nicht treffen (Theisen et al. 2016). Es wurde verringerte Monomethylierung und vermehrte Di- und Trimethylierung an H3K9 festgestellt. Signifikante Veränderung des Methylierungsstatus an H3K4 konnten nicht nachgewiesen werden (Sankar et al. 2014). Die KDM1A hat ihre entscheidende Rolle in Ewing-Sarkomzellen im NuRD (Nucleosom-Remodeling und Histondeacetylase)-Komplex. Dieser bindet an EWS/FLI und unterstützt die Genrepression von *LOX* und *TGFBR2* (Theisen et al. 2016, Sankar et al. 2014). Durch die KDM1A-Hemmung konnten die reprimierten Gene *LOX* und *TGFBR2* (Sankar et al. 2013) bei Ewing-Sarkomzellen mit EWS/FLI oder EWS/ERG wieder hochreguliert werden (Theisen et al. 2016). Zudem konnte durch die Hemmung Apoptose induziert und die morphologischen, onkogenischen

Phenotypmodulationen unterbrochen werden. Ein signifikant reduziertes Tumorwachstum (Sankar et al. 2014) und verzögerte Tumorentstehung in vivo durch KDM1A-Inhibitor wurde nachgewiesen (Theisen et al. 2016).

2.2.3.3. Bedeutung der KDM1A beim Prostatakarzinom

Eine KDM1A-Überexpression geht beim Prostatakarzinom mit einer schlechten Prognose, Kastrationsresistenz (Gupta et al. 2016) und einem erhöhten Rezidivrisiko einher (Kashyap et al. 2013). Die KDM1A ist ein Koregulator des Androgenrezeptors (AR) und wirkt, in Anwesenheit dessen durch Liganden-induzierte Demethylierung von H3K9Me2/Me1, transkriptionsaktivierend. Beispielsweise wird so vermehrt Prostataspezifisches Antigen (PSA) exprimiert (Gupta et al. 2016, Wang et al. 2015). Die Interaktion der KDM1A mit dem AR fördert zudem die Expression von c-MYC. c-MYC wird assoziiert mit der Entstehung einer Kastrationsresistenz, mit epithelial-mesenchymaler Transition (EMT) und Docetaxel-Resistenz in Prostatakrebszellen (Gupta et al. 2016). Eine KDM1A-Überexpression korreliert auch mit einem erhöhten Vaskulär Endothelialen Growth Factor (VEGF-A). Durch eine siRNA-basierte Depletion der KDM1A in Prostatakrebszellen konnte die Androgen-induzierte VEGF-A-, PSA-, und Tmprss2-Expression blockiert werden. Tmprss2 führt in Prostatakarzinomzellen zu rekurrenten Genfusionen (Kashyap et al. 2013). Die KDM1A reguliert auch die Expression des LPAR6 (lysophosphatidic acid receptor 6) und die von fokalen Adhäsionsadapterproteinen (PXN). Durch eine Depletion in der KDM1A wurde eine erhöhte LPAR6-Expression beobachtet, welche zu gesteigerter Migration sowie zur Phosphorylierung von PXN führte (Ketscher et al. 2014). Eine Hemmung der Demethylase führt zudem zur Reduktion von c-MYC, zu sinkender Proliferation bei Androgen-abhängigen und -unabhängigen Prostatakarzinomzellen (Kashyap et al. 2013), zu einer verminderten Migration und Invasivität sowie einer Hemmung der EMT durch erhöhte E-Cadherin- und erniedrigte N-Cadherin- und Vimentinexpression (Gupta et al. 2016, Wang et al. 2015). Eine KDM1A-Hemmung durch Pargylin konnte zudem die PSA-Expression in vitro und in vivo senken und die Transition in von Androgen-abhängigen zum -unabhängigen Prostatakrebs verzögern (Wang et al. 2015).

2.3 Inhibitoren der Histon-Lysin-Demethylase KDM1A

Aufgrund der Überexpression der KDM1A in verschiedenen Krebsarten und den gut erforschten Wirkmechanismen ist die Hemmung ein vielversprechender Ansatzpunkt in der Krebstherapie (Hojfeldt et al. 2013). Das katalytische Zentrum der KDM1A ähnelt den Monoaminoxidasen MAO-A und MAO-B. Das wurde als Ansatzpunkt genutzt und irreversible MAO-Hemmer zur KDM1A-Inhibition verwendet. Sie wirken durch eine kovalente Bindung an FAD und der Aminooxidasedomäne. Diese Inhibitoren haben eine geringere Potenz, Selektivität und mehr Nebenwirkungen als später entwickelte Tranylcypromin- und Benzohydrazid-Derivate (Maes et al. 2015, Lee et al. 2006). Diese haben eine höhere Spezifität und Wirksamkeit (Mould et al. 2015, Arrowsmith et al. 2012). Die folgenden KDM1A-Inhibitoren wurden in dieser Arbeit verwendet.

2.3.1. SP2509

SP2509 ist ein reversibler, selektiver Inhibitor der Histon-Lysin-Demethylase KDM1A, der nicht zusätzlich die MAO-A, MAO-B, Laktat-Dehydrogenase D -LDH und Glucose-Oxidase GO hemmt. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) beträgt 13 nM. In vitro hemmt SP2509 die Bindung von KDM1A mit dem Corepressor CoREST, steigert H3K4Me3 und induziert p53, p21 und C/EBP α in AML-Zellen. Der Inhibitor hemmt signifikant das Koloniewachstum und steigert die Apoptoserate von Leukämiezellen (Fiskus et al. 2014). Zudem führt SP2509 auch zur Differenzierung und zu morphologischen Veränderung von kultivierten und primären AML-Blasten. An den AML-Zelllinien OCI-AML3, MOLM-13 und MV4-11 konnte ein synergistischer Effekt bezüglich der Zelltodrate durch SP2509 nach Behandlung mit Panobinostat, einem pan-HDAC-Inhibitor, beobachtet werden. In vivo wurde ein signifikant längeres Überleben von Mäusen, denen OCI-AML3-Zellen injiziert wurde, bei einer zusätzlichen SP2509-Behandlung (25 mg/kg i. p.), neben der Behandlung mit Panobinostat, nachgewiesen (Fiskus et al. 2014).

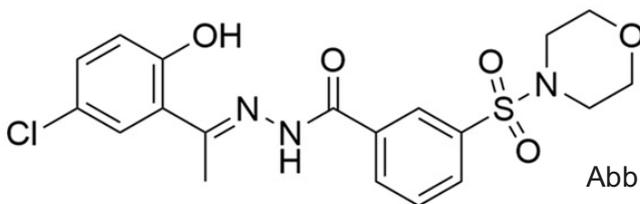


Abb. 1: Struktur von SP2509 (Song et al. 2016)

2.3.2. ORY-1001

ORY-1001 (RG-6016) ist ein hochselektiver, irreversibler KDM1A-Inhibitor (Mould et al. 2015) mit einer IC_{50} von <20 nM. Der Demethylase ähnelnde, FAD-abhängige Aminooxidasen (MAO-A/B, IL4I1) werden von ORY-1001 nicht gehemmt (Maes et al. 2013). In Zellen der Zelllinie THP-1 führt ORY-1001 zu einer Akkumulation von H3K4Me2 und ruft zudem eine Differenzierung der Zellen hervor. CD11b ist vermehrt nachzuweisen ($EC_{50} <1$ nM), der Phenotyp wird monozytenähnlich. Zudem induziert der Inhibitor Apoptose und verändert die Koloniestruktur der Leukämiezellen ($EC_{50} < 1$ nM). In vivo wurde an mit THP-1-Zellen transplantierten Nagetieren bei einer täglichen Wirkstoffgabe von $<0,02$ mg/kg per os eine signifikante Reduzierung des Tumorwachstums beobachtet. Eine sehr gute orale Bioverfügbarkeit ist zusätzlich nachgewiesen (Maes et al. 2013). ORY-1001 befindet sich in einer Phase 1-Studie für Patienten mit refraktärer bzw. rezidivierender akuter Leukämie (Eudra Clinical Trials Number: 2013-002447-29).

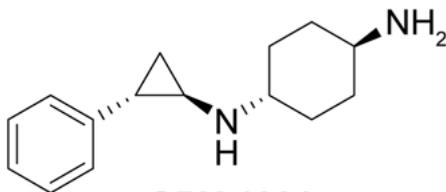


Abb. 2: Struktur von ORY-1001 (Morera et al. 2016)

2.3.3. GSK2879552

GSK2879552 ist ein selektiver, irreversibler KDM1A-Inhibitor mit einer IC_{50} von $1,7$ μ M. Bei 9 von 28 Zelllinien mit kleinzelligen Lungenkarzinomzellen (SCLC) wurde eine Hemmung des Wachstums durch GSK2879552 nachgewiesen (Mohammad et al. 2015). Bei Mäusen mit transplantierten SCLC-Zellen konnte nach Behandlung mit dem Inhibitor (1.5 mg/kg, p.o.) eine Reduzierung des Tumorwachstums um 17-83 % beobachtet werden. Auch bei 20 von 29 AML-Zelllinien konnte das Tumorwachstum um 40-100 % durch GSK2879552 verringert werden. Insgesamt wurden 165 verschiedene Zelllinien auf das Ansprechen des Inhibitors überprüft. Hierbei wurde herausgefunden, dass die meisten Zelllinien, bei denen eine Wachstumshemmung auszulösen war, eine DNA-Hypomethylierung zeigten. Der Wirkstoff ist oral bioverfügbar und befindet sich in Phase 1 der Arzneimittelzulassung für AML (ClinicalTrials.gov Identifiers: NCT02177812) und SCLC (NCT02034123) (Mohammad et al. 2015).

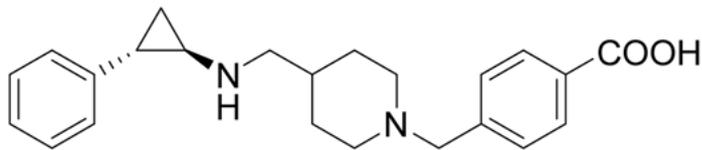


Abb. 3: Struktur von GSK2879552 (Morera et al. 2016)

2.3.4. Tranlycypromin

Tranlycypromin (2-PCPA) ist ein irreversibler Inhibitor der KDM1A (IC_{50} 20,7 μ M) und der Monoaminoxidasen (MAO-A IC_{50} 2,3 μ M; MAO-B IC_{50} 0,95 μ M). In embryonalen Teratokarzinomzellen der Zelllinie P19 wurde nach Behandlung mit Tranlycypromin eine vermehrte Methylierung von H3K4 beobachtet (Schmidt und McCafferty 2007, Yang et al. 2007). In der Kombination mit ATRA konnte eine starke Wachstumsreduzierung von AML-Zellen beobachtet werden (Schenk et al. 2012). Diese Kombination wird gegenwärtig in einer Phase 1-Studie in Patienten mit AML geprüft (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02273102).

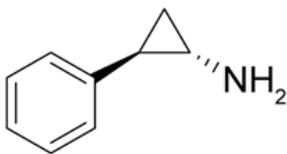


Abb. 4: Struktur von Tranlycypromin (Morera et al. 2016)

2.4. Akute myeloische Leukämie

2.4.1. Epidemiologie

Leukämien, bösartige Erkrankungen des blutbildenden Systems, sind mit fast 31 % aller bösartigen Neubildungen die häufigsten Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter. Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) stellt die häufigste, die AML mit fast 20 % die zweithäufigste Leukämie dar. Nach Angaben des Deutschen Kinderkrebsregisters in Mainz erkranken in Deutschland ungefähr 80 Kinder unter 15 Jahren und 110 Kinder unter 18 Jahren an AML. Die Krankheit kann in jedem Alter auftreten und ist im höheren Erwachsenenalter am häufigsten. Im Kindes- und Jugendalter erkranken die meisten in den ersten beiden Lebensjahren. Jungen leiden etwas häufiger an AML als Mädchen (Yiallouros 2016a).

2.4.2. Ätiologie und Formen

Die AML ist gekennzeichnet durch eine bösartige Entartung unreifer myeloischer Zellen im Knochenmark und einer folgenden unkontrolliert raschen Bildung unreifer Leukozyten. Erythrozyten und Thrombozyten können nicht mehr im notwendigen Umfang gebildet werden. Da verschiedene Arten myeloischer Vorläuferzellen betroffen sein können, gibt es unterschiedliche Subtypen der AML. Die häufigste akute myeloische Leukämie ist die aus den Myeloblasten hervorgehende Myeloblastenleukämie. Ebenfalls zur granulozytären Reihe gehört die seltene Promyelozytenleukämie. Zudem gibt es die Monoblastenleukämie, Mischformen der Myeloblasten- und Monoblastenleukämie, so genannte akute myelomonozytäre Leukämie, Erythroblastenleukämie und Megakaryozytenleukämie. Weitere Einteilungen können anhand der genetischen Veränderungen getroffen werden, welche für die Therapieplanung mit entscheidend sind (Yiallourous 2016a).

2.4.3. Risikofaktoren

Die Ursachen der AML sind weitgehend unbekannt, trotzdem gibt es einige untersuchte Faktoren, die die Entstehung begünstigen. Es wurde nachgewiesen, dass das Risiko an Leukämie zu erkranken leicht erhöht ist, wenn in der Familie diese Krankheit schon aufgetreten ist. Somit sind erbliche Veranlagungen vorhanden. Bestimmte genetische Erkrankungen wie beispielsweise Down-Syndrom, Fanconi-Anämie, Bloom-Syndrom, Neurofibromatose, familiäre Monosomie 7, Kostmann-Syndrom, Blackfan-Diamond-Anämie, Shwachman-Diamond-Syndrom und Li-Fraumeni-Syndrom erhöhen ebenso das Risiko einer AML-Erkrankung. Kinder mit einer schweren aplastischen Anämie sind auch einem erhöhten Risiko ausgesetzt. Weitere Risikofaktoren sind radioaktive Strahlen, Röntgenstrahlung in der Schwangerschaft, Strahlentherapie, Benzol und Zytostatika sowie Immunsuppressiva. Zudem belegen Studien den Einfluss von Rauchen, Alkohol- und Drogenkonsum während der Schwangerschaft auf die Entstehung einer akuten Leukämie (Yiallourous 2016a).

2.4.4. Symptome

AML ist durch einen raschen Verlauf mit frühzeitigem Auftreten von Symptomen gekennzeichnet. Sehr häufige Symptome (bei über 60 % der Patienten) sind

Müdigkeit, allgemeine Abgeschlagenheit, Lustlosigkeit, Krankheitsgefühl und Hautblässe. Zudem haben die Patienten sehr häufig Fieber und eine erhöhte Infektneigung. Aufgrund von Ansammlungen der Krebszellen in Leber und Milz kommt es zu Bauchschmerzen und Appetitlosigkeit. Häufig bis relativ häufig (20 bis 60 % der Patienten) sind Blutungsneigung ohne oder bei nur geringer Einwirkung von außen, blaue Flecken, Petechien, geschwollene zervikale, axilläre und inguinale Lymphknoten sowie Knochen- und Gelenkschmerzen. Selten (unter 20 % der Patienten) sind Kopfschmerzen, Sehstörungen, Erbrechen, Hirnnervpareesen, Dyspnoe bei Hyperleukozytose, Hautveränderungen, Myeloblastome, -sarkome und Gingivahyperplasie. Die AML führt unbehandelt innerhalb weniger Wochen bis Monate zum Tod (Yiallourous 2016a).

2.4.5. Diagnostik

Nach einem auffälligen Befund bei einer Anamnese und körperlichen Untersuchung, der für akute Leukämie sprechen könnte, wird ein Differentialblutbild erstellt. Dieses zeigt bei 80 % der Patienten einen Hämoglobin-Wert unter 10 g/dl (Norm: 10 und 16 g/dl). Die Leukozyten können vermehrt, aber auch vermindert auftreten. Bei der Leukozytopenie steht der Rückgang der Granulozyten im Vordergrund, während eine Leukozytose in der Regel auf eine erhöhte Zahl entarteter Myeloblasten zurückzuführen ist. Eine Hyperleukozytose kommt bei ungefähr 20 % der AML-Patienten vor. Neben normalen, reifen Zellen sind unreife Leukozytenvorstufen zu sehen, die normalerweise nur im Knochenmark vorkommen. Die Leukozytenzahl zum Diagnosezeitpunkt ist wichtig für die Risikoeinschätzung und Therapieplanung. Durch die Blutuntersuchung kann der Verdacht einer akuten Leukämie bestätigt werden, Diagnosesichernd ist allerdings erst die Knochenmarksuntersuchung. Hierfür müssen mehr als 20 % der kernhaltigen Zellen des Knochenmarks Blasten sein. Desweiteren werden Immunphänotypisierungen und zytogenetische Analysen durchgeführt. Zur Beurteilung eines Befalls des zentralen Nervensystems wird in der Regel der Liquor untersucht. Bei 5-10 % der AML-Patienten sind leukämische Zellen auch darin vorzufinden. Zudem wird der Befall von inneren Organen und Lymphknoten sonografisch untersucht. Zur weiteren Diagnostik sind Röntgenuntersuchungen, Magnetresonanz-, Computertomo-, Elektroenzephalo-, Knochenszinti-, Elektrokardio- und Echokardiographie möglich (Yiallourous 2016a).

2.4.6. Therapie

AML-Ersterkrankte werden nach genetischen Zellmerkmalen in drei Risikogruppen eingeteilt, welche in folgender Tabelle aufgeführt sind (Yiallourous 2016a).

Standardrisiko	Intermediäres Risiko	Hochrisiko
t(15;17) (FAB M3)	Patienten mit allen anderen Merkmalen	12p/t(2;12)
inv(16) (FAB M4eo)		isolierte Monosomie 7
t(8;21)		t(4;11)
normaler Karyotyp und NPM1-Mutation oder CEB-PA-Doppelmutation		t(6;11)
Down-Syndrom		t(10,11)
		t(6;9)
		t(7;12)
		t(9;22)
		t(5;11); NUP98/NSD1
		WT1mut/FLT-ITD
		komplexer Karyotyp

Die Intensität und Dauer der Chemotherapie, die Notwendigkeit einer Strahlentherapie oder einer Stammzelltransplantation sowie die Prognose der Erkrankung sind von der AML-Unterform, der Ausbreitung der Leukämiezellen im Körper und dem Therapieansprechen abhängig. Im Zentrum der Leukämietherapie steht die Chemotherapie mit der Kombination aus Cytarabin und einem Anthrazyklin, es können zudem weitere Zytostatika wie Etoposid oder Thioguanin zum Einsatz kommen. In wenigen Fällen kann diese mit Bestrahlungstherapie ergänzt werden. Bei Nichtansprechen oder einem Rezidiv ist meist eine Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender Stammzelltransplantation nötig. Als Supportivtherapie sind Transfusionen mit fehlenden Blutbestandteilen, häufig Erythrozyten und Thrombozyten, möglich. Zudem wird der Patient zur Vermeidung eines Tumorlyse-Syndroms hydriert und Allopurinol sowie Rasburicase verabreicht. Bei Hyperleukozytose können Austauschtransfusion oder Leukapherese durchgeführt

werden. Patienten mit akuter Promyelozytenleukämie (APL) sind von schweren Blutungskomplikationen bedroht und erhalten deshalb vor und während der Therapie ATRA (Yiallouros 2016a).

