

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie)

**Anreicherung der Side Population der KG-1a-Zelllinie
unter Inkubation mit Doxorubicin und Disulfiram**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Baumann, David

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Ebinger

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Bethge

Tag der Disputation: 26.10.2020

„Lehre mich bedenken, dass ich sterben muss, auf das ich klug werde“

nach der Bibel (Psalm 90, 12)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	X
TABELLENVERZEICHNIS	XII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Akute Myeloische Leukämie	2
1.1.1 Definition und Epidemiologie.....	2
1.1.2 Diagnostik der Akuten Myeloischen Leukämie.....	3
1.1.3 Unterschiede der Infantilen und Erwachsenen Akuten Myeloischen Leukämie.....	3
1.1.4 Therapie der Akuten Myeloischen Leukämie	4
1.1.5 Rezidiv und primär refraktäre Akute Myeloische Leukämien	4
1.1.6 Management der frühzeitigen Rezidiverkennung	5
1.2 Krebsstammzellen und Leukämische Stammzellen	7
1.2.1 Modell der Krebsstammzellen (CSC)	7
1.2.2 Krebsstammzellen der Leukämie.....	7
1.2.3 Eigenschaften Leukämischer Stammzellen.....	7
1.2.4 Leukämiinduzierendes Potential von LSC Populationen	8
1.2.5 Auswirkungen von LSCs auf den Therapieerfolg.....	8
1.2.6 CD34 ⁺ /CD38 ⁻ -Zellen als unabhängiger prognostischer Marker	8
1.2.7 Aldehyddehydrogenaseexpression als Nachweis Leukämischer Stammzellen.....	9
1.3 (Zelluläre) Mechanismen der Resistenz und Multidrug Resistance	10
1.3.1 ATP-Bindungskassetten-Transporter als Resistenzmechanismus.....	10
1.3.2 Co-Expressionen von ABC-Transportern	11
1.3.3 Zellteilungsaktivität als Resistenzmechanismus	12
1.4 Darstellung der Side Population durch Hoechst 33342.....	12
1.5 Leukämische KG-1a-Zellen.....	13
1.6 Anthrazykline und ihr Vertreter Doxorubicin	13
1.6.1 Wirkmechanismus von Doxorubicin als Topoisomerase-Inhibitor.....	13
1.6.2 Kardiotoxische Nebenwirkungen von Doxorubicin.....	14

1.6.3	Wirkung von Doxorubicin in Bezug auf den Zellzyklus	15
1.6.4	Relevanz der Verbesserung kardiotoxischer Anthrazyklin-Regime	15
1.6.5	Kardioprotektion durch Kombinationstherapien und weitere Strategien zur Senkung der Kardiotoxizität von Doxorubicin	15
1.6.6	Doxorubicin und ABC-Transporter	16
1.7	Disulfiram	17
1.7.1	Neuverwendung eines etablierten Medikaments.....	17
1.7.2	Hauptwirkmechanismus von Disulfiram in der Alkoholentwöhnung	17
1.7.3	Wirkung von Disulfiram in malignen Zellen	17
1.7.3.1	Disulfiram als Inhibitor des Proteasoms.....	18
1.7.3.2	Bortezomib als Proteasom-Inhibitor	18
1.7.3.3	Beeinflussung der p97-ATPase und NPL4 durch Disulfiram	19
1.7.3.4	Erhöhung der Reaktiven Sauerstoffspeziesspiegel und deren Folgen	19
1.7.3.5	Hemmung der Methylguanin-DNA-Methyltransferase.....	20
1.7.4	Wirkung von Disulfiram in Bezug auf den Zellzyklus	20
1.8	Fragestellung der Dissertationsarbeit.....	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Material.....	22
2.1.1	Geräte- und Verbrauchsliste.....	22
2.1.2	Allgemeine Chemikalien.....	23
2.1.3	Stammlösungen.....	23
2.1.4	Stammzellreagenzien und Lebend-Tot-Marker	24
2.1.4.1	Reagenzien zur Bestimmung der Side Population	24
2.1.4.2	Lebend-Tot-Farbstoff.....	24
2.1.5	Potentielle Therapeutika	24
2.1.6	EDV-Hilfsmittel.....	24
2.2	Methoden	24
2.2.1	Auswahl der verwendeten Zelllinie	25
2.2.2	Was sind Zellkulturen	25
2.2.3	Pflege von Zellkulturen.....	25
2.2.3.1	Allgemeine Lebens- und Umgebungsbedingungen.....	25
2.2.3.2	RPMI+ als Nährmedium	26
2.2.3.3	Fetal calf serum (FCS)	26
2.2.3.4	L-Glutamin als Energielieferant.....	26
2.2.3.5	HEPES als organischer Puffer.....	27
2.2.3.6	Schutz vor Kontaminationen	27
2.2.3.7	Aufbewahrung der Zellkultur	27

2.2.3.8	Passagieren von Zellkulturen	27
2.2.4	Durchflusszytometrie	28
2.2.4.1	Messverfahren und Ziel der Durchflusszytometrie	28
2.2.4.2	Fluoreszenz	29
2.2.4.3	Differenzierung von Signalen	29
2.2.4.4	Verwendetes Durchflusszytometer.....	30
2.2.4.5	Kompensation zweier Fluorochrome	31
2.2.4.6	Darstellung der gemessenen Daten	32
2.2.4.7	Gating von Zellen mit bestimmten Eigenschaften	32
2.2.5	Vorbereitung von Versuchen	33
2.2.5.1	Vorversuch zur Findung der geeigneten Zelllinie	33
2.2.5.2	Kryokonservierung.....	33
2.2.5.3	Auftau-Protokoll kryokonservierter Aliquots.....	34
2.2.6	Ansetzen von RPMI+ mit 20% FCS-Anteil.....	34
2.2.7	Doxorubicin-Monoversuch	35
2.2.8	Prinzip der Hoechst 33342-Färbung	36
2.2.8.1	Herstellung des Hoechst- und Verapamilansatzes.....	36
2.2.8.2	Hoechst 33342-Färbung von Doxorubicin auf KG-1a-Zellen nach 0h	37
2.2.8.3	Hoechst 33342-Färbung von Doxorubicin auf KG-1a-Zellen nach 24h-, 48h-, 72h- Inkubationszeit	37
2.2.9	Lebend-Tot-Diskriminierung	38
2.2.10	Disulfiram-Versuche	39
2.2.10.1	Tetraethylthiuramdisulfid-Ansatz („Disulfiram“, DSF) in DMSO	39
2.2.10.2	Disulfiram-Monovorversuch	39
2.2.10.3	Disulfiram-Monoversuch	41
2.2.10.4	Disulfiram Ansatz	42
2.2.10.5	Hoechst 33342-Färbung von DSF auf KG-1a-Zellen nach 0h-, 24h-, 48h-, 72h-Inkubation	43
2.2.11	Doxorubicin-Disulfiram-Kombinationsversuch	43
2.2.11.1	Doxorubicin-Disulfiram-Versuchsansatz	44
2.2.11.2	Hoechst 33342-Färbung von Doxo (0,5µM) und DSF auf KG-1a-Zellen nach 0h-, 24h-, 48h-, 72h-Inkubation.....	45
2.2.12	Doxorubicin-Disulfiram-Langzeitkombinationsversuch	45
2.2.12.1	Doxorubicin-Disulfiram-Langzeitinkubations-Versuchsansatz	46
2.2.12.2	Hoechst 33342-Färbung von Doxorubicin (0,5µM) und DSF auf KG-1a-Zellen 0h, 24h, 48h, 72h, 96h und 120h.....	46
2.2.12.3	Mediumwechsel während des Langzeit-Inkubationsversuches	47
2.2.12.4	Durchführung des Medium-Tausches für Versuchsansätze mit 72h-, 96h- und 120h- Inkubationszeit	47
2.2.12.5	Medikamentenkonzentrationsreihe für 48h-Mediumtausch.....	47

