

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Imke Bokelmann

aus Delmenhorst

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Epigenetische Therapieansätze am Beispiel
der Chronischen Lymphatischen Leukämie und
des Myelodysplastischen Syndroms

Gutachter: Prof. Dr. Dr. hc. Konrad Beyreuther

Prof. Dr. Ulrich Mahlknecht, PhD

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Hämatologie/Onkologie der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums in Heidelberg in der Zeit von März 2004 bis Dezember 2007 unter der wissenschaftlichen Anleitung von Prof. Dr. Ulrich Mahlknecht, PhD angefertigt.

meinen Lieben

Zusammenfassung

Unter der Bezeichnung „Epigenetik“ fasst man diejenigen Mechanismen zusammen, die es Zellen ermöglichen entsprechend ihrer Funktion und Umgebung ein individuelles Genexpressionsmuster zu etablieren und ohne Veränderung der DNA-Sequenz zu vererben. Die individuellen Informationen werden in der Zelle durch chemische Veränderungen der Chromatinbestandteile, wie die posttranslationalen Modifikationen an Histon-Proteinen oder die Methylierung der DNA, definiert und beeinflussen die Aktivität der betroffenen Abschnitte des Genoms. Störungen dieser Regulationsmechanismen können zur Aktivierung von Onkogenen und zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen und die maligne Entartung von Zellen verursachen. Im Gegensatz zu genetischen Mutationen sind die auf biochemischen Modifikationen des Chromatins beruhenden Epimutationen reversibel. Diese Eigenschaft wird von epigenetischen Therapieansätzen genutzt, deren Ziel es ist, durch die Inhibition bestimmter Enzyme das Ungleichgewicht in der epigenetischen Regulation zu beheben. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Histon-Deacetylase (HDAC)-Inhibitor Valproat (VPA) die Apoptoserate von *ex vivo* kultivierten CLL-Patienten-Zellen erhöht. Es stellte sich heraus, dass durch den Einfluss des HDAC-Inhibitors die Sensitivität der Zellen für die Induktion der Apoptose wieder hergestellt wurde. Dies geschah über die Aktivierung der klassischen Apoptosewege, wie durch die Aktivierung von Caspase 8 und 9 sowie die Beteiligung verschiedener Proteine der Bcl-2-Familie nachgewiesen werden konnte. Die Untersuchungen ergaben außerdem, dass CLL-Zellen deutlich empfindlicher auf VPA reagieren, als Zellen von gesunden Probanden. Somit ergaben sich neue Erkenntnisse über die Wirkungsweise dieses HDAC-Inhibitors in CLL-Zellen, die VPA allein oder in Kombination mit anderen Substanzen als eine Option für die Therapie von CLL-Patienten darstellen. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Behandlung mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Azacytidin bei MDS-Patienten zu einer reversiblen DNA-Hypomethylierung führte, die sowohl für das gesamte Genom als auch für spezifische Sequenzen nachweisbar war. Das klinische Ansprechen der Patienten war nicht mit der festgestellten Demethylierung korreliert. Ebenso ergab sich bei den untersuchten Genen nur teilweise ein Zusammenhang zwischen den Veränderungen der Genexpression und der Promotor-Methylierung. Somit konnte die Wirksamkeit von 5-Azacytidin bei der Reaktivierung hypermethylierter Gene festgestellt werden, um die Bedeutung dieses Mechanismus für Therapieerfolge aufzuklären, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

Summary

Epigenetics comprises mechanisms that initiate and maintain heritable patterns of gene expression according to cell function and microenvironment without changing the sequence of the genome. The “epigenetic code” is established by chromatin modifying enzymes like Histone deacetylases (HDACs) or DNA methyltransferases (DNMTs) and determines the activity state of affected genomic regions. Aberrant histone acetylation or DNA methylation may promote the activation of oncogenes or the silencing of tumor suppressor genes. These so called “epimutations”, play an important role in the pathogenesis of cancer. In contrast to genomic mutations, epimutations are reversible. This property is used for epigenetic treatment strategies which aims for the compensation of the imbalanced enzyme activities. In the first part of this work, blood cells of patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) were treated with valproic acid (VPA), a well-established histone deacetylase (HDAC) inhibitor. The main feature of the disease is the prolonged survival of B-cells that is being caused by aberrant apoptosis. It was observed that VPA mediates apoptosis in CLL cells *ex vivo* through caspase activation via both, the extrinsic and the intrinsic apoptosis pathways, as indicated by the activation of the caspase proteins 8 and 9, and cleavage of the proapoptotic protein BID. The Bcl-2/Bax ratio was decreased as a consequence of decreased *bcl-2* mRNA levels in response to treatment with VPA. With the results presented in this study, we have identified the HDAC inhibitor VPA to restore the apoptotic pathways in CLL cells and thus their ability to undergo apoptosis. The second part of this work shows the results of a study on Myelodysplastic Syndrome (MDS) patients treated with the DNMT inhibitor 5-azacytidine. A number of clinical trials with 5-azacytidine have reported durable improvements in bone marrow function and a reduction in the risk of leukemic transformation in MDS patients when compared to best supportive care. However, the demethylation characteristics of the drug have not been determined yet. The treatment of 10 patients was monitored and clinical and hematological parameters, as well as DNA methylation and gene expression markers were analyzed at weekly intervals. Significant clinical and hematological improvements, particularly in high-risk MDS patients, were observed. Also transient global DNA demethylation was detected in a subset of patients. However, the degree of 5-azacytidine mediated demethylation did not clearly correlate with the hematological response or epigenetic alterations at specific genomic loci. The study presents a detailed analysis of 5-azacytidine-induced epigenetic changes in MDS patients and suggests that the mode of action does not strictly depend on the demethylating activity of the drug.

Zusammenfassung

Summary

Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung	4
1.1. Epigenetik	4
1.1.1. Posttranslationale Modifikation von Histonen	4
1.1.2. DNA-Methylierung	7
1.2. Epigenetische Krebs-Therapie	9
1.2.1. HDAC-Inhibitoren	9
1.2.2. DNMT-Inhibitoren	13
1.3. Hämatopoese	15
1.4. Die Chronische Lymphatische Leukämie (CLL)	16
1.5. Das Myelodysplastische Syndrom (MDS)	19
1.6. Zielsetzung der Arbeit	22
2. Materialien und Methoden	23
2.1. Patienten- und Probandenmaterial für die Versuche zur Chronischen Lymphatischen Leukämie	23
2.2. Isolierung von mononukleären Zellen aus peripheren Blut	24
2.3. Zellkultur	25
2.4. Durchflusszytometrie	26
2.4.1. Grundlagen	26
2.4.2. Experimentelle Durchführung	27
2.5. Morphologische Analyse des Zellkerns	28
2.6. Western blot-Analyse	29
2.6.1. Herstellung von Gesamtzellsat	29
2.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	29
2.6.3. Histon-Isolierung	30
2.6.4. SDS-PAGE	31
2.6.5. Western blot	31
2.6.6. Ponceau-Färbung	33
2.7. RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und Real time PCR	34
2.7.1. Prinzip der Real time PCR	34
2.7.2. RNA-Isolierung	35
2.7.3. cDNA-Synthese	35
2.7.4. Real time PCR	35
2.8. Caspase-Aktivitätsmessung	36
2.8.1. Prinzip des Caspase Glo 3/7 assays	36
2.8.2. Durchführung des Caspase 3/7-Aktivitätstests	36
2.9. Statistik	37
2.10. Patienten- und Probandenmaterial für die Untersuchungen zur Therapie von MDS-Patienten mit dem DNMT-Inhibitor 5-Azacytidine	37
2.10.1. Patienten und Probanden	37
2.10.2. Therapieschema	39
2.11. Isolierung mononukleärer Zellen aus Blut- und Knochenmarkproben	40
2.12. Isolierung von DNA und RNA	40

2.13.	Anreicherung von CD34 ⁺ -Zellen mittels MACS-Technologie	40
2.14.	Analyse der klinischen Daten	40
2.15.	Methylierungsanalyse der DNA	41
2.15.1.	Analyse der genomweiten Methylierung	41
2.15.2.	Analyse der Promotor-spezifischen Methylierung	42
2.16.	Expressionsanalyse mittels Real time PCR	42
2.17.	Materialienverzeichnis	43
2.17.1.	Chemikalien	43
2.17.2.	Verbrauchsmaterial	44
2.17.3.	Geräte	44
2.17.4.	Computerprogramme	45
3.	Ergebnisse	46
3.1.	Einfluss von Valproinsäure auf die Apoptose-Rate von CLL-Zellen ex vivo	46
3.2.	Morphologische Veränderungen des Zellkerns	49
3.3.	Analyse der Histon-Acetylierung	50
3.4.	Einfluss von Valproinsäure auf die Apoptose-Rate von Probanden-Zellen	51
3.5.	Untersuchung der Caspase-Aktivierung	53
3.6.	Analyse der Expression pro- und anti-apoptotischer Gene der Bcl-2-Familie	55
3.7.	Untersuchung der Valproat-induzierten Aktivierung von Bid	56
3.8.	Expressionsanalyse der Antigene CD95 und CD49d	57
3.9.	Untersuchung des Einflusses von Valproinsäure auf die Aktivierung des extrinsischen und des intrinsischen Apoptose-Wegs	58
3.10.	Analyse der klinischen Daten	61
3.11.	Methylierungs- und Expressionsanalyse	65
3.11.1.	p15-, esr1-, ril- und hoxA4-Expression im Blut von Probanden	66
3.11.2.	Analyse der Knochenmark-Proben	67
3.11.3.	Analyse der Blut-Proben	72
3.11.4.	Analyse der Azacytidin-Wirkung auf Blutzellpopulationen mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad	80
4.	Diskussion	83
4.1.	Valproat erhöht die Apoptoserate von CLL-Zellen ex vivo	83
4.2.	Diagnostischen Parameter haben nur bedingt Einfluss auf das Ansprechen der CLL-Zellen <i>ex vivo</i>	83
4.3.	PBMCs von gesunden Probanden sind weniger sensitiv gegenüber der Apoptose-Induktion durch VPA	84
4.4.	Valproat-induzierte Apoptose in CLL-Zellen entsteht durch die Aktivierung des extrinsischen und des intrinsischen Signalwegs	85
4.5.	Valproat senkt das Bcl-2/Bax-Verhältnis der CLL-Zellen	88
4.6.	Schlussfolgerungen aus Teil I	90
4.7.	Azacytidin bewirkt bei einem Teil der MDS-Patienten klinisches und hämatologisches Ansprechen	91
4.8.	Azacytidin führt bei einer Subpopulation der MDS-Patienten zu reversibler DNA-Demethylierung	92
4.9.	Azacytidin beeinflusst die Gen-Expression sowohl durch die Demethylierung von Promotorsequenzen als auch durch weitere Mechanismen	94
4.10.	Schlussfolgerungen aus Teil II	95

5. Literaturverzeichnis	96
6. Anhang	111
6.1. Abkürzungsverzeichnis	111
6.2. Abbildungsverzeichnis	113
6.3. Tabellenverzeichnis	115
6.4. Erklärung	116
6.5. Danksagung	117

1. Einleitung

1.1. Epigenetik

Unter der Bezeichnung „Epigenetik“ fasst man diejenigen Mechanismen zusammen, die es Zellen ermöglichen ein von ihrer individuellen Funktion und Umgebung geprägtes Genexpressionsmuster zu etablieren und ohne Veränderung der DNA-Sequenz zu vererben. Die epigenetische Regulation stellt somit das Bindeglied zwischen den uniformen Erbanlagen eines Organismus und der Individualität der einzelnen Zellen dar (Esteller, 2006; Kornberg and Lorch, 1999).

Das Genom eukaryotischer Zellen liegt im Zellkern in geordneter Form als Chromatin, einem Komplex aus DNA und Proteinen, vor. Die epigenetische Regulation erfolgt durch chemische Veränderungen der Chromatinbestandteile, wie die posttranslationale Modifikation von Histon-Proteinen oder die Methylierung der DNA, und beeinflusst die Aktivität der betroffenen Abschnitte des Genoms. Da epigenetische Veränderungen im Gegensatz zu genetischen Aberrationen jedoch reversibel sind, können diese Abschnitte später aber auch wieder reaktiviert werden. Epigenetische Veränderungen spielen eine essentielle Rolle für die normale Funktionsweise eines Organismus von der Embryonalentwicklung bis zur Differenzierung spezialisierter Zelltypen (Reik, 2007).

1.1.1. Posttranslationale Modifikation von Histonen

Nukleosomen sind die Untereinheiten des Chromatins. Sie setzen sich aus einem Oktamer aus Paaren der Histone H4, H3, H2a und H2b zusammen, um das jeweils ein 146 Basenpaare umfassender DNA-Abschnitt gewunden ist. Die Interaktion zwischen DNA und Histonen wird durch Modifikationen der Lysin-reichen N-Termini der Proteine beeinflusst (Kornberg and Lorch, 1999). Zu den regulatorischen Modifikationen gehören die Acetylierung der Lysine, die Methylierung der Lysine und Arginine, die Phosphorylierung der Serine sowie die Ubiquitinierung und SUMOylierung der Lysine (Jenuwein and Allis, 2001; Strahl and Allis, 2000; Gregory et al., 2001; Davie, 1998). Aus der Kombination der chemischen Veränderungen ergibt sich der so genannte „Histon-Code“, der die Chromatinstruktur und

damit die Zugänglichkeit für DNA-bindende Proteine beeinflusst (Strahl and Allis, 2000). Die am besten charakterisierte Histon-Modifikation ist die posttranslationale Acetylierung. Sie wird durch zwei konkurrierende Enzymgruppen, die Histon-Acetyltransferasen (HATs) und die Histon-Deacetylasen (HDACs), reguliert.

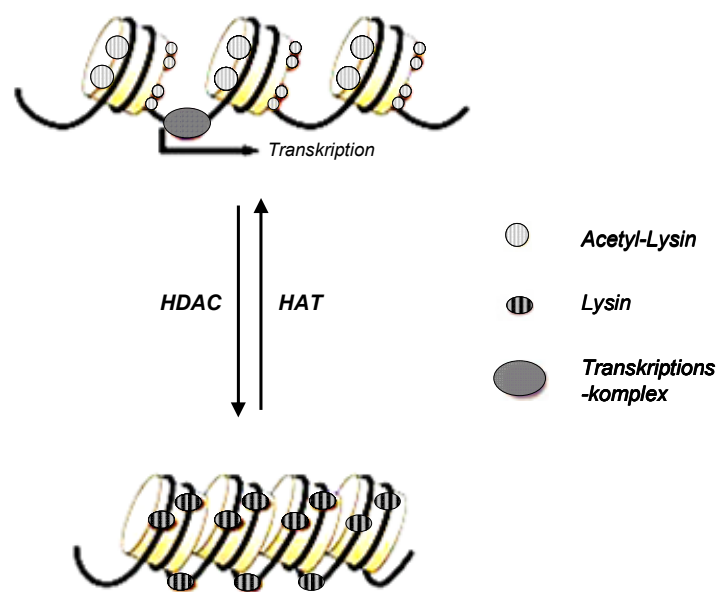


Abbildung 1:

schematische Darstellung der HAT- und HDAC-Aktivität

Histon-Acetyltransferasen und Histon-Deacetylasen modulieren durch die Addition und Subtraktion von Acetylgruppen die Chromatinstruktur und beeinflussen dadurch die Transkriptionsaktivität. (Abbildung modifiziert nach Taylor (Taylor, 2006))

HATs transferieren mit Hilfe des Cofaktors Acetyl-CoA Acetyl-Gruppen an Lysine der N-terminalen Bereiche der Histone. Dies führt teilweise zur Neutralisation der positiven Ladungen und reduziert die Bindung der Histone an die DNA. Diese gelockerte Chromatinstruktur ermöglicht den Zugang von Transkriptionsfaktoren und ist deshalb mit einer Aktivierung des entsprechenden DNA-Abschnitts assoziiert. HATs agieren meist als Bestandteile von Multiproteinkomplexen mit verschiedenen Coaktivatoren, die durch DNA-bindende Proteine sequenzspezifisch an Chromatinbereiche rekrutiert werden. HATs werden

in fünf Familien eingeteilt: die GNAT-Superfamilie, die MYST-Familie, p300/CBP, Coaktivatoren der nukleären Rezeptoren (z. B. SRC) und direkte Untereinheiten der Transkriptionskomplexe (wie z. B. TAF_{II}250) (Sterner and Berger, 2000). Neben Histonen sind auch verschiedene Transkriptionsfaktoren wie p53, E2F1 und GATA1 Substrate verschiedener HATs (Roth et al., 2001).

HDACs treten durch das Entfernen von Acetyl-Gruppen in Konkurrenz zu HATs und stellen somit den Gegenpart für die Regulation des Acetylierungsstatus. Durch die Wiederherstellung der positiven Ladung der Lysinreste fördern sie die Bindung der Histone an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA. Damit wird in den entsprechenden Abschnitten eine kompaktere Chromatinstruktur gebildet, die eine Gen-spezifische Repression der Transkription ermöglicht (Abbildung 1). Wie HATs binden auch HDACs nicht direkt an DNA-Sequenzen sondern kommen in Multiproteinkomplexen vor, die von Transkriptionsfaktoren und Corepressoren, wie Sin3, NuRD und SMRT, an Promotorregionen rekrutiert werden (Grozinger et al., 1999; Kuo and Allis, 1998; Torchia et al., 1998). Als Substrate sind außer Histonen auch Transkriptionsfaktoren, wie p53 und NFκB, sowie andere Nicht-Histon-Proteine, z. B. Tubulin und Hsp90 bekannt (Sterner and Berger, 2000; Bhalla, 2005). Die 18 bisher bekannten HDACs werden auf der Basis ihrer Homologie zu Hefe-Enzymen in vier Klassen eingeteilt (Xu et al., 2007). Der RPD3-homologen Klasse I gehören HDAC 1, 2, 3 und 8 an, der HDA1-homologen Klasse II die HDACs 4 bis 7, 9 und 10. Die Enzyme beider Klassen weisen Zn²⁺-abhängige katalytische Zentren auf (Miller et al., 2003). Im Gegensatz zu den primär im Zellkern lokalisierten kleineren HDACs der Klasse I (22 bis 55 kDa) werden die HDACs der Klasse II (120 bis 135 kDa) zwischen Kern und Zytoplasma hin und her transportiert (Marks et al., 2004; Gray and Ekstrom, 2001). HDACs der Klasse III werden auch als Sirtuine bezeichnet. Es sind sieben humane Sirtuine (SIRT 1 bis 7) bekannt. Sie zeigen keine strukturelle Ähnlichkeit zu HDACs der Klassen I und II. Ihre enzymatische Aktivität ist, wie die ihres Hefe-Homologs SIR2, von dem Cofaktor NAD (Nicotinamiddinukleotid) abhängig (Imai et al., 2000; li-Youcef et al., 2007). HDAC 11 weist sowohl Merkmale der Klasse I als auch Klasse II auf und wird deshalb separat in die Klasse IV eingeteilt (Voelter-Mahlknecht et al., 2005).

Veränderungen im Histon-Code bzw. in der Regulation Histon-modifizierender Enzyme können zu einer veränderten Genexpression sowie zu fehlerhafter DNA-Reparatur führen und werden mit der malignen Transformation von Zellen in Verbindung gebracht (Seligson et al.,

2005). Durch aberrante HAT- oder HDAC-Aktivität verursachte Expressionsveränderungen sind besonders bei hämatologischen Erkrankungen bekannt. Beispielsweise werden bei bestimmten Typen der Akuten Promyelozyten-Leukämie (APL) und der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) durch chromosomale Translokationen die Fusionsproteine PML-RAR α bzw. AML-ETO gebildet. Beide Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle bei der Differenzierung der myeloischen Reihe spielen. Im Gegensatz zu den normalen Faktoren rekrutieren die Fusionsproteine jedoch HDAC-enhaltende Repressorkomplexe, welche die Transkription der Zielgene verhindern und einen für beide Erkrankungen typischen Differenzierungsblock verursachen (Grignani et al., 2000; Amann et al., 2001).

1.1.2. DNA-Methylierung

Als DNA-Methylierung wird das Anfügen einer Methylgruppe an die Position C-5 eines Cytosinrests bezeichnet, der in einem GC-reichen Abschnitt der DNA, einer so genannten „CpG Insel“ (CpG island), lokalisiert ist. Die Reaktion wird von DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert, die S-Adenosyl-Methionin als Methylgruppen-Donor verwenden (Herman and Baylin, 2003; Issa, 2004).

DNMT 3a und DNMT 3b wurden ursprünglich als *de novo*-Methyltransferasen beschrieben; ihnen wurde die Funktion zugeschrieben, das DNA-Methylierungsmuster der Zellen im Laufe von Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen festzulegen (Okano et al., 1999). DNMT 1 wurde die Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung im Verlauf der Zellteilungen zugeschrieben, die durch die Übertragung des ursprünglichen Methylierungsmusters auf die neu synthetisierten DNA-Stränge weitergegeben wird (Chuang et al., 1997). Weitere Untersuchungen deuten jedoch überlappende Funktionen der unterschiedlichen DNMTs an (Rhee et al., 2002; Rhee et al., 2000).

CpG Inseln befinden sich vorwiegend in den Promotor-Sequenzen von Genen und Retroelementen, wo ihre Methylierung typischerweise inhibierend auf die Transkription des entsprechenden Bereichs wirkt (Klose and Bird, 2006). Die Stilllegung von Genen mittels Methylierung ist normalerweise ein differenzierungsabhängiger Prozess, durch den im jeweiligen Zelltyp nicht benötigte Gene abgeschaltet werden. Retroelemente werden dagegen permanent inaktiviert, um Veränderungen im Genom zu verhindern (Reik, 2007). In malignen Zellen sind Veränderungen im Methylierungsmuster der DNA verbreitet und werden als

„Epimutationen“ bezeichnet, die sowohl ursächlich als auch sekundär mit der Transformation der Zellen in Verbindung gebracht werden. Epimutationen treten sowohl in Form von Methylierungszunahmen (Hypermethylierung) als auch in Form von Methylierungsabnahmen (Hypomethylierung) auf (Abbildung 2). Eine Hypermethylierung wird vorwiegend an Promotoren von Tumorsuppressor-Genen wie z. B. p16^{INK4a}, p15^{INK4b} und ESR1 beobachtet (Esteller and Herman, 2002; Galm et al., 2006). Eine Hypomethylierung wird dagegen für die Gesamt-Methylierung des Genoms beobachtet und verursacht bezogen auf Centromere und Retroelemente genetische Instabilität (Eden et al., 2003).

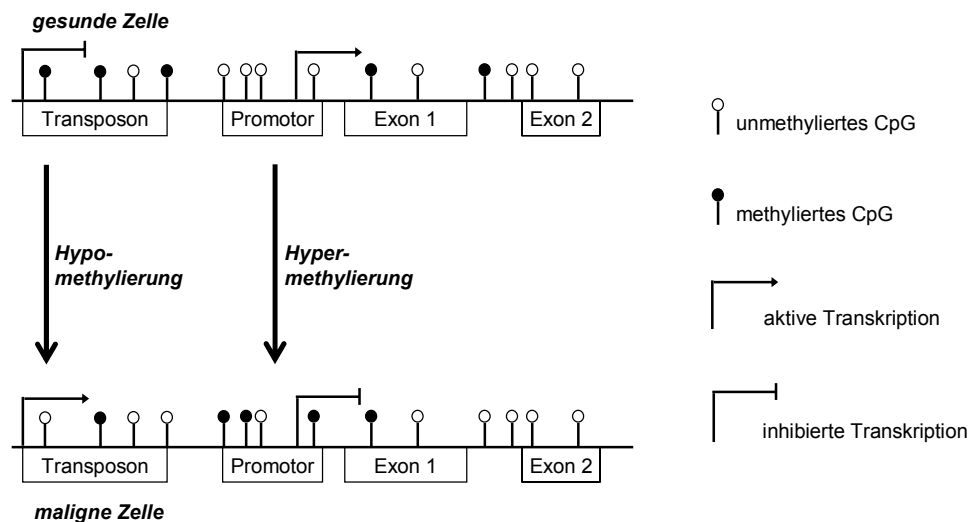


Abbildung 2:

schematische Darstellung der DNA-Methylierung in gesunden und malignen Zellen

In gesunden Zellen liegen Promotoren meist unmethyliert, Retroelemente und nicht kodierende Bereiche des Genoms weitgehend methyliert vor. Maligne Zellen zeigen im Gegensatz vermehrt Promotor-Hypermethylierung und genomweite Hypomethylierung.

1.2. Epigenetische Krebs-Therapie

Epigenetische Modifikationen legen im Verlauf der Differenzierung Art und Funktion der Zelle fest. Obwohl der genaue Mechanismus der Regulation noch nicht vollständig aufgeklärt ist, konnte der Zusammenhang zwischen Veränderungen im epigenetischen Code und der Entartung von Zellen festgestellt werden. Derartige Veränderungen können zur Aktivierung von Onkogenen und zur Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen führen, die Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und von DNA-Reparaturmechanismen haben.

Im Gegensatz zu genetischen Mutationen, die zu Sequenzveränderungen der DNA führen, sind die auf biochemischen Modifikationen des Chromatins beruhenden Epimutationen reversibel. Diese Eigenschaft wird von epigenetischen Therapieansätzen genutzt, deren Ziel es ist, durch die Inhibition bestimmter Chromatin-modifizierender Enzyme das Ungleichgewicht in der epigenetischen Regulation zu beheben.

1.2.1. HDAC-Inhibitoren

Es sind verschiedene strukturell unterschiedliche Moleküle natürlichen und synthetischen Ursprungs bekannt, die die Aktivität von HDACs inhibieren. Einige dieser Moleküle werden aktuell in klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit bei der Behandlung verschiedener Krebserkrankungen getestet (Tabelle 1). Verschiedene Inhibitoren verhindern die Aktivität der HDACs indem sie im aktiven Zentrum der Enzyme binden und das Zink-Ion chelatieren (Lu et al., 2004b). Da nur Klasse I und II HDACs Zn^{2+} -abhängig sind, werden Sirtuine von den bisher bekannten HDAC-Inhibitoren nicht beeinflusst.

Für HDAC-Inhibitoren (HDAC-Is) wurden diverse Anti-Tumoreffekte *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen. So führt die Behandlung mit HDAC-Is zum Zellzyklusarrest, zur Differenzierung und/oder zum Absterben maligner Zellen (Bhalla, 2005). Die Beeinflussung der unterschiedlichen zellulären Signalwege beruht auf verschiedenen Mechanismen: zum einen werden Promotoren und somit die Transkription bestimmter Gene durch die Inhibition der Histon-Deacetylierung reaktiviert; zum anderen wird die Deacetylierung von Nicht-Histon-Substraten der HDACs verhindert, womit Signalkaskaden direkt beeinflusst und/oder die Transkription anderer Gene inhibiert werden kann.

Die Wirkungsweise ist sowohl vom jeweiligen Zelltyp als auch von der Art des HDAC-Is abhängig (Bhalla, 2005; Xu et al., 2007).

Substanzgruppe	HDAC-Inhibitor	klinische Studien
kurzkettige Fettsäuren	Natriumbutyrat, Phenylnatriumbutyrat	Phase I, II (AML, MDS, ZNS-Tumore, kolorektale Karzinome)
	Valproinsäure (VPA, Orfiril)	Phase I, II (Melanom, ZNS-Tumore, AML, MDS)
Hydroxaminsäuren	Trichostatin A (TSA)	-
	Suberoylanilidhydroxamsäure (SAHA, Varinostat)	Phase I, II, III (verschiedene hämatologische Neoplasien, solide Tumore) Zulassung für kutane T-Zell-Lymphome
	Tubacin	-
	NVP-LAQ824	Phase I (hämatologische Neoplasien)
zyklische Tetrapeptide	Apicidin	-
	Depsipeptid (FK-228, FR901228)	Phase I, II (AML, CLL, kutane T-Zell-Lymphome, verschiedene solide Tumore)
	Trapoxin A	-
Benzamide	CI-994, Tacedinalin(N-Acetyldinalin)	Phase I, II (NSCLC, Pankreaskarzinom, multiples Myelom)
	MS-275	Phase I, II (AML, MDS, solide Tumore)

Tabelle 1:

Histon-Deacetylase-Inhibitoren

Auflistung einiger Substanzgruppen von HDAC-Is mit Beispielen und deren aktueller Studienlage (Tabelle modifiziert nach Claus & Lübbert (Claus and Lubbert, 2003))

Zellzyklusarrest und Wachstumsinhibition werden vornehmlich durch die Aktivierung von p21^{WAF1/CIP1} (transkriptionsabhängig) sowie p27^{KIP1} (transkriptionsunabhängig) und/oder die Inhibition der Transkription von Cyclin A und D verursacht (Richon et al., 2000; Gui et al., 2004; Sandor et al., 2000). Vor allem in leukämischen Zellen ist die Induktion des Zellzyklusarrests durch HDAC-Is in Verbindung mit nachfolgender Differenzierung beschrieben worden.

Durch die Behandlung mit HDAC-Is allein oder in Kombination mit All-Trans-Retinolsäure (ATRA) oder Granulozyten-koloniestimulierendem Faktor (G-CSF) kann der durch Fusionsproteine wie PML-RAR, PLZF-RAR oder AML-ETO verursachte

Differenzierungsblock aufgehoben werden (Johnstone and Licht, 2003; He et al., 2001; Ferrara et al., 2001; Liu et al., 2007).

Für die pro-apoptotische Wirkung der HDAC-Is sind verschiedene Mechanismen beschrieben worden. Apoptose kann in Zellen durch zwei Signalwege, den extrinsischen und den intrinsischen Weg, induziert werden (Abbildung 3).

Beim extrinsischen oder Rezeptor-abhängigen Weg bindet zunächst ein Ligand (z. B. Fas-L, TRAIL, TNF) an den entsprechenden Zelloberflächenrezeptor, den so genannten Todesrezeptor (z. B. Fas, DR4, DR5). Durch die Bindung werden strukturelle Umlagerungen eingeleitet, die zur Bildung des sog. DISC („death inducing signaling complex“), führen, der wiederum die Aktivierung der Caspase 8 katalysiert (Bodmer et al., 2000; Kischkel et al., 2000; Muzio et al., 1996; Srinivasula et al., 1996). Caspase 8 fungiert als Initiatorcaspase des extrinsischen Wegs und aktiviert nachfolgend die aus weiteren Effektorcaspasen wie Caspase 3, 6 und 7 bestehende so genannte Caspase-Kaskade. Dies determiniert die finale Phase der Apoptose und führt letztendlich zum Absterben der Zelle und zur Auflösung der Zellstrukturen (Slee et al., 1999; Chang and Yang, 2000; Cryns and Yuan, 1998).

HDAC-Is induzieren Apoptose zum einen durch die Erhöhung der Expression von Todesrezeptoren und deren Liganden, zum anderen durch die Expressionshemmung des Caspase 8-Inhibitors c-FLIP (Nakata et al., 2004; Aron et al., 2003; Insinga et al., 2005).

Der intrinsische oder Mitochondrien-vermittelte Apoptose-Weg beginnt mit der Freisetzung von proapoptotischen Faktoren wie Cytochrom C oder Smac/DIABLO aus dem Intermembranraum der Mitochondrien. Im Zytoplasma bildet Cytochrom C gemeinsam mit Apaf-1 (apoptotischer Proteaseaktivierungsfaktor-1) und Caspase 9 einen als Apoptosom bezeichneten Komplex, wodurch Caspase 9 aktiviert wird. Analog zu Caspase 8 im extrinsischen Weg agiert Caspase 9 als Initiatorcaspase des intrinsischen Wegs, die nachfolgend die Caspase-Kaskade aktiviert (Li et al., 1997; Saleh et al., 1999; Zou et al., 1999).

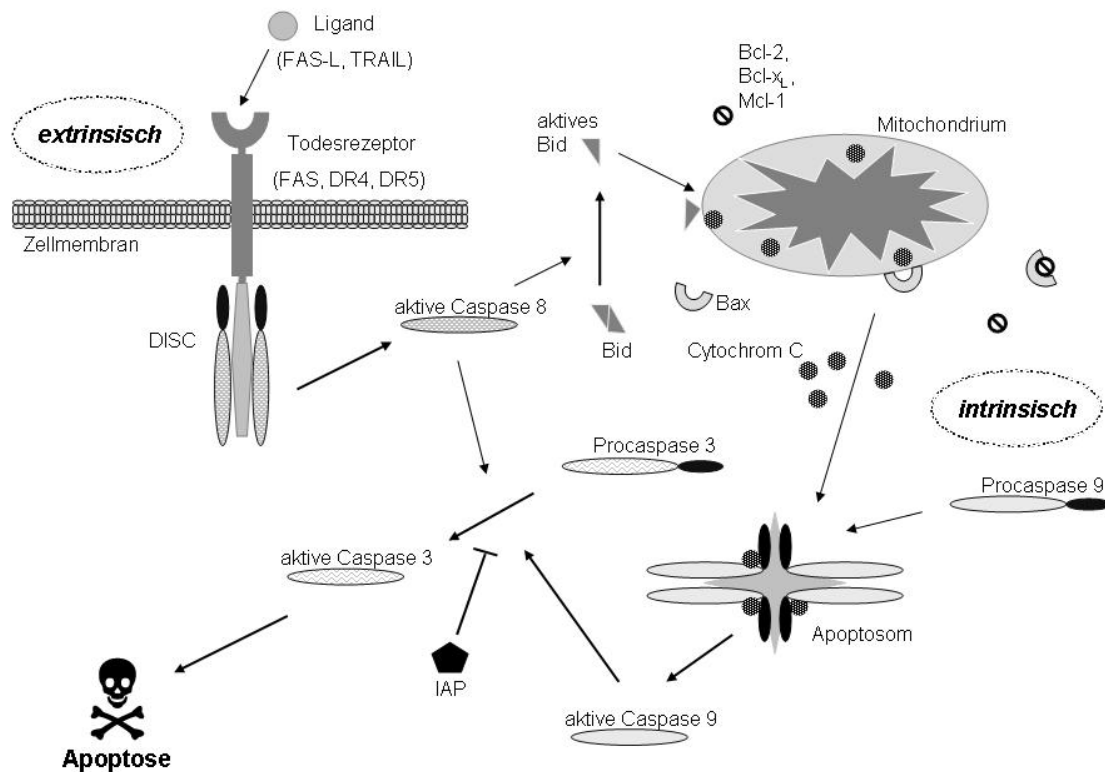


Abbildung 3:

vereinfachte schematische Darstellung der Apoptose-Wege in der Zelle

Die klassischen Wege zur Initiierung der Apoptose sind der extrinsische oder Rezeptor-abhängige Weg und der intrinsische bzw. Mitochondrien-vermittelte Weg.

Eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Mitochondrien-vermittelten Apoptose üben die Proteine der Bcl-2-Familie sowie IAPs (Apoptose-inhibitorische Proteine, „inhibitor of apoptosis proteins“) aus. Das Mengenverhältnis der antiapoptotischen Proteine (wie Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1) zu den proapoptotischen (z. B. Bax, Bid, Bak) beeinflusst die Sensitivität der Zellen gegenüber der Auslösung des intrinsischen Apoptose-Wegs (Pepper et al., 1997; Coultas and Strasser, 2003). Mit Hilfe von Bid, das von Caspase 8 aktiviert wird und durch die Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien, die zusätzliche Aktivierung von Caspase 9 vermittelt, kann eine Signalverstärkung der Rezeptor-induzierten Apoptose erreicht werden (Bokelmann and Mahlknecht, 2007; Barnhart et al., 2003; Scaffidi et al., 1999; Schmitz et al., 2000).

Die Aktivierung des intrinsischen Apoptose-Wegs ist die am häufigsten beschriebene Ursache des HDAC-I-induzierten Zelltods (Bhalla, 2005; Marks and Dokmanovic, 2005; Xu et al., 2007; Bolden et al., 2006). Die Mechanismen wurden bisher nicht abschließend aufgeklärt, es wurde jedoch die verstärkte Expression pro-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie (Zhang et al., 2004; Zhao et al., 2005) sowie die Repression von IAPs und anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie festgestellt (Zhang et al., 2004; Rosato et al., 2006).

1.2.2. DNMT-Inhibitoren

Die bekanntesten und am häufigsten verwendeten DNMT-Inhibitoren (DNMT-Is) sind die Azanukleoside Azacytidine (5-Azacytidine, Vidaza[®]) und Decitabine (2'-Desoxy-5-Azacytidine, Dacogen[®]). Ursprünglich als Nukleosidanaloga zur Chemotherapie entwickelt (Li et al., 1970b; Li et al., 1970a; Von Hoff et al., 1976), wurde später *in vitro* ihre Fähigkeit zur Induktion der Zelldifferenzierung sowie ihre demethylierende Wirkung entdeckt (Christman et al., 1983; Creusot et al., 1982; Gambari et al., 1984).

Beide Moleküle inhibieren DNMTs über den gleichen Mechanismus: bei der Replikation werden sie anstelle von Cytosin in die neu synthetisierten DNA-Stränge eingebaut; DNMTs erkennen die modifizierten Nukleotide als Substrat, werden jedoch während der Methylierungsreaktion kovalent an die DNA gebunden (Santi et al., 1984). Die irreversible Deaktivierung und anschließende Degradierung der DNMTs führt dazu, dass das DNA-Methylierungsmuster bei der Mitose nicht weitergegeben werden kann und bewirkt somit eine passive Demethylierung bei fortschreitender Zellteilung.