2.4.7. Prognose

Aufgrund von modernen Untersuchungs- und Behandlungsmethoden beträgt die Rate der Kinder die 5-Jahre-ereignisfrei (EFS) sind 57 ± 2 %. Prognoseentscheidend können auch genetische Merkmale sein. Eine relativ günstige Prognose gilt für die AML mit t(8;21), inv(16), t(15;17), t(1;11) sowie mit normalem Karyotyp und NPM1-Mutation (EFS 74 ± 3 %). Eine schlechte Prognose haben AML-Patienten mit t(4;11), t(5;11), t(6;11), t(10;11); t(6;9), t(7;12), t(9;22), Monosomie 7, kombinierte FLT3-ITD/WT1-Mutationen, der(12p)-Aberration und mit komplexem Karyotyp (EFS 30 ± 6 %) (Reinhardt et al. 2012). Etwa 30 % der Patienten erleiden ein Rezidiv (Yiallouros 2016a).

2.5. Ewing-Sarkom

2.5.1. Epidemiologie

Ewing-Sarkome treten selten auf. Von einer Millionen Kindern unter 15 Jahren erkranken etwa drei pro Jahr in Deutschland. Somit erkranken ungefähr 40 Kinder pro Jahr. 2,4 von einer Millionen Heranwachsenden zwischen 15 und 24 Jahren erkranken jährlich neu. Die Erkrankung kann in jedem Lebensalter auftreten, über die Hälfte der Patienten erkranken allerdings im Alter zwischen 10 und 20 Jahren. Jungen und Männer erkranken häufiger, das Geschlechterverhältnis ist 1,3:1 (Yiallouros 2016b).

2.5.2. Ätiologie und Formen

Das Ewing-Sarkom kann in jedem Knochen und auch in dem umgebenden Weichgewebe wachsen. Die häufigsten Lokalisationen sind die Beckenknochen, Femur, Tibia, Fibula sowie die Ossa Costae (Greenspan 2000). Extraossäre Ewing-Tumore sind selten. Die Tumorart zeichnet sich durch ein schnelles Wachstum mit Metastasierung aus. Zum Diagnosezeitpunkt werden bei einem Viertel der Patienten

bereits Metastasen gefunden. Das Ewing-Sarkom gehört zu den primitiven bösartigen Tumoren und entwickelt sich, nach dem derzeitigen Forschungsstand, aus mesenchymalen Stammzellen. Die Tumorzellen können nur mittels feingeweblichen und molekulargenetischen Untersuchungen von anderen undifferenzierten Tumorzellen anderer Krebsarten unterschieden werden. Innerhalb der Ewing-Sarkome wird anhand des Ursprungsortes und der feingeweblichen Eigenschaften zwischen dem klassischen Ewing-Sarkom, dem peripheren malignen primitiven neuroektodermalen Tumor, dem Askin-Tumor der Brustwand und dem Weichteil Ewing-Tumor unterschieden (Yiallourous 2016b).

2.5.3. Risikofaktoren

Der Grund für die Entstehung des Ewing-Sarkoms ist momentan noch unbekannt. Äußere Einflussfaktoren wie beispielsweise eine Strahlentherapie oder auch erbliche Veranlagungen gelten nicht als ursächlich. Translokationen am Ewing-Sarkom-Gen auf Chromosom 22 wurde bei einigen Tumorzellen entdeckt (Yiallourous 2016b).

2.5.4. Symptome

Das Ewing-Sarkom zeichnet sich klinisch durch eine schmerzhafte, meist aktivitätsabhängige, Raumforderung aus. Funktionsverluste können als Folge von Schwellungen auftreten, allerdings auch alleinig mit dem betroffenen Gebiet bzw. Gewebe zusammenhängen. Beispielsweise kann ein Befall der Wirbelsäule oder peripherer Nerven zu Parästhesien sowie zu Paresen führen (Yiallourous 2016b). Neben den Schmerzen sind Allgemeinsymptome wie Fieber, Abgeschlagenheit und Gewichtsverlust beschrieben. Laborchemisch ist, vor allem bei großen Tumoren, der Serumspiegel für LDH, Ferritin, CRP und die BSG erhöht (Dirksen und Jürgens 2014).

2.5.5. Diagnostik

Zur Diagnostik werden unter den bildgebenden Verfahren konventionelle Röntgenaufnahmen, CT- und MRT-Untersuchungen durchgeführt. Diese sind wichtig um die genaue Lage und Größe des Tumors sowie seine Abgrenzung zu Nachbarstrukturen zu sehen. Zusätzlich können Skelett-Szintigraphien, PET-Untersuchungen, Knochenmarks- und Lumbalpunktionen zur Metastasensuche

durchgeführt werden. Metastasen sind am häufigsten in Lunge, Knochen und Knochenmark zu finden. Zur Diagnosestellung muss eine Biopsie mit anschließender molekularbiologischer Untersuchung erfolgen. Wird hierbei zusätzlich zu morphologischen und immunhistochemischen Befunden eine Ewing-Sarkom-spezifische Translokation im Tumorgewebe nachgewiesen, gilt dies als eindeutig Diagnosesichernd. Die häufigsten dieser Translokationen sind $t(11;22)(q24;q12)$, $t(21;22)(q22;q12)$ und $t(7;22)(p22;q12)$ (Dirksen und Jürgens 2014).

2.5.6. Therapie

In der Regel besteht die Therapie aus einer operativen Tumoresektion, Strahlentherapie und Chemotherapie. Begonnen wird mit einer Induktions-Chemotherapie bestehend aus Wirkstoffkombinationen mit Vincristin, Ifosfamid, Doxorubicin sowie Etoposid. Gleichzeitig oder darauf folgend wird die Lokalthherapie durchgeführt, welche essentieller Bestandteil der Behandlung ist. Hierbei wird je nach Tumorgöße, -ausbreitung sowie Metastasierung der Tumor entfernt und zusätzlich eine Radiotherapie durchgeführt. Darauf folgt eine adjuvante Chemotherapie, bei der sich die Zytostatikakombinationen Vincristin, Actinomycin D und Cyclophosphamid bzw. Ifosfamid als wirksam erwiesen haben. Die Behandlung erstreckt sich meist über zehn bis zwölf Monate (Yiallourous 2016b). Im Rahmen von Studien wird aktuell geprüft, ob eine Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender Retransfusion autologer hämatopoetischer Stammzellen bei Patienten mit schlechtem Ansprechen auf die Induktions-Chemotherapie oder mit einem Tumolvolumen über 200 ml, zu besseren Behandlungsergebnissen führt (ClinicalTrials.gov identifier:NCT00987636). Bei einem Rezidiv gibt es derzeit keine Standardtherapie. Je nach Krankheitssituation muss individuell über ein passendes Vorgehen entschieden werden. Eine weitere Chemotherapie, auch eine Hochdosis-Therapie, Operation und Bestrahlung sind möglich. Neben der Behandlung muss der Patient engmaschig überwacht und mit einer Supporttherapie unterstützt werden. Im Anschluss an die Behandlung ist eine Nachsorge mit dem Ziel einer Rezidivfrüherkennung notwendig. Hierfür muss insbesondere das Tumorgebiet, die Lunge und das Skelettsystem regelmäßig untersucht werden. Die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs ist in den ersten drei Jahren nach Diagnosestellung am größten (Yiallourous 2016b, Dirksen und Jürgens 2014).

2.5.7. Prognose

Patienten ohne sichtbare Metastasen können durchschnittlich zu 65 % geheilt werden. Eine gute Prognose ergibt sich aus einer vollständigen Tumorsektion und dem Ansprechen auf die Chemotherapie. Eine ungünstige Prognose haben Patienten, bei denen bereits zum Diagnosezeitpunkt Metastasen aufzufinden sind. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit liegt dann bei etwa 25 %. Hierbei sind die Überlebenschancen für Patienten mit einzelnen, operablen Lungenmetastasen besser als für Patienten mit Knochen- oder Knochenmarkmetastasen. Die Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv zu erleiden liegt bei 30-40 %. Nach einem Rezidivaufreten liegt die Chance auf ein 2-Jahresüberleben bei ungefähr 20 %. Hierbei ist der Zeitpunkt des Auftretens sowie die Rezidivform entscheidend (Yiallourous 2016b, Dirksen und Jürgens 2014).

2.6. Prostatakarzinom

2.6.1. Epidemiologie

Die häufigste diagnostizierte Krebserkrankung unter Männern in Deutschland ist mit 25,4 % das Prostatakarzinom. Es erkranken in der BRD jährlich ungefähr 58.000 Männer neu an dem Tumor und circa 12.000 versterben daran. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwa 69 Jahren. Somit ist das Prostatakarzinom die dritthäufigste tödlich verlaufende Krebserkrankung unter Männern. Das Risiko der männlichen Bevölkerung in den westlichen Industrieländern ein Prostatakarzinom zu entwickeln liegt bei ca. 40 %, 10 % davon werden symptomatisch und etwa 3 % versterben daran (DGU 2014).

2.6.2. Ätiologie und Formen

95 % der Prostatakarzinome sind Adenokarzinome mit Ursprung vom azinären Prostataepithel, welches auch duktale, muzinöse oder Sigelringzellkomponenten haben kann. Nicht-Adenokarzinome sind meist urothelialer Herkunft. Außerst seltene Tumore sind die kleinzelligen neuroendokrinen bzw. sarkomatoiden Prostatakarzinome (Rübben 2014).

2.6.3. Risikofaktoren

Das Prostatakarzinom zeigt eine familiäre Häufung, allerdings sind auch nicht genetische Einflussfaktoren mit der Tumorentstehung assoziiert. Der größte Risikofaktor ist das Alter. Des Weiteren spielt die ethnische Herkunft eine Rolle. Die höchste Inzidenz und Mortalität ist bei der jamaikanischen und schwarzen US-Bevölkerung zu finden. Die geografisch unterschiedliche Inzidenz kann durch verschiedene Ernährungsgewohnheiten erklärt werden. Generell spielt die Ernährung und körperliche Aktivität bei der Prostatakarzinomentstehung und der Genese eine wichtige Rolle. Zudem begünstigt eine Prostatitis, eine Infektion mit einer sexuell übertragbaren Krankheit wie Syphilis oder Gonorrhö und eine niedrige Ejakulationsfrequenz die Entstehung des Prostatakarzinoms (Rübben 2014).

2.6.4. Symptome

Das Prostatakarzinom ist in frühen Stadien meist symptomlos. Erst bei fortgeschrittenem Karzinom tritt die Hauptbeschwerde, die Blockade des Harnabflusses und daraus resultierende Miktionsstörungen wie Dysurie, Nykturie, Pollakisurie und Algurie, auf. Zudem kann es durch Druckschädigung von Nerven zu Erektionsstörungen kommen. Spätere Metastasierung führt je nach Lokalisation zu weiteren Symptomen (Rübben 2014).

2.6.5. Diagnostik

Um das Prostatakarzinom frühzeitig zu erkennen, kann eine Bestimmung des Prostataspezifischen Antigens PSA zusammen mit einer digital-rektalen Untersuchung durchgeführt werden (DGU 2014). Auffällige Ergebnisse stellen eine Indikation zur Biopsie dar, sodass das Prostatakarzinom histologisch gesichert werden kann. Eine MRT- oder transurale Ultraschalluntersuchung kann die Diagnose zusätzlich bestätigen (Rübben 2014).

2.6.6. Therapie

Je nach Wachstum und Ausbreitung des Karzinoms sind verschiedene Behandlungen möglich. Primäre Therapieoptionen sind radikale Prostatektomie, perkutane Strahlentherapie, welche mit adjuvanter hormonablativer Therapie kombiniert werden kann, und Brachytherapie. Letztere sollte nur bei Patienten mit

einem lokal begrenzten Karzinom und niedrigem Risikoprofil angewendet werden. Lymphknotenmetastasen sollten operativ entfernt oder bestrahlt werden. Eine Metastasierung wird systemisch hormonablativ behandelt. Zudem sollte symptomatisch und supportiv therapiert werden (DGU 2014).

2.6.7. Prognose

Die Prognose ist neben der TumorgroÙe und -ausbreitung auch stark vom Patientenalter mit einhergehender Komorbidität abhängig. Die 10-Jahres-Gesamtüberlebensrate nach radikaler Prostatektomie eines lokalen Tumors ist nach Altersgruppen stratifiziert. Patienten unter 55 Jahre haben eine 10-Jahres-Gesamtüberlebensrate von 90,1 %, über 75-Jahrig 73,6 % (Rübben 2014).

3. Ziel der Arbeit

SP2509 wird als antineoplastisch wirksamer KDM1A-Hemmstoff beschrieben, insbesondere bei AML- (Fiskus et al. 2014), Ewing-Sarkom- (Sankar et al. 2014) und Prostatakarzinomzellen (Gupta et al. 2016). Ein für den klinischen Einsatz besser geeignetes Derivat von SP2509, nämlich SP2577, soll zudem in einer Phase I-Studie an Ewing-Sarkom-Patienten getestet werden (Pishas und Lessnick 2016). Hieraus ergab sich das Ziel dieser Arbeit, in welcher die Wirkung von SP2509 bezüglich der KDM1A-Hemmung evaluiert werden sollte. Vorangegangene Versuche der Arbeitsgruppe hatten indes uneinheitliche Ergebnisse beim Auslösen des Zelltodes durch SP2509 im Vergleich zu anderen KDM1A-Inhibitoren gezeigt. Die Zellen hatten deutlich stärker auf SP2509 angesprochen als auf die bereits in klinischer Erprobung befindlichen KDM1A-Inhibitoren ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin, was den Verdacht nahelegte, dass die zytotoxische Wirkung von SP2509 nur teilweise oder gar nicht auf der Hemmung der KDM1A beruhte.

In dieser Arbeit sollte darum untersucht werden, ob die zytotoxische Aktivität von SP2509 von der KDM1A-Hemmung abhängt. Hierzu wurden die zytotoxischen Effekte der vier Inhibitoren an einer Reihe von AML-, Ewing-Sarkom- und Prostatakarzinomzelllinien systematisch vergleichend getestet. Um die Bedeutung der KDM1A für die Zelltod-auslösende Wirkung von SP2509 noch eindeutiger zu klären, wurden überdies Untersuchungen an KDM1A-Knockout-Zellen vorgenommen.

Die vorliegende Arbeit sollte also die Frage beantworten, ob die antineoplastische Wirkung von SP2509 von der Hemmung der KDM1A abhängt.

4. Methodik

4.1. Material

Die aufgeführten Materialien und Chemikalien wurden über die Universitätsapothek Jena oder direkt von den Herstellern, die in der rechten Spalte gezeigt sind, bezogen.

4.1.1. Geräte und Arbeitsmittel

4 °C Kühlschrank, -20 °C Gefrierschrank	Robert Bosch GmbH, München
Accu-jet® Pipette Controller	BrandTech® Scientific, Wertheim
BBD 6220 CO ² -Inkubator	Heraeus Thermo Scientific, Hanau
BD FACSCanto™ II Durchflusszytometer	BD Biosciences
BD Falcon™ Rundbodenröhrchen, 5 ml	BD Biosciences
Cellstar® Kulturflaschen 75/25 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Cellstar® Serologische Pipette, 1/2/5/10 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Cellstar® Tubes, 15/50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Cellstar® Zellkulturplatten, 12/96 Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Combitips® advanced, 0,5/10/25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Combitips® plus, 5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Counter AC-15	Karl Hecht KG, Sondheim
Descosept AF, Desinfektionsmittel	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld
Eisbereiter SPR 80	NordCap GmbH & Co. KG, Bremen
FLUOstar Omega	BMG Labtech GmbH, Offenburg
HERA safe KS 12, Sterilwerkbank	Heraeus Thermo Scientific, Hanau
Meliseptol® HBV Desinfektionstücher	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Mikroskop Leica	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena

Mikrozentrifuge	Laboratory & Medical Supplies Co.
Multipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg
Neubauer Zählkammer (Improved)	Assistent Germany, Bad Blankenburg
Nitrilhandschuhe Nitril® 3000	Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden
Pipetten Eppendorf Reference variabel, 0,5-10/10-100/50-200/1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen, 10/100/200/1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
PS-Röhrchen, 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Safe Lock Tubes 0,5/1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Serum Pipette steril, 3 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Transferpipetten, 3,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Vortex-Genie®2	Scientific Industries, Inc., New York
Wasserbad	Julabo GmbH, Seelbach
Zentrifuge Rotanta/TR	Hettich AG, Bäch, Schweiz

4.1.2. Zelllinien

Alle Zelllinien, bis auf A673, HAP1-KDM1A und HAP1, sind vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, erstanden worden. HAP1-KDM1A und HAP1 wurden von Horizon Genomics GmbH, Wien, bezogen. Die Zelllinie A673 ist von Culture Collections, Public Health England, Salisbury.

4.1.2.1. MOLM-13

Akute myeloische Leukämiezellen, etabliert aus peripherem Blut eines 20-jährigen Mannes mit initialen myelodysplastischen Syndrom. FLT3-Protein wird nicht exprimiert. Die Zellen haben die CBL-deltaExon8-Mutation.

Morphologie: einzel-wachsende Suspensionszellen

Medium: RPMI mit stabilem Glutamin 500 ml

FKS 100 ml

Penicillin/Streptomycin 6 ml

4.1.2.2. THP-1

Akute monozytische Leukämiezellen, etabliert aus peripherem Blut eines Einjährigen.

Die Zellen weisen die MLL-AF9-Translokation auf.

Morphologie: einzeln-wachsende Suspensionszellen

Medium: RPMI mit stabilem Glutamin 500 ml

FKS 50 ml

Penicillin/Streptomycin 5 ml

4.1.2.3. SK-ES-1

Ewing-Sarkomzellen, etabliert aus dem Primärtumor eines 18-jährigen Mannes.

Zellen weisen eine p53-Mutation auf.

Morphologie: adhärenzte, fibroblastische Zellen

Medium: RPMI mit stabilem Glutamin 500 ml

FKS 50 ml

Penicillin/Streptomycin 6 ml

Die Zellen benötigen zum Wachsen einen kollagenbeschichteten Boden der Kulturflaschen und Wellplatten.

4.1.2.4. A673

Ewing-Sarkomzellen, etabliert aus Muskelgewebe einer 15-jährigen Patientin.