3	ERGEBNISSE	48
3.1	Gating-Hierarchie zur Darstellung der Side Population leukämischer Stammzellen	49
3.1.1	Time windows-Gates zur Erfassung sinnvoller Events.....	49
3.1.2	Differenzierung von Singlets und Doubletten mit Hilfe des Streulichts	50
3.1.3	Erfassen des Anteils toter Zellen und lebender Zellen.....	51
3.1.4	Erfassen der Phasen des Zellzyklus und der Side Population	52
3.1.5	Einteilung der Side Population	54
3.2	Analyse der Behandlung von leukämischen Zellen der KG-1a-Zelllinie mit Doxorubicin... 55	
3.2.1	Auswertung potenzieller Effekte von Doxorubicin auf die Proliferation leukämischer Zellen der KG-1a-Zelllinie.....	56
3.2.2	Auswertung potenzieller zytotoxischer Effekte von Doxorubicin auf leukämische Zellen der KG-1a-Zelllinie.....	57
3.2.3	Auswertung potenzieller Effekte von Doxorubicin auf den Anteil der diploiden SP leukämischer Zellen der KG-1a-Zelllinie.....	57
3.2.4	Auswertung potenzieller Effekte von Doxorubicin auf den Anteil der tetraploiden SP leukämischer Zellen der KG-1a-Zelllinie	59
3.2.5	Auswertung potenzieller Effekte von Doxorubicin auf das Verhältnis der strict diploiden und strict tetraploiden SP der KG-1a-Zelllinie	60
3.2.6	Auswertung potenzieller Effekte von Doxorubicin auf das Verhältnis von KG-1a-Zellen in den Stadien des Zellzyklus nach Hoechst-Färbung	61
3.3	Analyse der Behandlung von leukämischen Zellen der KG-1a-Zelllinie mit Disulfiram..... 62	
3.3.1	Auswertung potenzieller Effekte von Disulfiram auf die Proliferation leukämischer Zellen der KG-1a-Zelllinie.....	63
3.3.2	Auswertung potenzieller zytotoxischer Effekte von Disulfiram auf leukämische Zellen der KG-1a-Zelllinie.....	64
3.3.3	Auswertung potenzieller Effekte von Disulfiram auf den Anteil der diploiden SP leukämischer Zellen der KG-1a-Zelllinie.....	65
3.3.4	Auswertung potenzieller Effekte von Disulfiram auf den Anteil der tetraploiden SP leukämischer Zellen der KG-1a-Zelllinie	67
3.3.5	Auswertung potenzieller Effekte von Disulfiram auf das Verhältnis der strict diploiden und strict tetraploiden SP der KG-1a-Zelllinie	68
3.3.6	Auswertung potenzieller Effekte von Disulfiram auf das Verhältnis von KG-1a-Zellen in den Stadien des Zellzyklus nach Hoechst-Färbung	68
3.4	Analyse der Kombinationsbehandlung von leukämischen Zellen der KG-1a-Zelllinie mit Doxorubicin und Disulfiram..... 70	
3.4.1	Auswertung potenzieller Effekte von Doxorubicin und Disulfiram als Kombinationsbehandlung auf die Proliferation von KG-1a-Zellen.....	71

3.4.2	Auswertung potenzieller zytotoxischer Effekte von Doxorubicin und Disulfiram als Kombinationsbehandlung an KG-1a-Zellen	72
3.4.3	Auswertung potenzieller Effekte von Doxorubicin und Disulfiram als Kombinationsbehandlung auf den Anteil diploider SP von KG-1a-Zellen.....	73
3.4.4	Auswertung potenzieller Effekte von Doxorubicin und Disulfiram als Kombinationsbehandlung auf den Anteil tetraploider SP von KG-1a-Zellen.....	76
3.4.5	Auswertung potenzieller Effekte von Doxorubicin und Disulfiram als Kombinationsbehandlung auf das Verhältnis strict diploider und strict tetraploider SP von KG-1a-Zellen	79
3.4.6	Auswertung potenzieller Effekte von Doxorubicin und Disulfiram auf das Verhältnis der Zellzyklusstadien von KG-1a-Zellen nach Hoechst-Färbung	80
4	DISKUSSION	82
4.1	Einführung.....	82
4.2	Aktuelle Studien zur Kombination aus DSF/Cu.....	83
4.3	Diskussion der Ergebnisse	84
4.3.1	Vorteile und Einschränkungen von in-vitro-Modellen	85
4.3.2	Einschränkungen der Durchflusszytometrie sowie Darstellung der SP mittels Hoechstfärbung	86
4.3.3	Zusätzliche proliferationshemmende Wirkung von Doxo und DSF erst im Langzeitkombinationsversuch nachweisbar.....	87
4.3.3.1	Proliferationsverhalten im DSF/Doxo Kombinationsversuch	87
4.3.3.2	Proliferationsverhalten im DSF Monoversuch	88
4.3.3.3	Proliferationsverhalten im Doxo Monoversuch	88
4.3.4	Zusätzliche Zytotoxizität erst im LZV mit hohen DSF-Konzentrationen.....	89
4.3.4.1	Konzentrationsabhängige Zytotoxizitätssteigerung im Doxo-Monoversuch	89
4.3.4.2	Konzentrationsabhängige Zytotoxizitätssteigerung im DSF-Monoversuch.....	90
4.3.4.3	Zytotoxizitätssteigerung erst im DSF/Doxo-Langzeitkombinationsversuch.....	93
4.3.5	Zusätzliche Reduktion der G ₂ /M-Phase durch DSF/Doxo-Kombination.....	94
4.3.5.1	Zellzyklusverteilung im Doxo-Monoversuch.....	94
4.3.5.2	Zellzyklusverteilung im DSF-Monoversuch	95
4.3.5.3	Zellzyklusverteilung im DSF/Doxo-Kombinationsversuch	96
4.3.6	Zusätzliche Reduktion der unreifen diploiden SP und Erhöhung der unreifen tetraploiden SP durch die DSF/Doxo-Kombinationsanwendung	97
4.3.6.1	SP-Veränderung im Doxo-Monoversuch.....	98
4.3.6.2	SP-Veränderung im DSF-Monoversuch.....	99
4.3.6.3	SP-Veränderung im DSF/Doxo-Kombinationsversuch.....	100
4.3.7	DSF-abhängige Erhöhung des Quotienten aus unreifer tetraploider und unreifer diploider SP mit dosisabhängiger Reduktionsdynamik in Kombinationsversuchen	103