Im Gegensatz zum Desoxynukleosid Decitabine muss Azacytidine vor dem Einbau in die DNA von der Zelle in die Desoxy-Form umgewandelt werden. Zuvor kann es als RNA-Baustein in der Transkription und der Translation interferieren (Cihak et al., 1974; Cihak, 1974). Aufgrund dieses Unterschieds wird angenommen, dass Decitabine spezifischer in die DNA eingebaut wird und weniger Nebeneffekte verursacht als Azacytidine.

Azacytidine und Decitabine können die Promotor-Sequenz des bei Leukämien verbreitet hypermethylierten Tumorsuppressor-Gens *p15* in Knochenmarkzellen von Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (MDS) oder Akuter Myeloischer Leukämie (AML) demethylieren (Daskalakis et al., 2002; Gore et al., 2006).

Der therapeutische Effekt von DNMT-Is bei der Behandlung des MDS wurde in klinischen Studien für Azacytidine und Decitabine bewiesen (Kantarjian et al., 2007; Silverman et al., 2002), so dass beide Substanzen erstmals von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) für diese Indikation zugelassen wurden und mittlerweile auch in der Europäischen Union zugelassen sind.

Der erfolgreiche Einsatz von DNMT-Is beim MDS führte zur Initiation weiterer Studien zur Beurteilung der Einsatzmöglichkeiten bei anderen Erkrankungen. Viel versprechende Resultate wurden bei der Behandlung der AML und Therapie-resistenter Chronischer Myeloischer Leukämie (CML) erzielt (Issa et al., 2004; Issa et al., 2005). Auch für die Therapie von soliden Tumoren wurden die Einsatzmöglichkeiten von Azacytidine oder Decitabine untersucht, allerdings konnte ein therapeutischer Nutzen nicht eindeutig belegt werden (Chan et al., 2004; Samlowski et al., 2005).

In verschiedenen Patientengruppen konnte die Demethylierung von *LINE*-Elementen, repetitiven Centromer-Sequenzen und des Tumorsuppressor-Gens *p21* gezeigt werden (Issa et al., 2005; Mund et al., 2005).

Weitere DNMT-Is auf Nukleosidbasis, wie Zebularin (Cheng et al., 2003), oder mit anderem strukturellen Aufbau, wie Procain/Procainamid (Scheinbart et al., 1991), EGCG (Epigallocatechin-3-gallat) (Fang et al., 2003) oder RG108 (Brueckner et al., 2005) sind bekannt.

Trotz viel versprechender Studienresultate bezüglich der Verbesserung hämatologischer Parameter der Patienten ist über die molekularen Hintergründe der Veränderungen wenig bekannt. Als Mechanismus wird in erster Linie die epigenetische Reaktivierung von erkrankungsspezifisch inaktivierten Genen angenommen. Da als Reaktionen auf die Azacytidine-/Decitabine-Gabe Zytotoxizität und Myelosuppression auftreten, können auch diese Mechanismen nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren ist sowohl die Effizienz des Umbaus von Azacytidine in seine Desoxy-Form als auch des Einbaus der Cytosinanaloga in die DNA unbekannt und stellt in Zusammenhang mit der vergleichsweise niedrigen, klinischen Dosierung den epigenetischen Mechanismus der Therapien in Frage. Diesbezüglich sind somit weitere Untersuchungen erforderlich.

1.3. Hämatopoese

Die Bildung der unterschiedlichen Zellen des Blutsystems wird als Hämatopoese bezeichnet. Sie geht von multipotenten adulten Stammzellen aus, die hauptsächlich im Knochenmark lokalisiert sind und als hämatopoetische Stammzellen bezeichnet werden. Die Stammzellen teilen sich asymmetrisch, d.h. zum einen zum Selbsterhalt, zum anderen zur Bildung von Progenitorzellen, die über verschiedene Zwischenstufen alle zellulären Bestandteile des Blutes hervorbringen. Bei der weiteren Differenzierung unterscheidet man zwischen den Wegen der lymphatischen und der myeloischen Reihe. Lymphoide Progenitoren reifen im Lymphsystem aus und bilden dort T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen (natürliche Killerzellen). Myeloische Progenitoren differenzieren dagegen vorwiegend im Knochenmark und sind für die Bildung von Granulozyten und Monozyten/Makrophagen, Erythrozyten (roten Blutzellen) und Thrombozyten (Blutplättchen) verantwortlich (Abbildung 4).

Maligne Erkrankungen des hämatopoetischen Systems können in allen Zellreihen und auf allen Differenzierungsstufen auftreten. In Abhängigkeit vom entarteten Zelltyp und dem Krankheitsverlauf unterscheidet man zwischen Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL), Akuten Myeloischen Leukämie (AML), malignen Lymphomen, wie z. B. der Chronischen Lymphatischen Leukämie (CLL) und dem Multiplen Myelom, Myelodysplastischem Syndrom (MDS), myeloproliferativen Erkrankungen und verschiedenen Sonderformen dieser Gruppen.

Da sich diese Erkrankungen bezüglich ihrer Ursachen, des Krankheitsbildes und der Behandlungsmöglichkeiten stark voneinander unterscheiden, werden im Weiteren nur die beiden für diese Arbeit entscheidenden Entitäten charakterisiert.

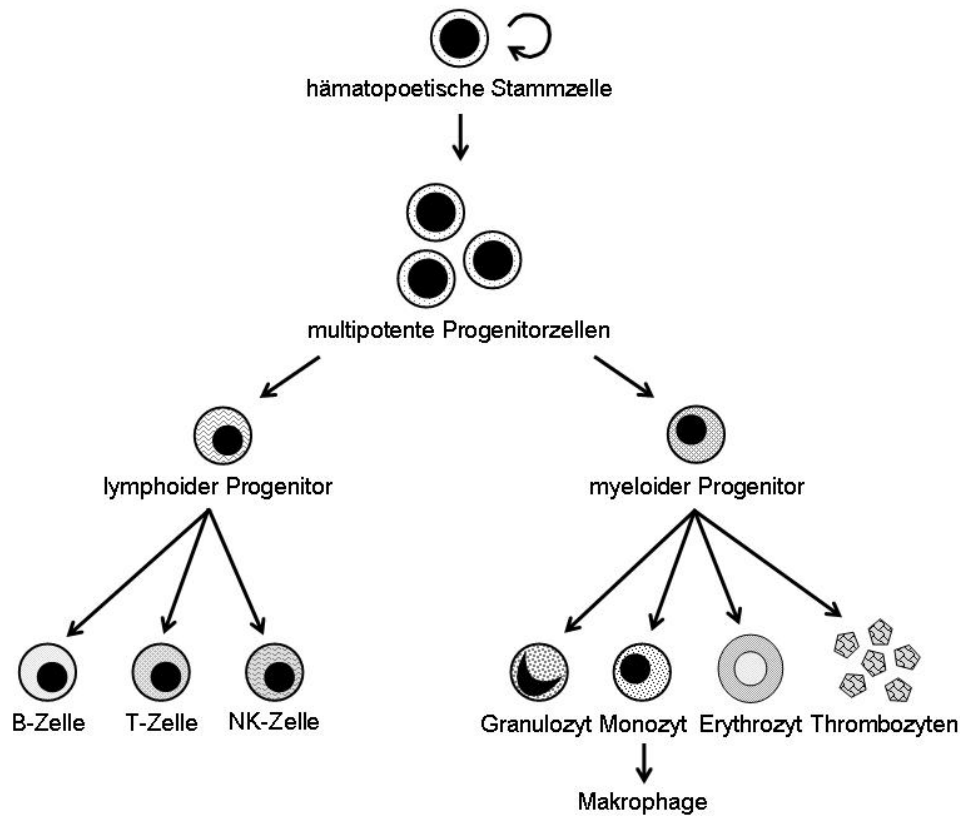


Abbildung 4:
Modell der Hämatopoese
 (Abbildung modifiziert nach Passegué et al. (Passegue et al., 2003))

1.4. Die Chronische Lymphatische Leukämie (CLL)

Die Chronische Lymphatische B-Zellen-Leukämie ist die am häufigsten vorkommende leukämische Erkrankung Erwachsener in der westlichen Welt. Die Krankheit zeichnet sich durch die allmähliche Vermehrung und Ansammlung monoklonaler $CD5^+$ B-Lymphozyten im Blut sowie häufig auch den Lymphknoten, dem Knochenmark und der Milz aus. Die CLL-B-Zellen befinden sich größtenteils in der G0/G1-Phase des Zellzyklus. Die primäre pathogene Veränderung, die zur Bildung der anormalen B-Zellen führt, ist noch nicht sicher identifiziert worden. Aufgrund der vielen Veränderungen im Bereich Apoptose-assoziiierter Gene und Signalwege wird die Unfähigkeit der CLL-Zellen zum programmierten Zelltod als grundlegende Ursache angenommen. Die Akkumulation der CLL-B-Zellen kommt somit eher durch ein verlängertes Überleben als durch verstärkte Proliferation zustande (Chanan-Khan

and Porter, 2006; Jewell, 2002). Allerdings hat die Proliferationsrate großen Einfluss auf die Aggressivität und damit den Verlauf der Erkrankung (Chiorazzi and Ferrarini, 2006).

Der klinische Verlauf der Erkrankung ist sehr unterschiedlich: Bei vielen Patienten treten keine Symptome auf und die Diagnose der Erkrankung erfolgt zufällig im Rahmen anderer Untersuchungen. Häufig benötigen diese Patienten über mehrere Jahre hinweg keine Behandlung der CLL und ihre Lebenserwartung wird durch die Erkrankung nicht verringert. Bei anderen Patienten kommt es sofort oder im Zuge des Fortschreitens der Erkrankung zur Ausprägung von Symptomen, wie Leistungsschwäche, Nachtschweiß, Lymphknotenschwellungen, Milzvergrößerung oder Infektneigung, die palliativ behandelt werden. Die einzige kurative Therapieoption stellt eine Stammzelltransplantation dar, die jedoch aufgrund des meist fortgeschrittenen Lebensalters und reduzierten Allgemeinzustands nur für wenige Patienten in Betracht kommt (Dreger et al., 2007). Zur Behandlung werden Zytostatika (z. B. Chlorambucil, Fludarabin, Cyclophosphamid) allein oder in Kombination mit spezifischen monoklonalen Antikörpern (z. B. Rituximab, Alemtuzumab) eingesetzt (Wierda, 2006).

Als Grundlage für die Therapieeinleitung dienen die Stadieneinteilungen nach Binet (Binet et al., 1981) oder Rai (Rai et al., 1975; Rai and Han, 1990) (Tabelle 2 und 3), die klinische Subgruppen anhand des Lymphknotenstatus, der Milz- und Lebergröße, des Hämoglobinwertes (Hb) und der Thrombozytenzahl definieren. Da die prognostische Aussage dieser Einteilungen aber nur gering ist, werden mittlerweile zusätzliche Faktoren berücksichtigt, wie die Expression der Zelloberflächenantigene CD38 (Krober et al., 2002) und ZAP70 (Chen et al., 2002), der Mutationsstatus der variablen Immunglobulin-Schwerketten-Genregion (IgV_H) (Hamblin et al., 1999; Damle et al., 1999) und zytogenetische Aberrationen.

Risiko	Stadium	Anzahl befallener Lymphknotenregionen	Hämoglobin [g/dl]	Thrombozyten [μ l]	medianes Überleben
niedrig	A	< 3	> 10	normal	> 10 Jahre
mittel	B	\geq 3	> 10	normal	5 Jahre
hoch	C	unabhängig	< 10	< 100000	2 Jahre

Tabelle 2:

Stadieneinteilung der CLL nach Binet

(Tabelle modifiziert nach Binet (Binet et al., 1981))

Risiko	Stadium	Definition	medianes Überleben
niedrig	0	Lymphozytose $\geq 5000/\mu\text{l}$ Knochenmark-Infiltration $> 30\%$	$\geq 12,5$ Jahre
mittel	I	Lymphozytose + Lymphadenopathie	8,5 Jahre
	II	Lymphozytose + Splenomegalie und/oder Hepatomegalie (mit oder ohne Lymphadenopathie)	6 Jahre
hoch	III	Lymphozytose + Anämie (Hämoglobin $< 11\text{ g/dl}$) (mit oder ohne Adenopathie/Organomegalie)	1,5 Jahre
	IV	Lymphozytose + Thrombozytopenie (Thrombozyten $< 100000/\mu\text{l}$) (mit oder ohne Anämie/Adenopathie/Organomegalie)	1,5 Jahre

Tabelle 3:**Stadieneinteilung der CLL nach Rai**

(Tabelle modifiziert nach Rai et al. (Rai et al., 1975; Rai and Han, 1990))

Chromosomale Veränderungen sind ein charakteristisches Phänomen aller Malignome. Mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungs (FISH)-Technik werden in über 80 % der CLL-Proben genetische Aberrationen festgestellt. Die am häufigsten vorkommenden Anomalien sind Deletionen im Bereich 13q14, 11q22-q23, 6q21, 17p13 und die Trisomie des Chromosoms 12 (Dohner et al., 2000). Dabei sind ein normaler Karyotyp, die Deletion 13q und Trisomie 12 mit einer guten Prognose, alle anderen Aberrationen sowie insbesondere komplexe Karyotypen mit einer schlechten Prognose verbunden.

Obwohl die Gene bzw. Signalkaskaden, die an der Ausbildung des CLL-Phänotyps beteiligt sind, noch nicht abschließend charakterisiert werden konnten, zeigt sich eine deutliche Beteiligung von Apoptose-assoziierten Genen. Im chromosomalen Lokus 13q14 sind zwei miRNA-Gene (miRNA-15a und -16-1) lokalisiert, die auf posttranskriptionaler Ebene die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 inhibieren (Cimmino et al., 2005). Insgesamt können in 65 % der CLL-Zellen Veränderungen, wie Deletionen oder Translokationen bzw. eine verringerte Expression der beiden miRNAs nachgewiesen werden (Calin et al., 2002). Die Verluste an den Chromosomen 11 und 17 sind mit der Deletion der Gene für ATM (11q22-q23) und p53 (17p13) verbunden, die beide eine proapoptotische Wirkung in der Zelle ausüben (Lin et al., 2002; Stankovic et al., 2002).

Unabhängig von chromosomalen Veränderungen wurden zahlreiche Faktoren identifiziert, die in CLL-B-Zellen verstärkt exprimiert bzw. aktiviert werden und mit der Apoptose-Inhibition in Verbindung stehen. Diese Protein-Kinasen und Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Akt, NF κ B und Faktoren des WNT-Signalwegs (Ringshausen et al., 2002; Mak and Yeh,

2002; Furman et al., 2000), regulieren die Expression der pro- und antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie und beeinflussen somit die Sensitivität der Zelle für Apoptose-induzierende Signale (Barragan et al., 2002; Wickremasinghe et al., 2001; Lu et al., 2004a).

1.5. Das Myelodysplastische Syndrom (MDS)

Das Myelodysplastische Syndrom (MDS) ist die erste Erkrankung, die erfolgreich mit DNMT-Inhibitoren behandelt wurde.

Unter der Bezeichnung MDS sind verschiedene Subtypen hämatopoetischer Stammzellerkrankungen zusammengefasst. Diese Erkrankungen zeichnen sich durch die ineffektive Bildung von Blutzellen aus, die aus Störungen in der Regulation der Proliferation, Differenzierung und Apoptose der hämatopoetischen Vorläuferzellen resultiert. Gemeinsames Merkmal der unterschiedlichen Typen ist deshalb das Auftreten von Dysplasien (Ganser and Hoelzer, 1992). Vor allem Anämie, aber auch Thrombozytopenie und Neutropenie/Granulozytopenie, kommen allein oder in Kombination, teilweise auch als Panzytopenie, vor. Des Weiteren kommt es verbreitet zu einer vermehrten Bildung von Blasten im Knochenmark (Malcovati et al., 2005). Die Erkrankung kann für den Patienten wenig beeinträchtigend und über einen langen Zeitraum stabil verlaufen oder innerhalb kürzester Zeit fortschreiten und sich zu einer sekundären AML entwickeln.

Der Krankheitsverlauf ist abhängig von bestimmten Krankheitsmerkmalen, wie der Blastenzahl im Knochenmark, der Anzahl und Stärke unterschiedlicher Zytopenien und chromosomalen Veränderungen. Diese Merkmale werden auch zur Unterteilung des MDS in verschiedene Subtypen nach den Richtlinien der WHO und zur Einordnung in IPSS (international prognostic scoring system) -Risikogruppen verwendet (Haferlach and Schoch, 2002) (vergleiche Tabelle 4).

Ein MDS tritt vorwiegend bei älteren Menschen auf, häufig auch sekundär nach einer Strahlen- oder Chemotherapie, nur eine Minderheit der Betroffenen befindet sich im mittleren Erwachsenenalter. Da Patienten mit fortgeschrittenem Alter empfindlicher auf die Belastungen und Nebenwirkungen zytotoxischer Chemotherapien reagieren, sind die Behandlungsmöglichkeiten und auch die Therapie durch eine Stammzelltransplantation

limitiert. Die Standardbehandlung für Patienten mit MDS ist deshalb eine supportive Therapie mit Transfusionen von Erythrozyten oder Thrombozyten bei entsprechend gesenkten Blutwerten, außerdem die prophylaktische Gabe von Antibiotika bei Infektionsneigung sowie die Verabreichung bestimmter Wachstumsfaktoren, wie Erythropoetin und G-CSF (Casadevall et al., 2004; Hellstrom-Lindberg, 1995; Negrin et al., 1996).

Entität	Dysplasie	Blasten im Blut	Blasten im Knochenmark	Ringsideroblasten	Zytogenetik	
5q- Syndrom	meist nur Erythropoese	< 5 %		-	nur Del. 5q	
refraktäre Anämie (RA)		< 1 %		-	verschieden	
RA mit Ringsideroblasten (RARS)		keine		+		
refraktäre Zytopenie mit Multiliniendysplasie (RCMD)	2-3 Linien	selten	< 5 %	-		
RCMD mit Ringsideroblasten (RCMD-RS)			+			
RA mit Erhöhung von Blasten, Grad 1 (RAEB-1)	1-3 Linien	< 5 %	< 5-9 %	-		
RA mit Erhöhung von Blasten, Grad 2 (RAEB-2)		5-19 %	10-19 %	-		
chronische myelomonozytäre Leukämie, Grad 1 (CMML-1)		< 5 %	< 10 %	-		
chronische myelomonozytäre Leukämie, Grad 2 (CMML-2)		5-19 %	10-19 %	-		
unklassifizierbare MDS (MDS-U)	1 Linie	keine	< 5 %	-		

Tabelle 4:

WHO-Vorschläge zur Klassifizierung myelodysplastischer Syndrome

(Tabelle modifiziert nach Haferlach & Schoch (Haferlach and Schoch, 2002))

Neue Behandlungsstrategien sollen selektiv molekulare Ziele in einzelnen Signalwegen der entarteten Zellen oder deren epigenetische Regulation beeinflussen und damit Nebenwirkungen minimieren. Vorreiter auf diesem Gebiet sind die Wirkstoffe Lenalidomid, Azacytidine und Decitabine.

Der immunmodulatorische Wirkstoff Lenalidomid (Revlimid®) ist ein Struktur analog des Thalidomid (Thalomid®) und wird für die Behandlung von MDS-Patienten mit der zytogenetischen Aberration 5q- eingesetzt. Es hemmt in dieser Patientengruppe die Bildung inflammatorischer Zytokine und die Angiogenese und fördert die Aktivität des Erythropoetin-Rezeptors (Crane and List, 2005).

Durch die Behandlung mit DNMT-Is Azacytidine und Decitabine zeigten sich deutliche Verbesserungen der klinischen Parameter und der Knochenmarkfunktion sowie eine Verbesserung der Lebensqualität der Patienten. Zusätzlich nahm das Risiko einer Transformation des MDS in eine akute Leukämie ab (Kantarjian et al., 2007; Silverman et al., 2002). Azacytidine wird sowohl bei Niedrigrisiko- als auch bei Hochrisiko-Patienten eingesetzt. In einer randomisierten Phase III-Studie sprachen 60 % der MDS-Patienten auf die Behandlung an; 7 % zeigten eine komplette Remission, 16 % eine partielle Remission und 37 % eine hämatologische Verbesserung (Silverman et al., 2002).

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht die Inhibition epigenetischer Modulatoren zur Behandlung von entarteten Zellen in hämatologischen Erkrankungen.

Der erste Teil beschäftigt sich mit der Wirkung des Histon-Deacetylase-Inhibitors Valproat auf *ex vivo* kultivierte Zellen von Patienten mit Chronischer Lymphatischer Leukämie. Ziel der Untersuchung war es, den Apoptose-Block der Zellen mit Hilfe des Inhibitors aufzuheben und die daran beteiligten Mechanismen zu identifizieren.

Thema des zweiten Teils ist die Untersuchung der Wirkungsweise des DNA-Methyltransferase-Inhibitors 5-Azacytidin (Vidaza[®]) bei der Behandlung von Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom. Es wurde die DNA-Methylierung und die Expression bestimmter Zielgene in Blut- und Knochenmark-Proben von Patienten im Verlauf der Therapie untersucht. Ziel der Untersuchung war es, den Zusammenhang zwischen den therapeutischen Erfolgen des Inhibitors und seiner demethylierenden Wirkung zu analysieren.

2. Materialien und Methoden

2.1. Patienten- und Probandenmaterial für die Versuche zur Chronischen Lymphatischen Leukämie

Nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung und Einverständnis der Patienten bzw. gesunden Spender entsprechend der Richtlinien der Deklaration von Helsinki wurden je 8 ml periphervenösen Blutes entnommen. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Heidelberg lag vor.

Zellen aus den Blutproben von 30 Patienten mit diagnostizierter B-CLL und von 5 hämatologisch-unauffälligen Spendern wurden untersucht und ausgewertet. Auswahlkriterien für die Patienten waren die Diagnose einer B-CLL und ein zeitlicher Abstand zwischen Probenentnahme und letzter CLL-bezogener Therapie von mindestens 3 Monaten. Bei den CLL-Patienten handelte es sich um 21 Männer (70%) und 9 Frauen (30%) mit einem Altersdurchschnitt von 67,9 Jahren (54-81 Jahre; vergleiche Tabelle 13 in Abschnitt 3.1). Die hämatologisch-unauffälligen Probanden waren zwei Männer und drei Frauen mit einem Altersdurchschnitt von 32,0 Jahren (27-39 Jahre; vergleiche Tabelle 5).

Nr.	Alter ¹	Geschlecht ²
1	29	w
2	27	m
3	28	w
4	37	w
5	39	m

Tabelle 5:

Probandencharakteristika (I)

¹ bei Blutentnahme ² m, männlich; w, weiblich

2.2. Isolierung von mononukleären Zellen aus peripheren venösen Blut

Alle weiteren Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilarbeitsbank (LaminAir HLB2448GS, Heraeus) durchgeführt, soweit nicht anders vermerkt. Alle für die Zellkultur verwendeten Medien, Lösungen und Chemikalien waren steril oder vor Gebrauch 20 Minuten bei 121° C und 1 bar Überdruck autoklaviert bzw. steril filtriert worden.

Mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) weisen eine etwas geringere Dichte als Granulozyten auf und können auf Grund dessen mit Hilfe einer isopyknischen Zentrifugation mit einem diskontinuierlichen Dichtegradienten isoliert werden.

Die Zellseparation mit Ficoll-Metrizoat beruht darauf, dass das Polysaccharid Ficoll die Erythrozyten zu rasch sedimentierenden großen Klumpen agglutiniert, während Metrizoat (Na⁺-Diatrizoat; amerikanischer Handelsname: Hypaque[®]) die Dichte des Mediums auf 1,077 g/l erhöht.

Es wurden jeweils ein Teil antikoaguliertes Vollblut bzw. Knochenmark mit 1 Teil PBS (phosphate-buffered-saline without Ca²⁺ and Mg²⁺, Cambrex) in sterilen 50 mL-Röhrchen (Greiner) verdünnt. Je 35 ml dieses Gemisches wurden nun vorsichtig auf 15 ml Biocoll-Lösung (Biochrom KG) geschichtet und anschließend in einer Rotanta RPC-Zentrifuge (Hettich) bei 390 x g für 45 Minuten ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Wie in Abbildung 5 gezeigt, bilden die mononukleären Zellen (Peripheral-Blood-Mononuclear-Cells, PBMCs) eine weißliche Interphase zwischen der darunter liegender Gradientenlösung und dem darüber liegenden Überstand, einem Gemisch aus PBS und Plasma, und können mit einer sterilen Einmal-Pasteurpipette (Sarstedt) abgenommen werden. Um mit den Zellen entnommene Gradientenlösung und eventuell noch vorhandene Thrombozyten zu entfernen, wurden die PBMCs zweimal mit PBS gewaschen (210 x g, 10 Minuten). Zur Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung wurde ein Aliquot mit einem Teil Trypan-Blau gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

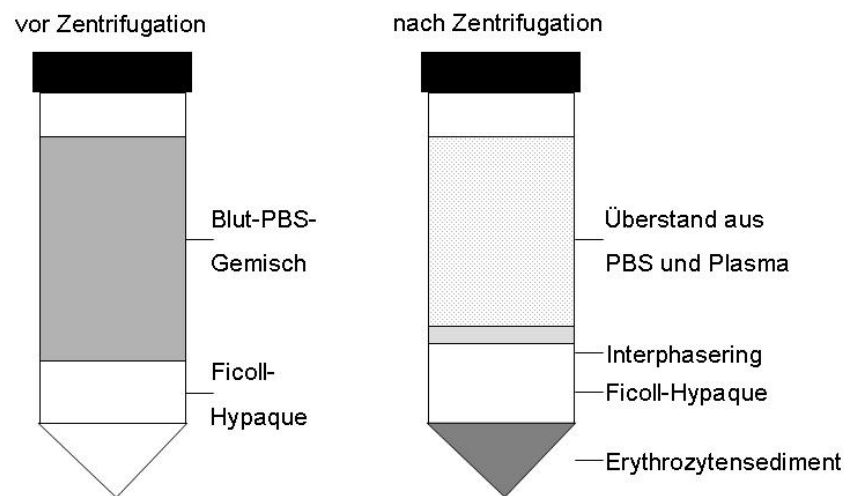


Abbildung 5:
Ficoll – Dichtezentrifugation

2.3. Zellkultur

Die PBMCs von CLL-Patienten wurden direkt nach der Isolierung in RPMI1640-Medium mit L-Glutamin (PAA) sowie 10 % FBS (fetal bovine serum, Biochrom) und 1% Penicillin und Streptomycin (Invitrogen) aufgenommen und auf etwa 2×10^6 Zellen/ml mit Medium verdünnt.

Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen in unterschiedliche Zellkulturplatten (Sarstedt) gegeben und mit verschiedenen Konzentrationen (0 bis 3 mM) Valproat (Orfiril® Injektionslösung; Destin) behandelt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂ / 95% Luftatmosphäre.

Die Dauer der Behandlung variierte je nach Versuchsaufbau und Fragestellung zwischen 8 Stunden und 14 Tagen.

2.4. Durchflusszytometrie

2.4.1. Grundlagen

Zur Untersuchung definierter Eigenschaften von Einzelzellen in Zellsuspensionen z.B. Größe, Granularität oder Expression spezifischer Antigene kann die Durchflusszytometrie verwendet werden. Durch Kombination mehrerer Messverfahren (z.B. Messung der Lichtstreuung und der Fluoreszenz definierter Wellenlänge) können mit durchflusszytometrischen Geräten (FACS-Gerät = fluorescence activated cell sorter) Zellen hinsichtlich morphologischer Kriterien (z.B. Größe, Membranstruktur, intrazellulärer Strukturen) und hinsichtlich ihrer Beladung mit fluorochrommarkierten Antikörpern analysiert werden. Beim Messvorgang wird eine definierte Anzahl Zellen einer Suspension durch eine Mikrokapillare einzeln durch einen Laserstrahl geleitet. Die Lichtstreuung wird als Vorwärtsstreuung („forward scatter“ = FSC) mit Beeinflussung durch die Zellgröße und im rechten Winkel dazu als Seitwärtsstreuung („side scatter“ = SSC) in Abhängigkeit von der intrazellulären Granularität und der Membranbeschaffenheit durch die Detektoren des Geräts erfasst. Dadurch können verschiedene Zellsubpopulationen (z.B. Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten) unterschieden werden. Verunreinigungen durch Zelltrümmer oder Erythrozyten können durch das Setzen eines Schwellenwerts im FSC in Abhängigkeit von ihrer Größe von der Messung ausgeschlossen werden.

Durch das Setzen von Zielbereichen können Populationen mit bestimmten Eigenschaften von den übrigen Zellen getrennt und quantifiziert werden. Durch eine elektronische Kompensation ist bei Mehrfachmessungen eine parallele Erfassung und Diskriminierung der sich teilweise überlagernden Fluoreszenzspektren (FL1-3) möglich.

Weiterhin kann mit Hilfe dieser Methode die Zellvitalität bestimmt werden. Dazu dient eine Färbung mit Annexin-V und Propidiumiodid (PI). Annexin-V bindet spezifisch an Phosphatidylserin, das bei vitalen Zellen ausschließlich auf der Membranseite innerhalb der Zelle lokalisiert ist. Apoptotische Zellen präsentieren Phosphatidylserin dagegen auch auf der Außenseite, wo es mit Hilfe von mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppeltem Annexin-V nachgewiesen werden kann. PI besitzt die Fähigkeit in die nukleäre DNA zu interkalieren und so ein messbares Fluoreszenzsignal zu erzeugen. Da der Farbstoff jedoch nur durch eine nicht mehr intakte Zellmembran zum Zellkern gelangen kann, ist die Anfärbung einer Zelle mit Propidiumiodid ein Anzeichen für fortgeschrittene Apoptose oder Nekrose.

2.4.2. Experimentelle Durchführung

Die PBMCs wurden entweder direkt nach der Isolation oder zu angegebenen Zeitpunkten nach Beginn der Kultivierung im FACS analysiert, um den Einfluss der Behandlung auf die Vitalität und Antigen-Expression der Zellen zu untersuchen.

Pro Ansatz wurden etwa 1×10^6 Zellen verwendet. Sie wurden einmal mit FACS-Puffer (PBS mit 1% FBS) gewaschen (Zentrifugation bei $300 \times g$ für 5 min) und in 100 μ l FACS-Puffer wieder aufgenommen. Für die Detektion von Oberflächenantigenen wurden die entsprechenden Antikörpersuspensionen (Tabelle 6) zugegeben und die Zellen für 30 min bei 4°C dunkel [im Dunkeln] inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift. Die Antikörper waren Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) bzw. Phycoerythrin (PE) markiert. Da diese Farbstoffe überlappende Absorptionsspektren durch einen Argonlaser bei 488 nm Wellenlänge zeigen, jedoch unterschiedliche Emissionsmaxima besitzen, können sie gleichzeitig zur Markierung von Zellen eingesetzt werden.

Für die Vitalitätsanalyse wurden die Zellen, gegebenenfalls nach der Antikörperfärbung, mit Annexin-V-Fluos (Roche) nach Angaben des Herstellers gefärbt. Dabei wurden 1×10^6 mit FACS-Puffer gewaschene Zellen in 100 μ l Annexin-V-Labeling solution (10 mM HEPES, pH 7,4; 140 mM NaCl; 5 mM CaCl_2 ; $1 \mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid; 20 $\mu\text{l/ml}$ Annexin-V-Fluos labeling solution) aufgenommen, für 15 min bei Raumtemperatur dunkel inkubiert und ohne erneutes Waschen analysiert.

Zur Messung der Autofluoreszenz der Zellen und unspezifischer Kreuzreaktivität der Antikörper wurden entsprechende Leer- und Isotyp-Kontrollen verwendet.

Die Messungen wurden an einem FACScan-Durchflusszytometer (Becton-Dickinson) durchgeführt. Bei jeder Messung wurden 50.000 Zellen erfasst und die Daten anschließend mit dem Programm WinMDI (Version 2.8[®]; J. Trotter, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) ausgewertet.

Antigen (Fluoreszenzmarkierung)	Hersteller
<i>CD95 (FITC)</i>	Immunotech
<i>CD49d (PE)</i>	BD Pharmingen
<i>CD3 (PE)</i>	BD Pharmingen
<i>CD19 (PE)</i>	DAKO

Tabelle 6:
Übersicht über die verwendeten FACS-Antikörper

2.5. Morphologische Analyse des Zellkerns

4',6-Diamino-2-phenylindiol-Dilactat (DAPI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die AT-reichen Regionen von Nukleinsäuren interkaliert. In gefärbten Zellen wird durch die Markierung des Chromatins eine indirekte Untersuchung der Morphologie der Zellkerne ermöglicht, die zur Detektion von apoptotischen Merkmalen wie Kernschrumpfung, -fragmentierung und -zerfall genutzt werden kann.

Aus dem Blut von CLL-Patienten gewonnene PBMCs wurden wie beschrieben mit verschiedenen Valproat-Konzentrationen kultiviert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen in der Zellkulturplatte durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert; 1 ml der Zellsuspension wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und mit einem Volumen PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml kaltem PBS resuspendiert, in 50 µl Aliquots auf Objektträger aufgetropft und luftgetrocknet. Die Fixierung erfolgte für 5 min in 3,7% Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Objektträger kurz in PBS gespült und luftgetrocknet. Für die Färbung mit DAPI (Sigma-Aldrich) wurden 100 µl der verdünnten Lösung (1 µg/ml in PBS) auf die getrockneten Zellen getropft und 3 min dunkel [im Dunkeln] inkubiert. Die Färbung wurde durch Spülen in PBS gestoppt. Zur Stabilisierung des Fluoreszenzfarbstoffs wurden auf den Bereich mit den gefärbten Zellen 3,5 µl Fluoromount-G (Biozol) getropft und mit einem Deckglas bedeckt, das mit Nagellack fixiert wurde. Die Präparate wurden mit einem AX70 Provis-Mikroskop (Olympus) mit dem DAPI-Filter (blaue Fluoreszenz: 490 nm) analysiert und für die Aufnahmen 1000 x vergrößert.

2.6. Western blot-Analyse

2.6.1. Herstellung von Gesamtzelllysate

Für die Western blot-Analyse der Zellproteine wurden die Zellen mit No salt lysis buffer (50 mM Hepes (pH 7), 1 % NP40) lysiert. Dem Lysepuffer wurde direkt vor jeder Proteinisolierung 100 µg/ml PMSF zugefügt.

Die Zellen wurden in der Platte resuspendiert, in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen abzentrifugiert und 100 µl Lysepuffer pro 5×10^6 Zellen zugegeben. Die Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren lysiert und die Proteinkonzentrationen bestimmt. Vor der Entnahme von Proteinlysate wurden die Proben für 5 min bei maximaler Umdrehungszahl der Tischzentrifuge zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile (DNA, Membranen) abzutrennen. Die Lagerung der Lysate erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Gesamtzelllysaten wurde mit dem DC Protein Assay von Biorad durchgeführt, dem im Wesentlichen das Prinzip der Proteinbestimmung nach Lowry zugrunde liegt.

Dazu versetzte man zunächst 1 ml Puffer A mit 20 µl Puffer S (= Puffer A'). Danach wurden 5 µl aus einer 1:10 – Verdünnung der Lysate bzw. je 5 µl einer BSA-Lösung bekannter Konzentration (0,2 mg/ml - 2 mg/ml) für die Standardkurve in 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert. Zu jedem Ansatz wurden 25 µl Puffer A' und 200 µl Puffer B gegeben und mittels vortexen gemischt. Nach 20 min Inkubation wurden die Ansätze à 100 µl jeweils doppelt in eine 96 well-Platte überführt und die Extinktion bei 750 nm mit dem Multi-Well-Plate-Reader (Kinetic Analyzer, Milenia) photometrisch bestimmt. Die Proteinkonzentrationen wurden anschließend mit Hilfe der BSA-Eichkurve berechnet, damit gleiche Proteinmengen für die SDS-PAGE verwendet werden konnten.

2.6.3. Histon-Isolierung

Um mit Hilfe der Western blot-Technik Histone zu detektieren, wurde eine Anreicherung nach dem Prinzip der „Acid extraction“ vorgenommen. Das Protokoll zur Aufreinigung der Histone wurde modifiziert nach einem Protokoll von Jansen et al. (Jansen et al., 2004).

Dazu wurden die Zellen zunächst in der Zellkulturplatte resuspendiert, in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und zweimal mit PBS gewaschen. Die Lyse von 2×10^6 Zellen erfolgte mit 100 μ l Puffer A (10 mM Hepes (pH 7,9), 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0,05 % DTT). Um die Lyseeffizienz zu erhöhen, wurden die Zellen für mindestens 1 h bei $-80^\circ C$ eingefroren und wieder aufgetaut. Anschließend wurden zu 200 μ l Lysat unter ständigem vorsichtigen Vortexen tropfenweise 50 μ l einer 2 M Schwefelsäure zugegeben und das Lysat für 1 h auf Eis gestellt, wobei alle 10 min kräftig gevortext wurde. Die verbliebenen Zellfragmente wurden für 10 min bei 13.000 Umdrehungen pro Minute in der Tischzentrifuge (Biofuge fresco, Heraeus, erste Nennung in 1.6.1) abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Durch Zugabe des dreifachen Volumens einer 20 %igen Trichloressigsäure erfolgte die Fällung der Proteine, die Ansätze wurden dafür auf Eis inkubiert und alle 20 min gemischt. Nach 1 h wurden die präzipitierten Proteine abzentrifugiert (13.000 rpm, 10 min). Das Pellet wurde anschließend zweimal mit angesäuertem Aceton (0,1 % HCl) und zweimal mit reinem Aceton gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand vollständig abgenommen, das Pellet luftgetrocknet und die Proteine in 25 μ l Wasser gelöst.