Morphologie: epitheliale, adhärenzte Zellen

Medium: DMEM mit 4,5g/l Glucose 500 ml

FKS 50 ml

Penicillin/Streptomycin 5 ml

Die Zellen benötigen zum Wachsen einen kollagenbeschichteten Boden.

4.1.2.5. PC-3

Prostatakarzinomzellen, etabliert aus einer Knochenmetastase eines 62-jährigen Mannes mit Grad IV Prostatakarzinom.

Morphologie: epitheliale, adhärenzte Zellen

Medium: RPMI mit stabilem Glutamin 500 ml

FKS 50 ml

Penicillin/Streptomycin 5,5 ml

4.1.2.6. DU-145

Prostatakarzinomzellen, etabliert aus einer Metastase im Zentralnervensystem eines 69-jährigen Mannes mit Prostatakarzinom.

Morphologie: epitheliale, adhärenente Zellen

Medium: RPMI mit stabilem Glutamin 500 ml

FKS 50 ml

Penicillin/Streptomycin 6 ml

4.1.2.7. HAP1

Haploide Zellen, etabliert aus chronisch myeloischen Leukämiezellen der Zelllinie KBM-7.

Morphologie: fibroblastenähnliche, adhärenente Zellen

Medium: IMDM 500 ml

FKS 50 ml

Penicillin/Streptomycin 6 ml

Glutamin 5ml

4.1.2.8. HAP1-KDM1A

KDM1A-Knockout-Zellen. Die parentale Zelllinie ist HAP1.

Morphologie: fibroblastenähnliche, adhärenente Zellen

Medium: IMDM 500 ml

FKS 50 ml

Penicillin/Streptomycin 6 ml

Glutamin 5ml

4.1.2.9. Reagenzien für die Zellkultur

BioWhittaker® DMEM	Lonza, Vieviers, Belgien
BioWhittaker® Dulbecco's PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Lonza, Vieviers, Belgien
BioWhittaker® IMDM	Lonza, Vieviers, Belgien
BioWhittaker® PEN-STREP 10.000 U/ml Penicillin, 10.000 U/ml Streptomycin	Lonza, Vieviers, Belgien

BioWhittaker® RPMI-1640 mit stabilem Glutamin	Lonza, Vieviere, Belgien
BioWhittaker® Trypsin EDTA 1x	Lonza, Vieviere, Belgien
BioWhittaker® Ultraglutamine 1	Lonza, Vieviere, Belgien
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

4.1.3. Reagenzien

Ampuwa® 10 ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
BD™ Cytometer Setup & Tracking Beads	BD Bioscience
BioWhittaker® Trypsin EDTA 10x	Lonza, Vieviere, Belgien
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
DiOC ₆ (3) (3'3-Dihexyloxycarbocyaniniodid) Stammlösung: 50 µg/ml	Molecular Probes™
GSK2879552, Stammlösung 20 mM	Selleck Chemicals
ORY-1001, Stammlösung 10 mM	Selleck Chemicals
Propidiumiodid, Stammlösung: 1 mg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Resazurin Solution	PromoCell GmbH, Heidelberg
SP2509, Stammlösung: 10 mM	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
Tranylcypromin, Stammlösung: 20 mM	Biomol GmbH, Hamburg
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau 0,5 % (w/v) in PBS	Biochrom AG, Berlin

4.2. Methoden

4.2.1. Zellkultivierung

4.2.1.1. Auftauen und Kultivieren der Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert, unter ständigem Schütteln im Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut und anschließend in 15 ml Medium überführt. Danach folgte eine dreiminütige Zentrifugation bei 1200 U/min. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in 5 ml vorgewärmten Medium resuspendiert und in eine 25 cm² Kulturflasche pipettiert. Bis zur nächsten Passage wurden die Kulturflaschen im Brutschrank verwahrt. Nach drei Passagen konnten die Zellen für Experimente genutzt werden. Das Auftauen wurde freundlicherweise von der Medizintechnischen Assistentin Sabine Becker durchgeführt.

4.2.1.2. Zellpassage

Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen passagiert, jeweils vor dem Erreichen der vollständigen Konfluenz. Die Zelllinien HAP1-KDM1A und HAP1 mussten alle zwei bis drei Tage, bei einer ungefähren Konfluenz von 70%, gesplittet werden. Die Zellen der Zellreihen SK-ES-1, A673, HAP1-KDM1A, HAP1, PC-3 und DU-145 mussten aufgrund ihrer Adhärenz vor der Passage trypsinisiert werden. Hierzu wurde unter der sterilen Werkbank das alte Medium abpipettiert und verworfen. Anschließend wurde die jeweilige Kulturflasche zweimal mit 10 ml vorgewärmten PBS gespült. Es wurde dann 2,5 ml Trypsin/EDTA in die Flasche gegeben und diese fünf bis sieben Minuten inkubiert. In dieser kurzen Zeitspanne lösten sich die Zellen vom Flaschenboden. Durch leichtes Klopfen an der Flasche wurde dies zusätzlich unterstützt. Danach wurde 6 ml Medium hinzugegeben und die Zellen darin mit einer Pipette vereinzelt. Die Zellsuspension wurden nun in ein 50-ml-Röhrchen überführt und die Flasche mit 10 ml Medium nochmals gespült, das genutzte Medium abpipettiert und mit in das Röhrchen gegeben. Die nicht-adhärenenten Zellen der Zelllinie MOLM-13 und THP-1 wurden in ein 50-ml-Röhrchen abpipettiert, die Kulturflasche zweimal mit 10 ml Medium gespült und dies ebenso in das Röhrchen hinzugegeben. Die folgenden Arbeitsschritte wurden dann bei allen Zellen gleich durchgeführt. Für die Röhrchen

mit der Zell-Medium-Suspension folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 1200 U/min. Der Überstand wurde abgekippt und verworfen. Zu dem Zellpellet wurde 15-20 ml frisches Medium, jeweils abhängig von der Pelletgröße, zugegeben und die Zellen darin vereinzelt.

4.2.1.3. Ermittlung der Zellzahl und Vitalität

Zur Zellzahlbestimmung wurden 20 µl aus der Zellsuspension entnommen und zusammen mit 20 µl Trypanblau gevortext. Hiermit wurde eine, mit einem Deckglas bedeckte, Neubauer-Zählkammer gefüllt und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Dazu wurden jeweils die Zellen in zwei diagonal entgegengesetzten Großquadraten gezählt. Hierbei wurden die toten, mit Trypanblau angefärbten, und lebende Zellen unterschieden. Die Zellvitalität konnte folglich berechnet werden:

$$\frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Anzahl aller Zellen}} \times 100 \% = \text{Zellvitalität}$$

Jedes Großquadrat hat ein Volumen von 0,1 µl, welches sich durch eine Fläche von 1 mm² und einer Höhe von 0,1 mm ergibt. Multipliziert man die gezählten Zellen mit 10⁴ erhält man die Anzahl der Zellen pro ml. Zudem muss die Trypanblau-Verdünnung (1:2) und die Anzahl der gezählten Großquadrate (hier 2) beachtet werden. Somit ergibt sich folgende Formel zur Berechnung der lebenden Zellen:

$$\frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl der gezählten Großquadrate}} = \text{lebende Zellen pro ml}$$

4.2.1.4. Erhaltung der Zellkultur

Um die Zellkultur weiterhin zu erhalten, wurden die Zellen mit frischem Medium in neue Kulturflaschen gegeben. Je nach Zellart und Zyklusdauer wurden unterschiedliche Zellzahlen in die Flasche eingesetzt:

MOLM-13: für einen Zyklus von 3 Tagen 10 x 10⁶ Zellen; für 4 Tage 8 x 10⁶;

THP-1: für 3 Tage 7 x 10⁶; für 4 Tage 5 x 10⁶;

SK-ES-1: für 3 Tage 3,5 x 10⁶; für 4 Tage 2,5 x 10⁶;

A673: für 3 Tage 2 x 10⁶; für 4 Tage 1,8 x 10⁶;

PC-3: für 3 Tage 1,5 x 10⁶; für 4 Tage 1 x 10⁶;

DU-145: für 3 Tage 1,8 x 10⁶;

HAP1- KDM1A: für 2 Tage 4 x 10⁶; für 3 Tage 2 x 10⁶;

HAP1: für 2 Tage 6×10^6 ; für 3 Tage 3×10^6 ;

Das Volumen mit der gewünschten Zellzahl wurde errechnet und mit frischem Medium, bis zum Erreichen von 20 ml, aufgefüllt. Die verwendeten Kulturflaschen hatten eine 75 cm^2 -große Bodenfläche. Für die Ewing-Sarkom-Zelllinien SK-ES-1 und A673 wurden kollagenbeschichtete Flaschen verwendet. Die Zellen wurden dann bis zur weiteren Verwendung bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

4.2.2. Aussäen der Zellen

Für die durchflusszytometrischen Tests wurden je 200.000 Zellen in jedes Well einer 12-Well-Platte ausgesät. Von den Zellen der Zelllinien HAP1-KDM1A und HAP1 wurden nur 100.000 Zellen in ein Well gegeben, da diese Zellen eine sehr hohe Teilungsrates haben. Zum Aussäen wurde in einem 50 ml-Röhrchen eine neue, mit frischem Medium verdünnte, Zellsuspension so hergestellt, dass sich darin 100.000 bzw. 200.000 Zellen pro ml befanden. Mittels Multipette wurde dann in jedes Well 1 ml gegeben und im Brutschrank bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit für 72 Stunden inkubiert.

Für den AlamarBlue[®]-Assay wurde eine 96-Wellplatte befüllt. Ebenso wie für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde hierfür eine neue Zellsuspension hergestellt. Diese wurde so verdünnt, dass sich in $100 \mu\text{l}$ 1000 Zellen befanden. In jedes Well wurden dann $100 \mu\text{l}$ der Suspension pipettiert, sodass sich in jedem Well 1000 Zellen befanden. Die Wellplatten wurden für 96 Stunden bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Die Ewing-Sarkomzellen wurden jeweils auf kollagenbeschichteten 12- bzw. 96-Well-Platten ausgesät.

4.2.3. Wirkstoffbehandlung

Die Zellen wurden mit den KDM1A-Inhibitoren SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin in der Tabelle aufgeführten Konzentrationen behandelt. Diese wurden in Vorversuchen ermittelt.

<i>Wirkstoff</i>	<i>Wirkstoffkonzentration für durchflusszytometrische Tests</i>	<i>Wirkstoffkonzentration für AlamarBlueTM-Assay</i>
SP2509	0,3/1/3/10 μM	0,1/0,3/1/3/10 μM

ORY-1001, GSK2879552, 3/10/30/100 μ M
Tranlylcypromin

1/3/10/30/100 μ M

Um die Wirkstoffkonzentrationen zu erhalten wurden Verdünnungsreihen mit frischem Medium durchgeführt. Zu den, für die durchflusszytometrischen Untersuchungen bestimmten, Zellen wurden 10 μ l des verdünnten Wirkstoffes pro Well hinzu pipettiert. In die wirkstofffreien Wells der 12-Wellplatte wurden 10 μ l Medium gegeben. Diese Behandlung wurde 24 Stunden nach dem Aussäen der Zellen durchgeführt. Nach weiteren 48 Stunden Inkubation konnte die Messung durchgeführt werden.

Die für den AlamarBlue[®]-Assay angesetzten Zellen in 96-Wellplatten erhielten pro Well 4 μ l des jeweiligen verdünnten Wirkstoffes. In die Wells ohne Wirkstoff wurde 4 μ l Medium pipettiert. Die Zellen für den Assay wurden direkt nach dem Aussäen behandelt. Die Messung erfolgte nach 96-stündiger Inkubation.

Die Arbeit mit den Wirkstoffen wurde lichtgeschützt unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

4.2.4. Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie, auch FACS-Analyse (engl. fluorescence activated cell sorting) genannt, kann der Zelltod und der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials gemessen werden. Anhand dieser Parameter kann die Wirkung der applizierten Inhibitoren evaluiert werden. Hierfür werden die vereinzelt Zellen mit einem oder mehreren Farbstoffen markiert und durch einen Laserstrahl geführt. Dabei senden die Zellen in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Probenvorbereitung charakteristische Lichtsignale aus. Dieses Fluoreszenz- und Streulicht wird von einem Photodetektor erfasst, weitergeleitet und zu elektrischen Signalen transformiert. Die Zellen können so nach ausgewählten Kriterien quantifiziert werden. Das Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter, FSC) lässt auf die Größe der Zellen schließen. Auskunft über die Granularität des Zytoplasmas, des Zellkerns und der Vesikel gibt das seitliche Streulicht (engl. side scatter, SCC). Für die Messungen wurde das Gerät FACSCanto™ II der Firma Becton Dickinson GmbH genutzt.

4.2.4.1. Mitochondriales Membranpotential und Zelltod

Zur Zelltodanalyse wurde Propidiumjodid (PI) verwendet. Dieser Farbstoff durchdringt nur perforierte Zellmembranen und interkaliert in die DNA-Stränge. Die mit PI gefärbten Zellen stellen somit tote Zellen dar. Das Absorptionsmaximum von PI liegt bei 536 nm und das Emissionsmaximum bei 617 nm. Zur Analyse des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) wurde DiOC₆(3) (3'3'-Dihexyloxycarbocyaniniodid) zu den Zellen gegeben. DiOC₆(3) ist ein grünfluoreszierender und lipophiler Farbstoff, der die Zellmembran überwindet. Er lagert sich aufgrund seiner positiven Ladung in die negativ geladene mitochondriale Membran ein. Da die Membran während des Zelltodprozesses depolarisiert, kann sich der Farbstoff nur in lebenden Zellen mit intaktem $\Delta\psi_m$ anreichern. Somit kann der prozentuale Anteil der ungefärbten, apoptotischen Zellen von der Gesamtzellzahl ermittelt werden. Das Absorptionsmaximum von DiOC₆(3) liegt bei 482 nm und das Emissionsmaximum bei 504 nm.

4.2.4.2. Kompensation

Bei dem gleichzeitigen Messen zweier Fluoreszenzfarbstoffe kann eine Überlappung der Fluoreszenzspektren auftreten, wodurch in dem entsprechenden Spektrum eine falsch positive Zellpopulation gemessen werden würde. Zur Vermeidung dessen muss die Streuung jedes Farbstoffes in das Spektrum des anderen Stoffes gemessen werden. Daraus wird eine Korrektur, die sogenannte Kompensation, berechnet. Für jede Zelllinie wurde eine eigene Kompensation durchgeführt und auf die Messungen angewendet.

Zur Durchführung der Kompensation wurden zusätzlich zu den Zellen, welche für die durchflusszytometrische Untersuchung in 12-Well-Kulturplatten ausgesät wurden, drei weitere Wells mit Zellsuspension gefüllt. Diese erhielten nach 24-stündiger Inkubation, ebenso wie die nicht mit Wirkstoff behandelten Zellen, 10 µl frisches Medium und inkubierten dann weitere 48 Stunden. Vor der Messung wurde in eins der drei Wells 1 µl DiOC₆(3) appliziert und für 45 Minuten vorinkubiert. Die Zellen wurden dann zusammen mit den für die Messung ausgesäten Zellen geerntet (siehe 4.2.4.3.). Zu einer anderen der drei Proben wurde nach der Ernte 55 µl 0,5%-iges Triton X-100 hinzugefügt. Dies tötet die Zellen, sodass der Zelltod simuliert wird. In diese Probe wurde zusätzlich 1 µl PI appliziert, um die toten Zellen messen zu

können. Für die Berechnung der Kompensation wurde die dritte Probe ungefärbt gelassen und als Negativkontrolle mitgemessen.

4.2.4.3. Vorbereitung und Durchführung der FACS-Analyse

Zur Durchführung der FACS-Analyse wurden die Zellen zunächst mit 1 μl DiOC₆(3) behandelt. Nach 45-minütiger Inkubation konnten die Zellen geerntet werden. Die nicht-adhärennten Zellen wurden hierbei mit einer Transferpipette aus den Wells in je ein 15 ml-FACS-Röhrchen überführt. Hiernach wurde jedes Well mit je 1 ml vorgewärmten PBS gespült und das zum Spülen genutzte PBS zu dem entsprechenden FACS-Röhrchen hinzu gegeben. Die adhärennten Zellen mussten vorher noch gelöst werden. Hierfür wurde zunächst das überstehende Medium aus jedem Well in je ein FACS-Röhrchen pipettiert. Danach wurde mit 1 ml PBS gespült und das PBS mit in das entsprechende Röhrchen gegeben. Nach einer Behandlung mit 300 μl Trypsin/EDTA pro Well folgte eine fünf- bis siebenminütige Inkubationszeit im Brutschrank bei 37 °C. Anschließend wurde auf jedes Well 1 ml PBS gegeben, die Zellen mit einer Pipette vereinzelt und in die FACS-Röhrchen überführt. Danach wurden die Wells wie auch bei den nicht-adhärennten Zellen mit 1 ml PBS gespült. Die folgenden Schritte wurden für alle Proben gleich durchgeführt. Die Röhrchen wurden geschlossen, geschwenkt und für fünf Minuten bei 1800 U/min zentrifugiert. Hiernach wurden die Röhrchen auf Eis gesetzt und so weiter verarbeitet. Es folgte ein scharfes Abkippen der Überstände, eine Zugabe von je 500 μl PBS und die Vereinzelung der Zellen darin. Ungefähr 20 Sekunden vor der Messung wurde zu jeder Probe 1 μl PI gegeben.

Die Ergebnisse wurden mit der BD FACSDiva Software (BD Bioscience, 2000) ausgewertet. Zur Auswertung wurden jeweils drei Dotplots erstellt, in denen die Zellen nach gemessenen Fluoreszenz- und Streusignalen in einem Koordinatensystem als Punkte dargestellt wurden. Dabei wurden FSC zu SSC, FSC zu PI und FSC zu DiOC₆(3) aufgetragen. Zudem wurden in jeweils zwei Histogrammen PI bzw. DiOC₆(3) zur Zellzahl aufgetragen. Bei allen Plots wurde eine Fensterung eingefügt. Durch diese konnten gemessene Zelltrümmer, Zellhaufen und Verunreinigungen aus den Analysedaten ausgeschlossen und so nur komplette, vereinzelt Zellen in die Auswertung mit einbezogen werden.

4.2.5. AlamarBlue[®]-Assay

Mit dem AlamarBlue[®]-Assay kann die metabolische Aktivität von Zellen bestimmt werden. Der verwendete blaue Farbstoff Resazurin ist wasserlöslich, nicht-toxisch und wird von den Zellen aufgenommen. Entsprechend der proliferativen Aktivität der Zellen wird der oxidierte, blaue Farbstoff reduziert. Hierdurch wird dieser pinkfarben und fluoreszierend. Die Fluoreszenz wurde mittels einem Fluoreszenzphotometer gemessen (Excitation 544 nm, Emission 590 nm) und als Maß für die Zellvitalität gewertet.