4.4	Ausblick.....	104
5	ZUSAMMENFASSUNG	105
6	LITERATURVERZEICHNIS	108
7	ANHANG	122
7.1	Doxorubicin Monoversuch ergänzende Darstellungen	122
7.1.1	Alternative Abbildung nicht-normierter Ergebnisse der Lebendzellen.....	122
7.1.2	Abbildung normierter Ergebnisse der tetraploiden SP.....	122
7.1.3	Abbildung normierter Ergebnisse der strict tetraploiden SP.....	123
7.2	Disulfiram Monoversuch ergänzende Darstellungen	123
7.2.1	Abbildung nicht-normierter Ergebnisse der diploiden SP	123
7.2.2	Alternative Abbildung nicht-normierter Ergebnisse der strict diploiden SP.....	124
7.2.3	Abbildung normierter Ergebnisse der tetraploiden SP.....	124
7.2.4	Abbildung normierter Ergebnisse der strict tetraploiden SP.....	125
7.3	Disulfiram/Doxorubicin Kombinationsversuch ergänzende Darstellungen.....	126
7.3.1	Alternative Abbildung nicht-normierter Ergebnisse der diploiden SP.....	126
7.3.2	Abbildung normierter Ergebnisse der strict diploiden SP.....	127
7.3.3	Alternative Abbildung nicht-normierter Ergebnisse der strict diploiden SP.....	128
7.3.4	Abbildung normierter Ergebnisse der strict tetraploiden SP.....	129
7.3.5	Abbildung nicht-normierter Ergebnisse der strict tetraploiden SP.....	130
7.4	Veröffentlichungen.....	130
8	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL DER DISSERTATIONSSCHRIFT. 131	
9	DANKSAGUNG.....	132
10	LEBENS LAUF	133

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Cytometer-Konfiguration des blauen Lasers.....	30
Abbildung 2.2: Cytometer-Konfiguration des UV Lasers und des violetten Lasers.....	31
Abbildung 2.3: Cytometer-Konfiguration des roten Lasers	31
Abbildung 3.1: Gating Hierarchie	49
Abbildung 3.2: Erstellung des Time-Gates.	50
Abbildung 3.3: Singlets - Area-Scaling.....	51
Abbildung 3.4: live- und dead cells-Gating	52
Abbildung 3.5: schematische Darstellung und Gating der Zellzyklusstadien.....	52
Abbildung 3.6: Darstellung der SP.....	54
Abbildung 3.7: Überprüfen der SP Gates.....	55
Abbildung 3.8: Zellzahlen als Index der Proliferationsaktivität nach Doxorubicin-Inkubation.....	56
Abbildung 3.9: Lebendzellen nach Doxorubicin-Inkubation	57
Abbildung 3.10: Anteil diploider SP von G_0/G_1 nach Doxorubicin-Inkubation unter Berücksichtigung der Zytotoxizität	58
Abbildung 3.11: Anteil strict diploider SP von G_0/G_1 nach Doxorubicin-Inkubation unter Berücksichtigung der Zytotoxizität – Normierung auf Kontrolle	59
Abbildung 3.12: Quotient aus strict tetraploider und strict diploider SP nach Doxorubicin-Inkubation.....	60
Abbildung 3.13: Prozentuale Verteilung der Populationen G_0/G_1 , S und G_2/M nach Doxorubicin-Inkubation und unter Berücksichtigung der Zytotoxizität.	61
Abbildung 3.14: Zellzahlen als Proliferationsindex nach Disulfiram-Inkubation	64
Abbildung 3.15: Anteil Lebendzellen nach Disulfiram-Inkubation.....	64
Abbildung 3.16: Anteil diploider SP von G_0/G_1 nach Disulfiram-Inkubation	65
Abbildung 3.17: Quotient aus strict tetraploider und strict diploider SP nach Disulfiram-Inkubation.....	68
Abbildung 3.18: Prozentuale Verteilung der Populationen G_0/G_1 , S und G_2/M nach Disulfiram-Inkubation und unter Berücksichtigung der Zytotoxizität.	69
Abbildung 3.19: Zellzahlen als Proliferationsindex nach 72h- und 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation	72
Abbildung 3.20: Anteil Lebendzellen nach 72h- und 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation.....	73

Abbildung 3.21: Anteil diploider-SP von G ₀ /G ₁ nach 72h- und 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation – Normierung auf 1/2μM-Doxo-Kontrolle.....	74
Abbildung 3.22: Anteil tetraploider SP von G ₀ /G ₁ nach 72h- und 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation	77
Abbildung 3.23: Quotient aus strict tetraploider und strict diploider SP (strict 4n/ strict 2n) nach 72h- und 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation.....	79
Abbildung 3.24: Anteil der prozentualen Mittelwerte der Populationen G ₀ /G ₁ , S und G ₂ /M zueinander nach 72h- und nach 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation ...	81
Abbildung 7.1: Lebendzellen nach Doxorubicin-Inkubation – alternative Darstellung	122
Abbildung 7.2: Anteil tetraploider SP von G ₂ /M+S nach Doxorubicin-Inkubation	122
Abbildung 7.3: Anteil strict tetraploider SP von G ₂ /M+S nach Doxorubicin-Inkubation	123
Abbildung 7.4: Anteil diploider SP von G ₀ /G ₁ nach Disulfiram-Inkubation – alternative Darstellung	123
Abbildung 7.5: Anteil strict diploider SP von G ₀ /G ₁ nach Disulfiram-Inkubation – alternative Darstellung.....	124
Abbildung 7.6: Anteil tetra-ploider SP von G ₂ /M+S nach Disulfiram-Inkubation.....	124
Abbildung 7.7: Anteil strict tetraploider SP von G ₂ /M+S nach Disulfiram-Inkubation	125
Abbildung 7.8: Anteil diploider-SP von G ₀ /G ₁ nach 72h- und 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation – alternative Darstellung.....	126
Abbildung 7.9: Anteil strict diploider-SP von G ₀ /G ₁ nach 72h- und 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation – Normierung auf 1/2μM-Doxo-Kontrolle.....	127
Abbildung 7.10: Anteil strict diploider-SP von G ₀ /G ₁ nach 72h- und 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation – alternative Darstellung.....	128
Abbildung 7.11: Anteil strict tetraploider SP von G ₂ /M+S nach 72h- und 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation – Normierung auf 1/2μM-Doxo-Kontrolle ...	129
Abbildung 7.12: Anteil strict diploider-SP von G ₂ /M+S nach 72h- und 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation – alternative Darstellung.....	130