Die Proteinkonzentration dieser Proben wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 230 nm bestimmt. Eine Extinktion von 4,2 entspricht dabei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml ([http://www.bio.com: bioProtocol/histones/Preparation of Core Histones from Calf Thymus](http://www.bio.com:bioProtocol/histones/Preparation%20of%20Core%20Histones%20from%20Calf%20Thymus)).

2.6.4. SDS-PAGE

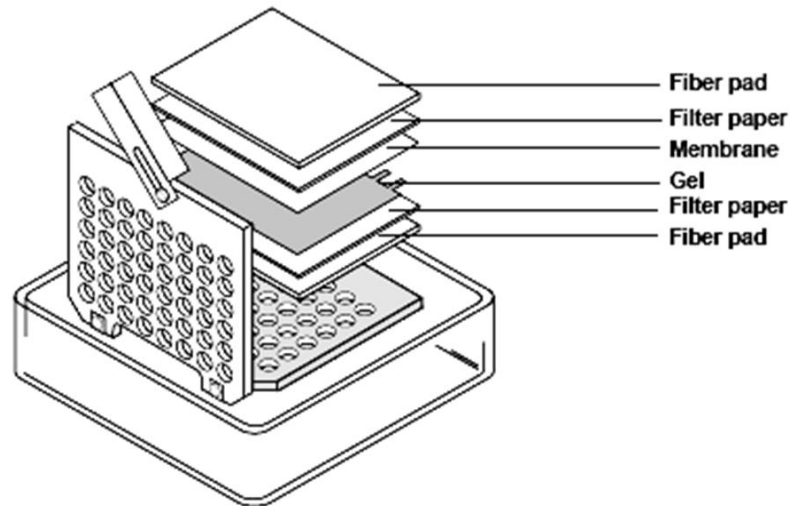
Die von Laemmli (Laemmli, 1970) beschriebene Methode der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) dient der elektrophoretischen Auftrennung denaturierter Proteine in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht.

Für die Proben wurden gleiche Proteinmengen aus den Zelllysaten entnommen und mit Wasser die Volumina angeglichen sowie entsprechende Mengen 5x SDS-Ladepuffer (225 mM Tris – HCl (pH 6,8), 50 % Glycerol, 5 % SDS, 0,05 % Bromphenolblau, 250 mM DTT) zugegeben. Die Elektrophorese wurde mit SDS-PA-Gelen durchgeführt, deren Sammelgele 4% und deren Trenngele 12 bis 15% Polyacrylamid enthielten. Für den Gellauf wurde das Mini Protean III Vertikal Elektrophorese System von Biorad verwendet; zur Passage des Sammelgels wurde eine Spannung von 100 V angelegt, während der Auftrennung im Trenngel 150 V. Als Größenstandard wurde der peqGOLD Protein-Marker IV (prestained) von PeqLab verwendet.

2.6.5. Western blot

Beim Western blot werden die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Trans-Blot Transfer Medium, Biorad) überführt. Die Durchführung des Blottings erfolgte in einer Mini Trans-Blot Cell von Biorad. Nach Äquilibration der Nitrozellulosemembran für 5 min in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Ethanol) wurde der Blot-Sandwich (vergleiche Abbildung 6) luftblasenfrei zusammengesetzt, wobei die Nitrozellulose zur Anode, das Gel zur Kathode gerichtet war. Der Transfer fand für 1 h bei konstanter Spannung von 100 V auf Eis statt.

Danach wurde die Membran für 10 min in TBST-Puffer (150 mM NaCl, 100 mM Tris – HCl (pH 7,4), 0,1 % Tween 20) gewaschen und anschließend für 1 h in blocking buffer (3 % Magermilchpulver in TBST-Puffer) gegeben. Durch diesen Schritt werden noch freie Proteinbindungsstellen auf der Membran besetzt und so ein unspezifisches Binden des Antikörpers weitgehend vermieden. Der Primärantikörper wurde in neuem blocking buffer verdünnt und über Nacht auf der Membran inkubiert.

**Abbildung 6:**Aufbau eines Western blots

(schematische Darstellung aus dem Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell - Instruction Manual von Biorad)

Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal 5 min in TBST-Puffer gewaschen und anschließend 1 h mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Dieser wurde 1:5000 in neuem blocking buffer verdünnt. Anschließend wurde die Membran dreimal in TBST-Puffer gewaschen (einmal 5 min, zweimal 10 min) und es erfolgte die Detektion der Banden mittels Enhanced Chemoluminescence. Dazu werden die beiden Lösungen ECLI (2,5 mM Luminol in DMSO, 0,4 mM Cumarin-Säure in DMSO, 10 mM Tris – HCL (pH 8,5)) und ECLII (0,2% Wasserstoffperoxid, 10 mM Tris – HCl (pH 8,5)) 1:1 gemischt und für 1 min auf die Membran gegeben. Durch die enzymatische Aktivität der an den Sekundärantikörper gebundenen Peroxidase erfolgt die Umsetzung des im ECL enthaltenen Substrats. Dadurch entsteht eine intensive Chemolumineszenz, die durch die Exposition eines Autoradiographiefilms auf der Membran detektiert werden kann. Der Film wurde mit einem automatischen Entwicklungsgerät (Agfa Curix 60 Processor) entwickelt.

Um die aufgetragenen Gesamtproteinmengen der verschiedenen Proben miteinander zu vergleichen, wurde zusätzlich das konstitutiv exprimierte Protein Actin detektiert. Dafür wurde die Membran erneut 30 min mit TBST-Puffer gewaschen und anschließend für mindestens 2 h mit einem Actin-Antikörper inkubiert (1:1000 in blocking buffer). Nach

zweimaligem Waschen (je 10 min) in TBST-Puffer wurde der entsprechende Sekundärantikörper (1:5000 in blocking solution) für 1 h auf die Membran gegeben und anschließend erneut dreimal gewaschen (5 min, 10 min, 15 min). Die Bandendetektion erfolgte wie oben bereits beschrieben. Auf identischen Membranen wurden nach dieser Methode bis zu vier Proteine unterschiedlicher Größe detektiert.

Der Nachweis von Actin war auch in den Histonpräzipitaten noch möglich, da dieses konstitutiv exprimierte Protein im Vergleich zu den Histonen in so großer Menge in den Zellen vorhanden ist, dass es durch die Histonisolierung nicht vollständig entfernt wurde.

Zielprotein	Antikörperbezeichnung
<i>Caspase 8</i>	SC-6134 (Santa Cruz)
<i>Caspase 9</i>	SC-17784 (Santa Cruz)
<i>BID</i>	#2002 (Cell Signaling Technology)
<i>BCL-2</i>	Apoptopak Miniature Set (Upstate/Millipore)
<i>BAX</i>	Apoptopak Miniature Set (Upstate/Millipore)
<i>BAK</i>	Apoptopak Miniature Set (Upstate/Millipore)
<i>Actin</i>	A5060 (Sigma)
<i>Acetyl-Histon H3</i>	06-599 (Upstate)
<i>Acetyl-Histon H4</i>	07-329 (Upstate)

Tabelle 7:
Übersicht über die verwendeten Western blot-Antikörper

2.6.6. Ponceau-Färbung

Zur Kontrolle aufgetragener Gesamtproteinmengen auf einer Membran wurde auch eine Färbung mit Ponceau-Rot durchgeführt. Für die Färbung wurde die Nitrozellulose 15 min in Ponceau-Rot-Lösung (0,5% w/v Ponceau S, 3% v/v Trichloressigsäure, 3% v/v Sulfosalicylsäure) inkubiert und anschließend bis zur gewünschten Farbtintensität mit Wasser entfärbt.

2.7. RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und Real time PCR

2.7.1. Prinzip der Real time PCR

Mit Hilfe der Real time PCR-Technik kann mRNA, die zuvor durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben wurde, quantifiziert werden. Bei der Real time PCR nach dem TaqMan-System (Applied Biosystems) wird die cDNA des Zielgens mit zwei sequenzspezifischen, unmarkierten Primern amplifiziert. Zusätzlich wird bei der PCR eine Sonde verwendet, die zwischen den Primern an die Sequenz des Zielgens bindet und am 5'-Ende mit einem Fluorochrom (fluoreszierenden Reporter) sowie einem Quencher am 3'-Ende markiert ist. Durch die räumliche Nähe von Fluorochrom und Quencher wird von der intakten Sonde kein Signal erzeugt. Bei der Bildung eines PCR-Produkts wird die Sonde durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut, sodass das freie Fluorochrom detektiert werden kann. Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgt durch die Bestimmung der Reaktionszyklen, die benötigt werden um ein Fluoreszenzsignal zu erzeugen, das einen bestimmten Schwellenwert (Threshold) übertrifft. Die Anzahl an PCR-Zyklen wird als sogenannter Ct-Wert angegeben. Der Ct-Wert des Zielgens wird bei der relativen Quantifizierung immer gegen den Ct-Wert eines Referenzgens normalisiert, für das man eine gleichmäßige Expression in allen miteinander verglichenen Proben annimmt. Die Normalisierung dient dazu Unterschiede in der Menge der für die PCR eingesetzten Gesamt-cDNA auszugleichen. Der normalisierte Wert wird als ΔCt bezeichnet. Die Expression des Zielgens in verschiedenen Proben kann mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, wie in den unten angegebenen Formeln, berechnet werden. Dafür werden die ΔCt -Werte der einzelnen Gruppen (z. B. gesund/krank oder unbehandelt/behandelt) voneinander abgezogen und ergeben den $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert. Dieser wird unter Berücksichtigung der logarithmischen PCR-Amplifikation in eine n-fache Expression (Expression value) umgerechnet.

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct Behandlung} - \Delta\text{Ct Kontrolle}$$

$$\text{expression value} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Abbildung 7:

Formeln zur Berechnung der relativen Expression (expression value)

2.7.2. RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Dafür wurden die in einem RNase-inaktivierenden Hochsalzpuffer lysierten Zellen über QiaShredder-Säulen (Qiagen) homogenisiert, anschließend die RNA nach Zugabe von Ethanol an Silicagel-Säulen gebunden, gewaschen und mit RNase-freiem Wasser eluiert.

2.7.3. cDNA-Synthese

Anschließend wurde die RNA mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) mit Random-Hexamer-Primern nach den Angaben des Herstellerprotokolls in cDNA umgeschrieben. Pro Reaktion wurden bis zu 5 µg RNA in einem Endvolumen von 50 µl eingesetzt. Die cDNA wurde bis zur Verwendung für die Real time PCR bei -80°C gelagert.

2.7.4. Real time PCR

Die Real time PCR-Reaktionen wurden in 96well-Platten in Ansätzen à 25 µl, bestehend aus 12,5 µl 2x TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), 7,5 µl Wasser und 5 µl 1:10 mit Wasser verdünnter cDNA, durchgeführt. Mit Hilfe von TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) wurde die Expression von *bcl-2*, *bax*, *bid* und *p21* in Proben von für 8h, 24h bzw. 48h kultivierten CLL-Zellen bestimmt. Alle Ansätze wurden pro Probe und Gen in Triplikaten gemessen; zur Normalisierung wurde die *gapdh*-Expression bestimmt. Gemessen wurde über 40 Zyklen (je 15 sec 95°C, 1 min 60°C) in einem ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems). Die Resultate wurden mit der SDS 7700 software ("sequence detection system", Applied Biosystems) analysiert.

Zielgen	assay ID
<i>bcl-2</i>	Hs00608023_m1
<i>bax</i>	Hs01016552_g1
<i>bid</i>	Hs01016552_g1
<i>p21</i>	Hs00355782_m1
Referenzgen	Sequenz
<i>gapdh</i>	Primer vorwärts 5'-gaaggtgaaggtcggagtc-3' Primer rückwärts 5'-gaagatggtgatgggatttc-3' Sonde 5'-caagcttcccgttctcagcc-3'

Tabelle 8:
Übersicht über die verwendeten Real time PCR assays (I)

2.8. Caspase-Aktivitätsmessung

2.8.1. Prinzip des Caspase Glo 3/7 assays

Die Aktivitäten der Caspasen 3 und 7 wurde mit dem Caspase Glo 3/7 Assay (Promega) bestimmt. Das Prinzip des Tests beruht auf der Messung der Lumineszenzzunahme, die zustande kommt, wenn das künstliche Substrat für die Caspasen 3 und 7 (Z-DEVD Aminoluziferin) gespalten wird. Das bei der durch die Caspase katalysierten, hydrolytischen Spaltung freiwerdende Aminoluziferin dient als Substrat für die im Test enthaltene „Ultra Glo Luziferase“, welche eine Luziferasereaktion mit verlängerter Halbwertszeit katalysiert.

2.8.2. Durchführung des Caspase 3/7-Aktivitätstests

CLL-PBMCs wurden in Zellkulturplatten kultiviert und mit Valproat (1 bis 3 mM) und spezifischen Peptid-Inhibitoren für die Caspasen 8 (Caspase 8/FLICE Inhibitor, Z-IETD-FMK; BioVision) und 9 (Caspase 9/Mch6 Inhibitor, Z-LEHD-FMK; BioVision) inkubiert oder unbehandelt gelassen. Die Caspase-Inhibitoren wurden in sterilem DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst, deshalb wurde auch ein Teil der Zellen ausschließlich mit DMSO behandelt, um eine Beeinflussung durch das Lösungsmittel auszuschließen.

Nach 48 h wurden die Zellen resuspendiert und 50 µl der Zellsuspension in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden mit 50 µl Caspase Glo 3/7 Reagenz gemischt, durch Vortexen lysiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lumineszenzsignal wurde in einem Luminometer (Luminometer TD-20/20; Turner Biosystems) quantifiziert. Um die Signale auf die Anzahl der Zellen zu korrigieren, wurden die Zellzahlen in den unterschiedlich behandelten Zellkultur-Ansätzen durch Zählen in der Neubauer-Kammer ermittelt.

2.9. Statistik

Die prozentualen Anteile vitaler Zellen in behandelten und unbehandelten Kulturen sowie deren mRNA-Mengen wurden mit Hilfe des zweiseitigen (Student) T-Test verglichen. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde für absolute Anteile unbehandelter entgegen Valproat-behandelter Annexin⁻/PI⁻-Zellen berechnet bzw. für entsprechende Ct-Werte, die auf *gapdh* normalisiert waren.

2.10. Patienten- und Probandenmaterial für die Untersuchungen zur Therapie von MDS-Patienten mit dem DNMT-Inhibitor 5-Azacytidine

2.10.1. Patienten und Probanden

Nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung und Einverständnis der Patienten bzw. gesunden Spender entsprechend der Richtlinien der Deklaration von Helsinki wurde periphervenöses Blut und Knochenmark entnommen. Ein positives Votum der Ethikkommission des Universitätsklinikums Heidelberg lag vor.

Zellen aus den Blutproben und Knochenmarkproben von 10 Patienten und aus den Blutproben von 8 hämatologisch-unauffälligen Spendern wurden untersucht. Die Patienten erfüllten die WHO-Kriterien für die Diagnose eines MDS (Haferlach and Schoch, 2002); es handelte sich um 5 Männer und 5 Frauen mit einem durchschnittlichen Alter von 71,9 Jahren (60-79 Jahre).

Die MDS-Patienten wurden für die Behandlung mit 5-Azacytidine ausgewählt, da sie entweder der Hochrisiko-Gruppe der Erkrankung angehörten oder starken Substitutionsbedarf für Erythrozyten-Konzentrate aufwiesen. Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 9 aufgeführt. Die für die Expressionsuntersuchungen verwendete Kontrollgruppe aus hämatologisch unauffälligen Personen setzte sich aus 4 Männern und 4 Frauen mit einem Altersmittel von 34,4 Jahren (24-50 Jahre) zusammen (vergleiche Tabelle 10).

Patient Nr.	Geschlecht ¹	Alter ²	WHO ³	Zytogenetik ⁴	IPSS ⁵
1	w	65	RAEB-2	normal	HR (2.5)
2	m	76	RA	Y-	IM-1 (0.5)
3	w	68	RAEB-2	normal	IM-2 (2.0)
4	m	79	RAEB-2	partielle Monosomie 7	HR (3.0)
5	w	70	5q- Syndrom	5q-	IM-1 (1.0)
6	m	71	RCMD	normal	IM-1 (0.5)
7	m	69	RAEB-2	Y-, Inv(9), +12q13	HR (3.0)
8	w	60	RAEB-2	n. a.	HR (2.5)
9	m	76	RARS	normal	LR (0)
10	w	75	RAEB-2	n. a.	HR (2.5)

Tabelle 9:

Patientencharakteristika (II)

¹ w, weiblich; m, männlich

² bei Blutentnahme

³ RA, refraktäre Anämie; RARS, refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten; RAEB, refraktäre Anämie mit Erhöhung von Blasten; RCMD, refraktäre Anämie mit Multilinien-Dysplasie

⁴ normal, keine Aberrationen detektiert; n. a., nicht analysiert

⁵ Internationaler Risikoscore; LR, low risk/niedriges Risiko; IM, intermediate risk/mittleres Risiko; HR, high risk/hohes Risiko

Proband Nr.	Geschlecht ¹	Alter ²
1	m	28
2	w	29
3	m	40
4	w	24
5	m	48
6	w	26
7	w	30
8	m	50

Tabelle 10:

Probandencharakteristika (II)

¹ m, männlich; w, weiblich ² bei Blutentnahme

2.10.2. Therapieschema

Das pulverförmige Medikament 5-Azacytidine (Vidaza™, Pharmion, Hamburg) wurde unmittelbar vor der Verabreichung in 5%iger Glucoselösung resuspendiert und subkutan appliziert. Es wurden an 7 aufeinander folgenden Tagen jeweils 75 mg/m^2 Körperoberfläche gegeben, parallel wurden jeweils 2 mg Granisetronhydrochlorid pro Tag als antiemetische Prophylaxe verabreicht. Die Behandlung wurde alle 4 Wochen wiederholt (vergleiche Abbildung 8A). Blut- und Knochenmark-Proben für die Basiswerte der einzelnen Patienten wurden direkt vor der ersten Behandlung entnommen. Im weiteren Therapieverlauf wurde wöchentlich Blut für die Analyse der klinischen Parameter und Isolierung von PBMCs entnommen. Die Entnahme von Knochenmark erfolgte alle 4 Wochen direkt vor dem Beginn des neuen Behandlungszyklus. Bei Patient Nr. 4 wurden die Knochenmarkproben 2 bis 5 direkt nach der Woche genommen, in der 5-Azacytidine verabreicht worden war, um kurzfristige Effekte beobachten zu können. Ein vollständiger Therapieblock setzte sich aus vier aufeinander folgenden Zyklen zusammen (vergleiche Abbildung 8B).

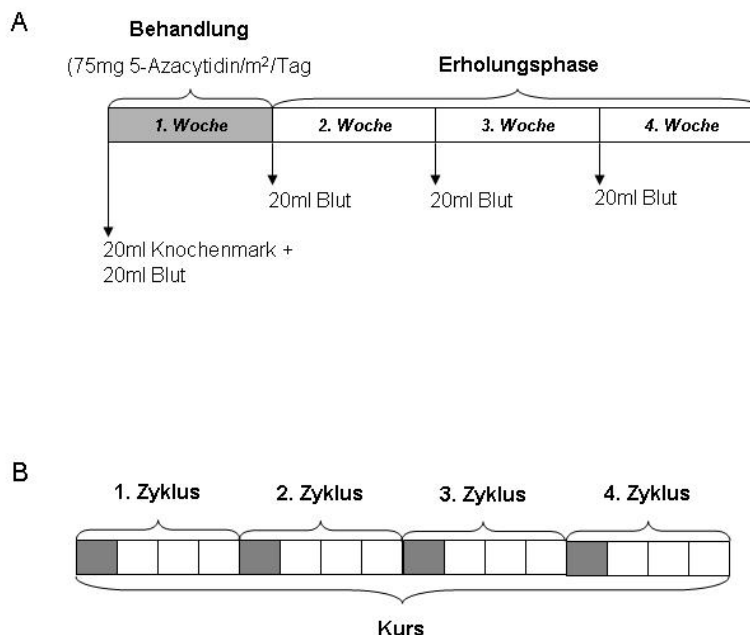


Abbildung 8:

Therapie-Schema

A detaillierter Aufbau eines Behandlungszyklus **B** Aufbau eines Therapiekurses

2.11. Isolierung mononukleärer Zellen aus Blut- und Knochenmarkproben

Die Isolierung mononukleärer Zellen aus den Blut- und Knochenmarkproben der MDS-Patienten bzw. Probanden erfolgte wie unter Punkt 2.2 (Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherenvenösem Blut) beschrieben. Die Zellen wurden im Anschluss à 1×10^7 Zellen/ml in Trizol-Reagenz (Invitrogen) lysiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

2.12. Isolierung von DNA und RNA

Die Isolierung von DNA und RNA aus in Trizol-Reagenz lysierten PBMCs erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers Invitrogen, das leicht modifiziert wurde.

2.13. Anreicherung von CD34^+ -Zellen mittels MACS-Technologie

Eine Anreicherung CD34^+ -Zellen erfolgte mit dem Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Aus dem Knochenmark mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation isolierte PBMCs wurden nach Angaben des Herstellers mit entsprechenden Reagenzien und Antikörpern behandelt. Die Separation der Zellen erfolgte mit einem AutoMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach).

2.14. Analyse der klinischen Daten

Das Ansprechen der Patienten auf die Therapie mit 5-Azacytidine wurde nach Standard-Kriterien bewertet (Cheson et al., 2000), die in Tabelle 11 dargestellt sind. Eine stabile Erkrankung wurde als Fehlen einer kompletten / partiellen Remission bzw. einer eindeutigen Verbesserung des hämatologischen Befunds ("hematological improvement") aber auch keinem deutlichen Fortschreiten der Erkrankung definiert.

Remission	komplett	< 5% Blasten im Knochenmark keine Dysplasien Hb > 11 g/dl Neutrophile $\geq 1,5/\text{nl}$ Thrombozyten $\geq 100/\text{nl}$
	partiell	Rückgang der Blasten im Knochenmark um mindestens 50% keine Dysplasien Hb > 11 g/dl Neutrophile $\geq 1,5/\text{nl}$ Thrombozyten $\geq 100/\text{nl}$
Verbesserung	Rote Blutzellen	stark: Transfusionsunabhängigkeit oder Steigerung des Hb um > 2 g/dl
		gering: Reduktion der Transfusionen um 50% oder Steigerung des Hb um 1-2 g/dl
	Thrombozyten	stark: Transfusionsunabhängigkeit oder Steigerung um > 30/nl wenn weniger als 100/nl vor Therapie
		gering: Steigerung um mindestens 50% (mindestens 10/nl) wenn weniger als 100/nl vor Therapie
	Neutrophile	stark: \geq Verdoppelung wenn absolute Anzahl < 1,5/nl oder absolute Steigerung um 0,5/nl
		gering: \geq Verdoppelung wenn absolute Anzahl < 1,5/nl aber absolute Steigerung < 0,5/nl

Tabelle 11:

Kriterien zur Beurteilung des Therapieansprechens von MDS-Patienten nach den Kriterien der IWG (Cheson et al., 2000)

2.15. Methylierungsanalyse der DNA

(durchgeführt von Dipl. Biol. Carlo Stresemann, Arbeitsgruppe Epigenetik am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg)

2.15.1. Analyse der genomweiten Methylierung

Der prozentuale Anteil methylierter Cytosin-Reste am in der DNA enthaltenen Gesamt-Cytosin wurde wie zuvor von Dirk Stach *et al.* beschrieben mittels Kapillarelektrophorese ermittelt (Stach et al., 2003). Dafür wurde die mittels Trizol-Reagenz isolierte DNA enzymatisch in Einzelnukleotide hydrolysiert und mit dem Fluoreszenz-Marker BODIPY (Molecular Probes) derivatisiert. Die derivatisierten Einzelnukleotide konnten durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit dem Beckman P/ACE MDQ Molecular Characterization System analysiert werden.

2.15.2. Analyse der Promotor-spezifischen Methylierung

Der Methylierungsstatus verschiedener Promotoren wurde mit Hilfe der COBRA-Technik wie beschrieben analysiert (Xiong and Laird, 1997). Dafür wurde die genomische DNA nach Protokoll mit Natriumbisulfit behandelt und mittels PCR Gen-spezifische Sequenzen amplifiziert. Reaktionsbedingungen und Primer waren wie beschrieben (Gore et al., 2006; Yang et al., 2004; Boumber et al., 2007; Mund et al., 2005; Strathdee et al., 2006). Die Restriktion der PCR-Produkte erfolgt mit folgenden Enzymen: *HinfI* (C1S2 and LINE-1), *BstUI* (*p15*), *TaqI* (*hoxA4*) und *HhaI* (*ril*). Die geschnittenen PCR-Produkte wurden im Anschluss auf Agarosegelen aufgetrennt.

Für die Bisulfitsequenzierung wurden PCR-Produkte mittels Agarosegel-Elektrophorese und Gelextraktion aufgereinigt und mit dem TOPO TA cloning kit (Invitrogen) nach dem Protokoll des Herstellers kloniert. Die Sequenzierung erfolgte bei GATC Biotech (GATC Biotech AG, Konstanz).

2.16. Expressionsanalyse mittels Real time PCR

Die Umschreibung der RNA der MDS-Patienten und der Probanden erfolgte wie unter 1.7.3 beschrieben. Die Expressionsanalyse der Proben mit Hilfe der Real time PCR-Technik wurde wie unter 2.7.4 beschrieben durchgeführt. Die verwendeten Assays wurden bei Applied Biosystems bezogen und sind in Tabelle 12 angegeben.

Zielgen	assay ID
<i>p15</i>	Hs00793225_m1
<i>ril</i>	Hs00184792_m1
<i>hoxA4</i>	Hs00427089_m1
Referenzgen	assay ID
<i>gapdh</i>	4333764F

Tabelle 12:
Übersicht über die verwendeten Real time PCR assays (II)

2.17. Materialienverzeichnis

2.17.1. Chemikalien

Aceton	Zentralbereich der Universität Heidelberg
Acrylamid – Lösung (30 %)	AppliChem, Darmstadt
APS	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, München
BSA	Sigma, München
Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blau R-250	AppliChem, Darmstadt
Coumaric Acid	Sigma, München
DMSO	Roth, Karlsruhe
DTT	Sigma, München
EDTA	Fluka/Sigma, München
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol vergällt, 96 %	Zentralbereich Universität Heidelberg
Ethanol z. Analyse, 99,9 %	Zentralbereich Universität Heidelberg
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Zentralbereich Universität Heidelberg
Glycin	Merck, Darmstadt
Hepes	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Zentralbereich Universität Heidelberg
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Riedel-de-Haën, Buchs, Schweiz
Luminol	Fluka/Sigma, München
Magermilchpulver	Lasana, Herford
Magnesiumchlorid	Fluka/Sigma, München
Methanol	Zentralbereich Universität Heidelberg
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Zentralbereich Universität Heidelberg
Natriumhydrogenphosphat Na ₂ HPO ₄	Riedel-de-Haën, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
NP40	Fluka/Sigma, München
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
PMSF	Sigma, München
Propidiumiodid	Sigma, München
Salzsäure	Zentralbereich Universität Heidelberg
Schwefelsäure	Zentralbereich Universität Heidelberg
SDS	CalBiochem, Schwalbach
Temed	Fluka/Sigma, München
Trichloressigsäure	AppliChem, Darmstadt
Tris base	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasser, nucleasfrei	Eppendorf, Hamburg
Wasserstoffperoxid (30 %)	Fischar, Saarbrücken

2.17.2. Verbrauchsmaterial

FACS - Röhrchen	Becton & Dickinson, Heidelberg
Falcon – Röhrchen 15 ml + 50 ml	greiner bio-one, Essen
Filterpapier	Berkshire Corporation, Massachusetts USA
Kodak Biomax XAR Filme	Kodak, Stuttgart
Kulturflaschen	greiner bio-one, Essen
Kulturplatten / „well-plates“	greiner bio-one, Essen
Nitrocellulose-Membran	Biorad, München
PCR - tubes	Applied Biosystems, Darmstadt
Petrischalen	Becton & Dickinson, Heidelberg
phase lock gel heavy 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Pipetten, serologische 10 ml + 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml + 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Real time PCR-Platten und -Deckelstreifen	Applied Biosystems, Darmstadt
Sterilfilter	neolab, Heidelberg
Spritzen, 20 ml	Becton & Dickinson, Heidelberg
3 MM Chromatografiefilterpapier	Whatman über Fisher Scientific, Schwerte

2.17.3. Geräte

Neben den laborüblichen Geräten wurden folgende verwendet:

Entwicklermaschine Curix – 60 (Kodak, Stuttgart)

FACS – Scan (BD, Heidelberg)

Fluoreszenzmikroskop Olympus CK 40 (Olympus, Hamburg)

Geltrockner Thermo Savant Slab Gel Dryer (Thermo, Dreieich)

Heraeus Biofuge fresco, Tischzentrifuge (Heraeus, Hanau)

Kamera Kaiser RA 1 (Kaiser Fototechnik, Buchen)

Kühlzentrifuge Sorvall RC 3BP (über R+S Laborgeräte GmbH, Wiesloch)

Luminometer TD-20/20 Turner – designs (über GENE0 BioTechProducts GmbH, Hamburg)

Mini Protean III Vertikal Elektrophorese System (biorad, München)

Multiwell-Plate-Reader V_{max} (über Molecular Devices, Ismaning/München)

Photometer NanoDrop® ND-1000 UV/Vis Spektralphotometer (Pqlab, Erlangen)

Power supply Western blot Power Pac 200 (biorad, München)

Robocycler Gradient 96 (Stratagene, La Jolla, CA)
Sterilwerkbank Hera safe (Heraeus, Hanau)
Thermomixer Kompakt (Eppendorf, Hamburg)
Tischzentrifuge Sigma (Sigma, München)
Ultraviolettstrahler Fisher Brand (Fisher Scientific, Wohlen, Schweiz)
Zellkulturzentrifuge Hettich Rotanta RPC (Hettich, Bäch, Schweiz)
Zellmikroskop Nikon Eclipse TS 100 (Nikon, Düsseldorf)
Zellkulturinkubator (Heraeus, Hanau)

2.17.4. Computerprogramme

Western-blots wurden mit dem Programm TotalLab (TotalLab Version 1.11, NonLinear Dynamics Ltd., Durham, NC) ausgewertet.

Die Daten der Durchflusszytometrie wurden mit dem Programm WinMDI Version 2.8[®] (J. Trotter, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) dargestellt und ausgewertet.

Die Messdaten des Lumineszenz – Assays wurden mit der Spreadsheet Interface Software (Software zum Luminometer TD-20/20 Turner – designs; über GENE0 BioTechProducts GmbH, Hamburg) aufgezeichnet und in Exel (Microsoft Office) analysiert.

3. Ergebnisse

Teil I: Untersuchung der Wirkung des Histon-Deacetylase-Inhibitors Valproinsäure auf CLL-Zellen

3.1. Einfluss von Valproinsäure auf die Apoptose-Rate von CLL-Zellen *ex vivo*

Um den Effekt des HDAC-Inhibitors Valproat (VPA) auf die Vitalität von Lymphozyten zu untersuchen, wurden mononukleäre Zellen aus dem Blut von 30 Patienten mit Chronischer Lymphatischer Leukämie (CLL) isoliert und *ex vivo* mit verschiedenen VPA-Konzentrationen behandelt. Die Anteile apoptotischer und nekrotischer Zellen wurden nach 1, 2, 4 und 7 Tagen mittels Annexin-V/PI-Färbung und FACS-Analyse bestimmt.

Abbildung 9A zeigt ein repräsentatives Beispiel einer FACS-Analyse. Die Zellen eines Patienten mit CLL wurden unbehandelt bzw. mit 1 mM VPA für 48 Stunden kultiviert und nach einer Färbung mit Annexin-V und Propidiumiodid analysiert. Unter beiden Kultivierungsbedingungen wurde die Präsentation von Phosphatidylserin (PS) auf der Zelloberfläche festgestellt, die in der unbehandelten Kontrolle auf die spontane Induktion von Apoptose zurückzuführen ist. Durch die Behandlung mit VPA wurde der Anteil PS⁺/apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht.

Abbildung 9B zeigt den VPA- und Zeit-abhängigen Rückgang der vitalen CLL-PBMCs (Phosphatidylserin (PS)/Propidiumiodid (PI)) in *in vitro*-Kultur. Die Anteile vitaler Zellen in Gegenwart von Valproat wurden für diese Darstellung auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle normalisiert. Der PS⁺/PI⁻-Anteil der unbehandelten Zellen wurde dafür gleich 100 % gesetzt. Ab einer Kultivierungszeit von etwa 24 Stunden zeigten sich Unterschiede im Überleben zwischen behandelten und unbehandelten Zellen. Bei einer Konzentration von 1 mM VPA waren nach 48 Stunden 28 % ($p < 0,001$) und nach 96 Stunden mehr als 57 % ($p < 0,001$) der Zellen apoptotisch. Die höchste getestete Konzentration von 3 mM VPA erhöhte die Apoptose-Rate auf 54 % ($p < 0,001$) nach 48 Stunden und 88 % ($p < 0,001$) nach 96

Stunden. Diese Unterschiede vergrößerten sich auch im weiteren Verlauf, wie für den Zeitpunkt nach 1 Woche (168 Stunden) *ex vivo*-Kultivierung dargestellt. Spätere Zeitpunkte wurden nicht analysiert, da die Anzahl vitaler Zellen bei langer Kultivierungszeit auch in den unbehandelten Ansätzen stark zurückging.

Zusammenfassend ergaben die FACS-Untersuchungen, dass VPA die Apoptose-Rate bei kultivierten CLL-PBMCs zeit- und konzentrationsabhängig erhöht.

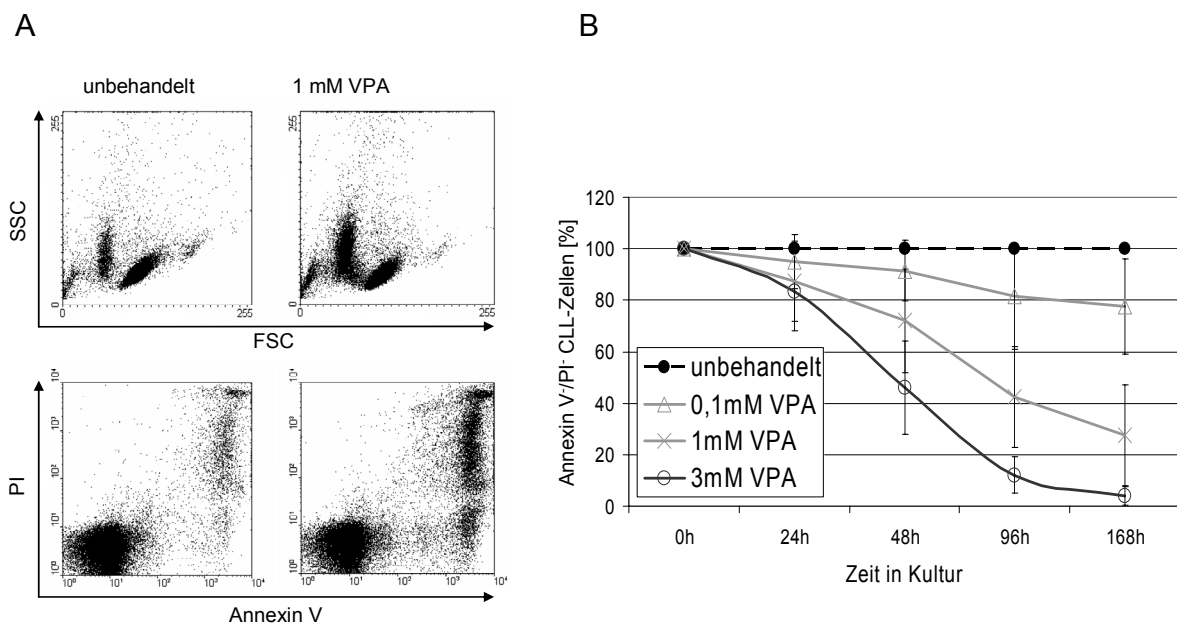


Abbildung 9:

FACS-Analyse der VPA-bedingten Apoptose-Induktion in PBMCs von CLL-Patienten

Mononukleäre Zellen aus dem Blut von CLL-Patienten wurden *ex vivo* kultiviert und mit unterschiedlichen VPA-Konzentrationen behandelt. Nach definierten Zeitpunkten wurde eine Untersuchung der Vitalität mit Annexin-V und PI mittels FACS vorgenommen.

A) Dotplot-Darstellung der repräsentativen FACS-Messung von CLL-Zellen nach 48 h Kultivierung B) graphische Darstellung der Apoptoserate der VPA-behandelten CLL-Zellen als Rückgang der Annexin-V/PI⁻ Zellen im Verlauf der Kultivierungsdauer

In Tabelle 13 ist der jeweilige Grad an spontaner und VPA-induzierter Apoptose für die verschiedenen Patientenproben angegeben. In der untersuchten Patientenpopulation ließ sich keine Korrelation zwischen Apoptose-Sensitivität und Zytogenetik, Prognose oder Vortherapie nachweisen. Dagegen hatten niedrige Leukozytenzahlen einen negativen Einfluss auf die Apoptose-Sensitivität.