Für die Messungen wurden die Zellen in 96-Wellplatten ausgesät, direkt danach mit den Wirkstoffen behandelt und dann für 96 Stunden inkubiert. Hiernach wurden 10 µl Resazurin in jedes Wells pipettiert und die Zellen für drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Leukämiezellen der Zelllinien MOLM-13 und THP-1 inkubierten jeweils 5 Stunden. Danach wurde die Messung am Fluoreszenzphotometer FLUOStar Omega der Firma BMG Labtech GmbH durchgeführt werden.

5. Ergebnisse

Die Zellen aller Zelllinien wurden mit den KDM1A-Inhibitoren SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin für 48 h (FACS-Analysen) oder 96 h (AlamarBlue-Assay) behandelt und danach auf den Zelltod, den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ und die Zellviabilität untersucht. Hierzu wurden durchflusszytometrische Messungen und der AlamarBlue[®]-Assay durchgeführt. Für die FACS-Messungen wurden die Zellen mit SP2509 jeweils in den Konzentrationen 0,3 μM , 1 μM , 3 μM und 10 μM behandelt. ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin wurde in den Konzentrationen 3 μM , 10 μM , 30 μM und 100 μM angewendet. Bei dem AlamarBlue[®]-Assay wurden zusätzlich die Wirkstoffkonzentrationen 0,1 μM bzw. 1 μM eingesetzt. Jedes Experiment wurde dreimal durchgeführt.

5.1. MOLM-13

SP2509 induzierte den Zelltod in bis zu 56,7 % und den Verlust von $\Delta\psi_m$ in bis zu 98,5 % der MOLM-13-Zellen. Die anderen drei Inhibitoren hatten auch bei zehnfach höheren Konzentrationen keinen Einfluss auf den Zelltod und den Verlust von $\Delta\psi_m$ (Abb. 5). Im AlamarBlue[®]-Assay zeigten alle Wirkstoffe einen Effekt. Allerdings war SP2509 bei einer Wirkstoffkonzentration von 1 μM etwa ebenso wirksam wie ORY-1001 bei 100 μM und erheblich wirksamer als GSK2879552 und Tranylcypromin bei 100 μM (Abb. 6).

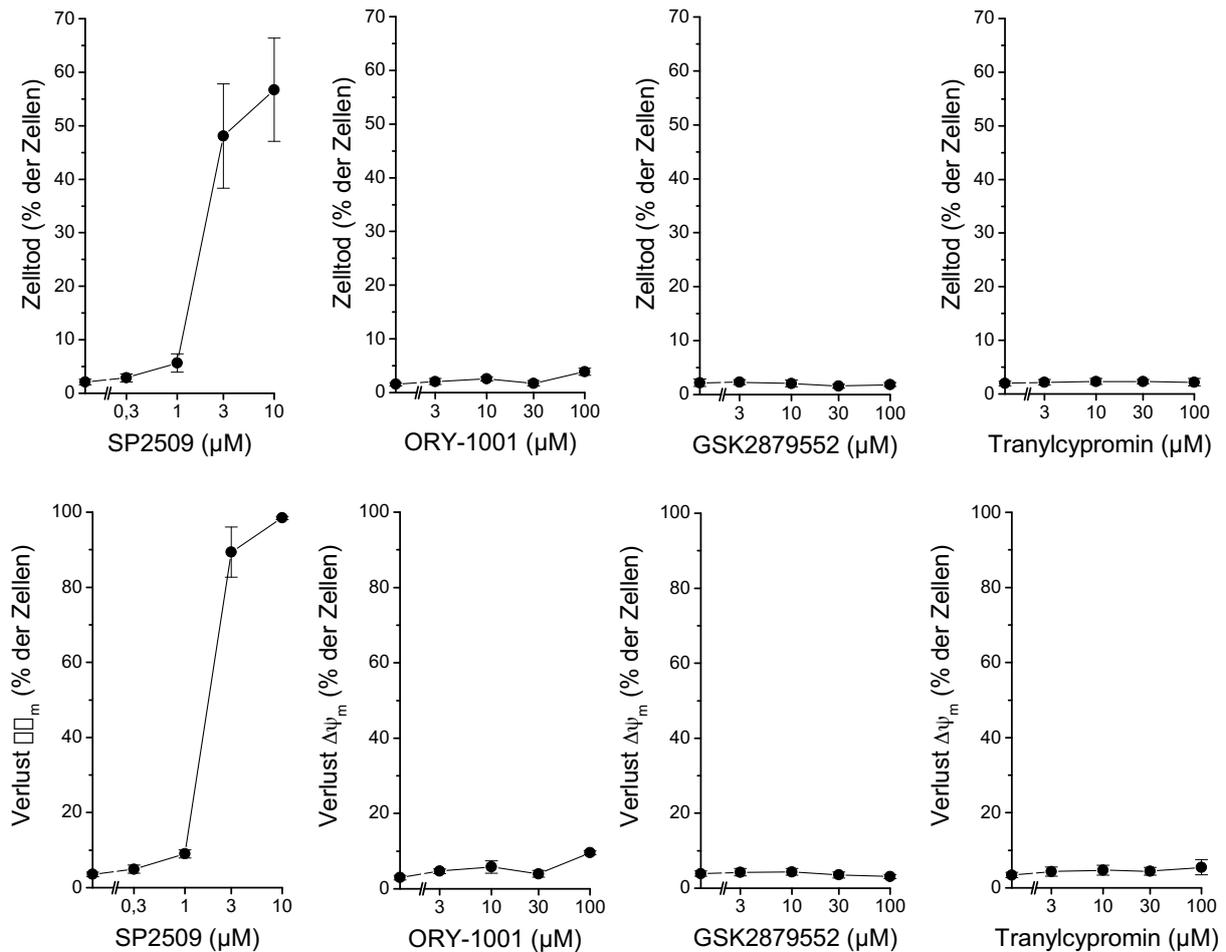


Abb. 5: Zelltod und Verlust von $\Delta\psi_m$ in MOLM-13-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 48 h mit den Inhibitoren behandelt und der Zelltod und der Verlust von $\Delta\psi_m$ mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bzw. DiOC₆(3)-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

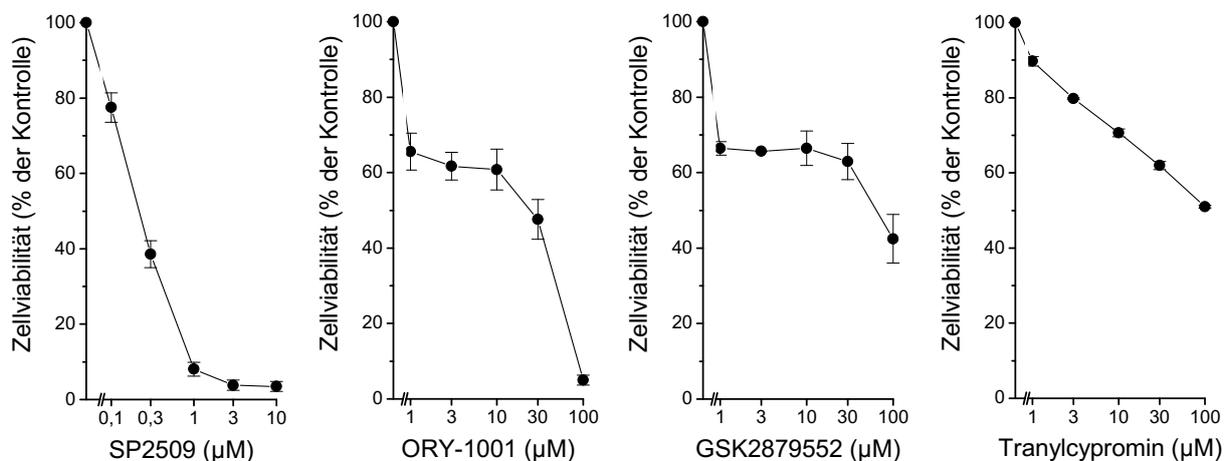


Abb. 6: Veränderung der Zellviabilität der MOLM-13-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 96 h mit den Inhibitoren behandelt und die Zellviabilität mittels AlamarBlue[®]-Assay bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

5.2. THP-1

In 69,3 % der THP-1-Zellen konnte SP2509 den Zelltod auslösen. Das mitochondriale Membranpotential $\Delta\psi_m$ ging durch Behandlung mit diesem Inhibitor in 90,9 % der Zellen verloren. ORY-1001 induzierte einen Zelltod von 65,2 %, allerdings nur in einer zehnfach höheren Konzentration wie SP2509. Bei einer Konzentration von 100 μM ORY-1001 konnte ein Verlust von $\Delta\psi_m$ in 72,9 % der Zellen gemessen werden. Die anderen beiden Hemmstoffe zeigten keine Wirkung auf den Zelltod und $\Delta\psi_m$ (Abb. 7). Im AlamarBlue[®]-Assay waren SP2509, ORY-1001 und GSK2879552 wirksam. In dem Konzentrationsbereich unter 10 μM zeigt SP2509 bereits einen starken Effekt, während die anderen beiden Inhibitoren hier noch nichts bewirkten. 100 μM ORY-1001 ließ die metabolische Aktivität der Zellen beinahe verschwinden (Abb. 8).

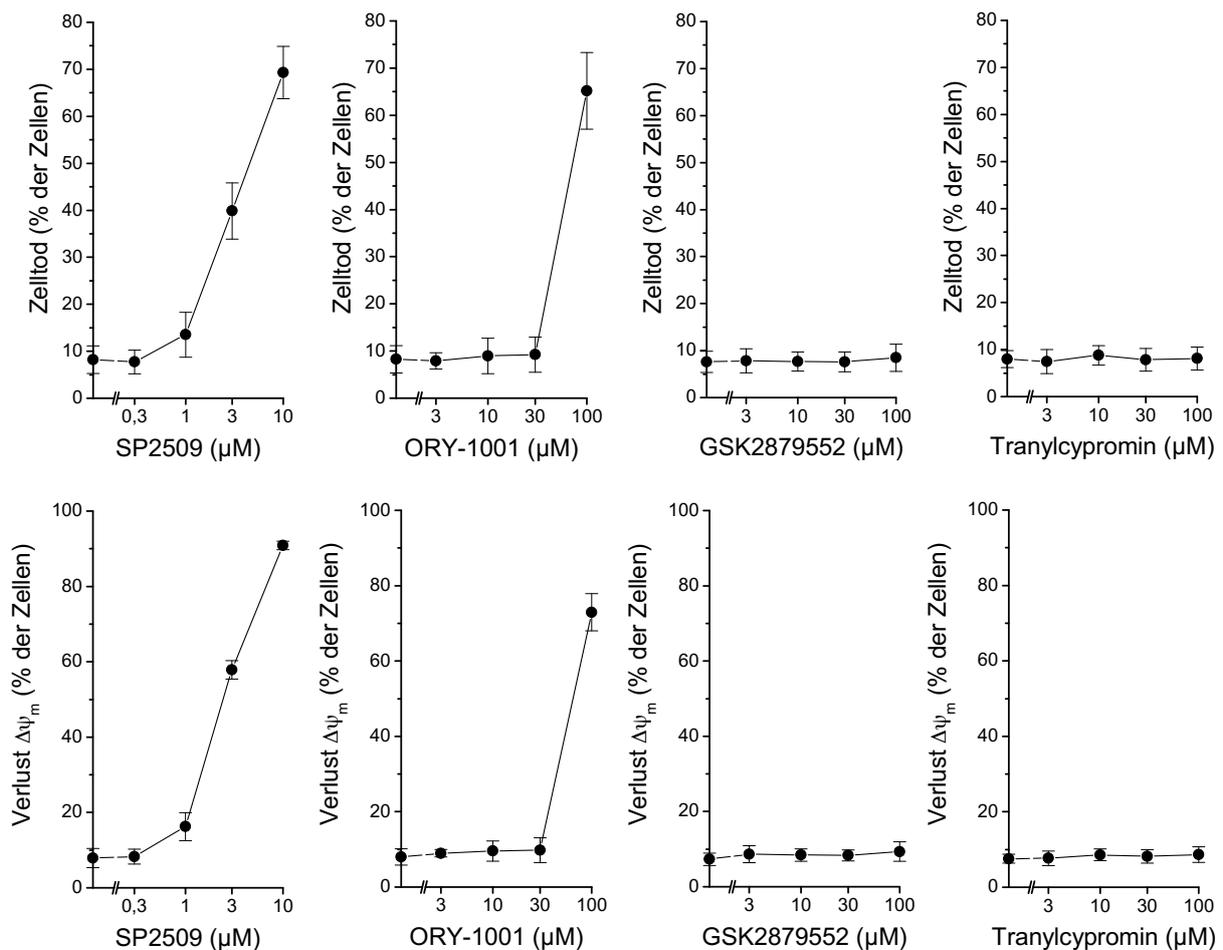


Abb. 7: Zelltod und Verlust von $\Delta\psi_m$ in THP-1-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 48 h mit den Inhibitoren behandelt und der Zelltod und der Verlust von $\Delta\psi_m$ mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bzw. DiOC₆(3)-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

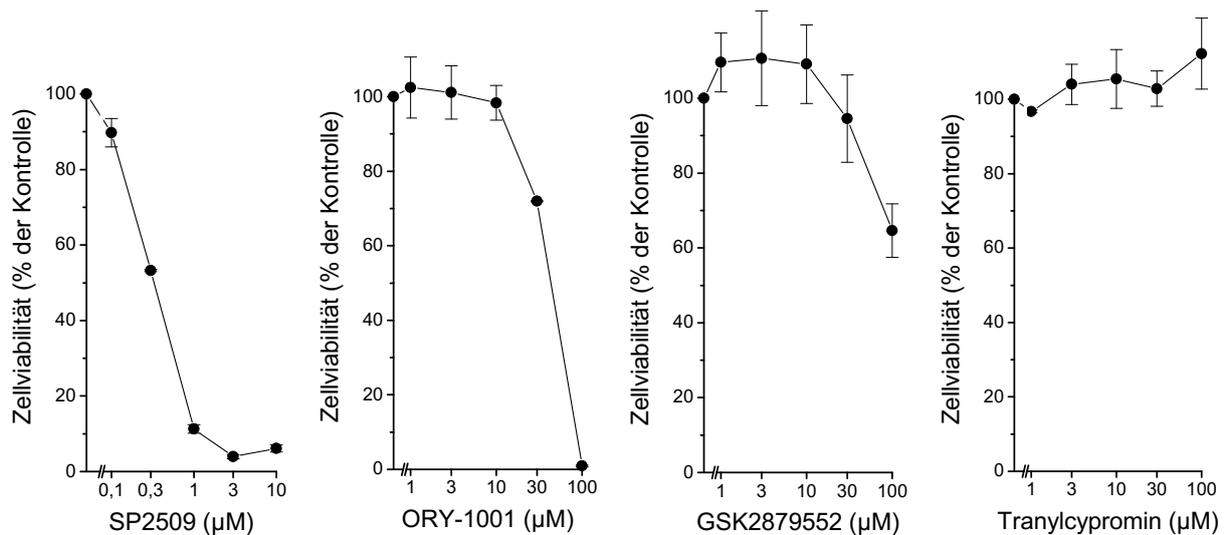


Abb. 8: Veränderung der Zellviabilität der THP-1-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 96 h mit den Inhibitoren behandelt und die Zellviabilität mittels AlamarBlue[®]-Assay bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

5.3. SK-ES-1

SP2509 induzierte den Zelltod und den Verlust von $\Delta\psi_m$ in fast 50 % der SK-ES-1-Zellen. ORY-1001 zeigte eine leichte Wirkung auf Zelltodrate und $\Delta\psi_m$, GSK2879552 und Tranylcypromin nicht (Abb. 9). SP2509 und ORY-1001 zeigten starke Effekte im AlamarBlue[®]-Assay, SP2509 jedoch bei viel geringeren Wirkstoffkonzentrationen. 3 μ M des Inhibitors führten zu demselben Effekt wie 100 μ M ORY-1001. Mit 100 μ M der anderen beiden Inhibitoren konnte ein Verlust der metabolischen Aktivität von 21 % bzw. 31 % erzielt werden (Abb. 10).