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte- und Verbrauchsliste	22
Tabelle 2: Allgemeine Chemikalien	23
Tabelle 3: Stammlösungen	23
Tabelle 4: Reagenzien zur Bestimmung der Side Population	24
Tabelle 5: Lebend-Tot-Farbstoff	24
Tabelle 6: Potentielle Therapeutika	24
Tabelle 7: EDV-Hilfsmittel	24
Tabelle 8: Doxorubicin-Konzentrationen und verwendete -Volumina	35
Tabelle 9: Disulfiram-Konzentrationen und verwendete -Volumina (Vorversuch).....	40
Tabelle 10: Disulfiram-Konzentration und verwendete -Volumina (Hauptversuch).....	42
Tabelle 11: Disulfiram- /Doxorubicin-Konzentrationen und verwendete -Volumina ...	44
Tabelle 12: Veränderungen vom 72h- zum 120h-Kombinationsversuch.....	46

Abkürzungsverzeichnis

t(;)	Translokation an (;)
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
2n	diploider Chromosomensatz
4n	tetraploider Chromosomensatz
ABC	ATP-binding cassette
AG & Co.	Aktiengesellschaft und Co
ALDH	Aldehyddehydrogenase
ALDH ⁺⁺	ALDH mittlerer Expression
ALDH ⁺⁺⁺	ALDH hochpositiv
AML	Akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	breast cancer resistance protein
BD	Becton Dickinson
Bsp.	Beispiel
bspw.	beispielsweise
BZ	Bortezomib
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBF	core-binding factor
CCG	children's cancer group
CD34 ⁺	Cluster of differentiation 34 positiv
CD38 ⁻	Cluster of differentiation 38 negativ
CDK1	cyclin-dependent kinase 1
CEBPA	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COG	children oncology group
CR	complet remission
CSCs	Krebsstammzellen
Cu	Kupfer
CuCl ₂	Kupferchlorid

CuGlu	Kupfergluconat
CuSO ₄	Kupfersulfat
DC.....	Diethyldithiocarbamat; Dithiocarb
DMEM.....	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Doxo	Doxorubicin
DSF.....	Disulfiram
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
engl.	englisch
ER.....	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	endoplasmic-reticulum-associated protein degradation
ERIC-ONC	Effect of Remote Ischaemic Conditioning in Oncology Patients
FAB	French-American British
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS.....	Fetal Bovine (Calve) Serum
FLT3-ITD.....	FMS-like tyrosine kinase 3 with internal tandem duplication
FSC.....	forward scatter
g	Gramm
G0.....	Gap 0
G1	Gap 1
G2.....	Gap 2
G2/M.....	Gap2/Mitosis
G-CSF.....	granulocyte-colony stimulating factor
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GPOH.....	Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie
h	Stunden
HEPES.....	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSC	hämatopoetische Stammzellen
IC50-Wert.....	mittlere inhibitorische Konzentration
Inc.	Incorporated
inv(16)	Inversion 16
JNK.....	C-Jun-N-terminale Kinase
KM.....	Knochenmark

KZV	72h-Kurzzeitversuch
l	Liter
LP	Langpassfilter
LSC.....	leukemic stem cells
LSCs	Leukämische Stammzellen
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LZV	Langzeitversuch
m ²	Quadratmeter
max.	maximal
MDR.....	multidrug resistance
MDR1	multidrug resistance 1
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MRC	medical research council
MRD	minimal residual disease
MRP.....	multidrug-related protein
mV	Millivolt
NCCN.....	National Comprehensive Cancer Network
NF-kB	nukleare Faktor-kB
nm	Nanometer
nM.....	Nanomolar
NPL4.....	nuclear protein localization 4
NPM1	Nucleophosmin
Nrf1.....	Nuclear respiratory factor 1
Nrf2.....	nuclear factor-E2-related factor 2
NSCLC	Non-small cell lung cancer
OS	overall survival
PBS	Phosphat buffered saline
PDGF	platelet-derived growth factor
Pen/Strep.....	Penicillin/Streptomycin
PERK.....	protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
P-gp-1	P-Glycoprotein 1

PI Propidium Iodid
 PMT Photomultiplier-Tubes
 PPAR Peroxisom-Proliferator-aktivierenden Rezeptor
 RIC Remote Ischaemic Conditioning
 ROS reaktive Sauerstoffspezies
 RPMI Roswell Park Memorial Institute
 RT-qPCR real-time quantitative polymerase chain reaction
 sog..... sogenannten
 SP..... Side Population
 S-Phase Synthese-Phase
 SSC.....side scatter
 Top2 α Topoisomerase 2 Isoenzym alpha
 Top2 β Topoisomerase 2 Isoenzym beta
 u.a. unter anderem
 UFD1 ubiquitin fusion degradation 1
 UV ultraviolett
 v.a. vor allem
 vgl. vergleiche
 z.B..... zum Beispiel
 ZNS.....Zentralnervensystem

1 Einleitung

Jährlich erkranken ca. 365 Kinder in den USA an einer akuten myeloischen Leukämie (AML) (Gamis et al., 2013). In Deutschland sind es etwa 100 pro Jahr mit einer Inzidenz von ca. 0,7 auf 100.000 Kinder unter 15 Jahren (Niemeyer and Eggert, 2018, S. 274 und S. 298). Trotz zahlreicher Fortschritte in den letzten Jahrzehnten, durch multimedikamentöse Therapiepläne, molekularmedizinische, medikamenteneinsparende Einteilungen in Risikogruppen und frühzeitigem Screening von Rückfällen mittels Techniken wie „minimal residual disease“-Messungen (MRD, deutsch: Minimale Resterkrankung) liegt das „overall survival“ (OS, deutsch: Gesamtüberleben) bei ca. 65-75 % (Cooper et al., 2012, Gamis et al., 2014, Creutzig et al., 2013). Hauptursache für die schlechten Ergebnisse sind frühzeitige Rezidive (Gamis et al., 2013) aus chemotherapieresistenten Zellen und hohe behandlungsbedingte Mortalitäten durch die multimedikamentöse Behandlung (Cooper et al., 2012, Rubnitz, 2017). Eine klinisch relevante Gruppe antineoplastischer Medikamente in der Induktionstherapie von AML sind Anthrazykline. Effektiv in der Zellreduktion haben sie jedoch den Nachteil, dass erfolgreich behandelte Patienten u.a. vermehrt kardiovaskuläre Langzeitkomplikationen erleiden (Mulrooney et al., 2009, van der Pal et al., 2012) und das Risiko für Zweitmalignome erhöht ist (Lipshultz et al., 2008). Diese Risiken werden v.a. bei Patienten nach einem Rückfall mit einer Reinduktionstherapie und erneuter Gabe von Anthrazyklinen stark erhöht (Creutzig et al., 2013).