Pat.-Nr.	Alter ¹	Geschlecht ²	Zytogenetik ³	Prognose ⁴	Vortherapie ⁵	Leukozyten/ml ⁶	spontane Apoptose ⁷	Valproat-Effekt ⁸
1	75	m	normal	ungünstig	+	44	+	0
2	71	w	13q-	günstig	-	16	0	++
3	79	w	n. a.	günstig	-	122	0	+
4	56	w	13q-	günstig	-	146	+	++
5	74	m	n. a.	günstig	-	16	0	++
6	75	m	13q-	ungünstig	+	261	+	++
7	67	m	normal	günstig	-	79	++	++
8	75	m	13q-	ungünstig	+	128	+	+
9	72	m	normal	ungünstig	-	58	+	+
10	64	m	13q-, 17p-	ungünstig	+	83	+	+
11	68	w	normal	ungünstig	+	98	+	++
12	75	m	12	günstig	-	27	0	0
13	57	m	normal	günstig	+	278	0	++
14	71	m	n. a.	ungünstig	+	11	+	++
15	72	w	13q-	günstig	-	19	+	++
16	81	w	n. a.	ungünstig	-	385	++	++
17	59	w	13q-	günstig	-	43	++	++
18	68	w	n. a.	günstig	-	50	0	++
19	54	m	normal	günstig	-	53	0	+
20	66	m	n. a.	ungünstig	-	61	++	++
21	65	m	12	günstig	-	35	++	++
22	67	m	+12, 17p-	ungünstig	-	81	0	+
23	67	m	12	ungünstig	-	43	+	++
24	66	m	12	günstig	-	45	0	++
25	66	m	13q-, 11q-	günstig	-	188	0	++
26	73	m	17p-	ungünstig	-	87	+	++
27	73	m	13q-	günstig	-	55	0	+
28	41	m	normal	ungünstig	-	68	++	++
29	65	w	normal	günstig	-	12	+	++
30	75	m	13q-, 11q-	günstig	-	39	+	+

Tabelle 13:

Patientencharakteristika und *ex vivo*-Ansprechen

¹ zur Zeit der Blutentnahme ² m, männlich; w, weiblich ³ Der Karyotyp wurde mit Hilfe der FISH (fluorescence in situ hybridization) -Technik ermittelt; normal, es wurden keine Aberrationen festgestellt; n. a., nicht analysiert ⁴ günstige Prognose: Binet A, Rai 0/ I; ungünstige Prognose: Binet B/C, Rai II/III/IV ⁵ CLL-Behandlung mit Purinanaloga, Alkylantien oder/und spezifischen Antikörpern ⁶ zur Zeit der Blutentnahme ⁷ FACS-Analyse nach 4 Tagen in Kultur ohne Behandlung: 0, <30 % apoptotische Zellen; +, 30-50 % apoptotische Zellen; ++, >50 % apoptotische Zellen ⁸ FACS-Analyse nach 4 Tagen in Kultur mit 1 mM Valproat (prozentuale Anteile normalisiert auf 100 % vitale Zellen der unbehandelten Kontrolle): 0, <30 % apoptotische Zellen; +, 30-50 % apoptotische Zellen; ++, >50 % apoptotische Zellen

3.2. Morphologische Veränderungen des Zellkerns

Mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen wurden die DAPI-gefärbten Zellen auf morphologische Veränderungen des Zellkerns untersucht.

Ein repräsentatives Beispiel für Patienten-Zellen, die unbehandelt bzw. mit 3 mM VPA für 48 Stunden kultiviert wurden, ist in Abbildung 10 dargestellt. Die VPA-behandelten Zellen wiesen typische Apoptose-Merkmale, wie die Kondensation des Zellkerns, auf. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den FACS-Ergebnissen, die eine VPA-abhängige Apoptose-Induktion in den CLL-PBMCs zeigen.

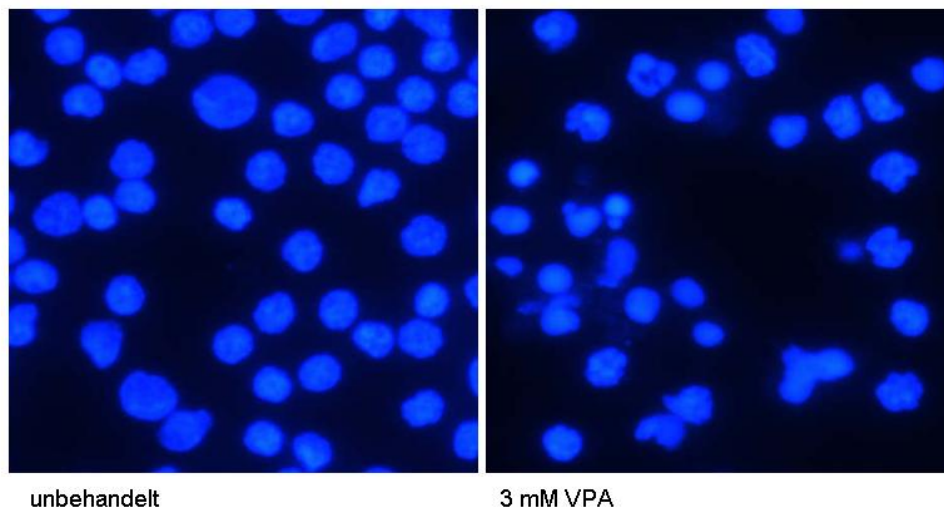


Abbildung 10:

Untersuchung morphologischer Veränderungen der Zellkerne von CLL-Zellen

Unbehandelte Kontrollzellen und Zellen, die mit VPA behandelt wurden, wurden nach 48 h Kultivierung auf Objektträgern fixiert und mit DAPI gefärbt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Beispiel der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von fünf Patientenproben (Vergrößerung 1:600).

3.3. Analyse der Histon-Acetylierung

Um den Einfluss der VPA-Behandlung auf die HDAC-Aktivität zu untersuchen, wurde als zelltypunabhängiger Indikator die Acetylierung der Histon-Proteine untersucht.

CLL-PBMCs wurden unbehandelt bzw. mit unterschiedlichen VPA-Konzentrationen kultiviert. Nach 48 Stunden wurden die Histone isoliert und mittels Western blot-Analyse die Acetylierung von Histon H3 und H4 untersucht. Es zeigte sich, dass VPA konzentrationsabhängig die Acetylierung der Histon-Proteine erhöht (Abbildung 11). In allen untersuchten CLL-Zellen (n = 3 Patienten) war der Effekt an Histon H3 gering, an Histon H4 dagegen deutlich ausgeprägt.

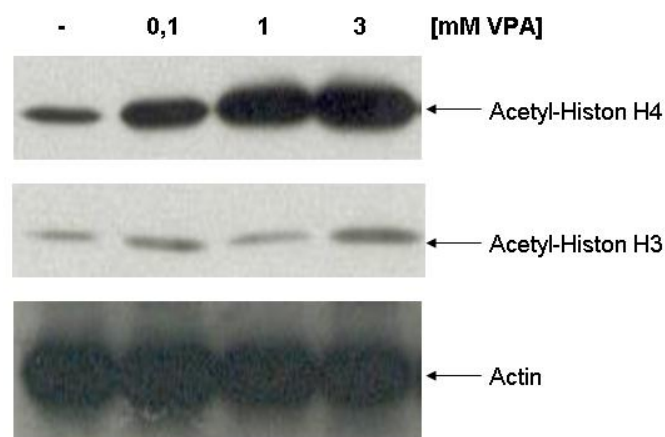


Abbildung 11:

Western blot-Analyse der Acetylierung von Histonen

Aus unbehandelten und behandelten CLL-Zellen wurden nach 48 h Kultivierung Histone isoliert und mit Antikörpern gegen acetyliertes Histon H4 und H3 analysiert, Actin diente als Mengenkontrolle des Gesamtproteins.

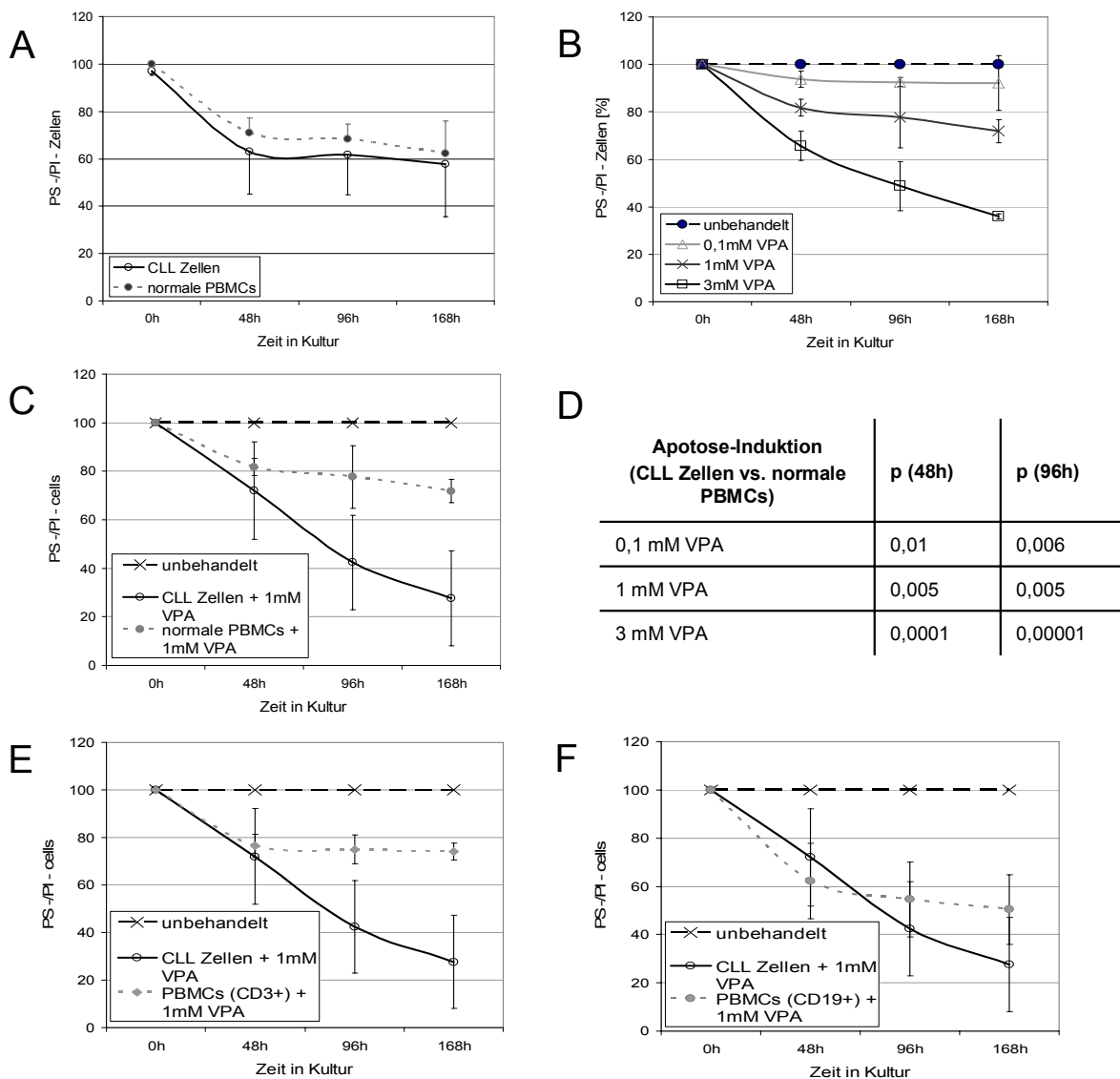
3.4. Einfluss von Valproinsäure auf die Apoptose-Rate von Probanden-Zellen

Um den Einfluss von VPA auf PBMCs von gesunden Spendern beurteilen und mit der Wirkung auf CLL-PBMCs vergleichen zu können, wurde ihre Apoptose-Rate unter identischen Kultivierungsbedingungen untersucht.

Zuerst wurde das Auftreten spontaner Apoptose quantifiziert. Wie in Abbildung 12A gezeigt, ergab sich für die PBMCs gesunder Spender eine etwas niedrigere Rate bzw. eine spätere Apoptose-Induktion als bei den PBMCs der CLL-Patienten. Nach 48 h Kultivierung waren 70,9 % der normalen aber nur 63,2 % der CLL-PBMCs vital, d. h. PS⁻/PI⁻.

Als nächstes wurde die VPA-bedingte Apoptose-Induktion untersucht. Abbildung 12B zeigt einen VPA- und Zeit-abhängigen Rückgang der vitalen PBMCs gesunder Spender, wie er auch für die CLL-PBMCs festgestellt wurde. Die Anteile vitaler Zellen in Gegenwart von VPA wurden für diese Darstellung auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle normalisiert. Bei einer Konzentration von 1 mM VPA waren nach 48 Stunden 18,2 % ($p < 0,001$) und nach 96 Stunden 32,3 % ($p < 0,001$) der Zellen apoptotisch. Mit 3 mM VPA erhöhte sich die Apoptose-Rate auf 34,2 % ($p < 0,001$) nach 48 Stunden und 51,3 % ($p < 0,001$) nach 96 Stunden. Die kleinste getestete Konzentration (0,1 mM VPA) bewirkte keine signifikante Apoptose-Induktion.

Abbildung 12C verdeutlicht im direkten Vergleich, dass PBMCs von gesunden Spendern weniger sensitiv auf Valproat reagieren als solche von CLL-Patienten. Die Unterschiede sind signifikant für höhere VPA-Konzentrationen und spätere Zeitpunkte (Abbildung 12D).

**Abbildung 12:****Analyse der VPA-abhängigen Apoptose-Induktion in PBMCs von gesunden Probanden und CLL-Patienten**

A) Vergleich der spontanen Apoptose-Rate zwischen PBMCs von Probanden und CLL-Patienten B) VPA-abhängige Apoptose in PBMCs von Probanden C) Vergleich der durch 1 mM VPA ausgelösten Apoptose-Rate zwischen PBMCs von Probanden und CLL-Patienten D) Signifikanz des unterschiedlichen Ansprechens der PBMCs von Probanden und CLL-Patienten auf die VPA-Behandlung E) Vergleich der Apoptose-Rate zwischen mit 1 mM behandelten CLL-PBMCs und CD3⁺ Probandenzellen F) Vergleich der Apoptose-Rate zwischen mit 1 mM behandelten CLL-PBMCs und CD3⁺ Probandenzellen

Die untersuchten PBMCs stellen ein Gemisch der beiden mononukleären Zellpopulationen im peripheren Blut dar, den Monozyten und Lymphozyten. Monozyten und die verschiedenen Lymphozytentypen (T-Zellen, B-Zellen und Natürliche Killerzellen) weisen unterschiedliche physiologische Eigenschaften auf und sprechen verschieden auf Behandlungen an. Eine differenzierte Analyse wurde für zwei Populationen der PBMCs gesunder Spender durch eine zusätzliche Färbung mit spezifischen Antikörpern in Rahmen der FACS-Messung vorgenommen: aufgrund ihrer Vergleichbarkeit mit den malignen CLL-Zellen wurden CD19⁺ B-Zellen untersucht und mit CD3⁺ T-Zellen verglichen, die den Großteil der PBMCs ausmachen. Abbildung 12E zeigt die Apoptose-Rate CD3⁺ T-Zellen, die deutlich weniger sensitiv auf VPA reagieren als CLL-PBMCs. Im Gegensatz dazu ist die Apoptose-Rate bei normalen CD19⁺ B-Zellen verglichen mit den CLL-PBMCs nur geringfügig niedriger (Abbildung 12F).

3.5. Untersuchung der Caspase-Aktivierung

Apoptose kann abhängig von Zelltyp und Ursache der Induktion über verschiedene Signalwege erreicht werden. Um zu analysieren welcher Mechanismus in den CLL-Zellen ausgelöst wird, wurde zunächst die Aktivierung der Caspasen 8 und 9 untersucht, die spezifisch für den extrinsischen bzw. intrinsischen Apoptose-Signalwegs sind. Die Aktivität der Caspasen wird posttranskriptional reguliert, um eine schnelle Induktion zu gewährleisten, bis dahin aber Zellschädigungen zu vermeiden. Caspasen werden als inaktive Pro-Form synthetisiert und erst durch die Abspaltung der Pro-Domäne aktiviert, die bei den Initiatorcaspasen 8 und 9 auch ihre Interaktion mit regulatorischen Faktoren (DISC bzw. Apoptosom) vermittelt.

Mittels Western blot-Analyse wurde festgestellt, dass die Vorläuferformen (Pro-Caspasen) sowohl von Caspase 8 als auch von Caspase 9 proportional zur VPA-Konzentration gespalten und dadurch aktiviert werden (Abbildung 13A). Die Aktivierung wurde anhand der Bandenstärke quantifiziert. Die Analyse ergab, dass nach dreitägiger Kultivierung in Gegenwart von 0,5 bzw. 1 mM VPA etwa die Hälfte der Pro-Caspase 8-Moleküle gespalten worden waren. In den parallel mit 2 bzw. 3 mM VPA behandelten Ansätzen wurde Pro-Caspase 8 zu etwa 75 % gespalten (Abbildung 13B). Proportional zum Rückgang der Pro-Form konnte das Erscheinen der aktiven Form der Caspase 8 (p20) detektiert werden

(Abbildung 13C). In den gleichen Ansätzen konnte ebenfalls die Aktivierung von Caspase 9 festgestellt werden. Bei der Behandlung mit 1 mM VPA waren nach drei Tagen Kultivierung durchschnittlich 25 % der Pro-Form aktiviert worden, in Gegenwart von 3 mM VPA etwa 80 % (Abbildung 13D).

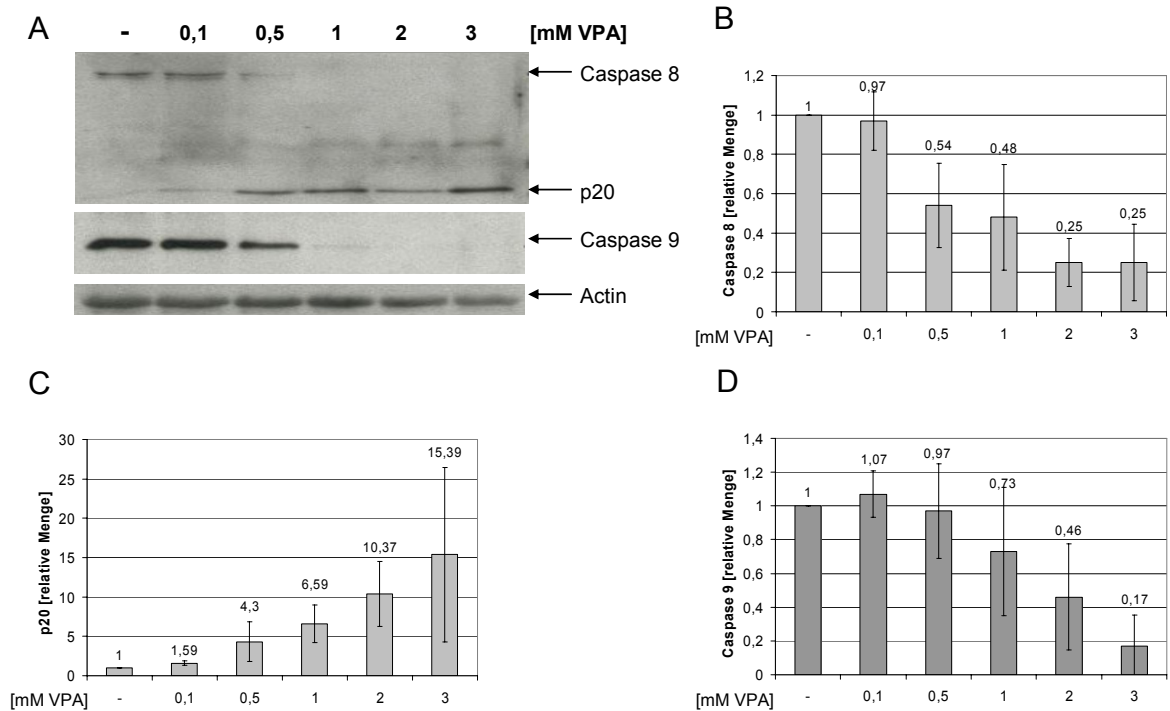


Abbildung 13:

Untersuchung der Caspase-Aktivierung

Mittels Western blot wurde die Aktivierung der Caspase 8 und 9 in Lysaten von CLL-Zellen untersucht, die für drei Tage in Gegenwart unterschiedlicher VPA-Konzentrationen kultiviert worden waren. A) Western blot-Analyse einer repräsentativen Patientenprobe; mit der TotalLab Software wurden die detektierten Proteinbanden für B) die Pro-Form der Caspase 8, C) die aktive Form der Caspase 8 (p20) und D) die Pro-Form der Caspase 9 quantifiziert

3.6. Analyse der Expression pro- und anti-apoptotischer Gene der Bcl-2-Familie

Des Weiteren wurde der Einfluss der VPA-Behandlung auf die Expression verschiedener Mitglieder der Bcl-2-Familie untersucht. Mittels Real time PCR wurde die mRNA-Synthese für *bcl-2*, *bax* und *bid* analysiert.

Es wurde festgestellt, dass die Expression von *bcl-2* durch die Behandlung der CLL-PBMCs mit VPA verringert wird (Abbildung 14A). Die Expression von *bax* und *bid* blieb dagegen annähernd konstant.

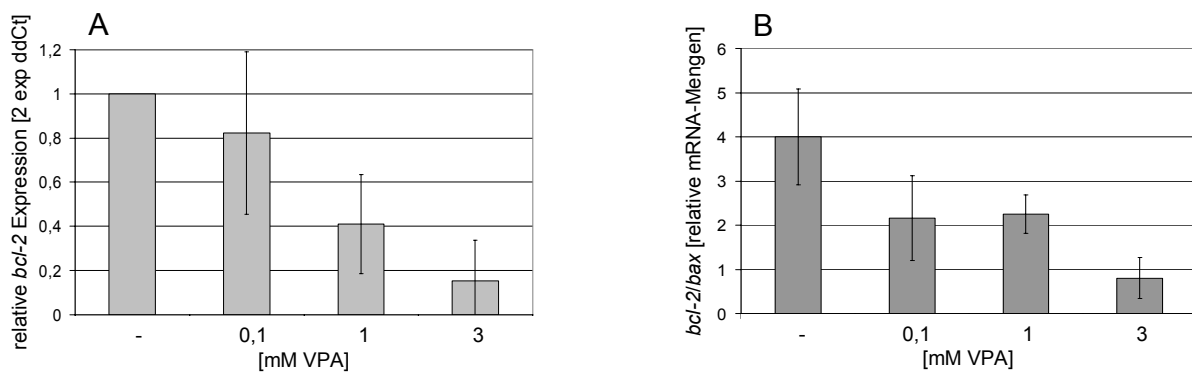


Abbildung 14:

Expressionsbestimmung mittels Real time PCR

A) Die *bcl-2*-Expression wurde in der Gesamt-RNA von CLL-Zellen bestimmt, die für 48 h unbehandelt oder mit verschiedenen VPA-Konzentrationen kultiviert worden waren. Die graphisch dargestellte relative Expression bezieht sich auf die unbehandelte Kontrolle der jeweiligen Patientenprobe, die gleich 1 gesetzt wurde. B) Das Verhältnis von *bcl-2* zu *bax* wurde anhand der relativen mRNA-Mengen (dCt) berechnet.

Durch den Rückgang der *bcl-2*-Expression verringerte sich somit das Verhältnis von *bcl-2* mRNA zu *bax* mRNA. In unbehandelten Zellen lag der Quotient bei 2,3 bis 7,7 und zeigte somit anti-apoptotische Signalwirkung. Bei mit 3 mM VPA behandelten Zellen sank der Quotient auf 0,3 bis 1,4 und signalisierte dadurch eine pro-apoptotische Tendenz (Abbildung 14B).

Der VPA-abhängige Rückgang der *bcl-2*-Expression konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden. Die Western blot-Analyse zeigte, dass die reduzierte Transkriptionsrate mit einer Verringerung der Bcl-2-Proteinmenge korreliert. Die Menge der zu Bcl-2 antagonistischen Proteine Bax und Bak blieb dagegen relativ konstant (Abbildung 15A).

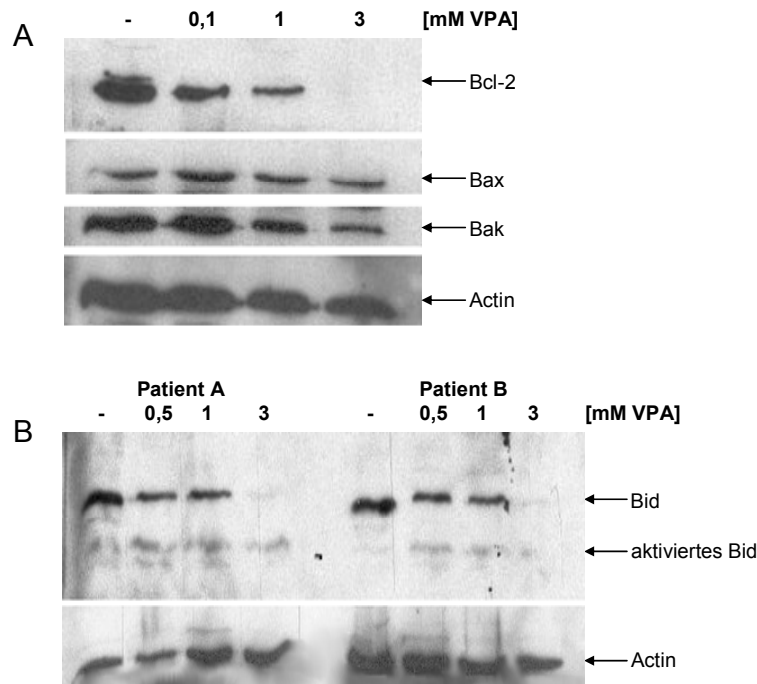


Abbildung 15:

Western blot-Analyse von Proteinen der Bcl-2-Familie

Aus unbehandelten und behandelten CLL-Zellen wurden nach 96 h Kultivierung Protein-Lysate gewonnen, Actin diente als Mengenkontrolle des Gesamtproteins.

A) Analyse der Bcl-2-, Bax- und Bak-Expression B) Analyse der Bid-Aktivierung

3.7. Untersuchung der Valproat-induzierten Aktivierung von Bid

Bid bildet als pro-apoptisches Mitglied der Bcl-2-Familie ein Bindeglied zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen Apoptose-Weg. Es kann von Caspase 8 mittels Spaltung aktiviert werden und mit Hilfe von Bax und Bak den Mitochondrien-vermittelten Apoptose-Weg initiieren (Marks and Dokmanovic, 2005; Bolden et al., 2006). Um die Aktivierung

beider Caspasen im Verlauf der VPA-vermittelten Apoptose zu erklären, wurde die Aktivierung von Bid mittels Western blot untersucht.

Wie in Abbildung 15B gezeigt, kam es in den CLL-Zellen unter VPA-Behandlung zu einer konzentrationsabhängigen Spaltung von Bid in seine aktive Form.

3.8. Expressionsanalyse der Antigene CD95 und CD49d

Der Todesrezeptor CD95 (Fas) ist ein häufig beschriebener Faktor des Signalwegs, der zur Aktivierung des proapoptotischen Proteins Bid führt. Die Expression des Rezeptors kann durch die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren erhöht werden (Insinga et al., 2005). Integrin $\alpha 4$ (CD49d) ist Bestandteil des VLA-4 (very late activation antigen 4)-Komplexes, der die Interaktion von Blutzellen mit Gewebe sowie die Bindung an Fibronectin beeinflusst und über die Aktivierung antiapoptotischer Signalwege Einfluss auf die Expression von *bcl-2* hat (Hynes, 2002). An AML-Zelllinien und –Patientenzellen konnte gezeigt werden, dass HDAC-Inhibitoren die Expression von CD49d auf mRNA- und Proteinebene verringern (Mahlknecht U. & Schönbein C., unveröffentlichte Ergebnisse). Mittels FACS-Analyse wurde die Expression der Zelloberflächenproteine CD95 (Fas-Rezeptor) und CD49d (Integrin $\alpha 4$) in Abhängigkeit von der VPA-Behandlung ermittelt (Abbildung 16).

Der Fas-Rezeptor war auf den CLL-PBMCs kaum vorhanden und seine Expression wurde weder durch die *ex vivo*-Kultivierung noch durch die Behandlung mit VPA induziert. CD49d wurde dagegen auf den CLL-PBMCs *in vivo* exprimiert. Die Expressionsstärke blieb, wie bei CD95, unabhängig von der Kultivierung oder VPA-Behandlung konstant.

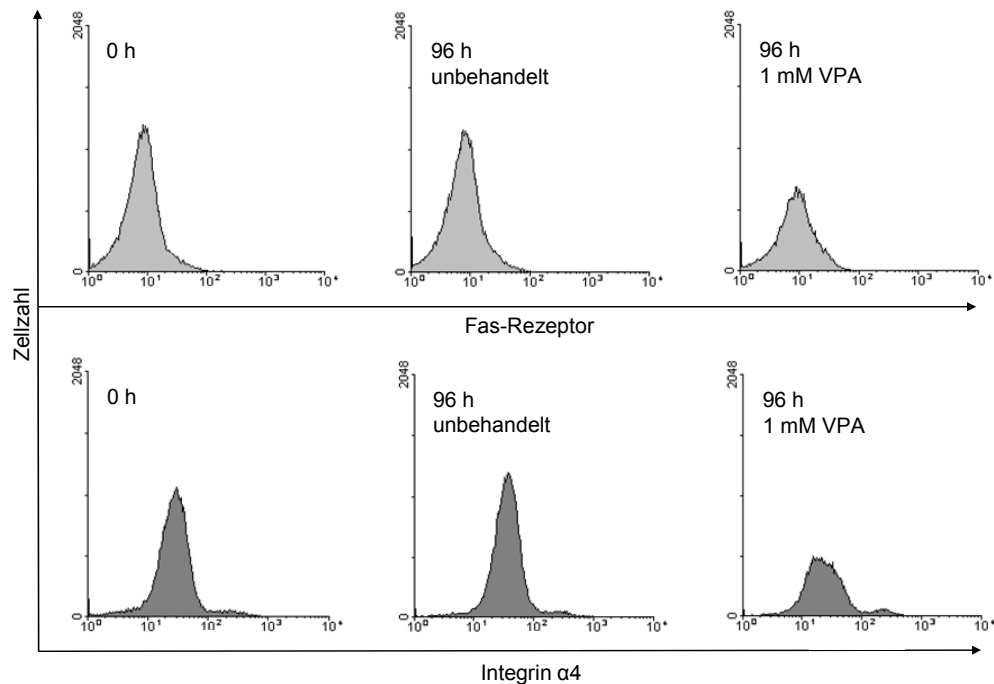


Abbildung 16:

FACS-Untersuchung der Expression von CD95 (Fas) und CD49d (Integrin α 4)

Die Expression von CD95 und CD49d auf CLL-Zellen wurde direkt nach der Isolierung (0 h) sowie nach 96 h Kultivierung, unbehandelt bzw. mit 1 mM VPA, analysiert. Es wurden jeweils 50.000 Zellen gemessen; in die Histogramm-Darstellung wurden nur PI-Zellen einbezogen, so dass sich die Anzahl der auswertbaren Zellen nach 96 h VPA-Behandlung deutlich reduziert.

3.9. Untersuchung des Einflusses von Valproinsäure auf die Aktivierung des extrinsischen und des intrinsischen Apoptose-Wegs

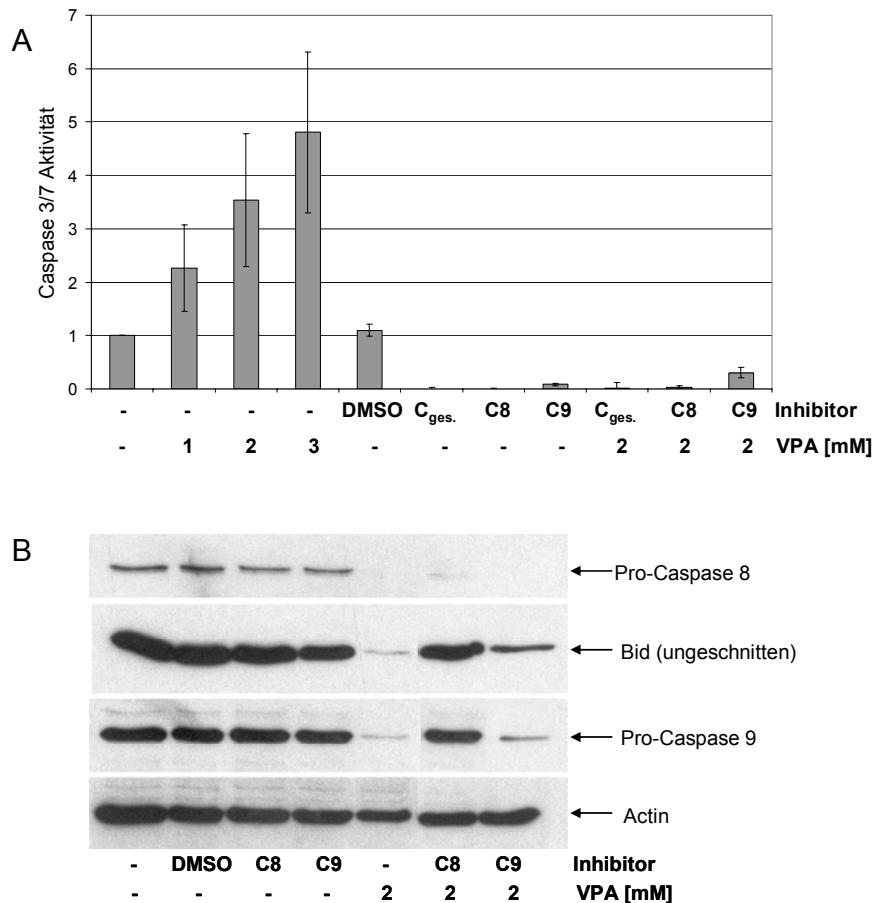
Caspasen sind Aspartat-spezifische Cystein-Proteasen, die konservierte Katalytische Domänen und Substratbindemotive aufweisen (Cryns and Yuan, 1998). Die Substratspezifität der Enzyme ermöglichte es Peptide zu entwickeln, die selektiv mit den Substraten einzelner Caspasen konkurrieren und durch angefügte Aldehyd-, Nitril- oder Ketongruppen zu reversiblen oder irreversiblen Inhibitoren der Caspase-Aktivität werden. Es wurden mit Fluoromethylketon derivatisierte Peptide als irreversible Inhibitoren eingesetzt, um die Notwendigkeit einzelner Caspasen für die VPA-bedingte Apoptose der CLL-PBMCs festzustellen. Inhibitoren für Caspase 8, 9 und ein genereller Caspase-Inhibitor allein oder in

Kombination mit Valproat wurden an den CLL-PBMCs getestet. Die Stärke der Apoptose-Induktion wurde mit einem Lumineszenz-Assay bestimmt, das die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 widerspiegelt.

Abbildung 17A gibt die gemessenen relativen Aktivitäten in den verschiedenen Zellkulturansätzen an, wobei die Caspase 3/7-Aktivität in der unbehandelten Kontrolle gleich 1 gesetzt wurde. In ausschließlich mit VPA behandelten Zellen erhöhte sich die Caspase-Aktivität proportional zur HDAC-I-Konzentration. Der Caspase 8-Inhibitor und der generelle Caspase-Inhibitor waren in der Lage sowohl die durch spontane Apoptose in ansonsten unbehandelten Zellen bedingte als auch die VPA-abhängige Caspase-Aktivierung komplett zu blockieren. Der Caspase 9-Inhibitor reduzierte sowohl die spontane als auch die VPA-abhängige Caspase-Aktivität auf etwa ein Zehntel der Aktivität in den Vergleichszellen.

Die Western blot-Analyse der für den Lumineszenz-Assay verwendeten Zellen zeigte erneut die VPA-abhängige Spaltung von Caspase 8, Caspase 9 und Bid (Abbildung 17B). In den mit dem Caspase 8-Inhibitor behandelten Zellen wurde, unabhängig von der VPA-Behandlung, die Spaltung/Aktivierung von Bid und Caspase 9 inhibiert. Im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle wurde durch die Inhibition von Caspase 9 die Spaltung von Caspase 8, Caspase 9 oder Bid weder in unbehandelten noch in VPA-behandelten Zellen beeinflusst.

Zusammenfassend zeigen die Beobachtungen, dass Caspase 8, die Initiator-Caspase des extrinsischen Apoptose-Wegs, unter den verwendeten Bedingungen die zuerst aktivierte Caspase war. Caspase 8 wurde im Weiteren für die Aktivierung von Bid und darauf folgend Caspase 9 benötigt.