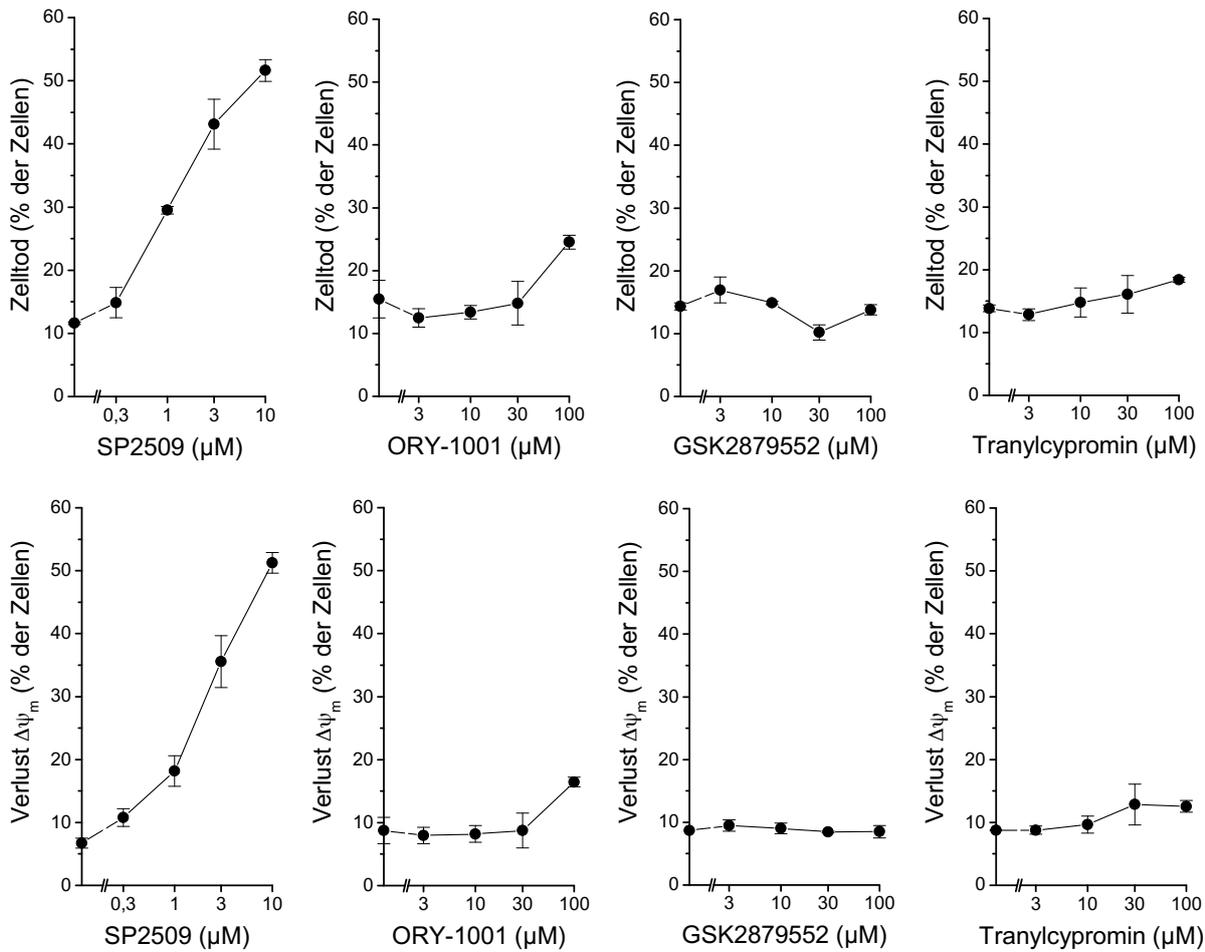


Abb. 9: Zelltod und Verlust von $\Delta\psi_m$ in SK-ES-1-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 48 h mit den Inhibitoren behandelt und der Zelltod und der Verlust von $\Delta\psi_m$ mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bzw. DiOC₆(3)-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

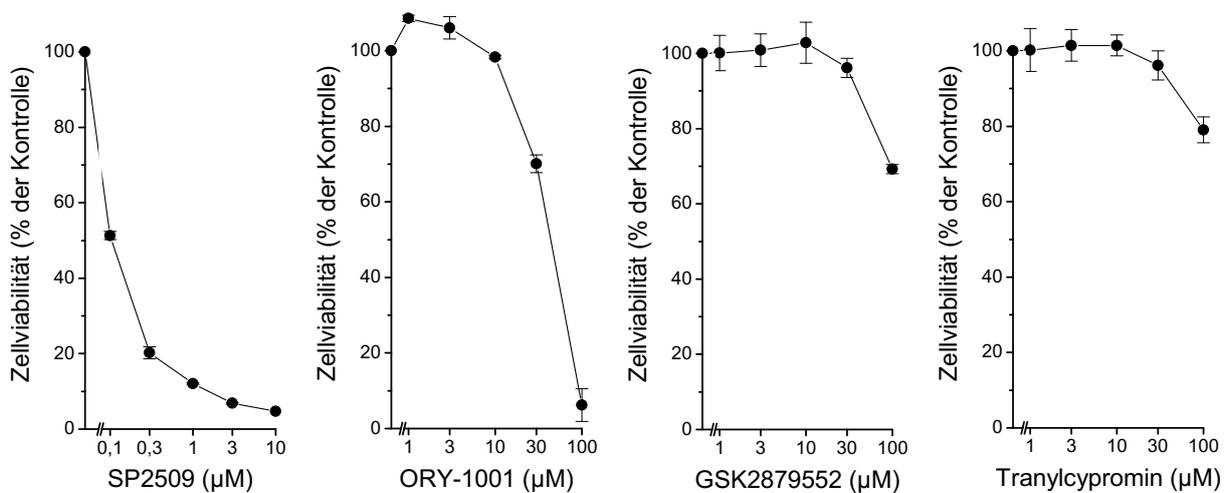


Abb. 10: Veränderung der Zellviabilität der SK-ES-1-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 96 h mit den Inhibitoren behandelt und die Zellviabilität mittels AlamarBlue[®]-Assay bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

5.4. A673

SP2509 induzierte bei einer Konzentration von 10 μM bei 32,4 % der Zellen den Zelltod und bei 47,7 % den Verlust von $\Delta\psi_m$. Bei dieser Konzentration zeigten die anderen drei Hemmstoffe keine Wirkungen. Ein gering toxischer Effekt bezüglich des Zelltodes und $\Delta\psi_m$ ist bei 100 μM ORY-1001 vorhanden (Abb. 11). Ein vollständiger Verlust der metabolischen Aktivität konnte mit 10 μM SP2509 und mit 100 μM ORY-1001 erzielt werden. Hierbei ist zu beachten, dass die zweithöchste Konzentration von ORY-1001, 30 μM , eine geringere Wirkung zeigte als die kleinste Konzentration, 0,1 μM , von SP2509. GSK2879552 und Tranylcypromin führten zu einem deutlich geringeren Verlust der Aktivität (Abb. 12).

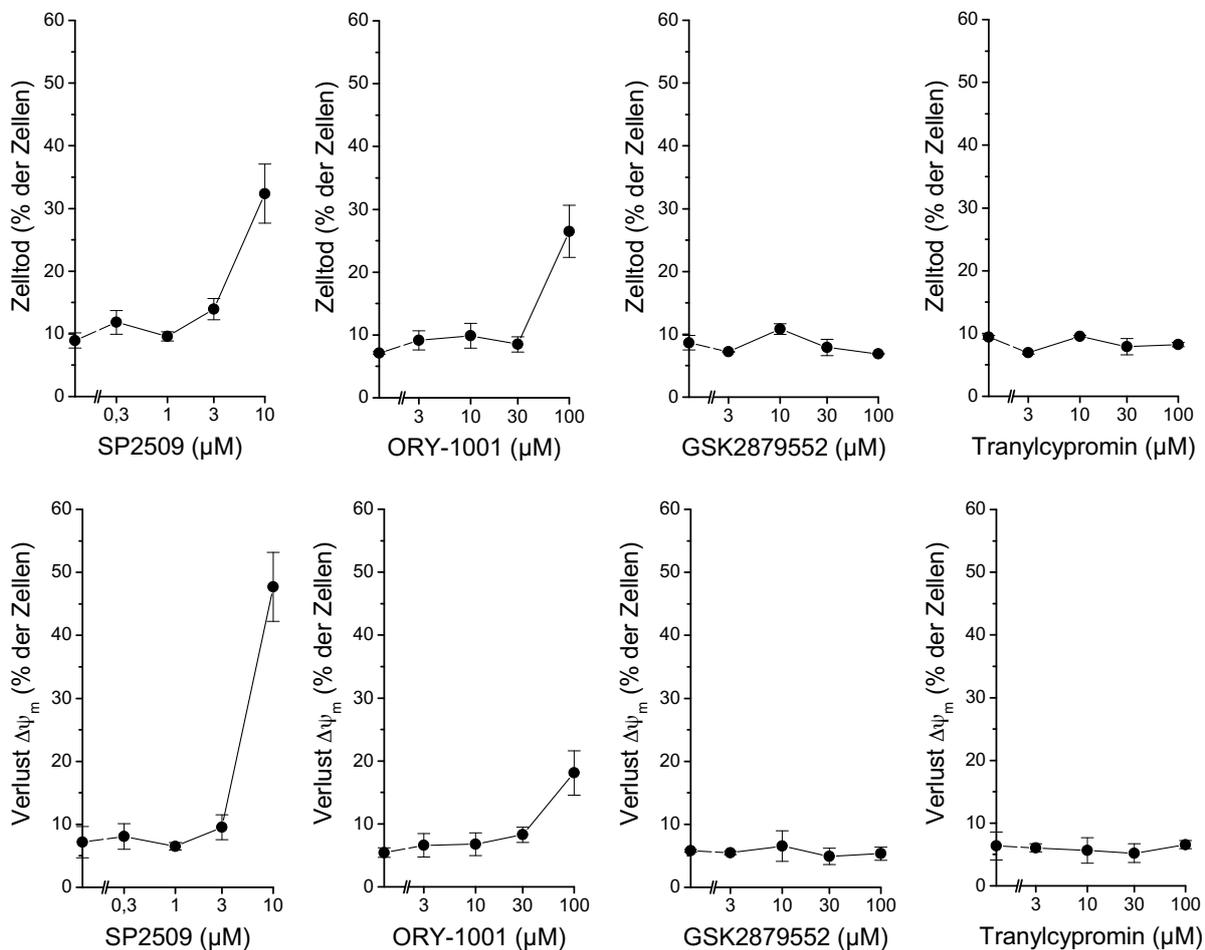


Abb. 11: Zelltod und Verlust von $\Delta\psi_m$ in A673-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 48 h mit den Inhibitoren behandelt und der Zelltod und der Verlust von $\Delta\psi_m$ mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bzw. DiOC₆(3)-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

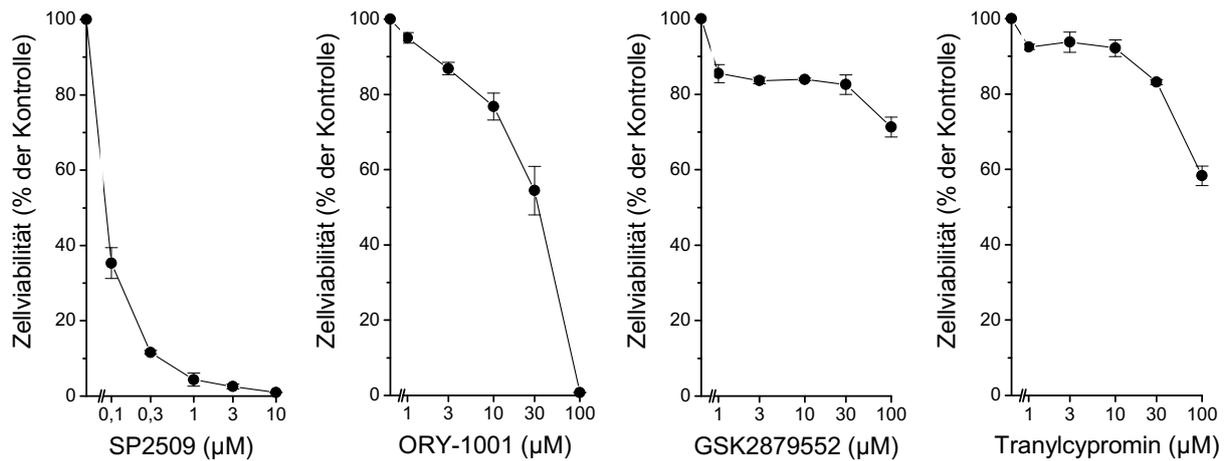


Abb. 12: Veränderung der Zellviabilität der A673-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 96 h mit den Inhibitoren behandelt und die Zellviabilität mittels AlamarBlue[®]-Assay bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

5.5. DU-145

In den DU-145-Zellen konnte mit keinem der Wirkstoffe ein deutlicher Effekt, im Vergleich zu der Anwendung bei anderen Zellen, auf den Zelltod und $\Delta\psi_m$ erreicht werden (Abb. 13). Im AlamarBlue[®]-Assay zeigten SP2509 und ORY-1001 in hohen Konzentrationen eine Wirkung auf die Zellviabilität. 10 μ M SP2509 führte zu einem Verlust der metabolischen Aktivität in 82 %, 100 μ M ORY-1001 zu einem Verlust in 55,6 % der Zellen (Abb. 14).

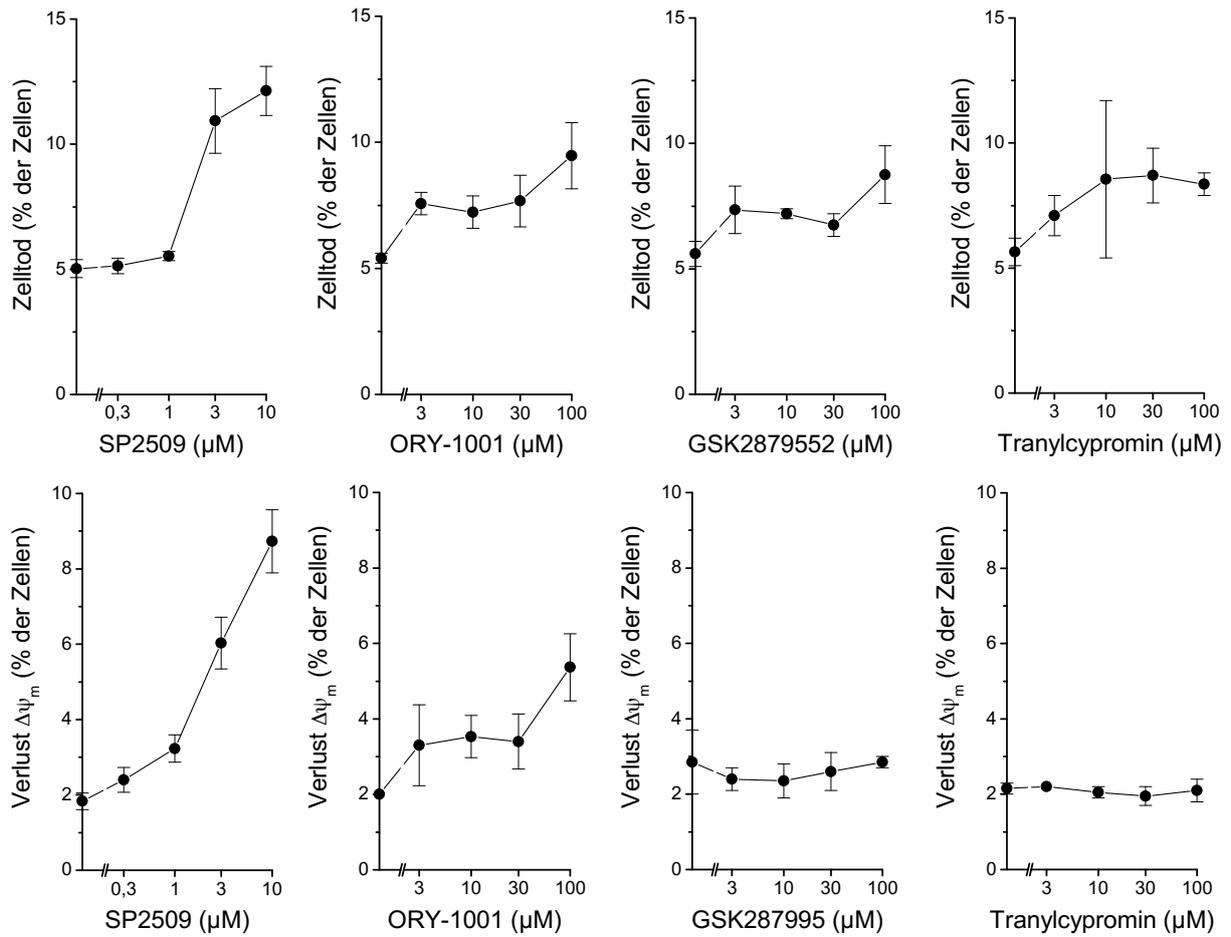


Abb. 13: Zelltod und Verlust von $\Delta\psi_m$ in DU-145-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 48 h mit den Inhibitoren behandelt und der Zelltod und der Verlust von $\Delta\psi_m$ mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bzw. DiOC₆(3)-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

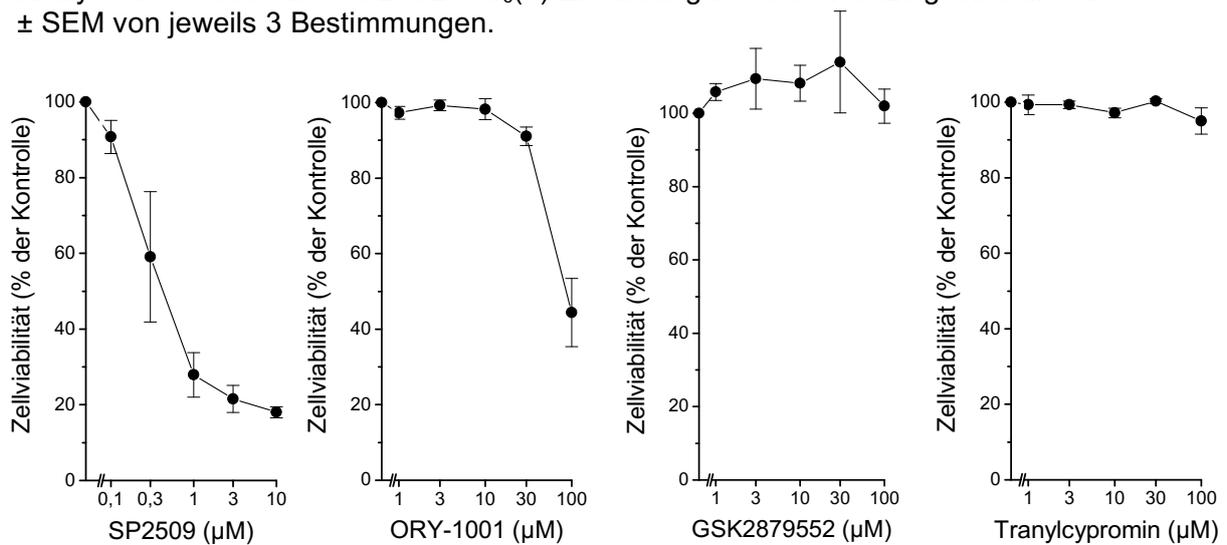


Abb. 14: Veränderung der Zellviabilität der DU-145-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 96 h mit den Inhibitoren behandelt und die Zellviabilität mittels AlamarBlue[®]-Assay bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

5.6. PC-3

Ebenso wie in den anderen Prostatakarzinomzellen DU-145 hatten die Behandlungen mit den KDM1A-Inhibitoren in den PC-3-Zellen keine deutlichen Wirkungen auf den Zelltod und $\Delta\psi_m$ (Abb. 15). Im AlamarBlue[®]-Assay war ein fast kompletter Verlust der Zellviabilität bei 3 μM SP2509 zu messen. 100 μM ORY-1001 führte in 79,5 % der Zellen zu einem Verlust der metabolischen Aktivität (Abb. 16).