Das Rezidivrisiko ist u.a. abhängig von einer kleinen, arzneimittelresistenten Population innerhalb der AML-Zellen, den sog. leukämischen Stammzellen (engl.: „leukemia stem cells“, LSCs) (Honoki, 2010). Diese sind ruhend und können mittels Resistenzmechanismen wie der überdurchschnittlichen Expression von ABC-Transportern effektiv Medikamentenwirkstoffe aus der Zelle hinaus pumpen und somit das Ansprechen auf die Therapie verringern. Aus den therapierefraktären LSCs kann, nach einiger Zeit und ausreichender Zellteilung, ein Rückfall generiert werden (Shaffer et al., 2012).

Patientengruppen mit schlechtem Outcome (bspw. aus der high risk Klassifikation, sekundäre AML) würden von neu entwickelten Medikamenten oder neuen Kombinationstherapien profitieren. Da die Entwicklung neuer Pharmaka jedoch

kostenintensiv sein kann, ist man dahin übergegangen, bereits etablierte, zugelassene und gut verträgliche Medikamente, im Sinne einer Neuverwendung, auch für die Krebstherapie zu erforschen (Pantziarka et al., 2014). Ein vielversprechendes, häufig untersuchtes Medikament zur Neuverwendung ist Disulfiram (DSF), ein Alkoholentwöhnungspharmaka, welches bereits seit über sechs Dekaden angewendet wird (Xu et al., 2017).

Diese Arbeit befasst sich mit den Auswirkungen der Inkubation von Doxorubicin (Doxo, einem Vertreter der Anthrazykline) und DSF in Mono- und Kombinationsversuchen mit leukämischen KG-1a-Zellen (einer AML-Zelllinie). Neben der Analyse von zytotoxischen und proliferationshemmenden Effekten wird schwerpunktmäßig auf die Anreicherung der Side Population (unreife leukämische Stammzellen) in der Hoechst-Färbungstechnik eingegangen. Abschließend wird das Verhalten und die Verteilung der KG-1a-Zellen im Zellzyklus beschrieben.

1.1 Akute Myeloische Leukämie

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Die AML ist eine klonalproliferative, maligne Erkrankung entstehend aus einer gestörten Differenzierung einer myeloiden Stamm- oder Progenitorzelle der physiologischen Hämatopoese (Shipley and Butera, 2009). Im Kindesalter ist die AML, im Vergleich zur ca. sechsmal häufigeren akuten lymphoblastischen Leukämie, eine etwas seltenere Erkrankung, welche trotz intensiver Therapien aufgrund ihrer Heterogenität schwer zu behandeln ist. Insgesamt macht sie zwischen 16 und 20% der akuten Leukämien im Kindesalter aus (de Rooij et al., 2015).

Die Therapieerfolge der letzten Jahrzehnte konnten bei Kindern mit AML zwar eine Gesamtüberlebensrate von bis zu 75% (Creutzig et al., 2013) und ein ereignisfreies Überleben (engl.: „event free survival“) von ca. 60% erreichen, jedoch erleiden auch in den neuesten Studien ca. 30% ein Rezidiv und es versterben weiter ca. 30% der erkrankten Patienten innerhalb von 10 Jahren (Creutzig et al., 2013). In anderen Arbeiten ist das Wiederaufflammen der Erkrankung (Rezidiv) mit ca. 38% (s. CCG-2961 Studie, CCG = engl.: „Children’s Cancer Group“) und ca. 34% (s. AAML03P1-Studie) der Hauptgrund für das schlechte Outcome der Patienten (Gamis et al., 2013). Ein weiteres deutliches Problem stellen laut COG-AAML03P1- (COG = engl.: „Children oncology

group“) und dem MRC AML 12-Bericht (MRC = engl.: „medical research council“) mit ca. 9% bzw. 10% akut, behandlungsinduzierter Mortalität, hauptsächlich infektiöser Genese, dar (Cooper et al., 2012).

Alle Patienten, die die Akuttoxizitäten der Intensivtherapie überstehen, kein Rezidiv erleiden oder dieses überwinden, erwartet ein nicht zu vernachlässigendes Risiko für Spätkomplikationen. Hauptvertreter sind therapieinduzierte Zweitmalignome (Lipshultz et al., 2008) und dosisabhängige Kardiotoxizitäten der Anthrazykline (van der Pal et al., 2012).

1.1.2 Diagnostik der Akuten Myeloischen Leukämie

Die bisherige v.a. morphologisch geprägte FAB-Klassifikation (FAB = French-American-British) (Creutzig et al., 2012) wurde 2016 durch eine neue molekular- und zytogenetikbasierende Klassifizierung erweitert, welche einheitliche Untergruppen nach Angriffspunkten und Therapieergebnissen bildet (Arber et al., 2016).

Die daraus resultierenden Mindestanforderungen, welche an die Diagnostik der Blut- und Knochenmarksproben einer pädiatrischen AML gestellt werden, sind (vgl. Creutzig et al., 2012):

- a. Blutbild mit Differenzialblutbild
- b. KM-Punktion (KM-Biopsie, v.a. bei „puncti sicca“)
- c. Immunphänotypisierung
- d. Lumbalpunktion
- e. Zytogenetik
- f. Molekulargenetik/Translokationen/Mutationen

1.1.3 Unterschiede der Infantilen und Erwachsenen Akuten Myeloischen Leukämie

Die biologische Ätiologie der AML-Untergruppen und deren Risikoprofile sind vergleichbar zwischen der pädiatrischen und der AML des Erwachsenen (Gamis et al., 2013).

Die wichtigsten Unterschiede sind neben der Prävalenz der biologischen Subtypen v.a. die Reaktion auf die intensive Chemotherapie, genetische Anomalien (Creutzig et al., 2012) sowie die längere Zeitspanne und Auswirkungen der Spätfolgen der intensiven Therapie (Gamis et al., 2013). Als prognostisch ungünstiges Zeichen wird eine besonders hohe Blastenlast bei Diagnosestellung gewertet, da mit ihr ein rascher Tod und ein hohes

Risiko für einen therapierefraktären Verlauf assoziiert sind (Creutzig et al., 2012). Weiterhin prognostisch wichtige Indikatoren sind, neben der Zyto- und Molekulargenetik der AML, das Ansprechen auf den zweiten Zyklus der Induktionstherapie an Tag 15 (im Sinne einer Blastenreduktion) (Abrahamsson et al., 2011).