**Abbildung 17:****Behandlung von CLL-PBMCs mit VPA und/oder Caspase-Inhibitoren**

PBMCs von fünf verschiedenen CLL-Patienten wurden in Gegenwart unterschiedlicher Kombinationen von VPA und Caspase-Inhibitoren kultiviert und nach 48 h die Caspase-Aktivität bestimmt. Als Referenz für die Normalisierung der gemessenen Aktivitäten diente jeweils die unbehandelte Kontrolle, als Kontrolle für die Behandlung mit den in DMSO gelösten Caspase-Inhibitoren dienten ausschließlich mit DMSO-behandelte Zellen. C_{ges.} = genereller Caspase-Inhibitor; C8 = Caspase 8-Inhibitor; C9 = Caspase 9-Inhibitor

A) graphische Darstellung der luminometrisch bestimmten Caspase-Aktivitäten

B) Western blot-Analyse von Protein-Lysaten einer der untersuchten Patientenproben nach 96 h Kultivierung

Teil II: Untersuchungen zur Wirkungsweise von Azacytidin bei der Behandlung von Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom

3.10. Analyse der klinischen Daten

Unsere Untersuchungen basieren auf der Behandlung von zehn Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (MDS) mit dem DNMT-Inhibitor Azacytidin (Vidaza®). Fünf dieser Patienten, Pat.-Nr. 1 bis 5, erhielten mindestens einen vollständigen Therapieblock mit vier Behandlungszyklen; eine Übersicht über den Therapieverlauf gibt das Behandlungsschema Abbildung 8 im Abschnitt 2.10.2. Klinisches Ansprechen auf Azacytidin konnte in sechs dieser Patienten festgestellt werden und wurde nach den Kriterien der IWG (International Working Group) bewertet (Tabelle 11 in Abschnitt 2.14.). Vier Patienten zeigten Verbesserungen der diagnostischen Parameter und zwei Patienten erreichten eine Stabilisierung der Erkrankung. Die Werte der hämatologischen Parameter vor und nach der Therapie sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Die Patienten 1 bis 4 erreichten Verbesserungen eines oder mehrerer hämatologischer Parameter („hematological improvement“). Patient 1 entwickelte während der Therapie eine essentielle Thrombozytose und benötigte eine zusätzliche Medikation mit Anagrelid (Xangrid™), um die Thrombozytenzahl zu reduzieren. Aufgrund der erhöhten Blastenzahl im Knochenmark befand sich der Patient vor der Therapie mit Azacytidin an der Grenze zur Transformation des MDS in eine AML. Während der ersten vier Behandlungszyklen konnte der Anteil an Blasten von bis zu 20 % auf 5 % reduziert werden. Patient 2 zeigte im Verlauf seiner MDS-Erkrankung einen immer schneller ansteigenden Bedarf an Erythrozyten-Konzentraten. Mit Hilfe der Behandlung konnte der Transfusionsbedarf bei konstanten Hb-Werten stabilisiert werden. Bei Patient 3 wurde mittels FACS-Untersuchung eine Verbesserung der myeloischen Differenzierung festgestellt, die sich durch eine verbesserte Ausreifung der Granulozyten äußerte. Zusätzlich konnte die Anzahl der Thrombozyten gesteigert, sowie der Anteil an Blasten im Knochenmark von 15 % auf 5 % reduziert werden. Patient 4 wies aufgrund seiner fortgeschrittenen Erkrankung nahe der Transformation in eine AML und der ungünstigen Zytogenetik (partielle Monosomie 7) eine besonders schlechte Prognose auf. Bei ihm ging die Anzahl der Blasten im Knochenmark von 16 % auf etwa 1 % zurück. Parallel dazu senkte sich sein Bedarf an Erythrozyten-Transfusionen.

Patienten Nr.	Hämoglobin [g/dl] ¹	Transfusions-Abhängigkeit ²	Leukozyten [/nl] ¹	Thrombozyten [/nl] ¹	Blasten [%] ¹
1	8.0 / 10.3	+	4.9 / 4.0	955 / 737	20 / 5
2	5.7 / 9.2	+	3.4 / 4.2	180 / 392	<5 / <5
3	10.7 / 10.9	-	1.7 / 1.7	55 / 126	15 / 5
4	9.9 / 9.5	+	1.9 / 1.2	387 / 435	16 / 1
5	9.7 / 8.0	+	6.8 / 4.3	339 / 240	8 / 11
6	9.0 / 7.0	+	2.2 / 1.0	74 / 23	<5 / <5
7	12.0 / 10.4	-	3.1 / 2.7	75 / 106	10 / 15
8	9.6 / 10.6	+	3.2 / 2.8	197 / 73	25 / 20
9	9.8 / 9.2	+	5.6 / 1.9	143 / 10	<5 / <5
10	8.4 / 9.9	+	1.6 / 1.4	49 / 25	20 / 50

Tabelle 14:Hämatologische Parameter

¹ Angegeben sind jeweils der Blutwert direkt vor dem Beginn der ersten Behandlung mit Azacytidin und der Wert nach Abschluss von 4 Zyklen bzw. beim Abbruch der Behandlung.

² Die Transfusionsabhängigkeit bezieht sich auf einen vor Beginn der Behandlung bestehenden Substitutionsbedarf mit Erythrozytenkonzentraten (+) bzw. die Unabhängigkeit davon (-).

Die Patienten 5 und 6 zeigten keine Verbesserung bezüglich der hämatologischen Parameter. Allerdings konnte das weitere Fortschreiten des MDS aufgehalten werden, die Erkrankung wurde somit stabilisiert („stable disease“).

Bei den anderen vier Patienten, Pat.-Nr. 7 bis 10, wurde eine Verschlechterung des Gesundheitszustandes beobachtet. Drei Patienten entwickelten eine AML, so dass die Azacytidin-Therapie abgebrochen werden musste. Die Patienten wurden im Anschluss mit einer Chemotherapie nach Standardprotokollen zur Behandlung der AML therapiert.

Die Bewertung der Behandlungserfolge ist in Tabelle 15 zusammengefasst.

Die am häufigsten beobachtete Nebenwirkung in Verlauf der Therapie mit Azacytidin war das Auftreten von Pan-Zytopenien im Blut. Die Anzahl der Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten nahm in den ersten zwei Wochen der Behandlungszyklen ab, regenerierte sich aber überwiegend bis zum Beginn des nächsten Zyklus. Abbildung 18 zeigt den zyklischen Rückgang der Leukozyten- und Thrombozytenzahl, der in Folge zytotoxischer Effekte jeweils nach der einwöchigen Azacytidin-Gabe auftrat. Der Hb-Wert wurde mit Hilfe der Transfusion von Erythrozyten-Konzentraten stabilisiert.

Patient Nr.	WHO ¹	Anzahl Blöcke ²	IWG Beurteilung ³
1	RAEB-2	10+	verbessert
2	RA	4+	verbessert
3	RAEB-2	4	verbessert
4	RAEB-2	4	verbessert
5	5q- Syndrom	4	stabil
6	RCMD	3	stabil
7	RAEB-2	3	fortschreitend
8	RAEB-2	3	fortschreitend
9	RARS	3	fortschreitend
10	RAEB-2	2	fortschreitend

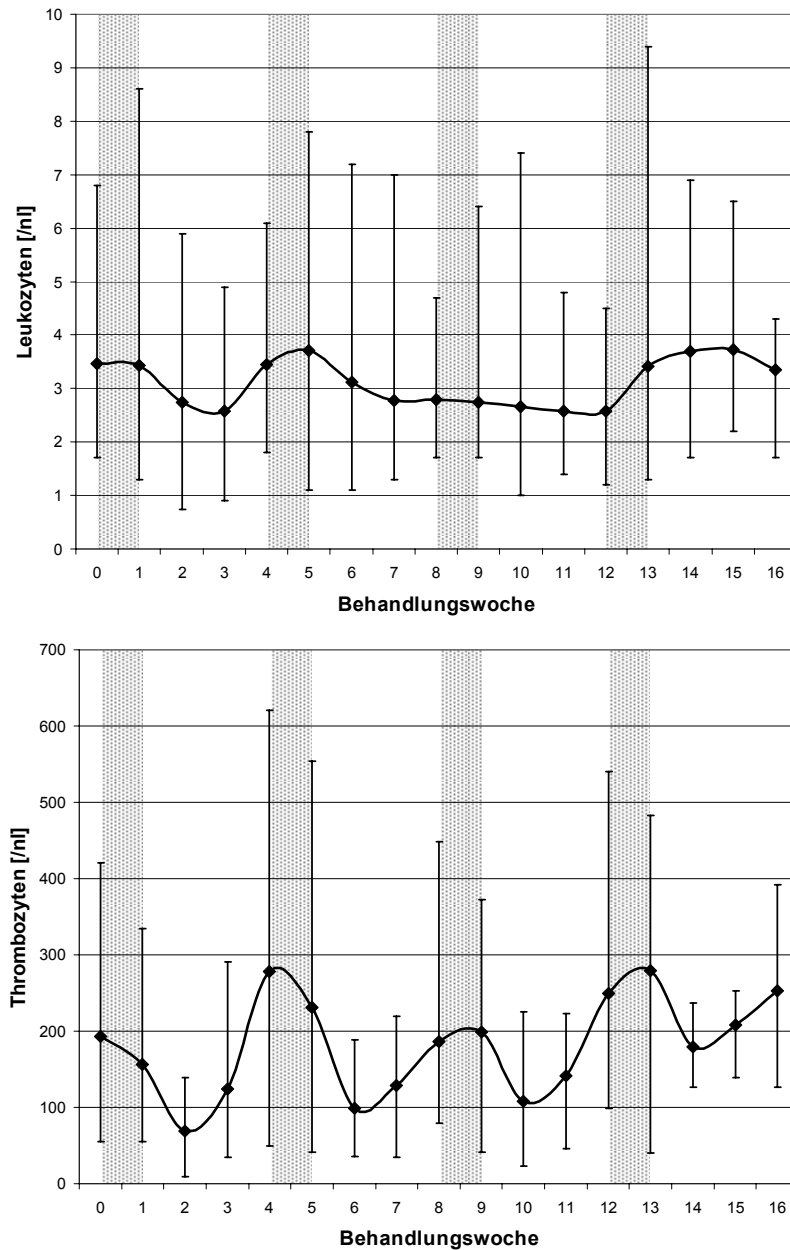
Tabelle 15:Behandlungsergebnisse

¹ RA, refraktäre Anämie; RARS, refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten; RAEB, refraktäre Anämie mit Erhöhung von Blasten; RCMD, refraktäre Anämie mit Multilinien-Dysplasie (diagnostiziert nach den Richtlinien der WHO)

² Die Anzahl der Blöcke wurde mit der Anzahl der einwöchigen Azacytidin-Gaben gleichgesetzt; +, die Therapie wird fortgesetzt

³ verbessert, improvement; stabil, stable disease; fortschreitend, progressive disease (beurteilt nach den Kriterien der IWG)

In Zusammenhang mit der therapiebedingten Myelosuppression traten bei vier Patienten (Pat.-Nr. 2, 5, 9 und 10) Fieber und Infektionen auf. Bei zwei Patienten (Pat.-Nr. 2 und 5) konnten die Infektionen durch die Behandlung mit Antibiotika erfolgreich behandelt werden. Die beiden anderen Patienten (Pat.-Nr. 9 und 10) verstarben an durch die Infektionen hervorgerufenen Komplikationen. Häufig beobachtete nicht-lebensbedrohliche Nebenwirkungen waren auf den Bereich der Injektionsstelle begrenzte Haut-Irritationen und Obstipation.

**Abbildung 18:**Leukozyten- und Thrombozytenzahl im Verlauf der Azacytidin-Behandlung

Verlaufskurven der Blutwerte von Woche 0 (vor Behandlung) bis Woche 16 (Ende des ersten Blocks), grau unterlegte Bereiche markieren den Zeitraum der Azacytidin-Gabe, angegeben ist jeweils der minimal und maximal erreichte Wert der Patientengruppe

oben: Mittelwerte der Leukozytenzahlen der Patienten 1 bis 7

unten: Mittelwerte der Thrombozytenzahlen der Patienten 2 bis 7, Patient 1 wurde aufgrund der bestehenden Thrombozytose nicht einbezogen

3.11. Methylierungs- und Expressionsanalyse

Die dem MDS zugrunde liegenden pathogenetischen molekularen Mechanismen sind größtenteils ungeklärt, jedoch wurden hypermethylierte Promotorstrukturen verschiedener potentiell involvierter Gene identifiziert. Die therapeutische Wirkung von Azacytidin wird im Allgemeinen auf die Demethylierung dieser Promotoren und eine darauf folgende Reaktivierung der Genexpression zurückgeführt. Da jedoch eine allgemeine Zytotoxizität und Myelosuppression als Reaktion auf die Azacytidin-/Decitabin-Gabe auftreten, können auch diese nicht als indirekte Wirkmechanismen ausgeschlossen werden. Um den Beitrag der DNMT-inhibierenden Wirkung von Azacytidin aufzuklären, wurde der Zusammenhang zwischen Therapieerfolg und DNA-Demethylierung sowie Genexpressionsveränderungen untersucht.

Parallel zur Routinediagnostik wurden aus Blut- und Knochenmarkproben von fünf der MDS-Patienten (Pat.-Nr. 1 bis 5) mononukleäre Zellen aufgereinigt. Aus den Zellen wurde zur Untersuchung von Methylierungsveränderungen im Therapieverlauf DNA isoliert. Die Gesamt-Methylierung der DNA wurde mittels Kapillarelektrophorese (CE) analysiert sowie die Sequenz-spezifische Methylierung von Chromosom 1 Satellit 2 (C1S2) und LINEs („long interspersed nuclear elements“) mit Hilfe der COBRA-Technik untersucht.

Zusätzlich zur COBRA-Untersuchung der DNA wurde die RNA aus den entsprechenden Proben isoliert und mittels Real time PCR die Expression der Gene *p15*, *esr1*, *ril* und *hoxA4* festgestellt, um den funktionellen Zusammenhang zwischen der Demethylierung der Promotoren und der Re-Expression der Gene zu untersuchen.

Die Methylierungsanalyse der C1S2- und LINE-1-Sequenzen diente in erster Linie der weiteren Untersuchung von genomweiter Methylierung. Es zeigte sich, dass die Veränderungen der Methylierung von C1S2 jedoch nicht von LINE-1 mit den CE-Ergebnissen korrelierten, wodurch frühere Beobachtungen bestätigt wurden (Mund et al., 2005). Alle hier angegebenen Methylierungsanalysen wurden von Dipl.-Biol. C. Stresemann durchgeführt.

3.11.1. p15-, esr1-, ril- und hoxA4-Expression im Blut von Probanden

Um Vergleichswerte für die Normalisierung und Bewertung der Expressionsdaten der MDS-Patienten zu erhalten, wurde zunächst aus den PBMCs von 8 hämatologisch unauffälligen Personen die Gesamt-RNA isoliert und für die Expressionsanalyse mittels Real time PCR verwendet. Analysiert wurde die Expression der Gene *p15*, *esr1*, *ril* und *hoxA4*.

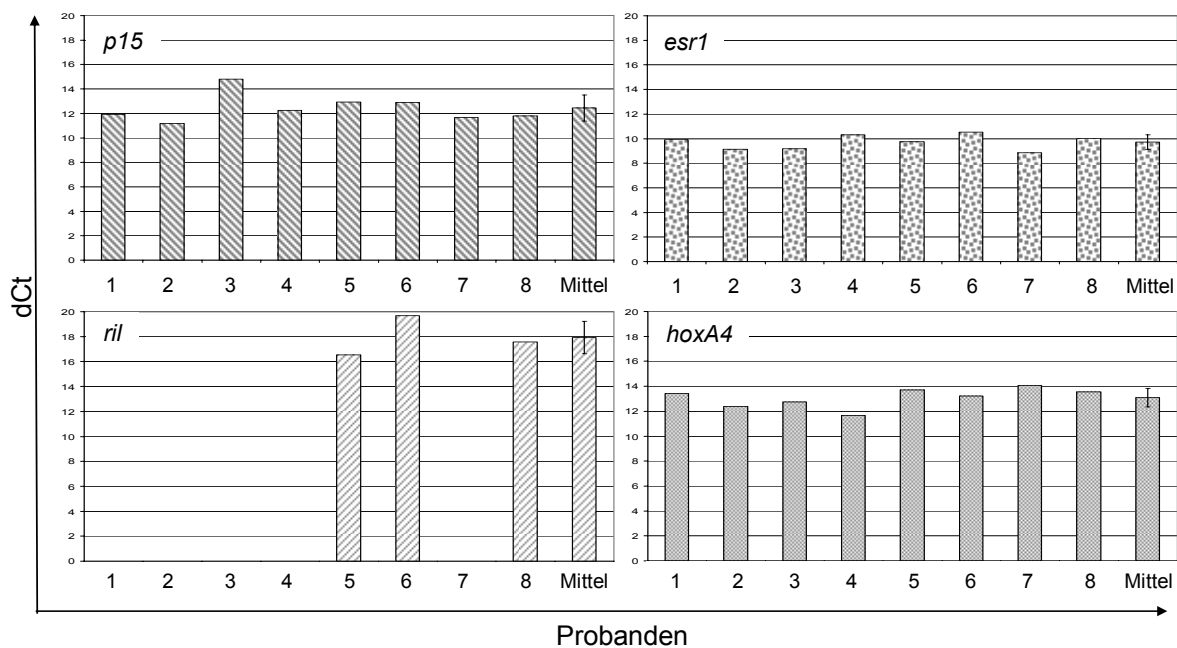


Abbildung 19:

Expressionsanalyse im Blut von Probanden

Auf *gapdh* normalisierte Expressionswerte (dCt) der Gene *p15*, *esr1*, *ril* und *hoxA4* hämatologisch unauffälliger Probanden (1-8) und Mittelwerte (Mittel)

Abbildung 19 gibt die auf die *gapdh*-Expression normalisierten Ct-Werte (dCt) der einzelnen Probanden wieder. Für die Gene *p15*, *esr1* und *hoxA4* war die Variation der festgestellten Expression zwischen den Probanden relativ gering. Erhebliche Unterschiede zeigten sich dagegen für *ril*. Bei den Probanden 1, 2, 3, 4 und 7 war keine Expression des Gens festzustellen, wobei die Probanden 5, 6 und 8 eine schwache Expression zeigten. Die jeweiligen Mittel der dCt-Werte wurden für die Darstellung der Expressionswerte der MDS-Patienten gleich 1 gesetzt.

3.11.2. Analyse der Knochenmark-Proben

Von den Patienten 1 bis 5 wurden jeweils fünf Knochenmark-Proben untersucht. Die Patienten 1, 2, 3 und 5 wurden direkt vor Therapiebeginn und vor jedem weiteren Zyklus punktiert.

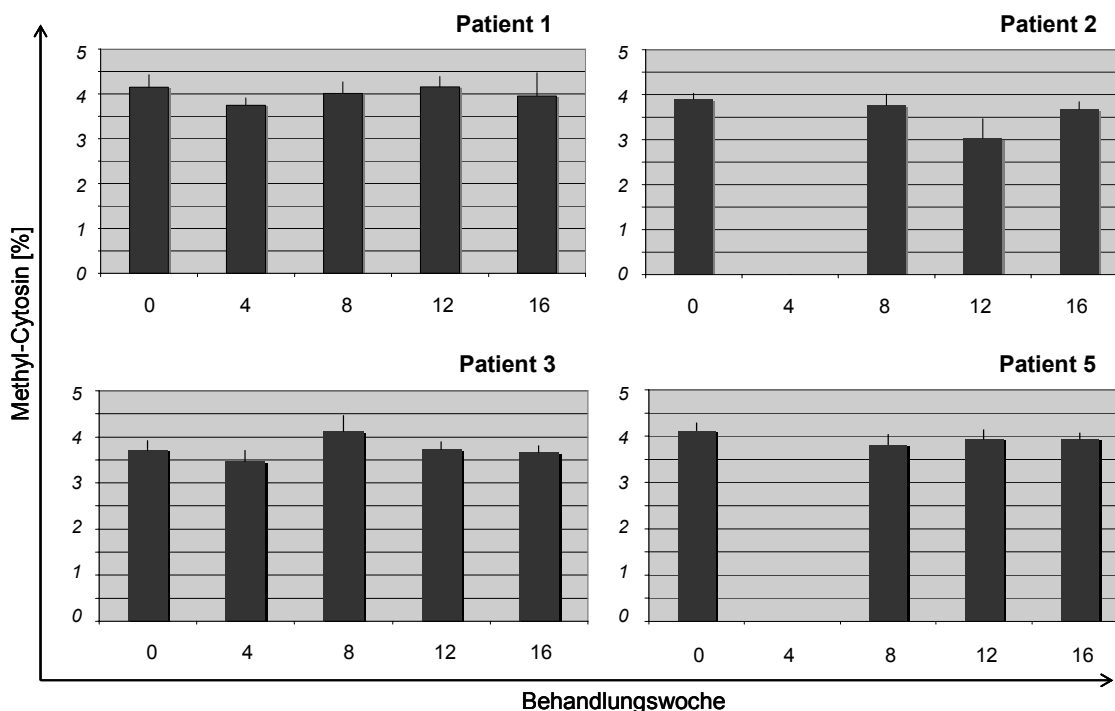


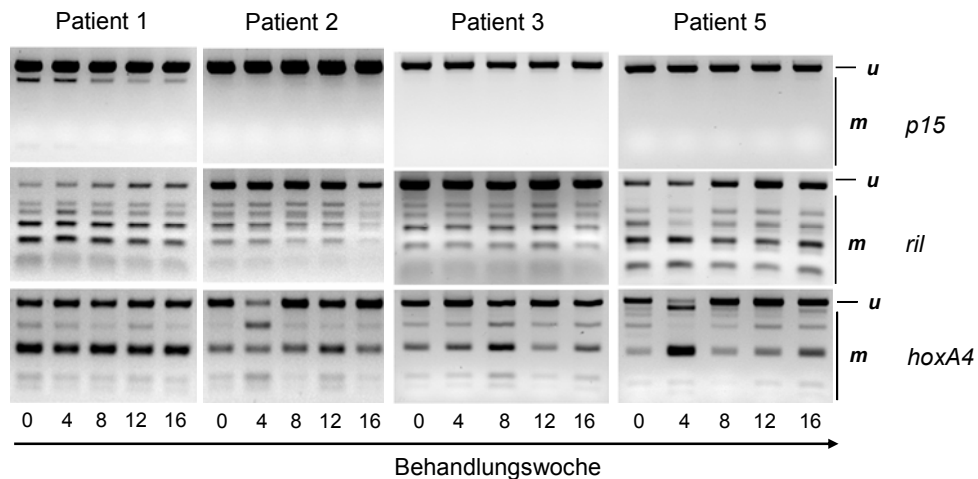
Abbildung 20:

Analyse der Gesamt-Methylierung im Knochenmark der Patienten 1, 2, 3 und 5

Die DNA aus den Knochenmarkaspiraten, die in Woche 0 (vor Therapiebeginn), 4, 8, 12 und 16 gewonnen wurden, wurde mittels Kapillarelektrophorese untersucht. Angegeben sind die Anteile an methyliertem Cytosin in % bezogen auf das insgesamt in der Probe enthaltene Cytosin.

globale Methylierung im Knochenmark der Patienten 1, 2, 3 und 5

Die Untersuchung der Knochenmark-Proben mittels Kapillarelektrophorese zeigte für die Patienten 1, 2, 3 und 5 keine starken Veränderungen im Anteil der Gesamt-Cytosin-Methylierung. Lediglich bei Patient 1 nach dem 1. Zyklus und bei Patient 2 nach dem 3. Zyklus wurde eine schwache Demethylierung festgestellt, der ursprüngliche Methylierungsgrad wurde jeweils im weiteren Verlauf wieder hergestellt (Abbildung 20).

**Abbildung 21:****Analyse der Promotor-spezifischen Methylierung im Knochenmark der Patienten 1, 2, 3 und 5**

Agarosegel-Analyse der COBRA-Produkte für die Promotoren von *p15*, *ril* und *hoxA4*

(u = Bande des unmethylierten Restriktionsproduktes, m = Bande eines methylierten Restriktionsproduktes)

Promotor-spezifische Methylierung im Knochenmark der Patienten 1, 2, 3 und 5

Bei der Analyse der Promotor-spezifischen Methylierung wurde für die Patienten 1, 2, 3 und 5 ebenfalls keine starke Demethylierung festgestellt (Abbildung 21). Der *p15*-Promotor war in den Patienten 2, 3 und 5 vollständig unmethyliert. Nur Patient 1 zeigte eine schwache Methylierungsbande, die im Therapieverlauf abnahm. Die Promotoren von *ril* und *hoxA4* waren teilmethyliert. Bei den Patienten 1 und 5 war für den *ril*-Promotor eine schwache kontinuierliche Demethylierung zu beobachten. Die Methylierung von *hoxA4* blieb bei den Patienten 1 und 3 im Therapieverlauf unverändert, bei Patient 2 und 5 zeigte sich nach dem ersten Behandlungszyklus eine verstärkte Methylierung.

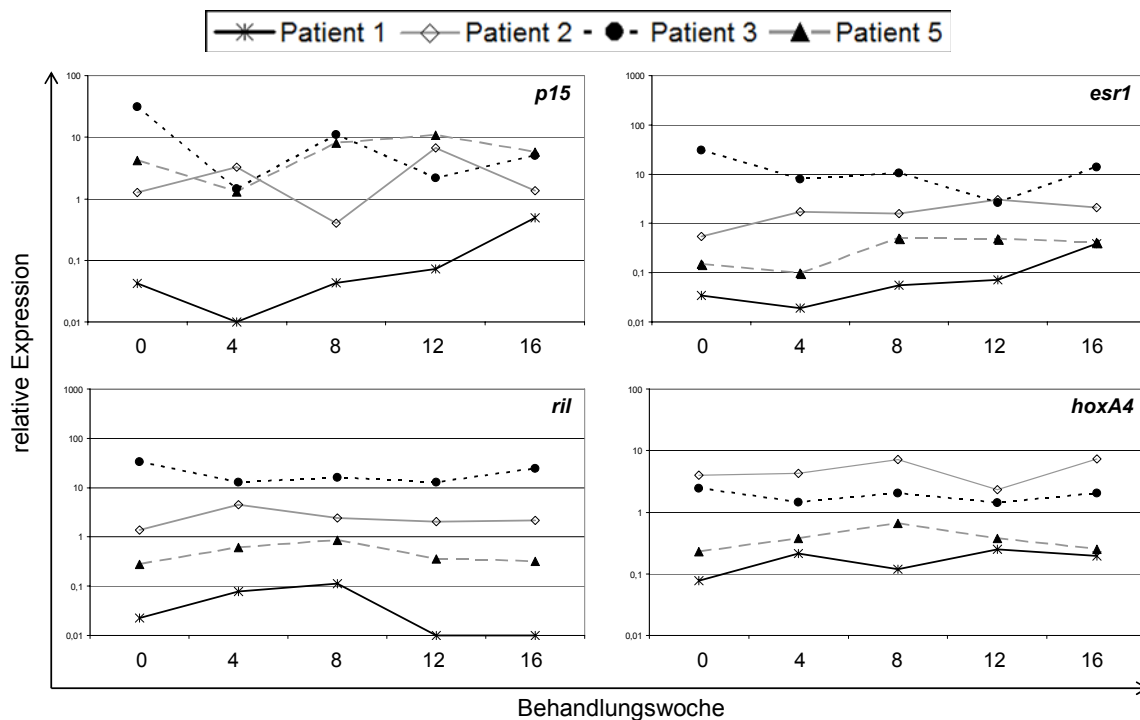


Abbildung 22:

Expressionsanalyse im Knochenmark der Patienten 1, 2, 3 und 5

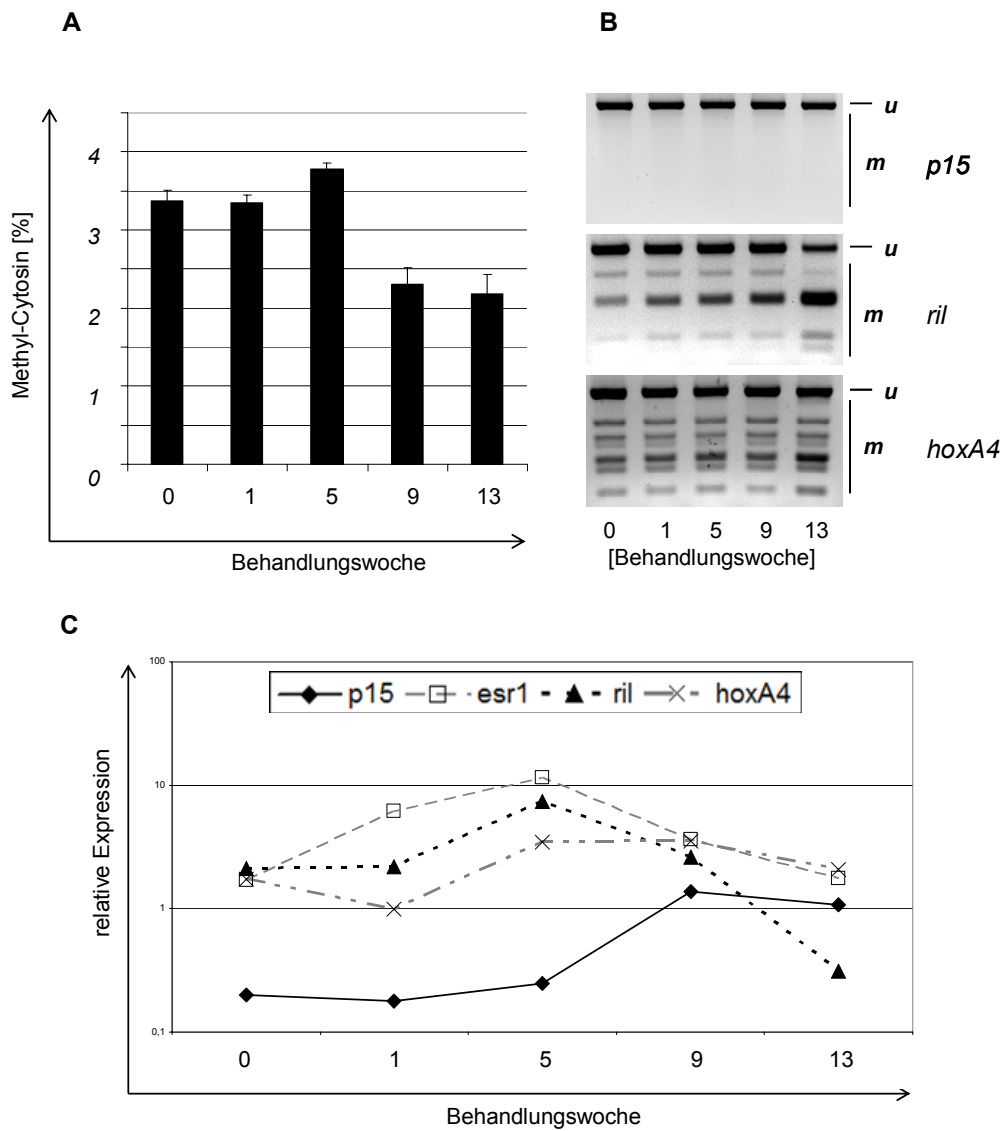
Die Expression der Gene *p15*, *esr1*, *ril* und *hoxA4* wurde mittels Real time PCR untersucht. Die Werte wurden auf die *gapdh*- Expression der jeweiligen Probe und die mittlere in den Probanden gemessene Expression normalisiert, die gleich 1 gesetzt wurde.

Expression im Knochenmark der Patienten 1, 2, 3 und 5

Die Expressionsanalyse für *p15* ergab für die Patienten 2, 3 und 5 relativ starke Schwankungen zwischen den verschiedenen Proben, die nach dem letzten Zyklus etwa wieder den ursprünglichen Wert erreichten (Abbildung 22). Aufgrund des schon vor Therapiebeginn demethylierten *p15*-Promotors stehen diese Schwankungen nicht in direktem Zusammenhang mit der Azacytidin-induzierten Demethylierung des zugehörigen Promotors.

Eine Korrelation der Expression mit der Promotor-Methylierung ist dabei nur für Patient 1 erkennbar, bei dem die sehr geringe Expression ab dem 2. Zyklus parallel zur leichten Abnahme der Promotor-Methylierung ansteigt.

Für die Gene *esr1*, *ril* und *hoxA4* ergab die Expressionsanalyse für keinen der fünf untersuchten Patienten signifikante Veränderungen. Es zeigten sich insbesondere keine Parallelen zu Methylierungsveränderungen an *ril* und *hoxA4*.

**Abbildung 23:**Analyse der Knochenmarkproben des Patienten 4

A Darstellung des Anteils an Methyl-Cytosin bezogen auf den Gesamt-Cytosinegehalt

B COBRA-Resultate für die Promotor-Sequenzen von *p15*, *ril* und *hoxA4*

(u = Bande des unmethylierten Restriktionsproduktes, m = Bande eines methylierten Restriktionsproduktes)

C Expressionsanalyse für die Gene *p15*, *esr1*, *ril* und *hoxA4*

Methylierung und Expression im Knochenmark von Patient 4

Da sich im Knochenmark der bisher beschriebenen Patienten keine signifikante Demethylierung durch die Azacytidin-Behandlung nachweisen ließ, wurde das Zeitschema für die Probengewinnung verändert. Durch einen kürzeren Abstand zwischen der Azacytidin-Gabe und der Knochenmarkentnahme sollten auch kurzfristig auftretende, sich zurück bildende Demethylierungen festgestellt werden. Bei Patient 4 erfolgte die Knochenmarkentnahme ebenfalls direkt vor Therapiebeginn, die weiteren Proben wurden jedoch immer direkt nach Abschluss der einwöchigen Azacytidin-Behandlung gewonnen.

Die Untersuchung der Knochenmark-Proben von Patient 4 mittels Kapillarelektrophorese zeigte einen deutlichen Rückgang der Methylierung nach dem 3. und 4. Zyklus (Abbildung 23A).

Wie bei den Patienten 2, 3 und 5 lag der *p15*-Promotor bei Patient 4 unmethyliert vor; die Promotoren von *ril* und *hoxA4* waren teilmethyliert (Abbildung 23B). Die COBRA-Untersuchung ergab zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten keine Veränderungen des Methylierungsmusters für *p15* und *hoxA4*; die Methylierung des *ril*-Promotors nahm dagegen zu.

Für *p15* zeigte sich ein Anstieg der Expression ab dem 3. Zyklus. Die Expression von *esr1* stieg nach den ersten beiden Zyklen an, war in der letzten Probe aber wieder auf dem Ausgangsniveau. Ein ähnlicher Verlauf ergab sich für *ril*. Die Expression fiel aber zum Ende der Behandlung auf einen fast nicht mehr messbaren Wert ab. Für *hoxA4* wurden geringe Schwankungen um weniger als den Faktor 2 gemessen. Verglichen mit dem Ausgangswert war die Expression nach vier Zyklen Azacytidin-Behandlung unverändert (Abbildung 23C).

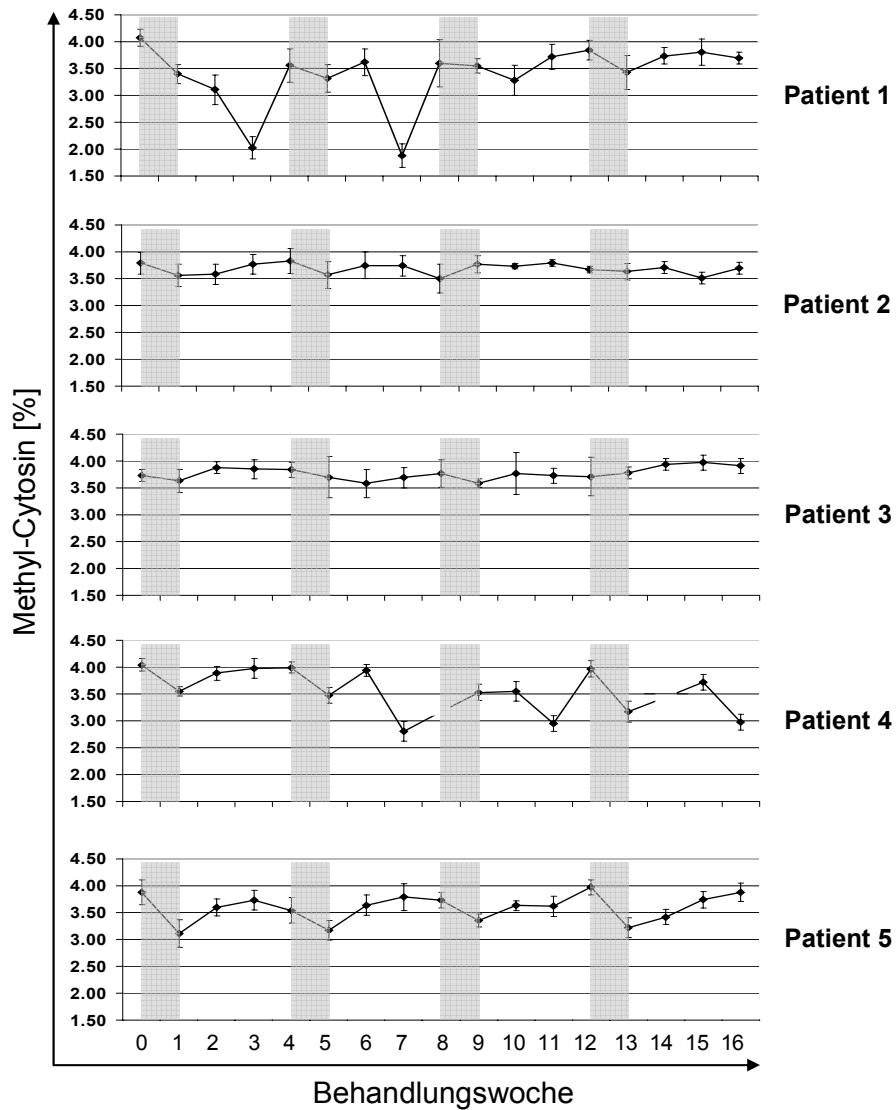
Somit konnte die demethylierende Wirkung von Azacytidin im Knochenmark nachgewiesen werden, wobei die Effekte aber offenbar nur kurzfristig waren, da der Nachweis nur in kurz nach der Behandlung gewonnenen Proben möglich war. Die Beobachtung, dass es im Verlauf der Behandlung trotz gleich bleibender Promotor-Methylierung bei den untersuchten Genen zu Expressionsveränderungen kam, zeigt, dass Azacytidin auch über sekundäre oder methylierungsunabhängige Mechanismen Einfluss auf die Genexpression hat.