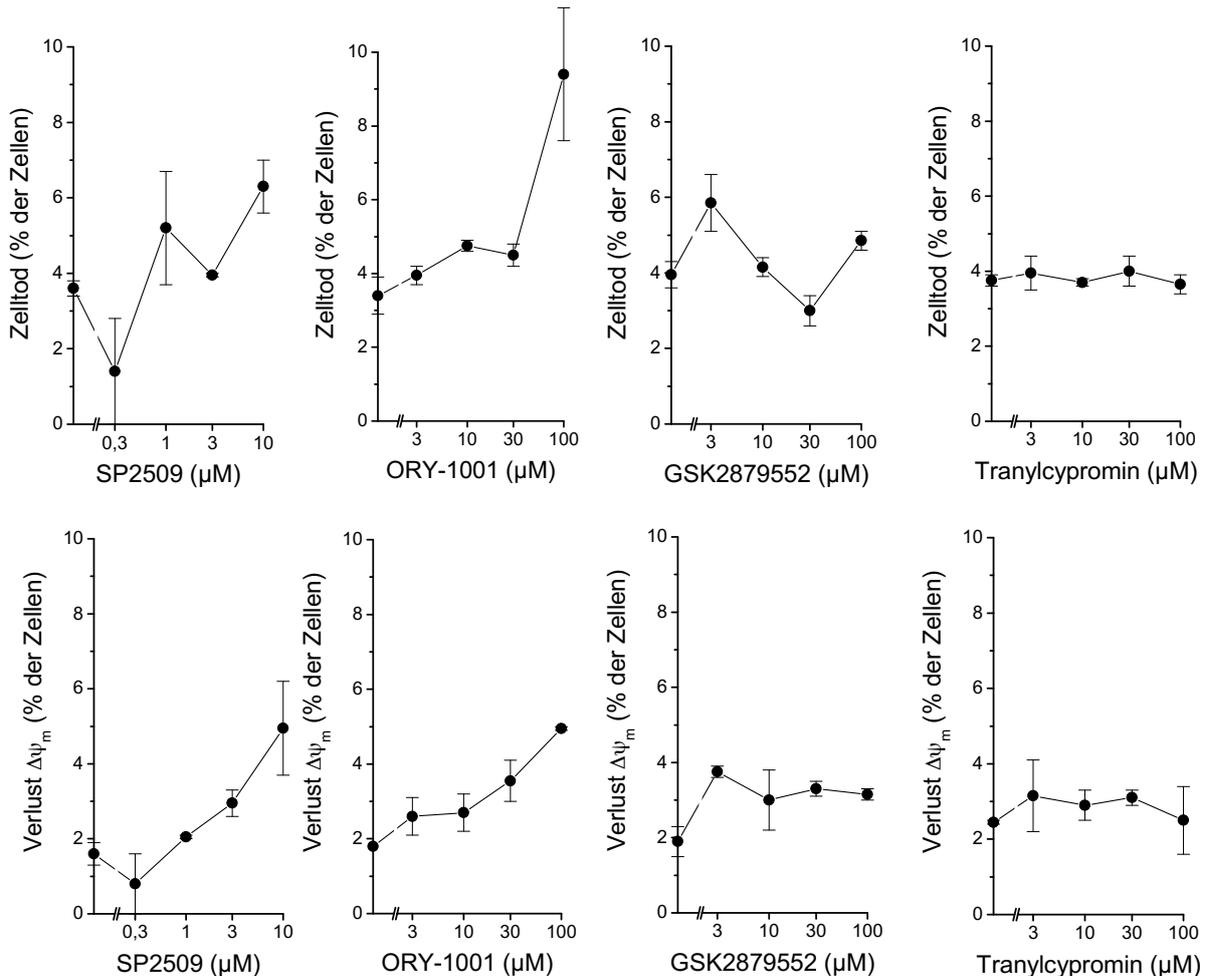


Abb. 15: Zelltod und Verlust von $\Delta\psi_m$ in PC-3-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 48 h mit den Inhibitoren behandelt und der Zelltod und der Verlust von $\Delta\psi_m$ mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bzw. DiOC₆(3)-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

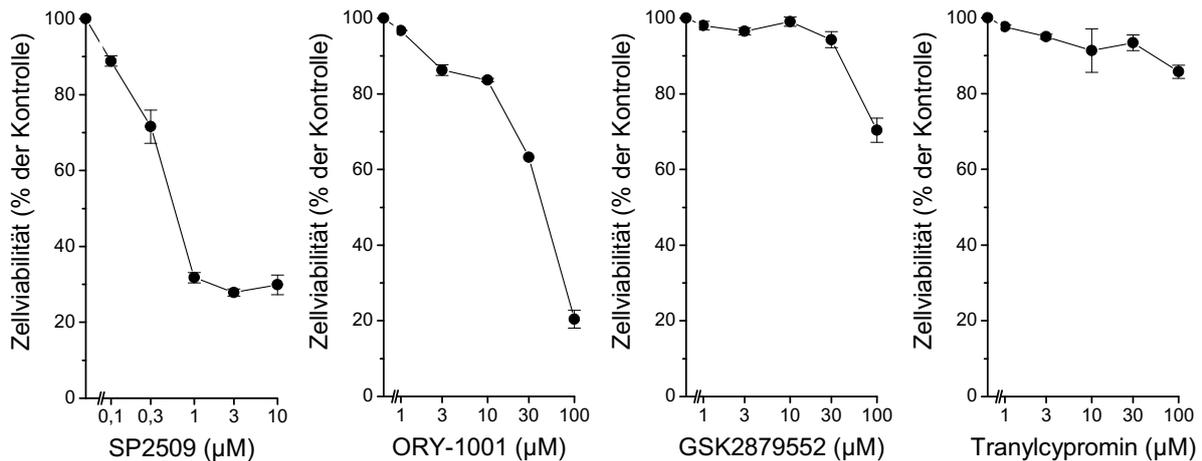


Abb. 16: Veränderung der Zellviabilität der PC-3-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 96 h mit den Inhibitoren behandelt und die Zellviabilität mittels AlamarBlue[®]-Assay bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

5.7. HAP1 und HAP1-KDM1A

HAP1 ist die parentale Zelllinie von HAP1-KDM1A, bei welcher KDM1A durch ein Knockout nicht vorhanden ist. 10 μ M des KDM1A-Inhibitors SP2509 induzierte in HAP1- bzw. HAP1-KDM1A-Zellen in 71,1 % bzw. 74,7 % der Zellen den Zelltod. Die Zelltodrate stieg kontinuierlich mit der Erhöhung der SP2509-Konzentration bis 10 μ M (Abb. 17). Der Effekt von 10 μ M SP2509 auf $\Delta\psi_m$ ist in beiden Zelllinien mit 94 % bzw. 95 % fast gleich (Abb.18). ORY-1001 zeigte erst bei einer Konzentration von 100 μ M einen Effekt auf den Zelltod und $\Delta\psi_m$. GSK2879552 und Tranylcypromin zeigten in beiden Zelllinien keine Wirkung auf den Zelltod und $\Delta\psi_m$ (Abb. 17 und 18). Die Ergebnisse der beiden Zelllinien im AlamarBlue[®]-Assay sind annähernd gleich. SP2509 zeigte hier wieder einen starken Effekt. Bei einer Konzentration von 1 μ M konnte in beiden Zelllinien ein fast vollständiger Verlust der metabolischen Aktivitäten verzeichnet werden. Dieselbe Wirkung war mit ORY-1001 erst bei einer Konzentration von 100 μ M zu messen. Die Konzentration von 1 μ M ORY-1001 führte zu keinem Effekt (Abb. 19).

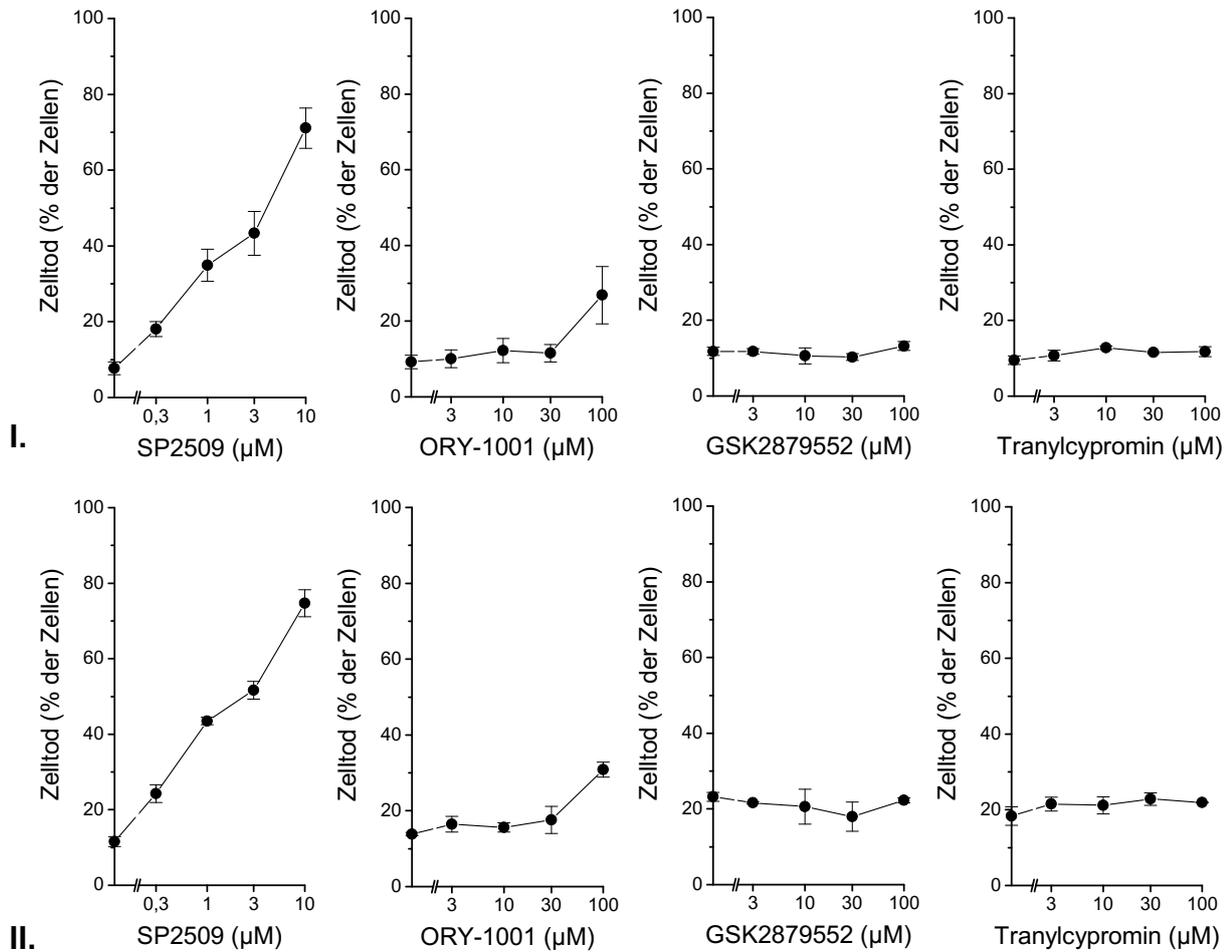


Abb. 17: Zelltod in HAP1-KDM1A- (II.) und den parental HAP1-Zellen (I.) nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 48 h mit den Inhibitoren behandelt und der Zelltod mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

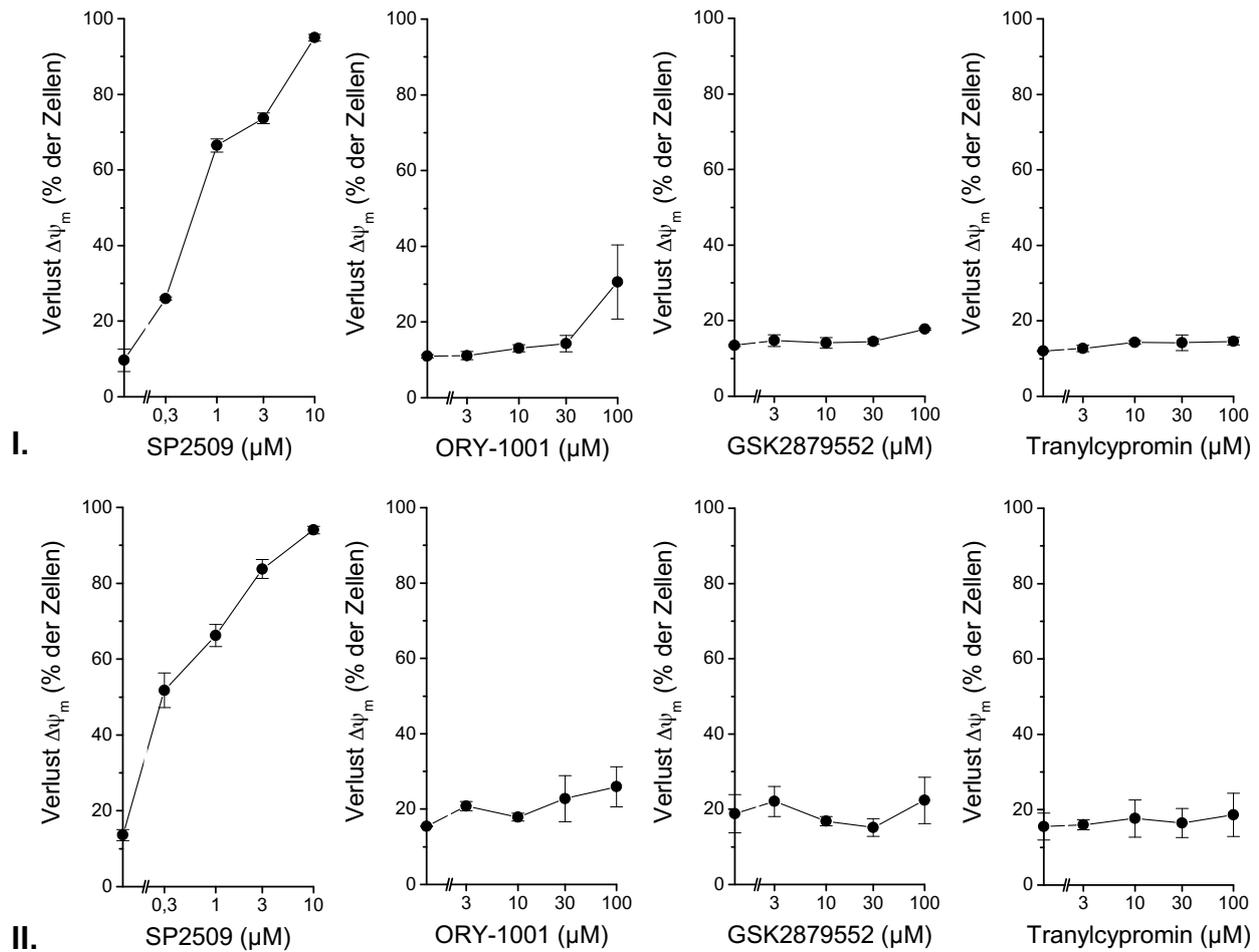


Abb. 18: Verlust von $\Delta\psi_m$ in HAP1-KDM1A- (II.) und den parental HAP1-Zellen (I.) nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranilcypromin. Die Zellen wurden 48 h mit den Inhibitoren behandelt und der Verlust von $\Delta\psi_m$ mittels durchflusszytometrischer Analyse nach DiOC₆(3)-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

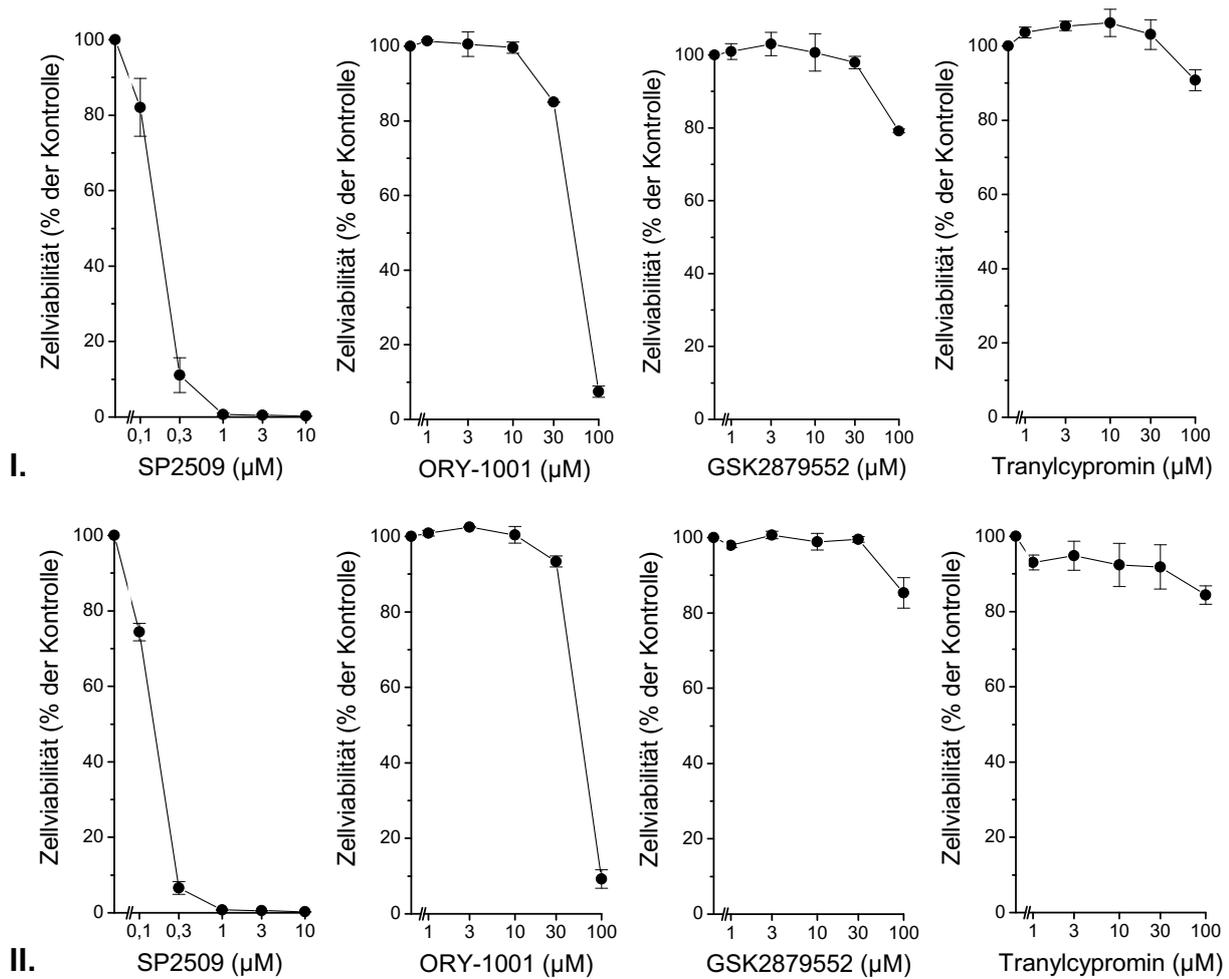


Abb. 19: Veränderung der Zellviabilität der HAP1-KDM1A- (II.) und der parentalen HAP1-Zellen (I.) nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 96 h mit den Inhibitoren behandelt und die Zellviabilität mittels AlamarBlue®-Assay bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

6. Diskussion

Die Histon-Demethylase KDM1A ist ein epigenetischer Modulator, welcher bei verschiedenen Krebsarten überexprimiert ist und dessen Hemmung einen vielversprechenden neuen Ansatzpunkt in der Krebstherapie darstellt. Diese Inhibition ist mit verschiedenen Hemmstoffen möglich. Die vier KDM1A-Inhibitoren SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin wurden hier an Leukämie-, Sarkom- und Karzinomzellen getestet.