1.1.4 Therapie der Akuten Myeloischen Leukämie

Die kindliche AML macht nur ca. 6% aller gemeldeter AML-Erkrankungen aus (Dores et al., 2012). Trotzdem ermöglichen groß angelegte Studien und die einheitliche Versorgung in bspw. GPOH- (= Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie) oder COG-Einrichtungen Vergleiche und Aussagen über bisherige und zukünftige Behandlungen von pädiatrischen Patienten und Erwachsenen (bis 29 Jahren) (Gamis et al., 2013). Das therapeutische Ziel ist die Auslöschung der leukämischen Progenitorzelle bei gleichzeitiger maximaler Reduktion der Akut- und Spättoxizitäten. Idealerweise sollten pädiatrische Patienten in solch einer zentrenübergreifend angelegten Studie behandelt werden. Durch die höhere Qualität und diagnostische Sicherheit kann eine risikobezogene Therapie nach molekularmedizinischen und zytogenetischen Kriterien geplant werden. Diese Differenzierung soll Übertherapien günstigerer AML-Fälle vermeiden und die Ergebnisse bei ungünstigeren Konstellationen durch intensivere Protokolle ermöglichen (Creutzig et al., 2012). Seit den 1980ern bildet das Grundgerüst der multimedikamentösen Induktionstherapie ein „3+7-“ bzw. „3+10-Schema“, welches aus dreitägiger Gabe von Anthrazyklinen (z.B. Daunorubicin mind. 60mg/m², Idarubicin 10-12mg/m² oder Anthracendion mitoxantron 10-12mg/m²) und einem sieben- bzw. zehntägigem Zyklus aus Purinanaloga (v.a. Cytarabin, Dosierung: 100-200mg/m² als Langzeitinfusion oder zweimal täglich intravenös) besteht (Rubnitz, 2017, Creutzig et al., 2012). Häufig wird zusätzlich ein drittes Medikament ergänzt (z.B. 6-Thioguanin, Etoposid...), dessen Nutzen jedoch nicht eindeutig belegt werden konnte (Creutzig et al., 2012). Um die angestrebte komplette Remission (CR = engl.: complet remission) zu stabilisieren, folgt eine Erhaltungstherapie, welche bisher nicht einheitlich umgesetzt wird.

1.1.5 Rezidiv und primär refraktäre Akute Myeloische Leukämien

In 85% bis teils über 90% der Fälle kann mittels der 3+7- oder 3+10-Schemata eine CR erreicht werden (Gibson et al., 2011, Creutzig et al., 2013, Gamis et al., 2014). Als prognostisch ungünstig gelten sowohl die 5% der pädiatrischen AMLs, welche

therapierefraktär auf die Induktionsphasen reagieren, als auch die ca. 30% der Patienten, welche ein Rezidiv erleiden (Creutzig et al., 2012). Ungefähr die Hälfte aller Patienten haben spätestens ein Jahr nach Erstdiagnose einen Rückfall („früher“ Rückfall) (Sander et al., 2010). Die häufigsten Rezidive können im Knochenmark (KM) oder in 10% der Fälle im ZNS festgestellt werden. In der erneuten Risikostratifizierung gelten als prognostisch günstig: ein schnelles Therapieansprechen (Kaspers et al., 2009), die Länge der primären CR sowie CBF-Leukämien (= core-binding factor Leukämien) (Sander et al., 2010). Zur Induktion einer zweiten Remission werden erneut v.a. Anthrazykline (begrenzt durch kumulative Dosis) und Antimetabolite (Fludarabin, Cytarabin) eingesetzt. Etwas geringere kardiotoxische Spätfolgen konnten in einer internationalen randomisierten Phase-III-Studie (s. „Relapsed AML 2001/01“) erreicht werden, indem im Vergleich Fludarabin/Cytarabin/G-CSF mit oder ohne liposomales Daunorubicin hinzugefügt wurde. In dieser Studie konnten CRs von 69% bzw. 59% erreicht werden und Überlebensraten aller Patienten von 40 und 35% (Kaspers et al., 2009).

1.1.6 Management der frühzeitigen Rezidiverkennung

Mit Erreichen der CR (definiert als <5% Blasten in einer KM-Probe) kann trotz fehlendem Nachweis von Blasten im Routinelabor eine MRD vorliegen. Die MRD ist somit ein Persistieren von erkrankten Leukämiezellen unterhalb der morphologischen Nachweisgrenze. Die aktuell am Häufigsten genutzten Methoden zur Bestimmung der MRD-Positivität sind die Immun-MRD, welche auf der Technik der Durchflusszytometrie basiert und die Molekular-MRD, welche auf der quantitativen Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (engl.: real-time quantitative polymerase chain reaction; RT-qPCR) fußt. Ihre Sensitivität liegt bei bis zu 10^{-6} für den Nachweis eines einzelnen leukämischen Blast unter einer Million weißer Blutkörperchen (kurz: 1:1000000) (Ossenkoppele and Schuurhuis, 2016).

Die Vielfältigkeit der Immunphänotypen der AML und Antigenverschiebungen während der Therapie können die Nutzung von immunphänotypischen MRD-Assessments bei einigen AMLs limitieren. Trotz der Grenzen können bis zu 96% der AML-erkrankten Kinder mit dieser Methode kontrolliert werden (Creutzig et al., 2012). Gleichzeitig führt die Erweiterung durchflusszytometrischer Assays mit mehr als 6 Farben zu einer positiven Verschiebung der Grenzen (Creutzig et al., 2012). Aktuell ist die RT-qPCR als Molekulare MRD-Technik bei knapp 50% der Patienten anwendbar (Ossenkoppele and

Schuurhuis, 2016). In einer retrospektiven Studie (Sievers et al., 1996) mit Blick speziell auf die MRD bei pädiatrischer AML konnte gezeigt werden, dass MRD-positive ein ca. 2,8-fach höheres Rückfallrisiko als die MRD-negativen AML Patienten besaßen. In einer weiteren Studie (Sievers et al., 2003), ebenfalls mit einer Cut-Off-Schwelle von 0,5% Blasten, lag das Rezidivrisiko bei Patienten mit einer okkulten Leukämie nahezu fünfmal so hoch wie bei MRD-negativen (van der Velden et al., 2010). MRD-Studien mit einem niedrigeren Cut-Off-Wert von 0,1% Blasten zeigten hingegen höhere falsch negative Werte (zwischen 20 und 40% aller untersuchter Patienten waren MRD falsch negativ). Diese Patienten wären aufgrund eines zu niedrig gewählten Schwellenwertes in die Gruppe MRD-negativer Patienten eingeordnet und in Folge einer differenzierten Risikostratifizierung unterbehandelt worden (Ossenkoppele and Schuurhuis, 2016). 2012 hat *Creutzig et al.* das Integrieren von standardisierte MRD-Assessments in die Therapie der AML als erstrebenswert bewertet (Creutzig et al., 2012). Heute ist es kaum noch wegzudenken. Zunehmend werden MRD-Messungen als zeitnahe prognostische Methode angewendet, um einzelne Subpopulationen nach erfolgter Therapie nachzuweisen (Hanekamp et al., 2017).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die MRD ein prognostischer Marker ist, welcher posttherapeutisch Aussagen bzgl. der Effektivität der Behandlung und dem Rezidivrisiko zulässt. Damit ist die MRD ein sehr wichtiger und starker prognostischer Faktor in der AML-Behandlung. Eine möglichst präzise Aussage ist erstrebenswert, um Übertherapien zu vermeiden (Ossenkoppele and Schuurhuis, 2016).