3.11.3. Analyse der Blut-Proben

Den Patienten wurde direkt vor Therapiebeginn und darauf folgend in wöchentlichem Abstand Blut abgenommen. Die höhere Probendichte ermöglichte eine bessere Auflösung bezüglich kurzfristig auftretender Methylierungs- und Expressionsveränderungen. Im Gegensatz zu Knochenmarkszellen konnten so in peripheren Blutzellen im Verlauf der Behandlung mit Azacytidine deutliche Veränderungen der DNA-Methylierung und/oder der Genexpression festgestellt werden.

globales Methylierungsmuster in peripheren Blutzellen

Bei allen untersuchten Patienten (Patient 1 bis 5) wurde in Blutzellen eine mehr oder weniger starke Reduzierung der DNA-Methylierung nach Azacytidin-Gabe festgestellt, die während der Regenerationszeit zwischen den Behandlungen bzw. bis zum Ende des Behandlungsblocks bei allen bis auf Patient 4 wieder hergestellt wurde (Abbildung 24). Die Patienten 1 und 4 zeigten zwischenzeitlich die stärkste Demethylierung, die bei Patient 1 vorwiegend in den ersten beiden Zyklen auftrat und bis zum Ende des Blocks regeneriert wurde. Bei Patient 4 wurde dagegen erst ab dem 2. Zyklus eine deutliche Demethylierung beobachtet, die auch zum Ende der Behandlung noch erhalten war. Bei Patient 5 zeigte sich eine deutliche Demethylierung, die periodisch nach der einwöchigen Gabe von Azacytidin auftrat und im Verlauf der Regenerationszeit jeweils wieder hergestellt wurde. Für die Patienten 2 und 3 wurden leicht Schwankungen bezüglich der Gesamt-Methylierung beobachtet, diese können aber nicht direkt mit dem Behandlungsschema korreliert werden.

**Abbildung 24:**Analyse der Gesamt-Methylierung im Blut im Verlauf der vier Behandlungszyklen

Die DNA aus den wöchentlich entnommenen Blutproben, wurde mittels Kapillarelektrophorese untersucht. Angegeben sind die Anteile an methyliertem Cytosin in % bezogen auf das insgesamt in der Probe enthaltene Cytosin. Die grau unterlegten Bereiche markieren den Zeitraum der Azacytidin-Behandlung.

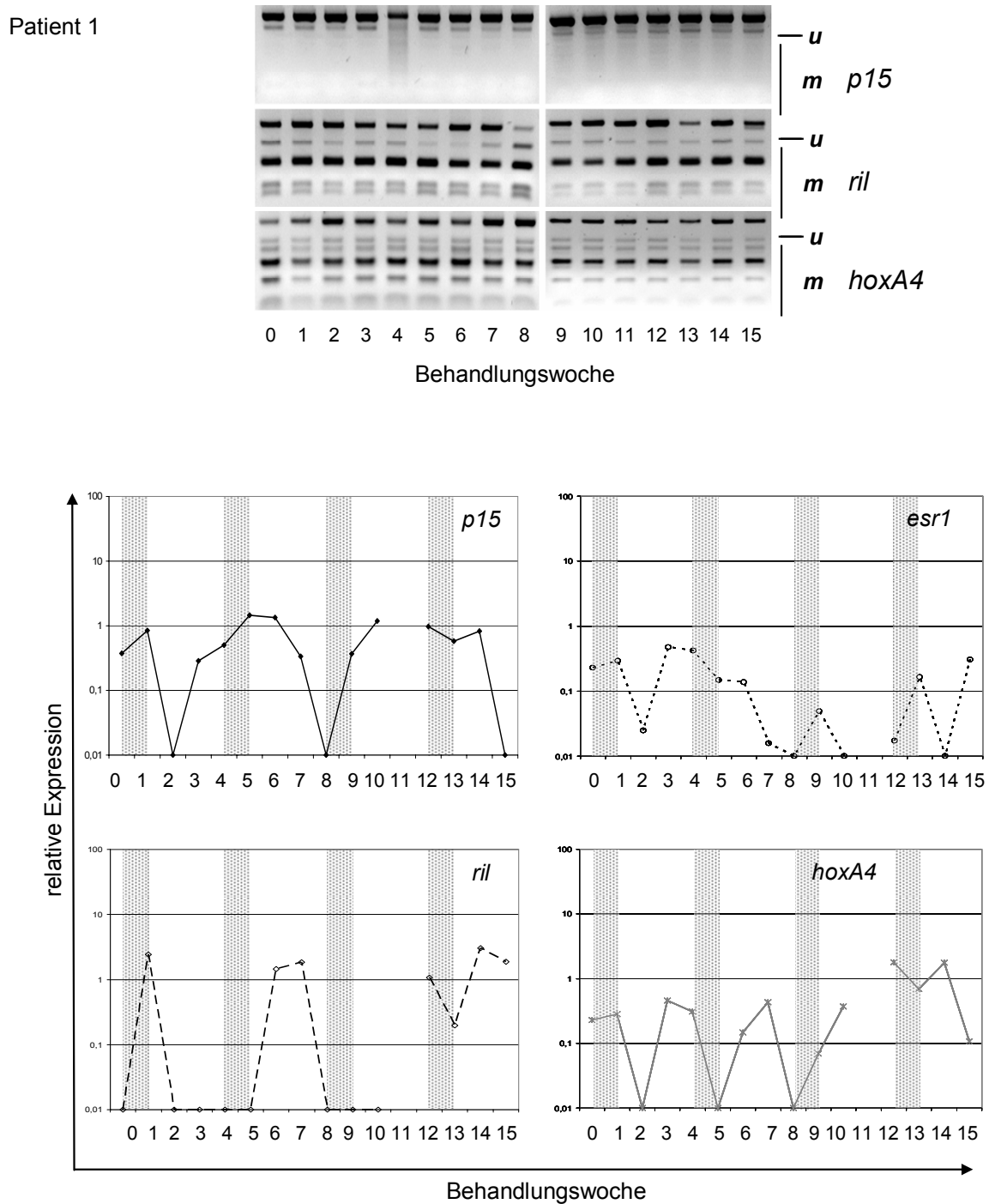
Promotor-spezifische Methylierung und Expression in Blutzellen

Die Methylierungsanalyse der Promotorsequenz von *p15* zeigte bei den Patienten 2 bis 5 ebenso wie in den Knochenmarkproben keine Methylierung vor Therapiebeginn und blieb während der Behandlung konstant demethyliert (Abbildung 25, 26, 27, 28 und 29). Bei Patient 1 wurde ebenfalls das gleiche Methylierungsmuster wie in den Knochenmarkproben festgestellt, das sich in Blutzellen jedoch nicht veränderte.

Auch für *ril* und *hoxA4* ergaben sich bezüglich der Methylierung bei Patient 1 keine signifikanten Veränderungen im Verlauf der Therapie. Dagegen zeigten sich starke Expressionsschwankungen aller vier untersuchten Gene, die jedoch nicht in direkter Weise mit dem Behandlungsschema korreliert werden konnten. Verglichen mit dem Expressionslevel der Probanden waren die Gene bei Patient 1 vor der Therapie durchgängig schwach exprimiert (Abbildung 25). Im Verlauf der Behandlung wurde die Expression zeitweise erhöht und erreichte die Stärke der in den Probanden gemessenen Expression.

Patient 2 zeigte ebenfalls Expressionsveränderungen aber keine Veränderung der Methylierung an den untersuchten Promotoren. Deutlich und anhaltend induziert wurde die Expression von *esr1* und *ril*. Für *p15* und *hoxA4* ergab sich eine vorübergehende, die Werte der Probanden-Expression deutlich überschreitende Induktion (Abbildung 26).

Im Gegensatz zu dem auch bei Patient 3 unveränderten Methylierungsmuster von *hoxA4*, konnte hier für *ril* eine periodische Demethylierung detektiert werden. Die Methylierung nahm jeweils nach der Azacytidin-Gabe ab und regenerierte sich bis zum nächsten Zyklus. Die Schwankungen der *ril*-Expression waren teilweise mit diesen Veränderungen korreliert, so z. B. die Induktion mit der Demethylierung in Woche 4 und 12 sowie die Repression mit der Remethylierung in Woche 4 (Abbildung 27). Für die anderen untersuchten Gene ergaben sich ebenfalls Expressionsschwankungen, die aber weder mit der Methylierung noch mit den Behandlungszyklen eindeutig korreliert werden konnten.

**Abbildung 25:**

Analyse der Promotor-Methylierung und Genexpression im Blut von Patient 1

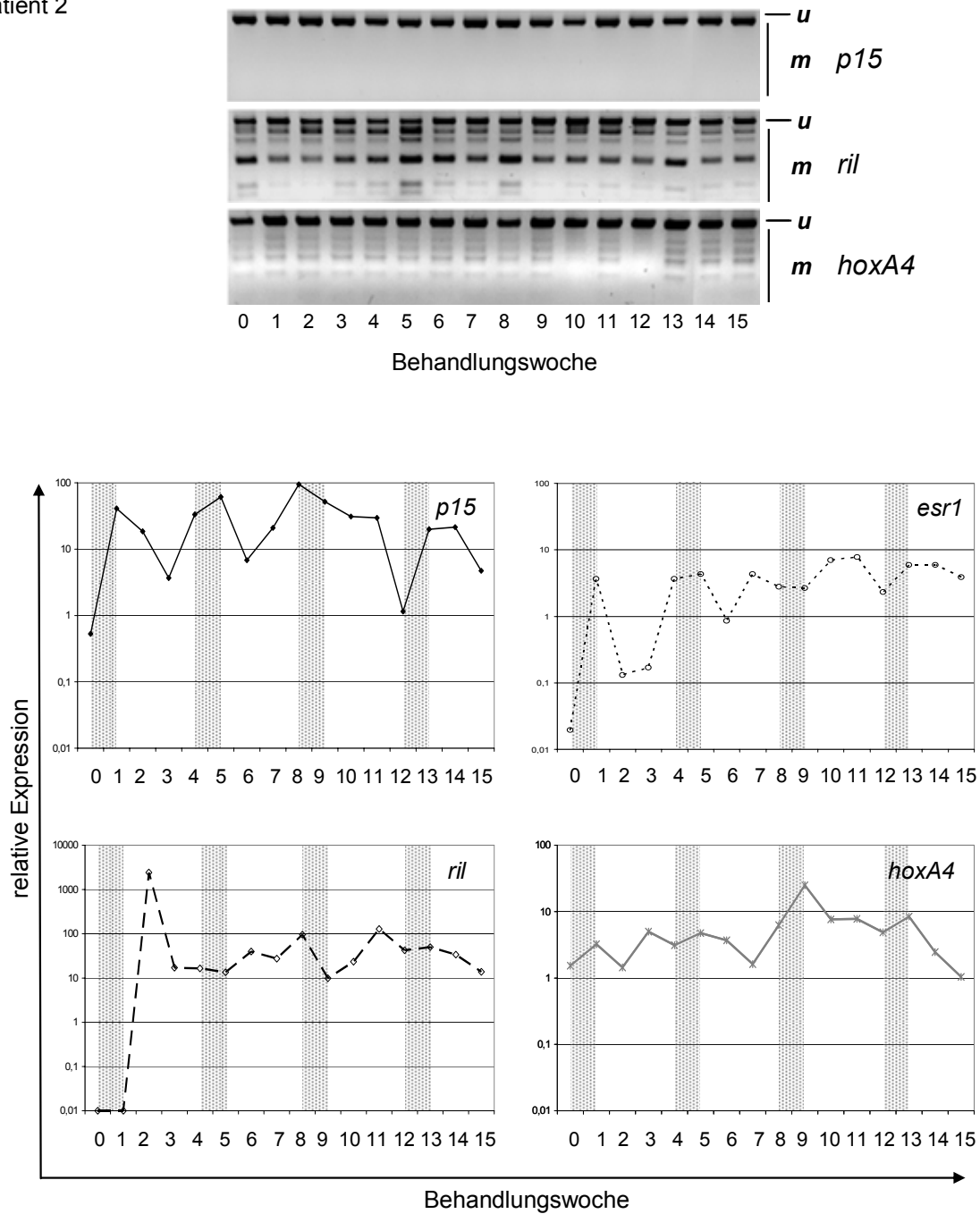
oben: COBRA-Resultate für die Promotor-Sequenzen von *p15*, *ril* und *hoxA4*

(u = Bande des unmethylierten Restriktionsproduktes, m = Bande eines methylierten Restriktionsproduktes)

unten: Expressionsanalyse für die Gene *p15*, *esr1*, *ril* und *hoxA4* (Die Probe aus Woche 11 konnte nicht analysiert werden.)

Die grau unterlegten Bereiche markieren den Zeitraum der Azacytidin-Behandlung.

Patient 2

**Abbildung 26:**

Analyse der Promotor-Methylierung und Genexpression im Blut von Patient 2

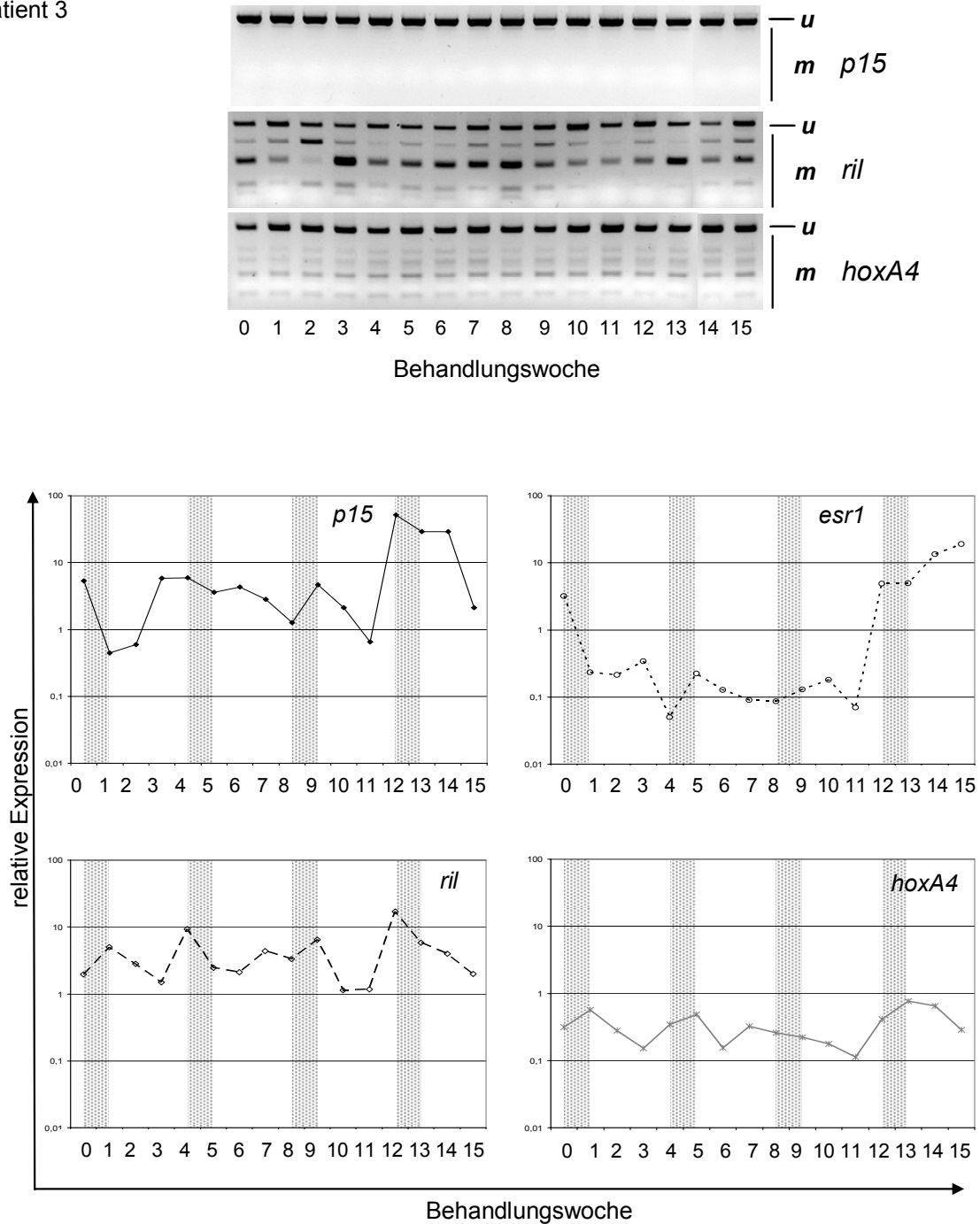
oben: COBRA-Resultate für die Promotor-Sequenzen von *p15*, *ril* und *hoxA4*

(u = Bande des unmethylierten Restriktionsproduktes, m = Bande eines methylierten Restriktionsproduktes)

unten: Expressionsanalyse für die Gene *p15*, *esr1*, *ril* und *hoxA4*

Die grau unterlegten Bereiche markieren den Zeitraum der Azacytidin-Behandlung.

Patient 3

**Abbildung 27:**

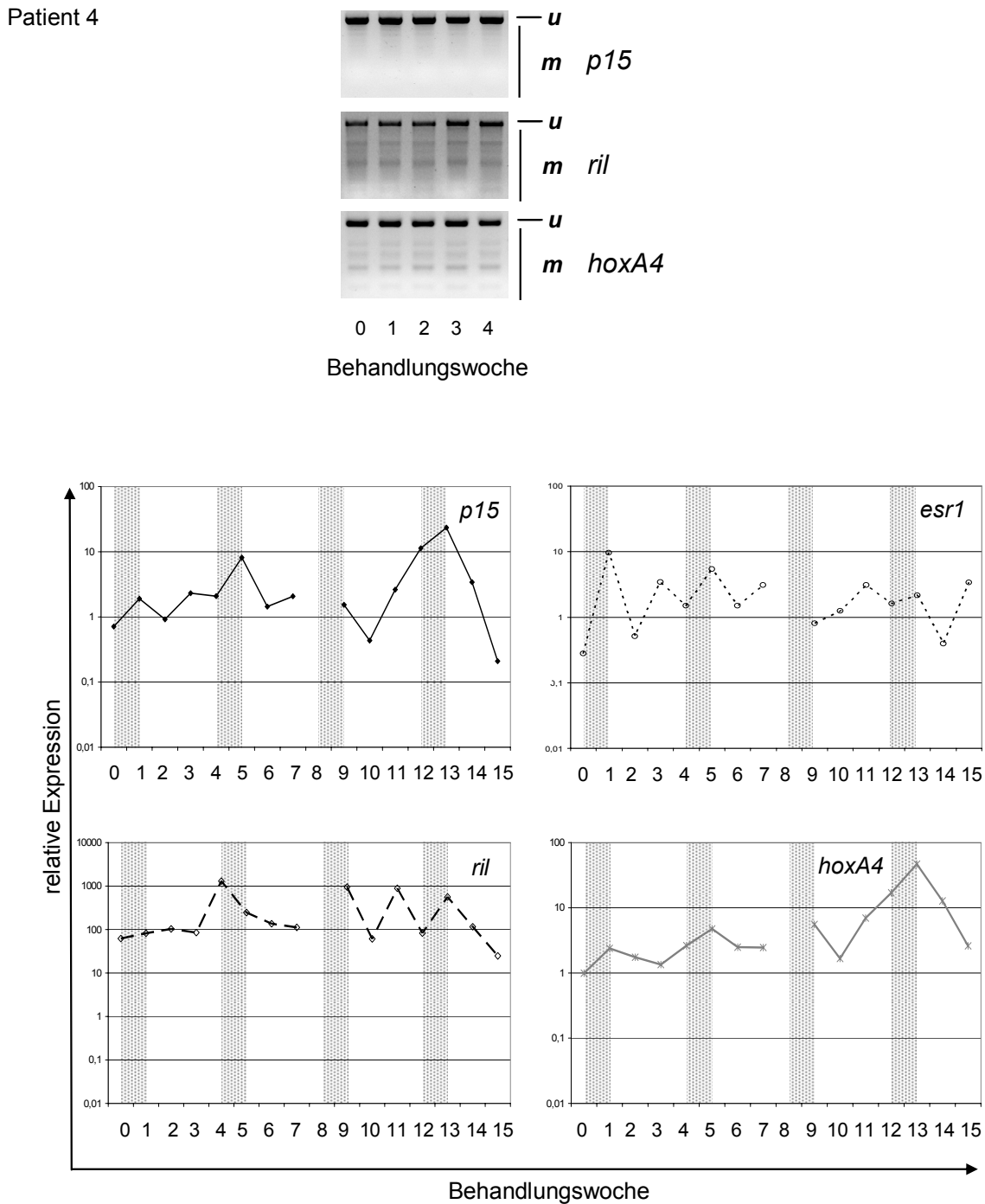
Analyse der Promotor-Methylierung und Genexpression im Blut von Patient 3

oben: COBRA-Resultate für die Promotor-Sequenzen von *p15*, *ril* und *hoxA4*

(u = Bande des unmethylierten Restriktionsproduktes, m = Bande eines methylierten Restriktionsproduktes)

unten: Expressionsanalyse für die Gene *p15*, *esr1*, *ril* und *hoxA4*

Die grau unterlegten Bereiche markieren den Zeitraum der Azacytidin-Behandlung.

**Abbildung 28:**

Analyse der Promotor-Methylierung und Genexpression im Blut von Patient 4

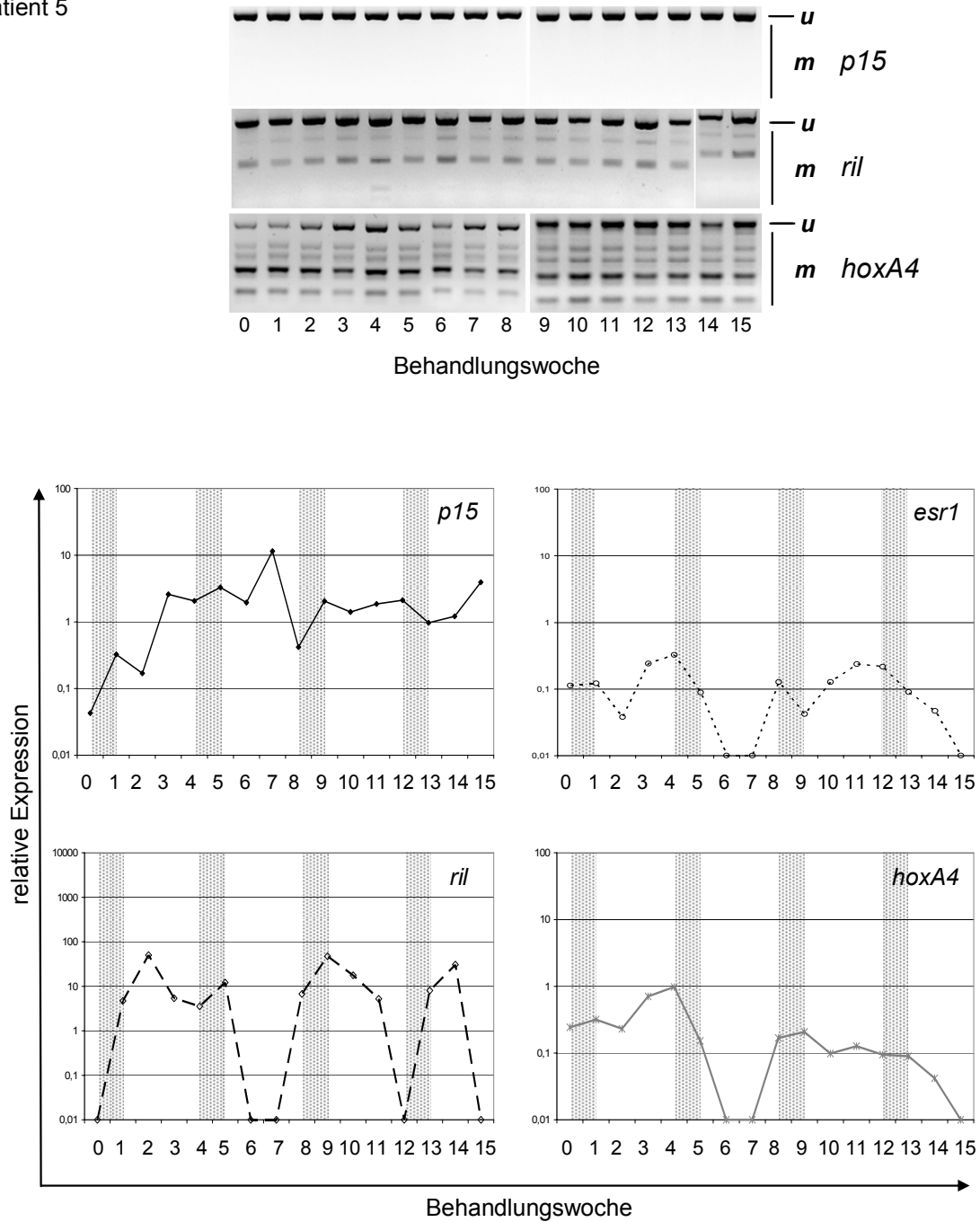
oben: COBRA-Resultate für die Promotor-Sequenzen von *p15*, *ril* und *hoxA4*

(u = Bande des unmethylierten Restriktionsproduktes, m = Bande eines methylierten Restriktionsproduktes)

unten: Expressionsanalyse für die Gene *p15*, *esr1*, *ril* und *hoxA4* (In Woche 8 konnte keine Blutprobe zur Verfügung gestellt werden.)

Die grau unterlegten Bereiche markieren den Zeitraum der Azacytidin-Behandlung.

Patient 5

**Abbildung 29:**

Analyse der Promotor-Methylierung und Genexpression im Blut von Patient 5

oben: COBRA-Resultate für die Promotor-Sequenzen von *p15*, *ril* und *hoxA4*

(u = Bande des unmethylierten Restriktionsproduktes, m = Bande eines methylierten Restriktionsproduktes)

unten: Expressionsanalyse für die Gene *p15*, *esr1*, *ril* und *hoxA4*

Die grau unterlegten Bereiche markieren den Zeitraum der Azacytidin-Behandlung.

Die Promotoren von *ril* und *hoxA4* waren bei Patient 4 schon zu Behandlungsbeginn unmethyliert und wurden deshalb nur im ersten Zyklus analysiert. Die Expressionskurven aller untersuchten Gene wiesen sehr starke Induktionsspitzen auf, die aber nicht direkt mit dem Therapieschema korreliert werden können (Abbildung 28).

Bei Patient 5 wurde bis auf eine leichte Demethylierung von *hoxA4* im ersten Zyklus keine Veränderung der Promotor-Methylierung festgestellt. Diese Demethylierung wird durch eine erhöhte Expression des Gens im gleichen Zeitraum widerspiegelt. Außerdem kommt es auf Expressionsebene zu einer andauernden Induktion von *p15* und zu einer zeitweisen Induktion von *ril*. Die Expression von *esr1* verlief schwankend und auf sehr niedrigem Niveau (Abbildung 29).

Zusammenfassend ergab die Untersuchung der Blutproben eine DNA-Demethylierung bei einem Teil der Patienten. Sowohl der Grad als auch die Dauer der beobachteten Demethylierung war dabei sehr unterschiedlich. Wie schon im Knochenmark beobachtet, zeigte sich, dass es im Verlauf der Behandlung bei den untersuchten Genen auch im Blut zu Expressionsveränderungen kam. Diese konnten teilweise mit Veränderungen der Promotor-Methylierung korreliert werden, größtenteils ließen sie sich jedoch nicht auf diesen Mechanismus zurückführen. Die aus der Analyse der Blutproben gewonnenen Ergebnisse bestätigen und erweitern damit die im Knochenmark beobachteten Effekte.

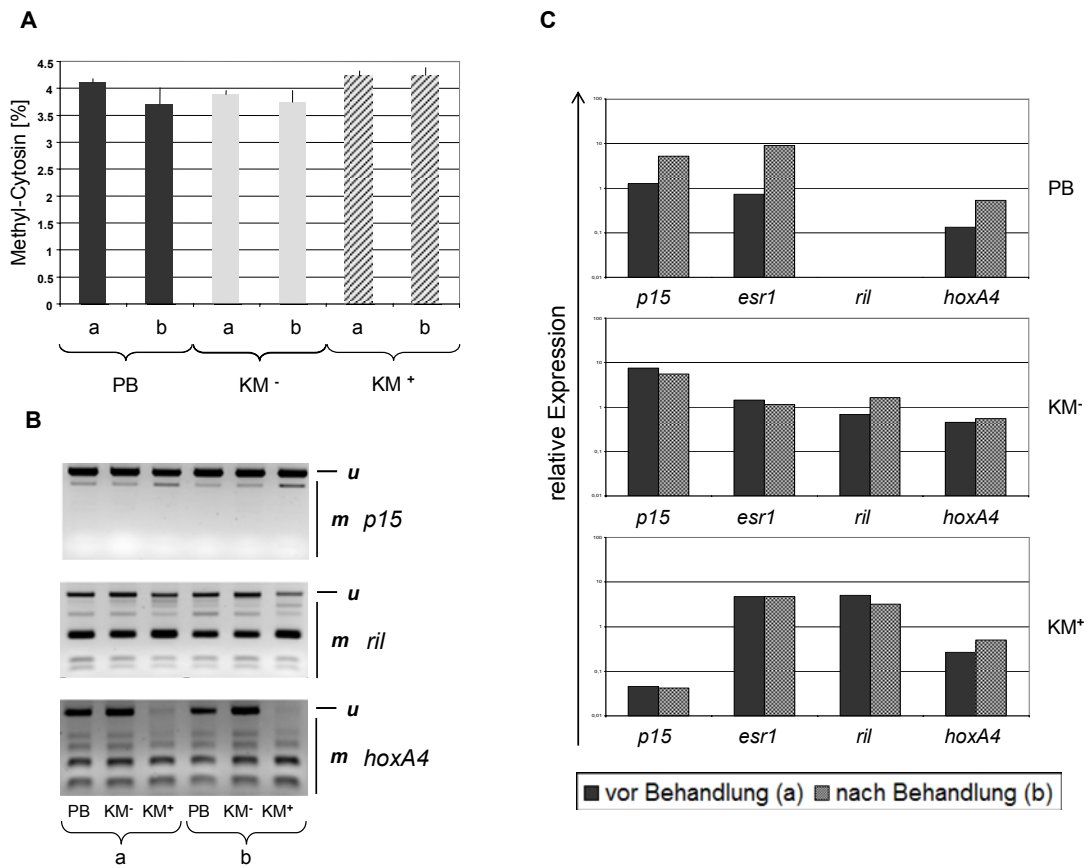
3.11.4. Analyse der Azacytidin-Wirkung auf Blutzellpopulationen mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad

Um den Einfluss der Azacytidin-Therapie auf verschiedene Zellpopulationen zu untersuchen, wurden von Patient 1 vor und nach der ersten Woche des 8. Zyklus Blut- und Knochenmarkproben entnommen. Das Zelloberflächen-Antigen CD34 gilt als Surrogat-Marker für hämatopoetische Vorläuferzellen (Krause et al., 1996). Die aus dem Knochenmark isolierten mononukleären Zellen wurden mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers in undifferenzierte CD34⁺ und ausreifende CD34⁻ Zellen unterteilt und parallel mit den PBMCs analysiert.

Die Untersuchung der Gesamt-Methylierung mittels Kapillarelektrophorese zeigte einen deutlichen Methylierungsrückgang in peripheren Blutzellen, eine schwache Demethylierung in den CD34⁻ Knochenmarkzellen und keine Veränderung in den CD34⁺ Knochenmarkzellen (Abbildung 30A).

Bei der Promotor-spezifischen Methylierung der Gene *p15*, *ril* und *hoxA4* wurden keine Unterschiede zwischen den vor und nach der Azacytidin-Gabe genommenen Proben festgestellt. Auffällig war jedoch, dass alle drei Promotoren in den CD34⁺ Zellen stärker methyliert vorlagen als in den CD34⁻ Zellen und den PBMCs, die etwa die gleiche Methylierung aufwiesen (Abbildung 30B).

Die Expressionsanalyse zeigte eine Induktion der Gene *p15*, *esr1* und *hoxA4* in peripheren Blutzellen. Für *ril* wurde, wie schon in früheren Blutproben des Patienten, keine Expression festgestellt. Im Knochenmark wurden für die untersuchten Gene weder bei den CD34⁺- noch bei den CD34⁻-Zellen signifikante Expressionsveränderungen festgestellt (Abbildung 30C).

**Abbildung 30:**Analysen unterschiedlicher Zellpopulationen des Patienten 1

A Darstellung des Anteils an Methyl-Cytosin bezogen auf den Gesamt-Cytosingehalt

B COBRA-Resultate für die Promotor-Sequenzen von *p15*, *ril* und *hoxA4*

C Expressionsanalyse für die Gene *p15*, *esr1*, *ril* und *hoxA4*

a: Probennahme vor der 8. Azacytidin-Gabe, b: Probennahme nach der 8. Azacytidin-Gabe; PB: Peripherblut, KM⁻: CD34⁻ Knochenmarkzellen, KM⁺: CD34⁺ Knochenmarkzellen; u: unmethyliert, m: methyliert

4. Diskussion

Teil I: Untersuchung der Wirkung des Histon-Deacetylase-Inhibitors Valproinsäure auf CLL-Zellen

4.1. Valproat erhöht die Apoptoserate von CLL-Zellen ex vivo

Mit Hilfe durchflusszytometrischer Messungen konnte gezeigt werden, dass sich die Apoptoserate der mit VPA-behandelten Zellen gegenüber unbehandelten CLL-Zellen signifikant erhöht. Der Anteil apoptotischer Zellen erhöhte sich proportional zu der VPA-Konzentration und der Kultivierungsdauer. Diese Ergebnisse scheinen im Gegensatz zur Publikation von MacFarlane *et al.* (MacFarlane et al., 2005) zu stehen, in der nach 16 h Behandlung und maximal 20 h Kultivierung keine Apoptoseinduktion durch alleinige Behandlung mit VPA festgestellt wurde. Die hier gezeigten Ergebnisse basieren jedoch auf einem längeren Beobachtungszeitraum, während dem erst zu späteren Zeitpunkten eine Erhöhung der Apoptoserate festgestellt werden konnte. Die voneinander abweichenden Beurteilungen ergeben sich somit aus der unterschiedlichen Dauer der Behandlung und Kultivierung.

4.2. Diagnostische Parameter haben nur bedingt Einfluss auf das Ansprechen der CLL-Zellen ex vivo

Die Gruppe der Patienten mit Chronischer Lymphatischer Leukämie, deren Zellen für die Versuche verwendet wurden, war sehr heterogen. Es wurden Patienten mit unterschiedlicher Zytogenetik, mit oder ohne Vortherapie und aus allen Gruppen nach Binet (Binet et al., 1981) bzw. Rai (Rai et al., 1975; Rai and Han, 1990) einbezogen. Für keines dieser Merkmale zeigte sich eine Korrelation mit dem Grad an spontaner Apoptose oder dem Ansprechen auf die VPA-Behandlung. Einzig eine niedrigere Leukozytenzahl beeinflusste die Apoptose-Sensitivität unter den verwendeten Versuchsbedingungen negativ. Durch eine relativ niedrige Anzahl an Leukozyten verringert sich das Verhältnis von CLL-Zellen zu anderen nicht-malignen mononukleären Blutzellen. Nicht-maligne PBMCs reagieren weniger sensitiv auf die Behandlung mit VPA und maskieren somit einen Teil der Wirkung auf die CLL-Zellen. Des

Weiteren ist bekannt, dass die Population der Nicht-B-Zellen antiapoptotische Signale an die CLL-B-Zellen abgeben kann (Gamberale et al., 2001). Somit kann angenommen werden, dass durch diese Zellen das Überleben in Kultur im Allgemeinen und auch die Wirkung von VPA beeinflusst wird.

4.3. PBMCs von gesunden Probanden sind weniger sensitiv gegenüber der Apoptose-Induktion durch VPA

HDAC-Inhibitoren induzieren in zahlreichen malignen Zelltypen Apoptose und Zellzyklusarrest während normale Zellen deutlich weniger sensitiv auf die Behandlung reagieren (Gaymes et al., 2006; Insinga et al., 2005; Marks and Dokmanovic, 2005; Nebbioso et al., 2005).

Valproinsäure (VPA) war ein etablierter therapeutischer Wirkstoff, bevor seine Wirkung als HDAC-Inhibitor entdeckt wurde. VPA wird seit langem bei der Behandlung von Epilepsie und manisch-depressiven Erkrankungen eingesetzt. Auch in der Langzeittherapie ist der Wirkstoff gut verträglich, während der Schwangerschaft ist die Einnahme jedoch aufgrund potentiell teratogener Effekte kontraindiziert (Phiel et al., 2001).

Durch die Untersuchung der Apoptoserate von PBMCs von hämatologisch unauffälligen Probanden konnte bestätigt werden, dass gesunde Zellen weniger sensitiv gegenüber VPA-induzierter Apoptose sind. Unter identischen Kultivierungsbedingungen mit 1 mM VPA behandelt, waren nach 48 h etwa 30 % der CLL-Zellen aber weniger als 20 % der Probanden-PBMCs apoptotisch.