Das reversibel hemmende Benzohydrazid SP2509 (Maiques-Diaz und Somerville 2016) induzierte in den Versuchen dieser Arbeit den Zelltod und Verlust von $\Delta\psi_m$ in AML- und Ewingsarkomzellen. Zudem konnten bereits kleine Konzentrationen des Wirkstoffes die Zellviabilität an diesen Zellen jeweils mehr als halbieren. Die anderen drei KDM1A-Hemmstoffe zeigten im Vergleich zu SP2509 eine auffällig geringere bzw. gar keine Wirkung. Diese Beobachtung, welche schon bei Vorversuchen zu dieser Arbeit gemacht worden war, ließ Zweifel daran aufkommen, ob die Wirkung von SP2509 ausschließlich Resultat der KDM1A-Hemmung ist. In einem Übersichtsartikel zu KDM1A-Hemmstoffen spekulieren *Mould et al.* 2015, dass die Effekte von SP2509 möglicherweise nicht aus der Hemmung der KDM1A resultieren, sondern von *off-target*-Effekten herrühren könnten. Mit dieser Hypothese im Einklang steht, dass keine Korrelation zwischen inhibitorischer Aktivität gegen die KDM1A und der Hemmung der Zellproliferation in AML-Zellen festgestellt werden konnte (*Mould et al.* 2015). *Fiskus et al.* zeigte 2014 mit einem shRNA-basierten KDM1A-Knockdown-Versuch in AML-Zellen, dass eine Reduzierung der Demethylase zu einem reduzierten Koloniewachstum, einer c-MYC-Depletion und Steigerung von H3K4Me₂, H3K4Me₃ und H3K9Me₂ führt. Bei einem weiteren Knockdown-Versuch wurde ein Teil der Zellen zusätzlich mit SP2509 behandelt. Diese Zellen zeigten interessanterweise einen signifikanten Verlust der Zellviabilität und der CD11b-Expression im Vergleich zu den Zellen, bei denen die KDM1A nur durch den Knockdown reduziert wurde. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass durch den Knockdown das KDM1A-Proteinlevel nur halbiert werden konnte und die Demethylase somit weiterhin, wenn auch vermindert, in den Zellen vorhanden war (*Fiskus et al.* 2014). Die Ergebnisse könnten trotzdem ein Hinweis auf mögliche *off-target*-Effekte von SP2509 sein. Schlussfolgernd gibt *Fiskus et al.* an, dass die Differenzierung und der Verlust der Zellviabilität nach SP2509-Behandlung wohl zumindest teilweise aus der KDM1A-Hemmung resultiert.

Um herauszufinden, ob die zytotoxischen Effekte von SP2509 aus der KDM1A-Hemmung resultieren, wurde in dieser Arbeit ein Versuch in der vollständigen Abwesenheit der KDM1A durchgeführt. Hierfür wurde eine KDM1A-Knockout- und deren parentale Zelllinie verwendet und die Ergebnisse nach der Wirkstoffbehandlungen mit SP2509 verglichen. Interessanterweise zeigten beide Zelllinien fast identische Ergebnisse bezüglich der Induktion von Zelltod und dem Verlust von $\Delta\psi_m$ sowie der Veränderung der Zellviabilität. Dies bestätigt die Vermutungen, dass diese Effekte von SP2509 nicht durch die KDM1A-Hemmung hervorgerufen werden. Zu betonen ist, dass an der Hemmung der Demethylase durch SP2509 hier nicht gezweifelt wird. Dass SP2509 ein potenter Inhibitor der KDM1A ist, beweisen *Sankar et al.* 2014 durch einen siRNA-basierten KDM1A-Knockdown-Versuch, bei dem nach Behandlung mit SP2509 sowie nach einem Knockdown ein Verlust der Demethylasenaktivität verzeichnet werden konnte. Um auch einen herstellerbedingten oder chargenabhängigen Fehler auszuschließen, wurden in der Arbeitsgruppe die Versuche nochmals mit SP2509 von zwei anderen Herstellern (Apexbio, Houston, TX, USA, B4894; Parkville, Australia, SYN-1212) durchgeführt. Diese zeigten entsprechend gleiche Ergebnisse. Die Knockout-Zelllinie wurde zudem mithilfe von RT-qPCR und einem Immunoblot verifiziert und somit die Anwesenheit von KDM1A ausgeschlossen (J. Sonnemann, persönliche Mitteilungen).

Die zytotoxische Wirkung von SP2509 konnte in dieser Arbeit nicht nur an AML, sondern auch an Ewingsarkomzellen beobachtet werden. *Sankar et al.* zeigte, dass eine signifikante Korrelation zwischen der Behandlung mit SP2509 und der Veränderung der Expression der Fusions-Onkoproteine EWS/FLI und EWS/ERG vorhanden ist. Zudem wurde eine Verbindung zwischen SP2509 und der Genregulation aufgedeckt. Durch den Inhibitor werden Gene, die mit Zellarrest und Apoptose assoziiert sind, hochreguliert, während S-Phase-, Zellzyklus- und Proliferations-assoziierte Gene herunterreguliert werden (*Sankar et al.* 2014). Des Weiteren wurde festgestellt, dass in AML-Zellen SP2509 die Bindung der KDM1A zu CoREST löst, während das bei Tranylcyprominderviaten nicht der Fall ist. *Mould et al.* 2015 weist darauf hin, dass die Kernstruktur von SP2509 ein Pan-assay interference compounds (PAINS) ist und somit dazu geneigt, mit einer Vielzahl an Proteinen, neben der KDM1A, zu interagieren. Alle diese Beobachtungen stellen

mögliche Erklärungsansätze für die zytotoxische Wirkung von SP2509 dar, die nicht direkt mit der KDM1A-Hemmung in Verbindung stehen.

In den Versuchen dieser Arbeit mit Prostatakarzinomzellen konnte SP2509 nur die Zellviabilität beeinflussen, auf den Zelltod und Veränderungen von $\Delta\psi_m$ hatte der Hemmstoff fast keinen Einfluss. Bei diesen Zellen zeigten die anderen Hemmstoffe allerdings auch nicht mehr Wirkung. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Veröffentlichungen über die KDM1A-Inhibition in Prostatakarzinomzellen überein (Gupta et al. 2016).

Diese Arbeit zeigt, dass SP2509 neben der KDM1A-Hemmung noch andere Effekte haben muss, welche entscheidend sind für dessen zytotoxische Wirkung an Krebszellen. Mögliche Erklärungsansätze wurden diskutiert. Zusätzlich ist noch zu erwähnen, dass SP2509 nicht bei allen Krebszellen zytotoxisch wirkt, was die Arbeit auch zeigt.

Das irreversible, hochselektive Tranylcypropinderivat ORY-1001 (Mould et al. 2015) induzierte hier in der Arbeit bei einer Konzentration von 100 μM in den AML-Zellen THP-1 stark den Zelltod und den Verlust von $\Delta\psi_m$. Auch bei den A673-Zellen konnte in dieser hohen Konzentration ein toxischer Effekt beobachtet werden. Die Ergebnisse dürfen allerdings nicht überinterpretiert werden, da in solch hoher Wirkstoffkonzentration der Inhibitor möglicherweise unspezifisch wirkt. Dieser unspezifische Effekt kann auch als Ursache für die Abnahme der Zellviabilität nach Behandlung mit ORY-1001 gewertet werden.

Die Behandlung der KDM1A-Knockout- und der parentalen Zellen mit ORY-1001 zeigte interessanterweise in beiden Zelllinien annähernd identische Ergebnisse bezüglich Zelltod, Verlust von $\Delta\psi_m$ und der Zellviabilität, allerdings konnte generell nur bei hoher Inhibitorkonzentration eine Wirkung beobachtet werden. Dieser Effekt ist vermutlich vielmehr ebenso das Resultat von unspezifischer Toxizität des Wirkstoffes in hoher Konzentration.

Der KDM1A-Inhibitor GSK2879552 befindet sich momentan in Phase-1-Studien zur Behandlung von AML (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02177812) und von SCLC (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02034123), basierend auf signifikanten antiproliferativen Wachstumseffekten (Morera et al. 2016). In den Versuchen dieser Arbeit konnte nach Behandlung mit GSK2879552 in keiner Zelllinie ein deutlicher Effekt bezüglich des Zelltodes oder des mitochondrialen Membranpotentials beobachtet werden. Im AlamarBlue[®]-Assay konnten Aktivitätsverluste gemessen

werden, die größten in den AML-Zellen MOLM-13 und THP-1. Diese Wirkungslosigkeit von GSK2879552 steht einerseits im Widerspruch zu den Hoffnungen, die auf diesen Wirkstoff gesetzt werden, der ja bereits in mehreren Phase I-Studien geprüft wird. Andererseits stehen diese Ergebnisse im Einklang mit Daten von *Mohammad et al.* 2015, die GSK2879552 an 165 Krebszelllinien in einem sechstägigen Proliferationsassay testeten. Hierbei zeigte der Inhibitor nur bei 39 von 165 Zelllinien eine Wirkung. Dabei wurde keine Wirkung des Hemmstoffes auf Prostatakarzinomzellen verzeichnet, ebenso wie in dieser Arbeit. Ewingsarkomzelllinien waren nicht in den Untersuchungen von *Mohammad et al.* inkludiert. In den Versuchen dieser Arbeit zeigt GSK2879552 bei diesem Sarkom keine Wirkung. Da der Inhibitor in allen von *Mohammad et al.* getesteten soliden Tumoren mit Ausnahme von SCLC nicht gewirkt hatte, erscheint es nicht unplausibel, dass der Hemmstoff auch nicht auf Ewingsarkome wirkt. Bei den Versuchen mit AML-Zellen konnte bei 20 von 29 Zelllinien ein Effekt durch GSK2879552 beobachtet werden. In den AlamarBlue[®]-Assays dieser Arbeit mit AML-Zellen konnte die Zellviabilität durch den Hemmstoff in einer Konzentration von 100 µM um etwa 40-60 % gesenkt werden. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen des Proliferationsassay von *Mohammad et al.*, bei dem eine Wachstumsreduktion von 40-60 % nach sechstägiger Inkubation mit einer EC₅₀ von 2-240 µM gemessen wurde.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass bei den Versuchen dieser Arbeit in den durchflusszytometrischen Untersuchungen keine Effekte zu beobachten waren, ist möglicherweise eine zu kurze Inkubationszeit. Es konnte nämlich festgestellt werden, dass eine Wachstumshemmung, wenn auch in SCLC-Zellen, erst ab dem vierten Inkubationstag erfolgt. Für die FACS-Messung inkubierten die Zellen hier allerdings nur 48 Stunden. Möglicherweise wäre der Zelltod und eine Veränderung im mitochondrialen Membranpotential nach längerer Inkubation noch eingetreten. Ob diese Erkenntnisse an den SCLC-Zellen auch für AML-Zellen gelten, wurde allerdings nicht untersucht (*Mohammad et al.* 2015).

In den Versuchen dieser Arbeit mit den Knockout- und den parental Zellen konnte jeweils keine Wirkungen von GSK2879552 beobachtet werden und somit lassen sich auch keine Schlüsse daraus ziehen, ob GSK2879552 nur oder überhaupt durch die Enzymhemmung wirkt. Der geringe Abfall der Aktivität im AlamarBlue[®]-Assay bei

100 μM ist hier auch wieder auf die Toxizität der hohen Konzentration an sich zu schieben.

Mit NCI-H1417-Zellen, SCLC-Zellen in denen GSK2879552 im Proliferationsassay eine Wachstumshemmung induzierte, wurden Experimente bezüglich einer vermehrten H3K4-Methylierung nach Behandlung mit dem Inhibitor durchgeführt. Es konnte vermehrte H3K4Me1 und H3K4Me2 gemessen werden, allerdings nicht signifikant (Mohammad et al. 2015). Dies könnte auf eine mögliche *off-target* Wirkung hindeuten, welche möglicherweise bei anderen Zelllinien nicht vorhanden ist und der Inhibitor deshalb bei diesen nicht wirkt. Eine weitere Erklärung für die selektive Wirkung des Hemmstoffes könnte eine unterschiedliche Genexpression sein. In SCLC-Zellen konnte beobachtet werden, dass hohe Expressionen von MYC die Zelle resistent, während die Expression von MYCN die Zelle sensitiv gegenüber GSK2879552 macht (Mohammad et al. 2015).

Tranylcypromin ist ein MAO-Hemmstoff der zur Behandlung von Depressionen verwendet wird und als Inhibitor der KDM1A entdeckt wurde. Er ist unselektiv und hat ein hohes Nebenwirkungsspektrum (Morera et al. 2016). Trotzdem zeigt der Wirkstoff gute wachstumshemmende Effekte an AML-Zellen und befindet sich deshalb in zwei Phase-1-Studien in AML-Patienten. In einer wird Tranylcypromin in Kombination mit ATRA getestet (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02273102) und bei der anderen wird zusätzlich Cytarabin verabreicht (German Clinical Trials Register, DRKS-ID: DRKS00006055) (Morera et al. 2016). In der Forschung von *Schenk et al.* 2012, auf der diese Studien aufbauen, wurde gezeigt, dass Tranylcypromin alleine fast keine Wirkung auf die ATRA-resistenten Leukämiezellen hat, diese jedoch dagegen sensibilisieren kann. Ebenso konnte Tranylcypromin nur in Verbindung mit ATRA eine Differenzierung induzieren (Schenk et al. 2012).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen bei keiner Zelllinie eine Induktion des Zelltods oder ein Verlust von $\Delta\psi_m$ durch Tranylcypromin. Aktivitätsverluste bis 50 % konnten im AlamarBlue[®]-Assay in den beiden Ewingsarkomzelllinien SK-ES-1 und A673 sowie den MOLM-13-Zellen verzeichnet werden. Bei den KDM1A-Knockout-Zellen ließ sich im AlamarBlue[®]-Assay ein kontinuierlicher Abfall der Aktivität um 20 % beobachten, während bei der parentalen Zelllinie nur ein Abfall um 15 % bei 100 μM zu messen war. Dieser Unterschied und auch die Wirkung an sich ist sehr gering und somit vernachlässigbar. Man kann somit davon ausgehen, dass an beiden Zelllinien Tranylcypromin zu keiner Wirkung führt und sollte hier nicht an der Hemmung der

KDM1A durch Tranylcypromin zweifeln. Letztendlich bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der Versuche mit Tranylcypromin die Aussage von *Schenk et al.*, dass der Inhibitor nicht alleine eingesetzt werden sollte.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Vermutung, dass die KDM1A-Hemmung durch SP2509 nicht der Grund für die wachstumshemmende, zelltötende Wirkung ist. Vielmehr muss SP2509 weitere Funktionen haben, die die zytotoxische Wirkung hervorbringt. Da letztere ja aber in allen untersuchten Zelllinien sehr deutlich ausfiel, könnte es sich bei SP2509 um einen interessanten Krebswirkstoff handeln, dessen Wirkmechanismus allerdings noch aufgeklärt werden muss.

7. Schlussfolgerung

Unter den Histon-modifizierenden epigenetischen Modulatoren liegt momentan ein Forschungsschwerpunkt auf der Histon-Lysin-Demethylase KDM1A, welche Teil von transkriptionsregulierenden Komplexen ist, die mit Zelldifferenzierung und Karzinogenese assoziiert sind, und somit einen vielversprechenden neuen Ansatzpunkt in der Krebstherapie darstellt (Maiques-Diaz und Somervaille 2016).

SP2509 ist ein KDM1A-Inhibitor, dem eine hohe zytotoxische Wirkung zugeschrieben wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diese Wirkung, zeigen allerdings auch, dass diese nicht aus der Hemmung der KDM1A resultiert. Dass SP2509 die Demethylase hemmt, wird dabei nicht bestritten. Aufgrund der hoch zytotoxischen Wirkung von SP2509 an Krebszellen stellt der Inhibitor einen vielversprechenden Ansatzpunkt in der Krebstherapie dar, welcher definitiv weiter erforscht werden sollte, um in den klinischen Gebrauch zu kommen. Diese Arbeit kann insbesondere die Behandlung von AML und Ewingsarkomen mit SP2509 empfehlen. Der genaue Wirkmechanismus des KDM1A-Inhibitors sollte allerdings zuvor ermittelt werden, vor allem in Hinblick auf den Einsatz am Menschen.

Weiterhin lässt sich aus dieser Arbeit schlussfolgern, dass die KDM1A-Inhibitoren generell nicht bei allen Krebsarten den Zelltod oder einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials induzieren. Welcher Inhibitor bei welcher Krebsart wirkt, wurde teilweise schon erprobt, wie beispielsweise GSK2879552 bei SCLC (Mohammad et al. 2015). Die Forschung in Hinblick auf spezifische Wirkungen an verschiedenen Krebszellen könnte allerdings noch erweitert werden.

Zudem muss darauf hingewiesen werden, dass durch die KDM1A-Hemmung Resistenzen überwunden werden können bzw. ein Synergismus entstehen kann, wie es beispielsweise für ATRA-resistente Leukämiezellen gezeigt wurde, die durch Tranylcypromin sensibilisiert werden konnten (Schenk et al. 2012). In der Kombination mit anderen Medikamenten einschließlich Chemotherapeutika liegt mithin ein weiterer möglicher Ansatzpunkt der Verwendung von KDM1A-Inhibitoren. Auch diese Art des Einsatzes bedarf weiterer Forschung.

ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin befinden sich momentan alle in Phase 1-Studien. In nächster Zeit wird sich somit zeigen, ob die Inhibitoren auch bei der Behandlung im Menschen tumorreduzierende Wirkung aufweisen und verträglich sind. Dies würde einen weiteren Erfolg im Bereich der Krebstherapie mit

epigenetischen Modulatoren darstellen und zudem unterstreichen, noch mehr in diesem Bereich zu forschen, vielleicht auch im Hinblick auf andere Krankheiten.