Die Tatsache, dass trotz aller Fortschritte in der Behandlung der kindlichen AML ca. 30% der Patienten ein Rezidiv erleiden, lässt vermuten, dass ein gewisser Anteil der leukämischen Zellen sich der intensiven Polychemotherapie entziehen kann (van der Velden et al., 2010).

Möglicherweise ist die gleiche Zellpopulation, neben einer zu geringen Sensitivität der MRD-Assessments, auch der Grund, warum in seltenen Fällen trotz MRD-Negativität ein Rezidiv nach einiger Zeit entsteht. Ihr Anteil könnte bei der MRD-Messung zu gering sein, um sensitiv nachgewiesen zu werden, jedoch hoch genug, um nach gewisser Zeit ein Rezidiv auszulösen (Terwijn et al., 2014). Der nächste Abschnitt befasst sich näher mit diesen Zellen.

1.2 Krebsstammzellen und Leukämische Stammzellen

1.2.1 Modell der Krebsstammzellen (CSC)

Die Existenz von Krebsstammzellen (CSCs) ist ein Konzept, das veranschaulicht, worauf die Rezidive der AML basieren (Gupta et al., 2009, Shaffer et al., 2012). Diese spezifische Subpopulation von Krebszellen wird in Theorien als besonders resistent beschrieben. Sie besitzen die Eigenschaften sich durch asymmetrische Teilung, stammzellähnlich, selbst erneuern und teilen zu können (Honoki, 2010). Aufgrund dieser Unterschiede zum Hauptanteil der tumorösen Zellen können die üblichen Chemotherapie-Schemata zwar den Großteil der Krebszellen abtöten, jedoch nicht die sehr kleine, undifferenzierte, arzneimittelresistente, sich selbsterneuernde Subpopulation der CSCs. Mit Beendigung der Therapie entsteht hieraus, nach ausreichend langer Zeit, die erneute Leukämie in Form eines Rezidivs (Shaffer et al., 2012).

Diese Hypothese reicht jedoch nicht aus, um alle beobachteten Phänomene in AMLs vollständig zu erklären. So gibt es parallel zum hierarchischen Konzept, dass klonale Expansions-Modell als Theorie der Leukämie Genese. Dieses geht davon aus, dass neben leukämischen Stammzellen auch ausdifferenzierte leukämische Blasten die Eigenschaft zur Induktion der Leukämie hätten (Adams and Strasser, 2008).

1.2.2 Krebsstammzellen der Leukämie

Als Leukämische Stammzellen (LSCs) werden spezifische CSCs der Leukämien bezeichnet. Diese konnten in einem Mausmodell nachgewiesen werden, als *Lapidot et al.* AML Zellen mit CD34 positiver- (CD34+) und CD38 negativer-Expression (CD38-) nutzten, um in anfangs gesunden Mäusen eine AML hervorzurufen (Lapidot et al 1994).

1.2.3 Eigenschaften Leukämischer Stammzellen

Die Oberflächenexpressionsmerkmale CD34⁺/CD38⁻ finden sich auch auf der Oberfläche von hämatopoetischen Stammzellen (HSCs), sodass die Vermutung nahelag, dass LSCs veränderte HSCs sind (Shaffer et al., 2012). Untermauernd kommt hinzu, dass LSCs die gleichen Eigenschaften wie HSCs besitzen. Diese sind in erster Linie (vgl. Ho and Wagner, 2006):

- Selbsterneuerung
- Ausdifferenzierung multipler nachfolgender Zellen
- Leukämieinitiierung

- Hohes Ruhepotential (Quieszenz) und langsame Teilungsfähigkeit

1.2.4 Leukämieinduzierendes Potential von LSC Populationen

Das LSCs tatsächlich aus mutierten HSCs stammen, konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. Ebenfalls vorstellbar ist, dass sie aus einer reiferen Vorläuferzelle des hämatopoetischen Systems herrühren oder es patientenabhängig variiert (Hanekamp et al., 2017). Wichtig ist, dass die ursprünglich von *Lapidot et al.* beschriebene Eigenschaft von LSCs, eine Leukämie neu zu initiieren, weiterhin als beweisgebend für den Nachweis von LSCs gilt (Buss and Ho, 2011).

Weitere Studien (Ng et al., 2016, van Rhenen et al., 2005) wiesen nach, dass genau dieses leukämieinduzierende Potential nicht nur auf CD34⁺/CD38⁻-Populationen begrenzt ist (Hanekamp et al., 2017). *Taussig et al.* zeigten bspw. im Tiermodell, dass 100% einer siebenteiligen Testreihe mit CD34⁺/CD38⁺-Zellen und einer Zellmenge von 10⁶ Zellen eine neue AML auslösten. Allerdings lag die benötigte Dosis für die CD34⁺/CD38⁻-Fraktion deutlich niedriger (Taussig et al., 2008). Insgesamt ist man sich weiter einig, dass trotz der deutlicheren Heterogenität des LSC-Phänotyps, der entscheidende leukämieinduzierende Faktor von den Zellen mit CD34⁺/CD38⁻-Merkmal ausgeht (Hanekamp et al., 2017).

1.2.5 Auswirkungen von LSCs auf den Therapieerfolg

Bachas et al. zeigten die Bedeutung von LSC-Populationen, in dem sie retrospektiv die Hauptpopulationen von Zellen aus Rezidiven untersuchten und mit den ersten Proben des Patienten verglichen. Es wurde deutlich, dass die im Rezidiv deutlichste Population (ungereifte Blasten (CD34⁺/CD38⁻/dim)) bei Erstdiagnose einen minimalen Anteil im Gesamtkontext der Blasten besaß (Bachas et al., 2012).

Da bei Diagnose eine Reihe von Subpopulationen der LSCs bestehen (Ding et al., 2012) scheint es umso wichtiger zu sein, möglichst alle rechtzeitig zu erkennen, um mittels LSC-Bestimmung den Erfolg einer Therapie und das Risiko eines Rezidivs abschätzen zu können (Kronke et al., 2013).