Die untersuchten PBMCs stellen ein Gemisch der unterschiedlichen mononukleären Zellpopulationen im Blut dar. Monozyten und die verschiedenen Lymphozytentypen (T-Zellen, B-Zellen und Natürliche Killerzellen) weisen unterschiedliche physiologische Eigenschaften auf und können deshalb verschieden auf Behandlungen ansprechen. Durch die Analyse zweier Subpopulationen der PBMCs wurde festgestellt, dass $CD3^+$ T-Zellen unempfindlicher gegenüber der VPA-Behandlung reagieren als $CD19^+$ B-Zellen, von denen sich die entarteten CLL-Zellen ableiten. Demnach wurde eine selektive Wirkung des HDAC

Inhibitors auf verschiedene Zelltypen, jedoch nicht ausschließlich auf maligne Zellen, bestätigt.

4.4. Valproat-induzierte Apoptose in CLL-Zellen entsteht durch die Aktivierung des extrinsischen und des intrinsischen Signalwegs

An der Apoptoseinduktion durch HDAC-Inhibitoren in malignen Zellen können verschiedene Mechanismen beteiligt sein. Welche Signalwege involviert sind, ist sowohl von der Entität der Erkrankung abhängig als auch Inhibitor-spezifisch.

Die HDAC-Inhibitoren LAQ824 und TSA induzieren in ALL-Zelllinien den intrinsischen Apoptoseweg (Romanski et al., 2004). Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch für die Wirkung von FK228 auf die Zelllinien HL-60 und K562 beschrieben (Sutheesophon et al., 2006). In U937-Zellen wurde eine proapoptotische Beeinflussung des NFkB-Signalwegs durch SAHA und Butyrat nachgewiesen (Gao et al., 2004). Gaymes et al. (Gaymes et al., 2006) zeigten in verschiedenen leukämischen Zelllinien, dass die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren DNA-Schäden auslöst und in Folge den intrinsischen Apoptoseweg auslöst.

Auch die Aktivierung des extrinsischen Apoptosewegs wurde bei der Behandlung von Zelllinien und Primärzellen akuter Leukämien mit HDAC-Inhibitoren beobachtet (Amin et al., 2001; Bernhard et al., 2001; Nebbioso et al., 2005). Als Ursache wurde die verstärkte Expression von spezifischen Rezeptoren oder regulatorischen Proteinen identifiziert.

Andere Untersuchungen beschreiben sowohl die Beteiligung des extrinsischen als auch des intrinsischen Apoptosewegs (Rahmani et al., 2002; Kwon et al., 2002; Shankar et al., 2005). Bei der Behandlung von U937-Zellen mit der Hydroxaminsäure SAHA wurde die Aktivierung von Caspase 8 und Bid in Kombination mit der Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien beobachtet, was die parallele Induktion beider Signalwege anzeigt (Almenara et al., 2002).

Des Weiteren wurde auch eine von den klassischen Apoptosewegen unabhängige Induktion des Zelltods über die Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) festgestellt (Rosato et al., 2003; Ruefli et al., 2001).

Die Mehrheit der bisherigen Untersuchungen wurde in mitotisch und metabolisch aktiven Zelllinien durchgeführt, die sich damit deutlich von den in dieser Arbeit verwendeten, wenig aktiven CLL-Zellen unterscheiden.

Bisherige Untersuchungen der Wirkung von HDAC-Inhibitoren auf CLL-Zellen kamen zu unterschiedlichen Resultaten. Für Depsipeptid (FR901228 oder FK228) wurde die Induktion des extrinsischen Apoptosewegs beschrieben. Die Apoptoseinduktion war abhängig von der Aktivierung von Caspase 8 und Caspase 3 sowie der Hemmung der cFLIP-Expression (Aron et al., 2003). Diese Beobachtungen ergaben sich auch bei der Behandlung von *ex vivo* kultivierten CLL-Zellen mit MS-275. Zusätzlich wurde jedoch die Beteiligung von Caspase 9 und die Bildung von ROS nachgewiesen (Lucas et al., 2004). Inoue et al. (Inoue et al., 2007) stellten dagegen die Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs durch verschiedene HDAC-Inhibitoren (VPA, MS-275, LBH589, SAHA) fest. Die Induktion erfolgte abhängig von der Steigerung der Expression von Bim und Noxa, die zu den proapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie gehören.

Die Induktion des extrinsischen Apoptosewegs wird in normalen Zellen durch die Bindung von Liganden an die Todesrezeptoren oder durch bestimmte Antikörper erreicht, während CLL-Zellen gegen diese Art der Apoptoseinduktion weitgehend resistent sind (Wang et al., 1997; MacFarlane et al., 2002). Die Sensibilität der CLL-Zellen für TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) kann durch die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren reaktiviert werden (Inoue et al., 2004; Inoue et al., 2006; Lagneaux et al., 2007; MacFarlane et al., 2005).

In dieser Arbeit wurden verschiedene Abschnitte des extrinsischen und des intrinsischen Apoptosewegs untersucht, um die Mechanismen der VPA-vermittelten Apoptoseinduktion in CLL-Zellen weiter aufzuklären. Abbildung 31 gibt einen Überblick über die Zusammenhänge der untersuchten Aspekte.

Western blot-Analysen ergaben, dass in Folge der VPA-Behandlung sowohl Caspase 8 als auch Caspase 9 aktiviert werden. Da Caspase 8 die apikale Caspase des extrinsischen Apoptosewegs und Caspase 9 die apikale Caspase des intrinsischen Apoptosewegs ist, ergab sich daraus die Beteiligung beide Signalwege. Die spezifische Inhibition der Caspasen zeigte, dass die Aktivität von Caspase 8 sowohl für die spontane Apoptoseinduktion *ex vivo* als auch für die VPA-vermittelte Apoptose der CLL-Zellen entscheidend ist. Die Aktivierung von Caspase 9 geschieht dagegen nur in Gegenwart aktiver Caspase 8 und führt zu einer Potenzierung der Apoptosesignals.

Die Verstärkung eines extrinsischen Apoptosesignals durch die zusätzliche Aktivierung des intrinsischen Signalwegs wurde für verschiedene Zelltypen beschrieben (Barnhart et al., 2003; Schmitz et al., 2000). Man kann bei der Umsetzung eines extrinsischen Stimulus zwischen Typ I-Zellen und Typ II-Zellen unterscheiden (Samraj et al., 2006; Scaffidi et al., 1999). Bei Zellen vom Typ I kommt es zu einer effektiven Aktivierung von Caspase 8 und darauf folgend zur Initiierung der Caspasekaskade und Zellauflösung. Typ II-Zellen sind dagegen nicht zu einer effektiven Aktivierung der Effektorcaspasen allein durch Caspase 8 fähig, da in den Zellen entweder zu wenig Caspase 8 gebildet wird oder die Aktivierung ineffektiv verläuft. In diesen Zellen wird die Stärke des Apoptosesignals durch die Einbeziehung des intrinsischen Signalwegs erhöht, um eine ausreichende Aktivierung der Caspasekaskade zu erreichen. Die Verbindung der beiden Signalwege erfolgt über die Aktivierung von Bid durch Caspase 8. Bid initiiert daraufhin die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und in Folge die Aktivierung von Caspase 9 (Bolden et al., 2006; Marks and Dokmanovic, 2005). In Übereinstimmung mit diesem Mechanismus wurde auch in den VPA-behandelten CLL-Zellen die Aktivierung von Bid nachgewiesen. Zusammenfassend wird somit angenommen, dass CLL-Zellen den extrinsischen Apoptoseweg nach dem Modell der Typ II-Zellen realisieren.

Ex vivo kultivierte CLL-Zellen neigen, wie in Abschnitt 3.1. und 3.4. beschrieben, auch ohne spezifische Behandlung zu spontaner Apoptoseinduktion. Dieses Verhalten kann durch die Abhängigkeit der Zellen von Überlebenssignalen erklärt, die sie *in vivo* durch die Interaktion mit anderen Blutzellen, Zellen des Knochenmark oder des Lymphsystems erhalten können und bei der *ex vivo*-Kultivierung fehlen (Pedersen and Reed, 2004). Es ist deshalb vorstellbar, dass VPA keinen Apoptosestimulus erzeugt sondern die Realisierung der Apoptoseinduktion fördert. Dies geschieht offenbar durch die Stärkung oder Reaktivierung der Mechanismen, die zur Aktivierung von Caspase 8 und Caspase 9 führen und einen funktionellen Bestandteil der Entartung der Zellen darstellen.

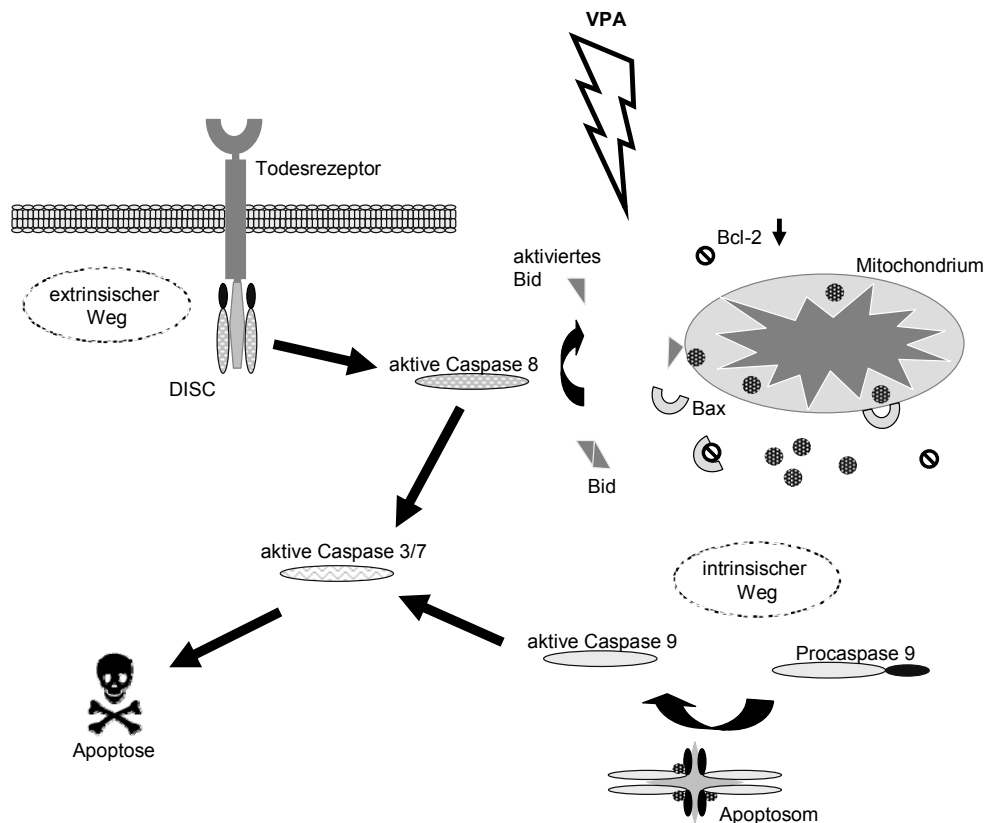


Abbildung 31:
Modell der VPA-vermittelten Apoptoseinduktion in CLL-Zellen

4.5. Valproat senkt das Bcl-2/Bax-Verhältnis der CLL-Zellen

Die Freisetzung von Cytochrom C und anderen mitochondrialen Faktoren zur Induktion des intrinsischen Apoptosewegs wird von den Proteinen der Bcl-2-Familie kontrolliert. Eine starke Expression von *bcl-2* und ein sich daraus ergebender erhöhter Bcl-2/Bax-Quotient, sind charakteristisch für CLL-Zellen (Kolb et al., 2003; Packham and Stevenson, 2005). Das Mengenverhältnis beeinflusst die Therapieresistenz *in vivo* und *in vitro* (Sartorius and Krammer, 2002; Saxena et al., 2004; Thomas et al., 1996). So konnte in einer Studie mit 33 zuvor unbehandelten CLL-Patienten gezeigt werden, dass eine hohe *bcl-2*-Expression mit einer schlechteren Überlebensrate korreliert ist (Robertson et al., 1996).

Die Abnahme der *bcl-2*-Expression bzw. die Zunahme der *bax*-Expression durch HDAC-Inhibitoren wurde für verschiedene Zelltypen beschrieben (Bhalla, 2005). Durch die Reduzierung des Bcl-2/Bax-Quotienten wurden die Apoptoserate und die Sensitivität für Zytostatika gesteigert.

Mit Hilfe von Real time PCR-Analysen wurde in den CLL-Zellen eine Verringerung der *bcl-2*-Expression in Abhängigkeit von VPA festgestellt. Die Hemmung auf der mRNA-Ebene spiegelte sich in einer Abnahme der Proteinmenge wider. Die Expression von *bax* blieb dagegen annähernd konstant, woraus sich ein deutlicher Rückgang des Bcl-2/Bax-Quotienten ergab.

Die Hemmung der *bcl-2*-Expression kann zumindest für einen Teil der Apoptose-fördernden Wirkung von VPA in CLL-Zellen verantwortlich sein, da sie die Induzierbarkeit des intrinsischen Signalwegs und somit die zuvor beschriebene Signalamplifikation des extrinsischen Signalwegs beeinflusst.

Zellen, die anti-apoptotische Proteine der Bcl-2-Familie überexprimieren, zeigen häufig Resistenz gegenüber der Induktion des extrinsischen Apoptosewegs. Bcl-2, Bcl-X_L, Survivin und c-FLIP hemmen die TRAIL- oder FAS-vermittelte Apoptose (Barnhart et al., 2003; Sartorius et al., 2001; Schmitz et al., 2000). Somit könnte durch die vorliegenden Ergebnisse auch die Sensibilisierung der CLL-Zellen für die Apoptoseinduktion mit TRAIL erklärt werden, die von verschiedenen Gruppen durch die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren erreicht wurde (Inoue et al., 2004; Inoue et al., 2006; MacFarlane et al., 2005; Lagneaux et al., 2007). Dieser Mechanismus wurde ebenfalls für die TRAIL-Sensibilisierung von Zelllinien des Multiplen Myeloms durch HDAC-Inhibitoren vermutet (Fandy et al., 2005).

Zusätzlich zur Reaktivierung der Fähigkeit zu Rezeptor-vermittelter Apoptose, ergibt sich durch den Einsatz von HDAC-Inhibitoren eine Möglichkeit, Therapieresistenz zu beeinflussen. Die Wirksamkeit der meisten Zytostatika ist von der Induktion des intrinsischen Apoptosewegs abhängig und könnte durch die Kombination mit HDAC-Inhibitoren positiv beeinflusst werden.

4.6. Schlussfolgerungen aus Teil I

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Histon-Deacetylase-Inhibitor Valproat die Apoptose-Induktion von *ex vivo* kultivierten CLL-Patienten-Zellen verstärkt. Die Wirkung beruhte darauf, dass die Sensitivität der Zellen für die Induktion der Apoptose über die klassischen Signalwege wieder hergestellt wurde. Dies konnte anhand der Aktivierung von Caspase 8 und 9 und des pro-apoptotischen Proteins Bid nachgewiesen werden. Des Weiteren verringerte Valproat die Expression des anti-apoptotischen Gens *bcl-2* auf mRNA- und Protein-Ebene.

Zusammenfassend ergeben sich aus den Ergebnissen dieser Untersuchung neue Erkenntnisse über die Wirkungsweise des HDAC-Inhibitors Valproinsäure in CLL-Zellen. Aufgrund seiner Apoptose-fördernden Wirkung auf CLL-Zellen und seines geringen Toxizitätsprofils könnte Valproinsäure allein oder in Kombination mit anderen Substanzen eine Option für die Therapie von CLL-Patienten darstellen. Um die Übertragbarkeit der vorliegenden präklinischen Daten auf den Patienten festzustellen, sind jedoch weitere Untersuchungen im Rahmen einer klinischen Studie notwendig.

Teil II: Untersuchungen zur Wirkungsweise von Azacytidin bei der Behandlung von Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom

4.7. Azacytidin bewirkt bei einem Teil der MDS-Patienten klinisches und hämatologisches Ansprechen

Unter den zehn behandelten Patienten zeigte sich bei sechs Patienten eine Verbesserung des Gesundheitszustandes bzw. eine Stabilisierung der Erkrankung. Die anderen vier Patienten sprachen nicht auf die Therapie mit Azacytidin an und das Fortschreiten der Erkrankung konnte in diesen Fällen nicht beeinflusst werden. Diese Beobachtungen stehen trotz der geringen Fallzahl und der damit verbundenen geringen statistischen Aussagekraft mit den Ergebnissen größerer Studien im Einklang (Kaminskas et al., 2005; Silverman et al., 2002).

Im Verlauf der Therapie entwickelten die meisten Patienten Zytopenien. Im Besonderen nahm die Anzahl der Leukozyten und Thrombozyten in den ersten zwei Wochen der Behandlungszyklen ab, regenerierte sich aber überwiegend bis zum Beginn des nächsten Zyklus. Zytotoxizität und Myelosuppression sind als Nebenwirkungen der Azacytidin-Gabe bekannt (Kaminskas et al., 2005; Shnider et al., 1976). Gegenüber klassischen Chemotherapeutika und aufgrund der niedrigen Dosierung fallen diese Effekte sehr gering aus. Da der therapeutische Nutzen auch bei älteren und geschwächten Patienten gegenüber den Risiken überwiegt, wird Azacytidin als gut verträgliches Medikament beschrieben (Silverman, 2004).

Bei den untersuchten Patienten zeigen Hoch-Risiko-Patienten tendenziell ein besseres Ansprechen als Niedrig-Risiko-Patienten. Unter den vier behandelten Patienten mit niedrigem Risiko (LR bzw. IM-1 nach IPSS) sprach nur einer auf die Behandlung an. Dies äußerte sich durch einen gesenkten Transfusionsbedarf an Erythrozytenkonzentraten. Dagegen konnten bei drei der sechs Patienten mit erhöhtem Risiko (HR bzw. IM-2 nach IPSS) im Verlauf der Behandlung mit Azacytidin deutliche Verbesserungen der hämatologischen Werte festgestellt werden. Die in der Gruppe der Myelodysplastischen Syndrome zusammengefassten Entitäten sind Stammzellerkrankungen, die durch normo- bis hyperzelluläres Knochenmark und periphere Zytopenien charakterisiert sind (Hofmann et al., 2004). Die Unterscheidung zwischen Hoch- und Niedrig-Risiko-Erkrankungen geschieht aufgrund von diagnostischen

Parametern, wie z.B. dem Vorhandensein von Dysplasien oder Blasten (Greenberg et al., 1997). Unter den CD34⁺ Zellen im Knochenmark von Patienten mit MDS wurde im Vergleich zu gesunden Probanden ein stark erhöhter Anteil apoptotischer Zellen festgestellt. Dieser Anteil war bei Patienten mit refraktärer Anämie (RA) und RA mit Ringsideroblasten (RARS) höher als bei Patienten mit Hoch-Risiko-Erkrankungen, bei denen eine Apoptoseresistenz der malignen Zellen festgestellt werden konnte. Die erhöhte Zellproliferation bei Patienten mit RA und RARS führt nicht zur vollständigen Kompensation der absterbenden Zellen, in fortgeschrittenen MDS-Stadien und bei Patienten mit prognostisch ungünstigen zytogenetischen Befunden bedingt sie dagegen eine Ansammlung von Blasten in Knochenmark und peripherem Blut (Kerbaui and Deeg, 2007; Parker and Mufti, 2000; Parker et al., 2000). Die unterschiedliche Apoptose-Sensitivität könnte eine Erklärung für das unterschiedliche Ansprechen auf die Azacytidin-Behandlung darstellen, wenn man zytotoxische Effekte als therapeutische Wirkung einbezieht, da von einer Erhöhung der Apoptoserate nach diesem Modell nur Hoch-Risiko-Patienten profitieren.

4.8. Azacytidin führt bei einer Subpopulation der MDS-Patienten zu reversibler DNA-Demethylierung

Die therapeutische Wirkung von Azacytidin wird im Allgemeinen auf die Demethylierung Erkrankungs-spezifisch hypermethylierter Promotoren und eine darauf folgende Reaktivierung der Genexpression zurückgeführt (Lubbert, 2000). Die Richtigkeit und Vollständigkeit dieser Annahme bedarf jedoch noch experimenteller Beweise (Gore et al., 2006).

Mit Hilfe einer Kapillarelektrophorese-Technik wurde die Methylierung der aus den einzelnen Proben isolierten Gesamt-DNA analysiert. Für die aus den Blutproben isolierte DNA ergab sich bei drei der fünf untersuchten Patienten eine signifikante DNA-Demethylierung. Die Demethylierung war reversibel und konnte in der Regel nur während der zwei Wochen nach der Behandlung mit Azacytidin festgestellt werden.

Eine deutliche Reduzierung der Gesamt-Methylierung der DNA im Knochenmark konnte nur bei einem Patienten festgestellt werden. Dies ergibt sich daraus, dass bei diesem Patienten die Proben direkt nach der Behandlungswoche gewonnen wurden, so dass die in dieser Woche etablierte Demethylierung detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde bei den

anderen Patienten erst drei Wochen nach der Azacytidin-Gabe Knochenmark entnommen, in dem keine deutliche Demethylierung nachgewiesen werden konnte. Die Untersuchungen der Blutproben legen nahe, dass sich das Methylierungsmuster bei den Patienten in der Zwischenzeit regeneriert hatte.

Patientenübergreifend wurde beobachtet, dass eine Demethylierung nur in relativ kurzen Zeiträumen nach der Verabreichung von Azacytidin auftrat und sich anschließend wieder auf das Ausgangslevel regenerierte. Diese Beobachtung spricht gegen die Induktion genetischer Instabilität, welche nach starker und permanenter DNA-Demethylierung im Maus-Modell festgestellt wurde (Gaudet et al., 2003).

Bei der Gegenüberstellung von nachgewiesener DNA-Demethylierung und dem klinischen Ansprechen der Patienten ergab sich keine Korrelation. So wurde bei den Patienten 1 und 4 Demethylierung und Ansprechen festgestellt, bei den Patienten 2 und 3 jedoch keine signifikante Demethylierung und gutes Ansprechen. Der umgekehrte Fall trat bei Patient 5 ein: Trotz deutlicher Demethylierung wurde keine Verbesserung der hämatologischen Parameter erreicht.

Für die Analyse der Methylierung und Expression erkrankungsspezifischer Gene wurden *p15*, *esr1*, *ril* und *hoxA4* ausgewählt. Im Zusammenhang mit der DNA-Methylierung beim MDS und der AML ist *p15* das am häufigsten untersuchte Gen. Eine Hypermethylierung der Promotoren von *p15* (CDKN2B), *esr1* (Östrogen-Rezeptor 1), *ril* (PDZ and LIM domain protein 4) und *hoxA4* (Homeobox A4) wurde im Zusammenhang mit der Entstehung bzw. einer schlechten Prognose der Erkrankung bei Leukämie-Patienten beschrieben (Aggerholm et al., 2006; Bumber et al., 2007; Strathdee et al., 2006; Tien et al., 2001; Daskalakis et al., 2002).

Die Analyse des *p15*-Promotors ergab keine bzw. bei einem Patienten eine sehr schwache Methylierung, die in Folge der Behandlung unverändert blieb. Dieses Ergebnis entspricht den Untersuchungen von Issa et al. und Kantarjian et al., die gezeigt haben, dass die Methylierung des Promotors von *p15* in malignen hämatopoetischen Zellen selten ist (Kantarjian et al., 2007; Issa, 2004).

Die Promotoren von *ril* und *hoxA4* waren dagegen in allen Patienten teilweise methyliert. Im Verlauf der Behandlung zeigte sich bei einigen Patienten eine reversible Demethylierung. Damit konnte bestätigt werden, dass Azacytidin die Demethylierung von Promotor-Sequenzen bewirken kann, wie es schon für Decitabin gezeigt wurde (Daskalakis et al., 2002; Mund et al., 2005). Da diese Effekte bei *ril* und *hoxA4* nur sehr vereinzelt und schwach auftraten, spiegeln sie nicht die auf genomweiter Ebene festgestellte DNA-Demethylierung wider und scheinen auch als Referenz-Gene für ein klinisches Therapieansprechen ungeeignet zu sein.

4.9. Azacytidin beeinflusst die Gen-Expression sowohl durch die Demethylierung von Promotorsequenzen als auch durch weitere Mechanismen

Sowohl in den Blut- als auch in den Knochenmarkproben kam es im Verlauf der Behandlung zu deutlichen Expressionsveränderungen der untersuchten Gene. Die Änderungen des Expressionslevels konnten teilweise mit Veränderungen der Promotor-Methylierung des Gens korreliert werden, größtenteils ließen sie sich jedoch nicht auf diesen Mechanismus zurückführen.

Diese Beobachtung legt nahe, dass Azacytidin auch über sekundäre oder methylierungsunabhängige Mechanismen Einfluss auf die Genexpression hat. Wie auch für HDAC-Inhibitoren bekannt, treten in Folge der Behandlung mit DNMT-Inhibitoren sowohl Expressionssteigerungen als auch –senkungen unterschiedlicher Gene auf (Gius et al., 2005; Stresemann et al., 2008). Eine mögliche Erklärung für diese Effekte ist eine sekundäre Wirkung über die Demethylierung anderer Promotoren, die z. B. die Expression von Transkriptionsfaktoren reaktiviert.

Des Weiteren kann aber auch eine Veränderung der Regulation aufgrund zytotoxischer Einflüsse oder anderer Eigenschaften von Azacytidin nicht ausgeschlossen werden. So ergaben Untersuchungen über den Mechanismus der Expressionsinduktion fetalen Hämoglobins (HbF) durch Azacytidin, dass weder die Demethylierung des HbF-Promotors noch die Auslösung von Differenzierungsvorgängen ausschlaggebend waren. Als Ursache

wurde eine Beeinflussung der post-transkriptionellen Regulation durch Azacytidin propagiert (Mabaera et al., 2008).

Das Ribonukleosid 5-Azacytidin wird in der Zelle zu 5-Azacytidin-Triphosphat phosphoryliert und kann in neu synthetisierte RNA eingebaut werden kann. 5-Azacytidin-Triphosphat beeinflusst den RNA-Metabolismus und die Proteinsynthese (Cohen and Glazer, 1985; Lu and Randerath, 1979). Die Reduktion zu 5-Aza-2'-Deoxycytidin und anschließende Phosphorylierung erzeugen ein Analog des DNA-Bausteins, das als DNMT-Inhibitor fungiert (Jones and Taylor, 1980; Juttermann et al., 1994).

Karpf et al. konnten zeigen, dass 5-Aza-2'-Deoxycytidin über die Induktion von p53 Apoptose auslöst und vermuteten als Ursache DNA-Schäden, die durch den Einbau von 5-Aza-2'-Deoxycytidin entstehen können (Karpf et al., 2001). Zytotoxische Effekte wurden auch für die Komplexe festgestellt, die aus der irreversiblen Bindung der DNMT-Methyltransferasen an 5-Aza-2'-Deoxycytidin resultieren (Oka et al., 2005).

Somit zeichnet sich für die Wirkung von Azacytidin ein vielschichtiges Zusammenspiel unterschiedlicher Mechanismen ab, über deren Anteile an den erwünschten und unerwünschten Effekten in Patienten bislang keine Ergebnisse vorliegen.

4.10. Schlussfolgerungen aus Teil II

Im Rahmen des zweiten Teils dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Behandlung mit Azacytidin bei MDS-Patienten zu einer reversiblen DNA-Hypomethylierung führte, die sowohl für das gesamte Genom als auch für spezifische Sequenzen nachweisbar war. Das klinische Ansprechen der Patienten schien nicht von der Hypomethylierung abhängig zu sein. Ebenso ergab sich bei den untersuchten Genen nur teilweise eine Korrelation zwischen den Veränderungen der Promotor-Methylierung und der Expression. Somit konnte die Wirksamkeit von Azacytidin für die DNA-Hypomethylierung und die Reaktivierung hypermethylierter Gene bestätigt werden, zur Klärung der Bedeutung dieses Mechanismus für die klinische Anwendung sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

5. Literaturverzeichnis

1. Aggerholm,A., Holm,M.S., Guldberg,P., Olesen,L.H., and Hokland,P. (2006). Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *Eur. J. Haematol.* *76*, 23-32.
2. Almenara,J., Rosato,R., and Grant,S. (2002). Synergistic induction of mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells by flavopiridol and the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *Leukemia* *16*, 1331-1343.
3. Amann,J.M., Nip,J., Strom,D.K., Lutterbach,B., Harada,H., Lenny,N., Downing,J.R., Meyers,S., and Hiebert,S.W. (2001). ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds mSin3A through its oligomerization domain. *Mol. Cell Biol.* *21*, 6470-6483.
4. Amin,H.M., Saeed,S., and Alkan,S. (2001). Histone deacetylase inhibitors induce caspase-dependent apoptosis and downregulation of daxx in acute promyelocytic leukaemia with t(15;17). *Br. J. Haematol.* *115*, 287-297.
5. Aron,J.L., Parthun,M.R., Marcucci,G., Kitada,S., Mone,A.P., Davis,M.E., Shen,T., Murphy,T., Wickham,J., Kanakry,C., Lucas,D.M., Reed,J.C., Grever,M.R., and Byrd,J.C. (2003). Depsipeptide (FR901228) induces histone acetylation and inhibition of histone deacetylase in chronic lymphocytic leukemia cells concurrent with activation of caspase 8-mediated apoptosis and down-regulation of c-FLIP protein. *Blood* *102*, 652-658.
6. Barnhart,B.C., Alappat,E.C., and Peter,M.E. (2003). The CD95 type I/type II model. *Semin. Immunol.* *15*, 185-193.
7. Barragan,M., Bellosillo,B., Campas,C., Colomer,D., Pons,G., and Gil,J. (2002). Involvement of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in the survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* *99*, 2969-2976.
8. Bernhard,D., Skvortsov,S., Tinhofer,I., Hubl,H., Greil,R., Csordas,A., and Kofler,R. (2001). Inhibition of histone deacetylase activity enhances Fas receptor-mediated apoptosis in leukemic lymphoblasts. *Cell Death. Differ.* *8*, 1014-1021.
9. Bhalla,K.N. (2005). Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies. *J. Clin. Oncol.* *23*, 3971-3993.
10. Binet,J.L., Auquier,A., Dighiero,G., Chastang,C., Piguët,H., Goasguen,J., Vaugier,G., Potron,G., Colona,P., Oberling,F., Thomas,M., Tchernia,G., Jacquillat,C., Boivin,P., Lesty,C., Duault,M.T., Monconduit,M., Belabbes,S., and Gremy,F. (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* *48*, 198-206.

11. Bodmer, J.L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo, P., Blenis, J., and Tschopp, J. (2000). TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat. Cell Biol.* 2, 241-243.
12. Bokelmann, I. and Mahlknecht, U. (2007). Valproic Acid Sensitizes Chronic Lymphocytic Leukemia Cells to Apoptosis and Restores the Balance Between Pro- and Antiapoptotic Proteins. *Mol. Med.*
13. Bolden, J.E., Peart, M.J., and Johnstone, R.W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 769-784.
14. Bumber, Y.A., Kondo, Y., Chen, X., Shen, L., Gharibyan, V., Konishi, K., Estey, E., Kantarjian, H., Garcia-Manero, G., and Issa, J.P. (2007). RIL, a LIM gene on 5q31, is silenced by methylation in cancer and sensitizes cancer cells to apoptosis. *Cancer Res.* 67, 1997-2005.
15. Brueckner, B., Boy, R.G., Siedlecki, P., Musch, T., Kliem, H.C., Zielenkiewicz, P., Suhai, S., Wiessler, M., and Lyko, F. (2005). Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. *Cancer Res.* 65, 6305-6311.
16. Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., and Croce, C.M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 15524-15529.
17. Casadevall, N., Durieux, P., Dubois, S., Hemery, F., Lepage, E., Quarre, M.C., Damaj, G., Giraudier, S., Guerci, A., Laurent, G., Dombret, H., Chomienne, C., Ribrag, V., Stamatoullas, A., Marie, J.P., Vekhoff, A., Maloisel, F., Navarro, R., Dreyfus, F., and Fenaux, P. (2004). Health, economic, and quality-of-life effects of erythropoietin and granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of myelodysplastic syndromes: a randomized, controlled trial. *Blood* 104, 321-327.
18. Chan, A.T., Tao, Q., Robertson, K.D., Flinn, I.W., Mann, R.B., Klencke, B., Kwan, W.H., Leung, T.W., Johnson, P.J., and Ambinder, R.F. (2004). Azacitidine induces demethylation of the Epstein-Barr virus genome in tumors. *J. Clin. Oncol.* 22, 1373-1381.
19. Chanan-Khan, A. and Porter, C.W. (2006). Immunomodulating drugs for chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet Oncol.* 7, 480-488.
20. Chang, H.Y. and Yang, X. (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 821-846.
21. Chen, L., Widhopf, G., Huynh, L., Rassenti, L., Rai, K.R., Weiss, A., and Kipps, T.J. (2002). Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100, 4609-4614.
22. Cheng, J.C., Matsen, C.B., Gonzales, F.A., Ye, W., Greer, S., Marquez, V.E., Jones, P.A., and Selker, E.U. (2003). Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 399-409.

23. Cheson,B.D., Bennett,J.M., Kantarjian,H., Pinto,A., Schiffer,C.A., Nimer,S.D., Lowenberg,B., Beran,M., de Witte,T.M., Stone,R.M., Mittelman,M., Sanz,G.F., Wijermans,P.W., Gore,S., and Greenberg,P.L. (2000). Report of an international working group to standardize response criteria for myelodysplastic syndromes. *Blood* 96, 3671-3674.
24. Chiorazzi,N. and Ferrarini,M. (2006). Evolving view of the in-vivo kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 273-8, 512.
25. Christman,J.K., Mendelsohn,N., Herzog,D., and Schneiderman,N. (1983). Effect of 5-azacytidine on differentiation and DNA methylation in human promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Cancer Res.* 43, 763-769.
26. Chuang,L.S., Ian,H.I., Koh,T.W., Ng,H.H., Xu,G., and Li,B.F. (1997). Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* 277, 1996-2000.
27. Cihak,A. (1974). Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes. *Oncology* 30, 405-422.
28. Cihak,A., Weiss,J.W., and Pitot,H.C. (1974). Characterization of polyribosomes and maturation of ribosomal RNA in hepatoma cells treated with 5-azacytidine. *Cancer Res.* 34, 3003-3009.
29. Cimmino,A., Calin,G.A., Fabbri,M., Iorio,M.V., Ferracin,M., Shimizu,M., Wojcik,S.E., Aqeilan,R.I., Zupo,S., Dono,M., Rassenti,L., Alder,H., Volinia,S., Liu,C.G., Kipps,T.J., Negrini,M., and Croce,C.M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 13944-13949.
30. Claus,R. and Lubbert,M. (2003). Epigenetic targets in hematopoietic malignancies. *Oncogene* 22, 6489-6496.
31. Cohen,M.B. and Glazer,R.I. (1985). Cytotoxicity and the inhibition of ribosomal RNA processing in human colon carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* 27, 308-313.
32. Coultas,L. and Strasser,A. (2003). The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 13, 115-123.
33. Crane,E. and List,A. (2005). Lenalidomide: an immunomodulatory drug. *Future. Oncol.* 1, 575-583.
34. Creusot,F., Acs,G., and Christman,J.K. (1982). Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *J. Biol. Chem.* 257, 2041-2048.
35. Cryns,V. and Yuan,J. (1998). Proteases to die for. *Genes Dev.* 12, 1551-1570.
36. Damle,R.N., Wasil,T., Fais,F., Ghiotto,F., Valetto,A., Allen,S.L., Buchbinder,A., Budman,D., Dittmar,K., Kolitz,J., Lichtman,S.M., Schulman,P., Vinciguerra,V.P., Rai,K.R., Ferrarini,M., and Chiorazzi,N. (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94, 1840-1847.

37. Daskalakis,M., Nguyen,T.T., Nguyen,C., Guldborg,P., Kohler,G., Wijermans,P., Jones,P.A., and Lubbert,M. (2002). Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood* *100*, 2957-2964.
38. Davie,J.R. (1998). Covalent modifications of histones: expression from chromatin templates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *8*, 173-178.
39. Dohner,H., Stilgenbauer,S., Benner,A., Leupolt,E., Krober,A., Bullinger,L., Dohner,K., Bentz,M., and Lichter,P. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* *343*, 1910-1916.
40. Dreger,P., Corradini,P., Kimby,E., Michallet,M., Milligan,D., Schetelig,J., Wiktor-Jedrzejczak,W., Niederwieser,D., Hallek,M., and Montserrat,E. (2007). Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia* *21*, 12-17.
41. Eden,A., Gaudet,F., Waghmare,A., and Jaenisch,R. (2003). Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* *300*, 455.
42. Esteller,M. (2006). The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis* *27*, 1121-1125.
43. Esteller,M. and Herman,J.G. (2002). Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J. Pathol.* *196*, 1-7.
44. Fandy,T.E., Shankar,S., Ross,D.D., Sausville,E., and Srivastava,R.K. (2005). Interactive effects of HDAC inhibitors and TRAIL on apoptosis are associated with changes in mitochondrial functions and expressions of cell cycle regulatory genes in multiple myeloma. *Neoplasia*. *7*, 646-657.
45. Fang,M.Z., Wang,Y., Ai,N., Hou,Z., Sun,Y., Lu,H., Welsh,W., and Yang,C.S. (2003). Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res.* *63*, 7563-7570.
46. Ferrara,F.F., Fazi,F., Bianchini,A., Padula,F., Gelmetti,V., Minucci,S., Mancini,M., Pelicci,P.G., Lo,C.F., and Nervi,C. (2001). Histone deacetylase-targeted treatment restores retinoic acid signaling and differentiation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* *61*, 2-7.
47. Furman,R.R., Asgary,Z., Mascarenhas,J.O., Liou,H.C., and Schattner,E.J. (2000). Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J. Immunol.* *164*, 2200-2206.
48. Galm,O., Herman,J.G., and Baylin,S.B. (2006). The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Rev.* *20*, 1-13.
49. Gambari,R., del,S.L., Barbieri,R., Viola,L., Tripodi,M., Raschella,G., and Fantoni,A. (1984). Human leukemia K-562 cells: induction of erythroid differentiation by 5-azacytidine. *Cell Differ.* *14*, 87-97.