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Amente S, Lania L, Majello B. 2013. The histone LSD1 demethylase in stemness and cancer transcription programs. *Biochim Biophys Acta*, 1829 (10):981-986.
- Arrowsmith CH, Bountra C, Fish PV, Lee K, Schapira M. 2012. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 11 (5):384-400.
- Biswas D, Milne TA, Basrur V, Kim J, Elenitoba-Johnson KS, Allis CD, Roeder RG. 2011. Function of leukemogenic mixed lineage leukemia 1 (MLL) fusion proteins through distinct partner protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (38):15751-15756.
- Chang B, Chen Y, Zhao Y, Bruick RK. 2007. JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science*, 318 (5849):444-447.
- Chen Y, Yang Y, Wang F, Wan K, Yamane K, Zhang Y, Lei M. 2006. Crystal structure of human histone lysine-specific demethylase 1 (LSD1). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (38):13956-13961.
- Ciccone DN, Su H, Hevi S, Gay F, Lei H, Bajko J, Xu G, Li E, Chen T. 2009. KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. *Nature*, 461 (7262):415-418.
- Cloos PA, Christensen J, Agger K, Helin K. 2008. Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes Dev*, 22 (9):1115-1140.
- Das PP, Shao Z, Beyaz S, Apostolou E, Pinello L, De Los Angeles A, O'Brien K, Atsma JM, Fujiwara Y, Nguyen M, Ljuboja D, Guo G, Woo A, Yuan GC, Onder T, Daley G, Hochedlinger K, Kim J, Orkin SH. 2014. Distinct and combinatorial functions of Jmjd2b/Kdm4b and Jmjd2c/Kdm4c in mouse embryonic stem cell identity. *Mol Cell*, 53 (1):32-48.
- DGU. 2014. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Kurzversion 3.1 AWMF.
- Dirksen U, Jürgens H. 2014. S1-Leitlinie: Ewing-Sarkome des Kindes- und Jugendalters [Leitlinie]. AWMF online.
- Fiskus W, Sharma S, Shah B, Portier BP, Devaraj SG, Liu K, Iyer SP, Bearss D, Bhalla KN. 2014. Highly effective combination of LSD1 (KDM1A) antagonist

- and pan-histone deacetylase inhibitor against human AML cells. *Leukemia*, 28 (11):2155-2164.
- Florea C, Schneckenger M, Grandjeanette C, Dicato M, Diederich M. 2011. Epigenomics of leukemia: from mechanisms to therapeutic applications. *Epigenomics*, 3 (5):581-609.
- Forneris F, Binda C, Vanoni MA, Battaglioli E, Mattevi A. 2005. Human histone demethylase LSD1 reads the histone code. *J Biol Chem*, 280 (50):41360-41365.
- Forneris F, Binda C, Adamo A, Battaglioli E, Mattevi A. 2007. Structural basis of LSD1-CoREST selectivity in histone H3 recognition. *J Biol Chem*, 282 (28):20070-20074.
- Fu X, Zhang P, Yu B. 2017. Advances toward LSD1 inhibitors for cancer therapy. *Future Med Chem*, 9 (11): 1227-1242.
- Fukuda T, Tokunaga A, Sakamoto R, Yoshida N. 2011. Fbxl10/Kdm2b deficiency accelerates neural progenitor cell death and leads to exencephaly. *Mol Cell Neurosci*, 46 (3):614-624.
- Greenspan A. 2000. *Knochtumoren: Differentialdiagnose in Radiologie und Pathologie*. Stuttgart: Thieme.
- Gupta S, Weston A, Bearrs J, Thode T, Neiss A, Soldi R, Sharma S. 2016. Reversible lysine-specific demethylase 1 antagonist HCI-2509 inhibits growth and decreases c-MYC in castration- and docetaxel-resistant prostate cancer cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis*.
- Harris WJ, Huang X, Lynch JT, Spencer GJ, Hitchin JR, Li Y, Ciceri F, Blaser JG, Greystoke BF, Jordan AM, Miller CJ, Ogilvie DJ, Somerville TC. 2012. The histone demethylase KDM1A sustains the oncogenic potential of MLL-AF9 leukemia stem cells. *Cancer Cell*, 21 (4):473-487.
- Hojfeldt JW, Agger K, Helin K. 2013. Histone lysine demethylases as targets for anticancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 12 (12):917-930.
- Kashyap V, Ahmad S, Nilsson EM, Helczynski L, Kenna S, Persson JL, Gudas LJ, Mongan NP. 2013. The lysine specific demethylase-1 (LSD1/KDM1A) regulates VEGF-A expression in prostate cancer. *Mol Oncol*, 7 (3):555-566.
- Kerenyi MA, Shao Z, Hsu YJ, Guo G, Luc S, O'Brien K, Fujiwara Y, Peng C, Nguyen M, Orkin SH. 2013. Histone demethylase Lsd1 represses hematopoietic stem and progenitor cell signatures during blood cell maturation. *Elife*, 2:e00633.

- Ketscher A, Jilg CA, Willmann D, Hummel B, Imhof A, Russeler V, Holz S, Metzger E, Muller JM, Schule R. 2014. LSD1 controls metastasis of androgen-independent prostate cancer cells through PXN and LPAR6. *Oncogenesis*, 3:e120.
- Kooistra SM, Helin K. 2012. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13 (5):297-311.
- Krishnan S, Trievel RC. 2013. Structural and functional analysis of JMJD2D reveals molecular basis for site-specific demethylation among JMJD2 demethylases. *Structure*, 21 (1):98-108.
- Lee MG, Wynder C, Schmidt DM, McCafferty DG, Shiekhattar R. 2006. Histone H3 lysine 4 demethylation is a target of nonselective antidepressive medications. *Chem Biol*, 13 (6):563-567.
- Lee S, Lee JW, Lee SK. 2012. UTX, a histone H3-lysine 27 demethylase, acts as a critical switch to activate the cardiac developmental program. *Dev Cell*, 22 (1):25-37.
- Liu Z, Chen X, Zhou S, Liao L, Jiang R, Xu J. 2015. The histone H3K9 demethylase Kdm3b is required for somatic growth and female reproductive function. *Int J Biol Sci*, 11 (5):494-507.
- Loh YH, Zhang W, Chen X, George J, Ng HH. 2007. Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells. *Genes Dev*, 21 (20):2545-2557.
- Maes T, Carceller E, Salas J, Ortega A, Buesa C. 2015. Advances in the development of histone lysine demethylase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*, 23:52-60.
- Maes T, Tirapu I, Mascaró C, Ortega A, Estiarte A, Valls N, Castro-Palomino J, Arjol C, Kurz G. 2013. Preclinical characterization of a potent and selective inhibitor of the histone demethylase KDM1A for MLL leukemia. *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr e13543).
- Maiques-Diaz A, Somervaille TC. 2016. LSD1: biologic roles and therapeutic targeting. *Epigenomics*, 8 (8):1103-1116.
- McGrath JP, Williamson KE, Balasubramanian S, Odate S, Arora S, Hatton C, Edwards TM, O'Brien T, Magnuson S, Stokoe D, Daniels DL, Bryant BM, Trojer P. 2016. Pharmacological Inhibition of the Histone Lysine Demethylase

- KDM1A Suppresses the Growth of Multiple Acute Myeloid Leukemia Subtypes. *Cancer Res*, 76 (7):1975-1988.
- Metzger E, Wissmann M, Yin N, Muller JM, Schneider R, Peters AH, Gunther T, Buettner R, Schule R. 2005. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature*, 437 (7057):436-439.
- Mohammad HP, Smitheman KN, Kamat CD, Soong D, Federowicz KE, Van Aller GS, Schneck JL, Carson JD, Liu Y, Butticello M, Bonnette WG, Gorman SA, Degenhardt Y, Bai Y, McCabe MT, Pappalardi MB, Kasparec J, Tian X, McNulty KC, Rouse M, McDevitt P, Ho T, Crouthamel M, Hart TK, Concha NO, McHugh CF, Miller WH, Dhanak D, Tummino PJ, Carpenter CL, Johnson NW, Hann CL, Kruger RG. 2015. A DNA Hypomethylation Signature Predicts Antitumor Activity of LSD1 Inhibitors in SCLC. *Cancer Cell*, 28 (1):57-69.
- Morera L, Lubbert M, Jung M. 2016. Targeting histone methyltransferases and demethylases in clinical trials for cancer therapy. *Clin Epigenetics*, 8:57.
- Mould DP, McGonagle AE, Wiseman DH, Williams EL, Jordan AM. 2015. Reversible inhibitors of LSD1 as therapeutic agents in acute myeloid leukemia: clinical significance and progress to date. *Med Res Rev*, 35 (3):586-618.
- Pishas KI, Lessnick SL. 2016. Recent advances in targeted therapy for Ewing sarcoma. *F1000Res*, 5.
- Reinhardt D, Von Neuhoff C, Sander A, Creutzig U. 2012. [Genetic prognostic factors in childhood acute myeloid leukemia]. *Klin Padiatr*, 224 (6):372-376.
- Rübber H. 2014. *Uroonkologie*. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin.
- Rudolph T, Beuch S, Reuter G. 2013. Lysine-specific histone demethylase LSD1 and the dynamic control of chromatin. *Biol Chem*, 394 (8):1019-1028.
- Sankar S, Bell R, Stephens B, Zhuo R, Sharma S, Bearss DJ, Lessnick SL. 2013. Mechanism and relevance of EWS/FLI-mediated transcriptional repression in Ewing sarcoma. *Oncogene*, 32 (42):5089-5100.
- Sankar S, Theisen ER, Bearss J, Mulvihill T, Hoffman LM, Sorna V, Beckerle MC, Sharma S, Lessnick SL. 2014. Reversible LSD1 inhibition interferes with global EWS/ETS transcriptional activity and impedes Ewing sarcoma tumor growth. *Clin Cancer Res*, 20 (17):4584-4597.
- Schenk T, Chen WC, Gollner S, Howell L, Jin L, Hebestreit K, Klein HU, Popescu AC, Burnett A, Mills K, Casero RA, Jr., Marton L, Woster P, Minden MD,

- Dugas M, Wang JC, Dick JE, Muller-Tidow C, Petrie K, Zelent A. 2012. Inhibition of the LSD1 (KDM1A) demethylase reactivates the all-trans-retinoic acid differentiation pathway in acute myeloid leukemia. *Nat Med*, 18 (4):605-611.
- Schmidt DM, McCafferty DG. 2007. trans-2-Phenylcyclopropylamine is a mechanism-based inactivator of the histone demethylase LSD1. *Biochemistry*, 46 (14):4408-4416.
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA. 2010. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31 (1):27-36.
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, 119 (7):941-953.
- Shi Y, Sawada J, Sui G, Affar el B, Whetstine JR, Lan F, Ogawa H, Luke MP, Nakatani Y, Shi Y. 2003. Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature*, 422 (6933):735-738.
- Song Y, Wu F, Wu J. 2016. Targeting histone methylation for cancer therapy: enzymes, inhibitors, biological activity and perspectives. *J Hematol Oncol*, 9 (1):49.
- Sorna V, Theisen ER, Stephens B, Warner SL, Bearss DJ, Vankayalapati H, Sharma S. 2013. High-throughput virtual screening identifies novel N'-(1-phenylethylidene)-benzohydrazides as potent, specific, and reversible LSD1 inhibitors. *J Med Chem*, 56 (23):9496-9508.
- Sprussel A, Schulte JH, Weber S, Necke M, Handschke K, Thor T, Pajtler KW, Schramm A, König K, Diehl L, Mestdagh P, Vandesompele J, Speleman F, Jastrow H, Heukamp LC, Schule R, Duhrsen U, Buettner R, Eggert A, Gothert JR. 2012. Lysine-specific demethylase 1 restricts hematopoietic progenitor proliferation and is essential for terminal differentiation. *Leukemia*, 26 (9):2039-2051.
- Theisen ER, Pishas KI, Saund RS, Lessnick SL. 2016. Therapeutic opportunities in Ewing sarcoma: EWS-FLI inhibition via LSD1 targeting. *Oncotarget*, 7 (14):17616-17630.
- Tian X, Zhang S, Liu HM, Zhang YB, Blair CA, Mercola D, Sassone-Corsi P, Zi X. 2013. Histone lysine-specific methyltransferases and demethylases in

- carcinogenesis: new targets for cancer therapy and prevention. *Curr Cancer Drug Targets*, 13 (5):558-579.
- Wada T, Koyama D, Kikuchi J, Honda H, Furukawa Y. 2015. Overexpression of the shortest isoform of histone demethylase LSD1 primes hematopoietic stem cells for malignant transformation. *Blood*, 125 (24):3731-3746.
- Wang J, Hevi S, Kurash JK, Lei H, Gay F, Bajko J, Su H, Sun W, Chang H, Xu G, Gaudet F, Li E, Chen T. 2009. The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat Genet*, 41 (1):125-129.
- Wang M, Liu X, Guo J, Weng X, Jiang G, Wang Z, He L. 2015. Inhibition of LSD1 by Pargyline inhibited process of EMT and delayed progression of prostate cancer in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 467 (2):310-315.
- Wigle TJ, Copeland RA. 2013. Drugging the human methylome: an emerging modality for reversible control of aberrant gene transcription. *Curr Opin Chem Biol*, 17 (3):369-378.
- Yang M, Culhane JC, Szewczuk LM, Jalili P, Ball HL, Machius M, Cole PA, Yu H. 2007. Structural basis for the inhibition of the LSD1 histone demethylase by the antidepressant trans-2-phenylcyclopropylamine. *Biochemistry*, 46 (27):8058-8065.
- Yiallourous M. 2016. Akute myeloische Leukämie (AML) http://www.kinderkrebsinfo.de/sites/kinderkrebsinfo/content/e9031/e9035/e9952/e13948/AML_Langfassung_16082016_ger.pdf (Zugriff am 20.09.2016).
- Yiallourous M. 2016. Ewing-Sarkom (Kurzinformation) http://www.kinderkrebsinfo.de/sites/kinderkrebsinfo/content/e9031/e10591/e7708/e63966/e66834/Ewing-Sarkom-Kurzinfo14072016_ger.pdf (Zugriff am 20.09.2016).
- Zhang QJ, Chen HZ, Wang L, Liu DP, Hill JA, Liu ZP. 2011. The histone trimethyllysine demethylase JMJD2A promotes cardiac hypertrophy in response to hypertrophic stimuli in mice. *J Clin Invest*, 121 (6):2447-2456.
- Zheng YC, Ma J, Wang Z, Li J, Jiang B, Zhou W, Shi X, Wang X, Zhao W, Liu HM. 2015. A Systematic Review of Histone Lysine-Specific Demethylase 1 and Its Inhibitors. *Med Res Rev*, 35 (5):1032-1071.

9. Anhang

9.1. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Struktur von SP2509
- Abb. 2: Struktur von ORY-1001
- Abb. 3: Struktur von GSK2879552
- Abb. 4: Struktur von Tranylcypromin
- Abb. 5: Zelltod und Verlust von $\Delta\psi_m$ in MOLM-13-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 48 h mit den Inhibitoren behandelt und der Zelltod und der Verlust von $\Delta\psi_m$ mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bzw. DiOC₆(3)-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.
- Abb. 6: Veränderung der Zellviabilität der MOLM-13-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 96 h mit den Inhibitoren behandelt und die Zellviabilität mittels AlamarBlue[®]-Assay bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.
- Abb. 7: Zelltod und Verlust von $\Delta\psi_m$ in THP-1-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 48 h mit den Inhibitoren behandelt und der Zelltod und der Verlust von $\Delta\psi_m$ mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bzw. DiOC₆(3)-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.
- Abb. 8: Veränderung der Zellviabilität der THP-1-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 96 h mit den Inhibitoren behandelt und die Zellviabilität mittels AlamarBlue[®]-Assay bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.
- Abb. 9: Zelltod und Verlust von $\Delta\psi_m$ in SK-ES-1-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 48 h mit den Inhibitoren behandelt und der Zelltod und der

Verlust von $\Delta\psi_m$ mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bzw. DiOC₆(3)-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

Abb. 10: Veränderung der Zellviabilität der SK-ES-1-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 96 h mit den Inhibitoren behandelt und die Zellviabilität mittels AlamarBlue[®]-Assay bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

Abb. 11: Zelltod und Verlust von $\Delta\psi_m$ in A673-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 48 h mit den Inhibitoren behandelt und der Zelltod und der Verlust von $\Delta\psi_m$ mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bzw. DiOC₆(3)-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

Abb. 12: Veränderung der Zellviabilität der A673-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 96 h mit den Inhibitoren behandelt und die Zellviabilität mittels AlamarBlue[®]-Assay bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

Abb. 13: Zelltod und Verlust von $\Delta\psi_m$ in DU-145-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 48 h mit den Inhibitoren behandelt und der Zelltod und der Verlust von $\Delta\psi_m$ mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bzw. DiOC₆(3)-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

Abb. 14: Veränderung der Zellviabilität der DU-145-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 96 h mit den Inhibitoren behandelt und die Zellviabilität mittels AlamarBlue[®]-Assay bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

Abb. 15: Zelltod und Verlust von $\Delta\psi_m$ in PC-3-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 48 h mit den Inhibitoren behandelt und der Zelltod und der Verlust von $\Delta\psi_m$ mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-

Aufnahme bzw. DiOC₆(3)-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

Abb. 16: Veränderung der Zellviabilität der PC-3-Zellen nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 96 h mit den Inhibitoren behandelt und die Zellviabilität mittels AlamarBlue[®]-Assay bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

Abb. 17: Zelltod in HAP1-KDM1A- (II.) und den parentalen HAP1-Zellen (I.) nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 48 h mit den Inhibitoren behandelt und der Zelltod mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

Abb. 18: Verlust von $\Delta\psi_m$ in HAP1-KDM1A- (II.) und den parentalen HAP1-Zellen (I.) nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 48 h mit den Inhibitoren behandelt und der Verlust von $\Delta\psi_m$ mittels durchflusszytometrischer Analyse nach DiOC₆(3)-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

Abb. 19: Veränderung der Zellviabilität der HAP1-KDM1A- (II.) und der parentalen HAP1-Zellen (I.) nach Behandlung mit SP2509, ORY-1001, GSK2879552 und Tranylcypromin. Die Zellen wurden 96 h mit den Inhibitoren behandelt und die Zellviabilität mittels AlamarBlue[®]-Assay bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Bestimmungen.

9.2. Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. James F. Beck für die wertvollen Hinweise und Denkanstöße wie auch für die kritische Erörterung der Versuchsergebnisse und Vorschläge in den regelmäßigen Besprechungen.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Jürgen Sonnemann für die intensive Betreuung, die Führung durch die gesamte Arbeit mit konstruktiven Gesprächen und praktischen Hilfestellungen.

Bei Sabine Becker bedanke ich mich ganz herzlich für die Hilfe und den Beistand bei den Versuchsdurchführungen sowie für das nette Arbeitsklima im Labor.

Des Weiteren danke ich dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung Jena für die Förderung meiner Arbeit in Form eines sechsmonatigen Promotionsstipendiums.

Zudem möchte ich mich bei meinen Eltern für die vielfältige Unterstützung und deren Einschluss der Arbeit in ihre Gebete bedanken.

9.3. Lebenslauf

Zum Schutz der personenbezogenen Daten enthält keine öffentliche Version dieser Dissertation meinen Lebenslauf.

9.4. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. James Beck, Dr. Jürgen Sonnemann, Sabine Becker

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 06.12.2019

Miriam Agnes Zimmermann