50. Gamberale,R., Geffner,J., Arrosagaray,G., Scolnik,M., Salamone,G., Trevani,A., Vermeulen,M., and Giordano,M. (2001). Non-malignant leukocytes delay spontaneous B-CLL cell apoptosis. *Leukemia* 15, 1860-1867.
51. Ganser,A. and Hoelzer,D. (1992). Clinical course of myelodysplastic syndromes. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 6, 607-618.
52. Gao,N., Dai,Y., Rahmani,M., Dent,P., and Grant,S. (2004). Contribution of disruption of the nuclear factor-kappaB pathway to induction of apoptosis in human leukemia cells by histone deacetylase inhibitors and flavopiridol. *Mol. Pharmacol.* 66, 956-963.
53. Gaudet,F., Hodgson,J.G., Eden,A., Jackson-Grusby,L., Dausman,J., Gray,J.W., Leonhardt,H., and Jaenisch,R. (2003). Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 300, 489-492.
54. Gaymes,T.J., Padua,R.A., Pla,M., Orr,S., Omidvar,N., Chomienne,C., Mufti,G.J., and Rassool,F.V. (2006). Histone deacetylase inhibitors (HDI) cause DNA damage in leukemia cells: a mechanism for leukemia-specific HDI-dependent apoptosis? *Mol. Cancer Res.* 4, 563-573.
55. Gius,D., Bradbury,C.M., Sun,L., Awwad,R.T., Huang,L., Smart,D.D., Bisht,K.S., Ho,A.S., and Nguyen,P. (2005). The epigenome as a molecular marker and target. *Cancer* 104, 1789-1793.
56. Gore,S.D., Baylin,S., Sugar,E., Carraway,H., Miller,C.B., Carducci,M., Grever,M., Galm,O., Dausen,T., Karp,J.E., Rudek,M.A., Zhao,M., Smith,B.D., Manning,J., Jiemjit,A., Dover,G., Mays,A., Zwiebel,J., Murgu,A., Weng,L.J., and Herman,J.G. (2006). Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer Res.* 66, 6361-6369.
57. Gray,S.G. and Ekstrom,T.J. (2001). The human histone deacetylase family. *Exp. Cell Res.* 262, 75-83.
58. Greenberg,P., Cox,C., LeBeau,M.M., Fenaux,P., Morel,P., Sanz,G., Sanz,M., Vallespi,T., Hamblin,T., Oscier,D., Ohyashiki,K., Toyama,K., Aul,C., Mufti,G., and Bennett,J. (1997). International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89, 2079-2088.
59. Gregory,P.D., Wagner,K., and Horz,W. (2001). Histone acetylation and chromatin remodeling. *Exp. Cell Res.* 265, 195-202.
60. Grignani,F., Valtieri,M., Gabbianelli,M., Gelmetti,V., Botta,R., Luchetti,L., Masella,B., Morsilli,O., Pelosi,E., Samoggia,P., Pelicci,P.G., and Peschle,C. (2000). PML/RAR alpha fusion protein expression in normal human hematopoietic progenitors dictates myeloid commitment and the promyelocytic phenotype. *Blood* 96, 1531-1537.
61. Grozinger,C.M., Hassig,C.A., and Schreiber,S.L. (1999). Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 4868-4873.

62. Gui,C.Y., Ngo,L., Xu,W.S., Richon,V.M., and Marks,P.A. (2004). Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21 WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 1241-1246.
63. Haferlach,T. and Schoch,C. (2002). [WHO classification of acute myeloid leukaemia (AML) and the myelodysplastic syndrome (MDS)]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* *127*, 447-450.
64. Hamblin,T.J., Davis,Z., Gardiner,A., Oscier,D.G., and Stevenson,F.K. (1999). Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *94*, 1848-1854.
65. He,L.Z., Tolentino,T., Grayson,P., Zhong,S., Warrell,R.P., Jr., Rifkind,R.A., Marks,P.A., Richon,V.M., and Pandolfi,P.P. (2001). Histone deacetylase inhibitors induce remission in transgenic models of therapy-resistant acute promyelocytic leukemia. *J. Clin. Invest* *108*, 1321-1330.
66. Hellstrom-Lindberg,E. (1995). Efficacy of erythropoietin in the myelodysplastic syndromes: a meta-analysis of 205 patients from 17 studies. *Br. J. Haematol.* *89*, 67-71.
67. Herman,J.G. and Baylin,S.B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* *349*, 2042-2054.
68. Hofmann,W.K., Lubbert,M., Hoelzer,D., and Phillip,K.H. (2004). Myelodysplastic syndromes. *Hematol. J.* *5*, 1-8.
69. Hynes,R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673-687.
70. Imai,S., Armstrong,C.M., Kaerberlein,M., and Guarente,L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* *403*, 795-800.
71. Inoue,S., MacFarlane,M., Harper,N., Wheat,L.M., Dyer,M.J., and Cohen,G.M. (2004). Histone deacetylase inhibitors potentiate TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in lymphoid malignancies. *Cell Death. Differ.* *11 Suppl 2*, S193-S206.
72. Inoue,S., Mai,A., Dyer,M.J., and Cohen,G.M. (2006). Inhibition of histone deacetylase class I but not class II is critical for the sensitization of leukemic cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res.* *66*, 6785-6792.
73. Inoue,S., Riley,J., Gant,T.W., Dyer,M.J., and Cohen,G.M. (2007). Apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors in leukemic cells is mediated by Bim and Noxa. *Leukemia* *21*, 1773-1782.
74. Insinga,A., Monestiroli,S., Ronzoni,S., Gelmetti,V., Marchesi,F., Viale,A., Altucci,L., Nervi,C., Minucci,S., and Pelicci,P.G. (2005). Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat. Med.* *11*, 71-76.

75. Issa,J.P. (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 988-993.
76. Issa,J.P., Garcia-Manero,G., Giles,F.J., Mannari,R., Thomas,D., Faderl,S., Bayar,E., Lyons,J., Rosenfeld,C.S., Cortes,J., and Kantarjian,H.M. (2004). Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* 103, 1635-1640.
77. Issa,J.P., Gharibyan,V., Cortes,J., Jelinek,J., Morris,G., Verstovsek,S., Talpaz,M., Garcia-Manero,G., and Kantarjian,H.M. (2005). Phase II study of low-dose decitabine in patients with chronic myelogenous leukemia resistant to imatinib mesylate. *J. Clin. Oncol.* 23, 3948-3956.
78. Jansen,M.S., Nagel,S.C., Miranda,P.J., Lobenhofer,E.K., Afshari,C.A., and McDonnell,D.P. (2004). Short-chain fatty acids enhance nuclear receptor activity through mitogen-activated protein kinase activation and histone deacetylase inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 7199-7204.
79. Jenuwein,T. and Allis,C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
80. Jewell,A.P. (2002). Role of apoptosis in the pathogenesis of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Biomed. Sci.* 59, 235-238.
81. Johnstone,R.W. and Licht,J.D. (2003). Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target? *Cancer Cell* 4, 13-18.
82. Jones,P.A. and Taylor,S.M. (1980). Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 20, 85-93.
83. Juttermann,R., Li,E., and Jaenisch,R. (1994). Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 11797-11801.
84. Kaminskas,E., Farrell,A., Abraham,S., Baird,A., Hsieh,L.S., Lee,S.L., Leighton,J.K., Patel,H., Rahman,A., Sridhara,R., Wang,Y.C., and Pazdur,R. (2005). Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin. Cancer Res.* 11, 3604-3608.
85. Kantarjian,H., Oki,Y., Garcia-Manero,G., Huang,X., O'Brien,S., Cortes,J., Faderl,S., Bueso-Ramos,C., Ravandi,F., Estrov,Z., Ferrajoli,A., Wierda,W., Shan,J., Davis,J., Giles,F., Saba,H.I., and Issa,J.P. (2007). Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 109, 52-57.
86. Karpf,A.R., Moore,B.C., Ririe,T.O., and Jones,D.A. (2001). Activation of the p53 DNA damage response pathway after inhibition of DNA methyltransferase by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Mol. Pharmacol.* 59, 751-757.
87. Kerbauy,D.B. and Deeg,H.J. (2007). Apoptosis and antiapoptotic mechanisms in the progression of myelodysplastic syndrome. *Exp. Hematol.* 35, 1739-1746.

88. Kischkel,F.C., Lawrence,D.A., Chuntharapai,A., Schow,P., Kim,K.J., and Ashkenazi,A. (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*. *12*, 611-620.
89. Klose,R.J. and Bird,A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 89-97.
90. Kolb,J.P., Kern,C., Quiney,C., Roman,V., and Billard,C. (2003). Re-establishment of a normal apoptotic process as a therapeutic approach in B-CLL. *Curr. Drug Targets. Cardiovasc. Haematol. Disord.* *3*, 261-286.
91. Kornberg,R.D. and Lorch,Y. (1999). Chromatin-modifying and -remodeling complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *9*, 148-151.
92. Krause,D.S., Fackler,M.J., Civin,C.I., and May,W.S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* *87*, 1-13.
93. Krober,A., Seiler,T., Benner,A., Bullinger,L., Bruckle,E., Lichter,P., Dohner,H., and Stilgenbauer,S. (2002). V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *100*, 1410-1416.
94. Kuo,M.H. and Allis,C.D. (1998). Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* *20*, 615-626.
95. Kwon,S.H., Ahn,S.H., Kim,Y.K., Bae,G.U., Yoon,J.W., Hong,S., Lee,H.Y., Lee,Y.W., Lee,H.W., and Han,J.W. (2002). Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis and Fas/Fas ligand expression in human acute promyelocytic leukemia cells. *J. Biol. Chem.* *277*, 2073-2080.
96. Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
97. Lagneaux,L., Gillet,N., Stamatopoulos,B., Delforge,A., Dejeneffe,M., Massy,M., Meuleman,N., Kentos,A., Martiat,P., Willems,L., and Bron,D. (2007). Valproic acid induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells through activation of the death receptor pathway and potentiates TRAIL response. *Exp. Hematol.* *35*, 1527-1537.
98. Li,L.H., Olin,E.J., Buskirk,H.H., and Reineke,L.M. (1970a). Cytotoxicity and mode of action of 5-azacytidine on L1210 leukemia. *Cancer Res.* *30*, 2760-2769.
99. Li,L.H., Olin,E.J., Fraser,T.J., and Bhuyan,B.K. (1970b). Phase specificity of 5-azacytidine against mammalian cells in tissue culture. *Cancer Res.* *30*, 2770-2775.
100. Li,P., Nijhawan,D., Budihardjo,I., Srinivasula,S.M., Ahmad,M., Alnemri,E.S., and Wang,X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* *91*, 479-489.
101. li-Youcef,N., Lagouge,M., Froelich,S., Koehl,C., Schoonjans,K., and Auwerx,J. (2007). Sirtuins: the 'magnificent seven', function, metabolism and longevity. *Ann. Med.* *39*, 335-345.

102. Lin,K., Sherrington,P.D., Dennis,M., Matrai,Z., Cawley,J.C., and Pettitt,A.R. (2002). Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV(H) mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *100*, 1404-1409.
103. Liu,S., Klisovic,R.B., Vukosavljevic,T., Yu,J., Paschka,P., Huynh,L., Pang,J., Neviani,P., Liu,Z., Blum,W., Chan,K.K., Perrotti,D., and Marcucci,G. (2007). Targeting AML1/ETO-histone deacetylase repressor complex: a novel mechanism for valproic acid-mediated gene expression and cellular differentiation in AML1/ETO-positive acute myeloid leukemia cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *321*, 953-960.
104. Lu,D., Zhao,Y., Tawatao,R., Cottam,H.B., Sen,M., Leoni,L.M., Kipps,T.J., Corr,M., and Carson,D.A. (2004a). Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 3118-3123.
105. Lu,L.J. and Randerath,K. (1979). Effects of 5-azacytidine on transfer RNA methyltransferases. *Cancer Res.* *39*, 940-949.
106. Lu,Q., Yang,Y.T., Chen,C.S., Davis,M., Byrd,J.C., Etherton,M.R., Umar,A., and Chen,C.S. (2004b). Zn²⁺-chelating motif-tethered short-chain fatty acids as a novel class of histone deacetylase inhibitors. *J. Med. Chem.* *47*, 467-474.
107. Lubbert,M. (2000). DNA methylation inhibitors in the treatment of leukemias, myelodysplastic syndromes and hemoglobinopathies: clinical results and possible mechanisms of action. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *249*, 135-164.
108. Lucas,D.M., Davis,M.E., Parthun,M.R., Mone,A.P., Kitada,S., Cunningham,K.D., Flax,E.L., Wickham,J., Reed,J.C., Byrd,J.C., and Grever,M.R. (2004). The histone deacetylase inhibitor MS-275 induces caspase-dependent apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* *18*, 1207-1214.
109. Mabaera,R., Greene,M.R., Richardson,C.A., Conine,S.J., Kozul,C.D., and Lowrey,C.H. (2008). Neither DNA hypomethylation nor changes in the kinetics of erythroid differentiation explain 5-azacytidine's ability to induce human fetal hemoglobin. *Blood* *111*, 411-420.
110. MacFarlane,M., Harper,N., Snowden,R.T., Dyer,M.J., Barnett,G.A., Pringle,J.H., and Cohen,G.M. (2002). Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in primary B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Oncogene* *21*, 6809-6818.
111. MacFarlane,M., Inoue,S., Kohlhaas,S.L., Majid,A., Harper,N., Kennedy,D.B., Dyer,M.J., and Cohen,G.M. (2005). Chronic lymphocytic leukemic cells exhibit apoptotic signaling via TRAIL-R1. *Cell Death. Differ.* *12*, 773-782.
112. Mak,T.W. and Yeh,W.C. (2002). Signaling for survival and apoptosis in the immune system. *Arthritis Res.* *4 Suppl 3*, S243-S252.
113. Malcovati,L., Porta,M.G., Pascutto,C., Invernizzi,R., Boni,M., Travaglino,E., Passamonti,F., Arcaini,L., Maffioli,M., Bernasconi,P., Lazzarino,M., and Cazzola,M. (2005). Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J. Clin. Oncol.* *23*, 7594-7603.

114. Marks,P.A. and Dokmanovic,M. (2005). Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents. *Expert. Opin. Investig. Drugs* *14*, 1497-1511.
115. Marks,P.A., Richon,V.M., Miller,T., and Kelly,W.K. (2004). Histone deacetylase inhibitors. *Adv. Cancer Res.* *91*, 137-168.
116. Miller,T.A., Witter,D.J., and Belvedere,S. (2003). Histone deacetylase inhibitors. *J. Med. Chem.* *46*, 5097-5116.
117. Mund,C., Hackanson,B., Stresemann,C., Lubbert,M., and Lyko,F. (2005). Characterization of DNA demethylation effects induced by 5-Aza-2'-deoxycytidine in patients with myelodysplastic syndrome. *Cancer Res.* *65*, 7086-7090.
118. Muzio,M., Chinnaiyan,A.M., Kischkel,F.C., O'Rourke,K., Shevchenko,A., Ni,J., Scaffidi,C., Bretz,J.D., Zhang,M., Gentz,R., Mann,M., Krammer,P.H., Peter,M.E., and Dixit,V.M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* *85*, 817-827.
119. Nakata,S., Yoshida,T., Horinaka,M., Shiraishi,T., Wakada,M., and Sakai,T. (2004). Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis induced by TRAIL/APO2-L in human malignant tumor cells. *Oncogene* *23*, 6261-6271.
120. Nebbioso,A., Clarke,N., Voltz,E., Germain,E., Ambrosino,C., Bontempo,P., Alvarez,R., Schiavone,E.M., Ferrara,F., Bresciani,F., Weisz,A., de Lera,A.R., Gronemeyer,H., and Altucci,L. (2005). Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat. Med.* *11*, 77-84.
121. Negrin,R.S., Stein,R., Doherty,K., Cornwell,J., Vardiman,J., Krantz,S., and Greenberg,P.L. (1996). Maintenance treatment of the anemia of myelodysplastic syndromes with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin: evidence for in vivo synergy. *Blood* *87*, 4076-4081.
122. Oka,M., Meacham,A.M., Hamazaki,T., Rodic,N., Chang,L.J., and Terada,N. (2005). De novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b primarily mediate the cytotoxic effect of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Oncogene* *24*, 3091-3099.
123. Okano,M., Bell,D.W., Haber,D.A., and Li,E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* *99*, 247-257.
124. Packham,G. and Stevenson,F.K. (2005). Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology* *114*, 441-449.
125. Parker,J.E. and Mufti,G.J. (2000). Excessive apoptosis in low risk myelodysplastic syndromes (MDS). *Leuk. Lymphoma* *40*, 1-24.
126. Parker,J.E., Mufti,G.J., Rasool,F., Mijovic,A., Devereux,S., and Pagliuca,A. (2000). The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood* *96*, 3932-3938.

127. Passegue,E., Jamieson,C.H., Ailles,L.E., and Weissman,I.L. (2003). Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100 Suppl 1*, 11842-11849.
128. Pedersen, I. M. and Reed, J. *Microenvironmental Interactions and Survival of CLL B-cells. Volume 45,Number 12*[8], 2365-2372. 2004. **Leukemia and Lymphoma**, Taylor and Francis Ltd.
Ref Type: Generic
129. Pepper,C., Hoy,T., and Bentley,D.P. (1997). Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance. *Br. J. Cancer* *76*, 935-938.
130. Phiel,C.J., Zhang,F., Huang,E.Y., Guenther,M.G., Lazar,M.A., and Klein,P.S. (2001). Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J. Biol. Chem.* *276*, 36734-36741.
131. Rahmani,M., Dai,Y., and Grant,S. (2002). The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate interacts synergistically with phorbol myristate acetate (PMA) to induce mitochondrial damage and apoptosis in human myeloid leukemia cells through a tumor necrosis factor-alpha-mediated process. *Exp. Cell Res.* *277*, 31-47.
132. Rai,K.R. and Han,T. (1990). Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* *4*, 447-456.
133. Rai,K.R., Sawitsky,A., Cronkite,E.P., Chanana,A.D., Levy,R.N., and Pasternack,B.S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *46*, 219-234.
134. Reik,W. (2007). Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* *447*, 425-432.
135. Rhee,I., Bachman,K.E., Park,B.H., Jair,K.W., Yen,R.W., Schuebel,K.E., Cui,H., Feinberg,A.P., Lengauer,C., Kinzler,K.W., Baylin,S.B., and Vogelstein,B. (2002). DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* *416*, 552-556.
136. Rhee,I., Jair,K.W., Yen,R.W., Lengauer,C., Herman,J.G., Kinzler,K.W., Vogelstein,B., Baylin,S.B., and Schuebel,K.E. (2000). CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* *404*, 1003-1007.
137. Richon,V.M., Sandhoff,T.W., Rifkind,R.A., and Marks,P.A. (2000). Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 10014-10019.
138. Ringshausen,I., Schneller,F., Bogner,C., Hipp,S., Duyster,J., Peschel,C., and Decker,T. (2002). Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta. *Blood* *100*, 3741-3748.
139. Robertson,L.E., Plunkett,W., McConnell,K., Keating,M.J., and McDonnell,T.J. (1996). Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia* *10*, 456-459.

140. Romanski,A., Bacic,B., Bug,G., Pfeifer,H., Gul,H., Remiszewski,S., Hoelzer,D., Atadja,P., Ruthardt,M., and Ottmann,O.G. (2004). Use of a novel histone deacetylase inhibitor to induce apoptosis in cell lines of acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 89, 419-426.
141. Rosato,R.R., Almenara,J.A., and Grant,S. (2003). The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1 1. *Cancer Res.* 63, 3637-3645.
142. Rosato,R.R., Maggio,S.C., Almenara,J.A., Payne,S.G., Atadja,P., Spiegel,S., Dent,P., and Grant,S. (2006). The histone deacetylase inhibitor LAQ824 induces human leukemia cell death through a process involving XIAP down-regulation, oxidative injury, and the acid sphingomyelinase-dependent generation of ceramide. *Mol. Pharmacol.* 69, 216-225.
143. Roth,S.Y., Denu,J.M., and Allis,C.D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 81-120.
144. Ruefli,A.A., Ausserlechner,M.J., Bernhard,D., Sutton,V.R., Tainton,K.M., Kofler,R., Smyth,M.J., and Johnstone,R.W. (2001). The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 10833-10838.
145. Saleh,A., Srinivasula,S.M., Acharya,S., Fishel,R., and Alnemri,E.S. (1999). Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J. Biol. Chem.* 274, 17941-17945.
146. Samlowski,W.E., Leachman,S.A., Wade,M., Cassidy,P., Porter-Gill,P., Busby,L., Wheeler,R., Boucher,K., Fitzpatrick,F., Jones,D.A., and Karpf,A.R. (2005). Evaluation of a 7-day continuous intravenous infusion of decitabine: inhibition of promoter-specific and global genomic DNA methylation. *J. Clin. Oncol.* 23, 3897-3905.
147. Samraj,A.K., Keil,E., Ueffing,N., Schulze-Osthoff,K., and Schmitz,I. (2006). Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 281, 29652-29659.
148. Sandor,V., Senderowicz,A., Mertins,S., Sackett,D., Sausville,E., Blagosklonny,M.V., and Bates,S.E. (2000). P21-dependent g(1)arrest with downregulation of cyclin D1 and upregulation of cyclin E by the histone deacetylase inhibitor FR901228. *Br. J. Cancer* 83, 817-825.
149. Santi,D.V., Norment,A., and Garrett,C.E. (1984). Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 81, 6993-6997.
150. Sartorius,U., Schmitz,I., and Krammer,P.H. (2001). Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem.* 2, 20-29.

151. Sartorius,U.A. and Krammer,P.H. (2002). Upregulation of Bcl-2 is involved in the mediation of chemotherapy resistance in human small cell lung cancer cell lines. *Int. J. Cancer* *97*, 584-592.
152. Saxena,A., Viswanathan,S., Moshynska,O., Tandon,P., Sankaran,K., and Sheridan,D.P. (2004). Mcl-1 and Bcl-2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Hematol.* *75*, 22-33.
153. Scaffidi,C., Schmitz,I., Zha,J., Korsmeyer,S.J., Krammer,P.H., and Peter,M.E. (1999). Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J. Biol. Chem.* *274*, 22532-22538.
154. Scheinbart,L.S., Johnson,M.A., Gross,L.A., Edelstein,S.R., and Richardson,B.C. (1991). Procainamide inhibits DNA methyltransferase in a human T cell line. *J. Rheumatol.* *18*, 530-534.
155. Schmitz,I., Kirchhoff,S., and Krammer,P.H. (2000). Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *32*, 1123-1136.
156. Seligson,D.B., Horvath,S., Shi,T., Yu,H., Tze,S., Grunstein,M., and Kurdistani,S.K. (2005). Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature* *435*, 1262-1266.
157. Shankar,S., Singh,T.R., Fandy,T.E., Luetrakul,T., Ross,D.D., and Srivastava,R.K. (2005). Interactive effects of histone deacetylase inhibitors and TRAIL on apoptosis in human leukemia cells: involvement of both death receptor and mitochondrial pathways. *Int. J. Mol. Med.* *16*, 1125-1138.
158. Shnider,B.I., Baig,M., and Colsky,J. (1976). A phase I study of 5-azacytidine (NSC-102816). *J. Clin. Pharmacol.* *16*, 205-212.
159. Silverman,L.R. (2004). DNA methyltransferase inhibitors in myelodysplastic syndrome. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* *17*, 585-594.
160. Silverman,L.R., Demakos,E.P., Peterson,B.L., Kornblith,A.B., Holland,J.C., Odchimar-Reissig,R., Stone,R.M., Nelson,D., Powell,B.L., DeCastro,C.M., Ellerton,J., Larson,R.A., Schiffer,C.A., and Holland,J.F. (2002). Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J. Clin. Oncol.* *20*, 2429-2440.
161. Slee,E.A., Harte,M.T., Kluck,R.M., Wolf,B.B., Casiano,C.A., Newmeyer,D.D., Wang,H.G., Reed,J.C., Nicholson,D.W., Alnemri,E.S., Green,D.R., and Martin,S.J. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.* *144*, 281-292.
162. Srinivasula,S.M., Ahmad,M., Fernandes-Alnemri,T., Litwack,G., and Alnemri,E.S. (1996). Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 14486-14491.

163. Stach,D., Schmitz,O.J., Stilgenbauer,S., Benner,A., Dohner,H., Wiessler,M., and Lyko,F. (2003). Capillary electrophoretic analysis of genomic DNA methylation levels. *Nucleic Acids Res.* *31*, E2.
164. Stankovic,T., Stewart,G.S., Fegan,C., Biggs,P., Last,J., Byrd,P.J., Keenan,R.D., Moss,P.A., and Taylor,A.M. (2002). Ataxia telangiectasia mutated-deficient B-cell chronic lymphocytic leukemia occurs in pregerminal center cells and results in defective damage response and unrepaired chromosome damage. *Blood* *99*, 300-309.
165. Sterner,D.E. and Berger,S.L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *64*, 435-459.
166. Strahl,B.D. and Allis,C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* *403*, 41-45.
167. Stratthdee,G., Sim,A., Parker,A., Oscier,D., and Brown,R. (2006). Promoter hypermethylation silences expression of the HoxA4 gene and correlates with IgVh mutational status in CLL. *Leukemia* *20*, 1326-1329.
168. Stresemann, C., Bokelmann, I., Mahlknecht, U., and Lyko, F. Azacytidine causes complex DNA methylation changes in myelodysplastic syndrome patients. eingereicht. 2008.
Ref Type: Generic
169. Sutheesophon,K., Kobayashi,Y., Takatoku,M.A., Ozawa,K., Kano,Y., Ishii,H., and Furukawa,Y. (2006). Histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) induces apoptosis in leukemic cells by facilitating mitochondrial translocation of Bax, which is enhanced by the proteasome inhibitor bortezomib. *Acta Haematol.* *115*, 78-90.
170. Taylor, S. M. p53 and deregulation of DNA methylation in cancer. Vol.2 No.3. 2006. *Cellscience Reviews*.
Ref Type: Generic
171. Thomas,A., El,R.S., Reed,J.C., Krajewski,S., Silber,R., Potmesil,M., and Newcomb,E.W. (1996). Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance. *Oncogene* *12*, 1055-1062.
172. Tien,H.F., Tang,J.H., Tsay,W., Liu,M.C., Lee,F.Y., Wang,C.H., Chen,Y.C., and Shen,M.C. (2001). Methylation of the p15(INK4B) gene in myelodysplastic syndrome: it can be detected early at diagnosis or during disease progression and is highly associated with leukaemic transformation. *Br. J. Haematol.* *112*, 148-154.
173. Torchia,J., Glass,C., and Rosenfeld,M.G. (1998). Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr. Opin. Cell Biol.* *10*, 373-383.
174. Voelter-Mahlknecht,S., Ho,A.D., and Mahlknecht,U. (2005). Chromosomal organization and localization of the novel class IV human histone deacetylase 11 gene. *Int. J. Mol. Med.* *16*, 589-598.
175. Von Hoff,D.D., Slavik,M., and Muggia,F.M. (1976). 5-Azacytidine. A new anticancer drug with effectiveness in acute myelogenous leukemia. *Ann. Intern. Med.* *85*, 237-245.

176. Wang,D., Freeman,G.J., Levine,H., Ritz,J., and Robertson,M.J. (1997). Role of the CD40 and CD95 (APO-1/Fas) antigens in the apoptosis of human B-cell malignancies. *Br. J. Haematol.* *97*, 409-417.
177. Wickremasinghe,R.G., Ganeshaguru,K., Jones,D.T., Lindsay,C., Spanswick,V.J., Hartley,J.A., Wadhwa,M., Thorpe,R., Hoffbrand,A.V., Prentice,H.G., and Mehta,A.B. (2001). Autologous plasma activates Akt/protein kinase B and enhances basal survival and resistance to DNA damage-induced apoptosis in B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* *114*, 608-615.
178. Wierda,W.G. (2006). Current and investigational therapies for patients with CLL. *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 285-294.
179. Xiong,Z. and Laird,P.W. (1997). COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.* *25*, 2532-2534.
180. Xu,W.S., Parmigiani,R.B., and Marks,P.A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* *26*, 5541-5552.
181. Yang,A.S., Estecio,M.R., Doshi,K., Kondo,Y., Tajara,E.H., and Issa,J.P. (2004). A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res.* *32*, e38.
182. Zhang,X.D., Gillespie,S.K., Borrow,J.M., and Hersey,P. (2004). The histone deacetylase inhibitor suberic bishydroxamate regulates the expression of multiple apoptotic mediators and induces mitochondria-dependent apoptosis of melanoma cells. *Mol. Cancer Ther.* *3*, 425-435.
183. Zhao,Y., Tan,J., Zhuang,L., Jiang,X., Liu,E.T., and Yu,Q. (2005). Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 16090-16095.
184. Zou,H., Li,Y., Liu,X., and Wang,X. (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* *274*, 11549-11556.

Teile dieser Arbeit wurden in dem unten aufgeführten Artikel publiziert:

Bokelmann,I. and Mahlknecht,U. (2008). Valproic Acid Sensitizes Chronic Lymphocytic Leukemia Cells to Apoptosis and Restores the Balance Between Pro- and Antiapoptotic Proteins. *Mol. Med.* *14*, 20-7

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
°C	Grad Celsius
AML	Akute Myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Azacytidin	5'-Azacytidin, Vidaza®
Bcl-2	B-Cell CLL/Lymphoma 2, Oncogene B-Cell leukemia 2
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
C1S2	Chromosom 1 Satellit 2
Ca	Calcium
CD	cluster of differentiation (Zelloberflächenmarker)
cDNA	complementary DNA
CE	capillary electrophoresis/Kapillarelektrophorese
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	cycle threshold
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindiol-Dilactat
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP's	Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	fluorescence activated cell sorting
FSC	forward scatter
g	Gramm, Beschleunigung
h	Stunde
H4	Histon H4
HAT	Histonacetyltransferase
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HDAC	Histondeacetylase
HR	high risk
IM	intermediate risk
IWG	international working group
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KM	Knochenmark

l	Liter
LINE	long interspersed nuclear elements
LR	low risk
M	Molar (mol/l)
m	Meter
m	männlich
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
Mg	Magnesium
min	Minute
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NFκB	Nuclear Factor Kappa B
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
NP40	4-Nonylphenolpolyethylenglykol
OD	optische Dichte
Pat.	Patient
PB	peripheres Blut
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
RA	refraktäre Anämie
RAEB	RA mit erhöhtem Blastenanteil
RARS	RA mit Ringsideroblasten
RCMD	refraktäre Zytopenie mit Multiliniendysplasie
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	rotations per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Nährmedium
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate
SIRT	silent information regulator
SSC	sideward scatter
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
u	units
UV	ultraviolett
w	weiblich
w/v	weight/volume
WHO	world health organisation
V	Volt
VPA	Valproat/Valproinsäure

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:

Schematische Darstellung der HAT- und HDAC-Aktivität

Abbildung 2:

Schematische Darstellung der DNA-Methylierung in gesunden und malignen Zellen

Abbildung 3:

Vereinfachtes Schema der Apoptosewege in der Zelle

Abbildung 4:

Modell der Hämatopoese

Abbildung 5:

Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Abbildung 6:

Aufbau eines Western blots

Abbildung 7:

Formeln zur Berechnung der relativen Expression

Abbildung 8:

Vidaza-Therapie-Schema

Abbildung 9:

FACS-Analyse der VPA-bedingten Apoptose-Induktion in PBMCs von CLL-Patienten

Abbildung 10:

Untersuchung morphologischer Veränderungen der Zellkerne von CLL-Patienten

Abbildung 11:

Western blot-Analyse der Acetylierung von Histonen

Abbildung 12:

Analyse der VPA-abhängigen Apoptoseinduktion in PBMCs von gesunden Probanden und CLL-Patienten

Abbildung 13:

Untersuchung der Caspase-Aktivierung

Abbildung 14:

Expressionsbestimmung mittels Real time-PCR

Abbildung 15:

Western blot-Analyse von Proteinen der Bcl-2-Familie

Abbildung 16:

FACS-Untersuchung der Expression von CD95 und CD49d

Abbildung 17:

Behandlung von CLL-PBMCs mit VPA und/oder Caspase-Inhibitoren

Abbildung 18:

Leukozyten- und Thrombozytenzahl im Verlauf der Azacytidin-Behandlung

Abbildung 19:

Expressionsanalyse im Blut von Probanden

Abbildung 20:

Analyse der Gesamt-DNA-Methylierung im Knochenmark der Patienten 1, 2, 3 und 5

Abbildung 21:

Analyse der Promotor-spezifischen Methylierung im Knochenmark der Patienten 1, 2, 3 und 5

Abbildung 22:

Expressionsanalyse im Knochenmark der Patienten 1, 2, 3 und 5

Abbildung 23:

Analyse der Knochenmarkproben des Patienten 4

Abbildung 24:

Analyse der Gesamt-DNA-Methylierung im Blut der im Verlauf der vier Behandlungszyklen

Abbildung 25:

Analyse der Promotor-Methylierung und Genexpression im Blut von Patient 1

Abbildung 26:

Analyse der Promotor-Methylierung und Genexpression im Blut von Patient 2

Abbildung 27:

Analyse der Promotor-Methylierung und Genexpression im Blut von Patient 3

Abbildung 28:

Analyse der Promotor-Methylierung und Genexpression im Blut von Patient 4

Abbildung 29:

Analyse der Promotor-Methylierung und Genexpression im Blut von Patient 5

Abbildung 30:

Analysen unterschiedlicher Zellpopulationen des Patienten 1

Abbildung 31:

Modell der VPA-vermittelten Apoptoseinduktion in CLL-Zellen

6.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:

Histon-Deacetylase-Inhibitoren

Tabelle 2:

Stadieneinteilung der CLL nach Binet

Tabelle 3:

Stadieneinteilung der CLL nach Rai

Tabelle 4:

WHO-Vorschläge zur Klassifizierung myelodysplastischer Syndrome

Tabelle 5:

Probandencharakteristika (I)

Tabelle 6:

Übersicht über die verwendeten FACS-Antikörper

Tabelle 7:

Übersicht über die verwendeten Western blot-Antikörper

Tabelle 8:

Übersicht über die verwendeten Real time PCR-assays (I)

Tabelle 9:

Patientencharakteristika (II)

Tabelle 10:

Probandencharakteristika (II)

Tabelle 11:

Kriterien zur Beurteilung des Therapieansprechens von MDS-Patienten nach den Kriterien der IWG

Tabelle 12:

Übersicht über die verwendeten Real time PCR-assays (II)

Tabelle 13:

Patientencharakteristika (I) und *ex vivo*-Ansprechen

Tabelle 14:

Hämatologische Parameter

Tabelle 15:

Behandlungsergebnisse

6.4. Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und mich dabei keinen anderen als den von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Heidelberg, Januar 2008

Imke Bokelmann

6.5. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Mahlknecht, PhD dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese interessante Arbeit anzufertigen. Ebenso danke ich ihm für seine hervorragende Betreuung und herzliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Konrad Beyreuther danke ich sehr für die Übernahme der Pflichten als Betreuer und Gutachter dieser Arbeit.

Mein spezieller Dank gilt Herrn Prof. Dr. Frank Lyko für fachliche Diskussionen und Anregungen und für die finanzielle Unterstützung, die den Abschluss dieser Arbeit erst ermöglicht hat.

Frau PD Dr. Ursula Klingmüller und Herrn Prof. Dr. Herbert Steinbeisser danke ich für ihre unkomplizierte Zusage, als Promotionsprüfer zu fungieren.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn PD Dr. Manfred Hensel für die Versorgung mit den CLL-Patientenproben.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Volker Eckstein für die Hilfe bei technischen Fragen im FACS-Labor.

Besonders danken möchte ich Carlo Stresemann für die nette und zuverlässige Zusammenarbeit und die Überlassung der Methylierungsdaten.

Ganz herzlich danken möchte ich außerdem allen, mit denen ich in den vergangenen Jahren das Freud und Leid des Laboralltags geteilt habe: Barbara Zschörnig, Christian Dransfeld, Christiane Schönbein, Nicole Engel, Karin Pflieger, Katrin Miesala und den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Lyko.

Ulf Krause, Birgit Teichmann und Gudrun Vierke danke ich herzlich für ihr Korrekturlesen und die anregenden Gespräche bzw. konstruktiven Kommentare.

Dirk Hose danke ich für seine Hilfsbereitschaft bei technischen Problemen und besonders für viele Diskussionen fachlicher und auch weniger fachlicher Natur.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung und ihren Rückhalt, ohne den diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Nicht zuletzt gilt mein Dank den Patienten und Probanden, die mit ihrer Zustimmung zur Verwendung ihres Knochenmarks und/oder Blutes diese Arbeit ermöglicht haben.

Ganz besonders (und nicht nur im Rahmen dieser Arbeit) danke ich Udo Lange für seine unzähligen Aufmunterungen, erholsamen Ablenkungen – einfach für alles!