1.2.6 CD34⁺/CD38⁻-Zellen als unabhängiger prognostischer Marker

Es konnte gezeigt werden, dass Zellen mit Arzneimittel-Efflux-Transportern (der ABCB1 und ABC-C-Subgruppe, näheres s. Kapitel 1.3.1) in unreifen Zellen mit dem CD34⁺/CD38⁻-Stammzellprofil assoziiert werden und diese zur Selektion der Population

unter Therapiedruck befähigen. Weiterhin besteht die Assoziation einer ungünstigen Prognose und der gleichzeitigen Expression von ABCB1 plus ABCG2-Transportern in CD34⁺-Zellen älterer AML Patienten (Shaffer et al., 2012). Als weiterer unabhängiger Faktor für einen ungünstigen Verlauf konnte der Anteil des CD34⁺/CD38⁻-Kompartiments an der Gesamtblastenlast gesichert werden. Ein hoher Anteil von Zellen des CD34⁺/CD38⁻-Phänotyps korreliert mit einem schlechten Outcome, welches durch eine erhöhte MRD-Positivität und hohem Rezidivrisiko belegt wurde (Terwijn et al., 2014, Gerber et al., 2012, Khan et al., 2015). Patienten mit einem CD34⁺/CD38⁻-Anteil von >3,5% bei Erstdiagnose hatten ein erhöhtes medianes Risiko für ein Rezidiv (krankheitsfreies Überleben von 5,6 Monaten; engl.: „Disease free survival“ = DFS) im Gegensatz zu Patienten mit einem Fraktionsanteil <3,5% (DFS von 16 Monaten) (van Rhenen et al., 2005). Dies wurde sowohl für die Erwachsenen - (van Rhenen et al., 2005) als auch die kindliche AML (Witte et al., 2011) belegt. Auch der Nachweis einer CD34-Negativität, konnte als prognostisch günstig im Vergleich zu einem geringen oder stark positiven Status ermittelt werden (Hanekamp et al., 2017).

Um weiteres Detailverständnis über die Heterogenität der LSCs und ihrer jeweiligen Relevanz im Krankheitsverlauf und der Therapie von AMLs zu bekommen, ist es nötig, die unterschiedlichen Phänotypen der LSCs zu erforschen. Dies wird u.a. durch Mittel wie der Durchflusszytometrie mit bis zu 10 Farben (Multiparameter Durchflusszytometrie) (Getta et al., 2016), SP-Analysen und ALDH-Bestimmungen angestrebt (Hanekamp et al., 2017). Durch die Erkenntnisse erhofft man sich eine sicherere Abgrenzung der LSCs von HSCs und eine feinere Einteilung von Risikogruppen, um wiederum - auch durch mögliche neue Angriffspunkte - die Therapie zielgerichtet anpassen zu können (Hanekamp et al., 2017). Gleiches wurde bereits durch das Zusammenspiel aus MRD-Bestimmung und LSC-Last erreicht. Gemeinsam führen sie zu einer differenzierten Gruppierung der Risikoklassifizierung als es diese beiden prognostischen Marker einzeln könnten (Terwijn et al., 2014).

1.2.7 Aldehyddehydrogenaseexpression als Nachweis Leukämischer Stammzellen

Neben der Immunphänotypisierung mittels CD34- und CD38-Oberflächenmerkmal ist eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung von LSCs die Färbung der Aldehyddehydrogenase (ALDH) in Zellen. Es konnte nachgewiesen werden, dass Stammzellen im KM besonders reich an ALDH sind (ALDH hochpositiv = ALDH+++).

ALDH schützt die Zellen vor Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Aldehyde (Gerber et al., 2012, Hanekamp et al., 2017). Eine hohe ALDH-Aktivität ist bei CSCs sinnvoll, da somit ein längeres Überleben der Zellen bei ungünstigen Umweltbedingungen gewährleistet wird und die Selbsterneuerung bestehen bleibt. Im KM eines Gesunden und bei der Mehrzahl der AML KM-Proben beinhaltet die Fraktion der CD34⁺/CD38⁻/ALDH⁺⁺⁺ ausschließlich HSCs (Gerber et al., 2012, Hanekamp et al., 2017). Jedoch konnte neben dieser Fraktion bei AML-Patienten eine weitere Population mit mittlerer ALDH-Intensität (ALDH⁺⁺) abgegrenzt werden. Sortiert und aufgearbeitet besaß diese ALDH⁺⁺-Population leukämisch, zytogenetische Eigenschaften und induzierte in anschließenden Transplantationen am Mausmodell am effektivsten eine neue AML. Sie reicherten sich auch in MRD-Kontrollen vermehrt an, sodass ihr Nachweis schließlich am Ende einer Behandlung als starker Prädiktionsfaktor für ein Rezidiv diente (Gerber et al., 2012, Hanekamp et al., 2017). In sehr geringen Fällen wurde auch von einer AML mit ALDH⁺⁺⁺-Expression berichtet. Es wird vermutet, dass diese LSCs von besonders unreifen hämatopoetischen Zellen abstammen. Patienten mit diesen Charakteristika werden mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Gerber et al., 2012).

Zusammenfassend kann man sagen, dass LSCs ähnlich wie HSCs die ALDH überdurchschnittlich hoch exprimieren. Eine Blockade der ALDH würde zu erhöhtem zellulären Stress durch ansteigende ROS-Spiegel führen. Eine selektive Blockade der ALDH in CSCs könnte ein therapeutisches Ziel sein, um in einer Chemotherapie den Anteil auch von LSCs zu reduzieren. Die Selektivität müsste eine ALDH-Blockade in physiologischen Stammzellen wie HSCs ausschließen.

1.3 (Zelluläre) Mechanismen der Resistenz und Multidrug Resistance

Neben den Eigenschaften der Pluripotenz und Selbsterneuerung sind LSCs bekannt für ihre Resistenz gegen zahlreiche Arzneimittel (engl.: Multidrug resistance, MDR).

1.3.1 ATP-Bindungskassetten-Transporter als Resistenzmechanismus

Eine Form der biochemischen Resistenz von Leukämiezellen beruht auf dem Vorhandensein von adenosintriphosphat-(ATP) verbrauchenden Transportern. Transporter der ABC-Familie (engl.: „ATP-binding cassette“) sind Beispiele solcher ATP-verbrauchenden Pumpen innerhalb der Biomembran von Zellen. Diese können

zellschädigende Stoffe, u.a. auch Zytostatika (wie bspw. Anthrazykline), erfolgreich aus dem Zellplasma zurück ins Blut pumpen (Cordon-Cardo et al., 1989). Der bekannteste Transporter ist der ABCB1-Transporter (auch P-Glycoprotein 1 (P-gp-1) bzw. MDR1 genannt). ABCB1 ist als Vertreter dieses Efflux-zugrundeliegenden Resistenzmechanismus überdurchschnittlich hoch in Zellmembranen von AML-Zellen exprimiert (Marzac et al., 2011) und wird in über 50% der arzneimittelresistenten Krebszellen vorgefunden (Januchowski et al., 2014).

Neben ABCB1 gibt es insgesamt 49 weitere Gene, die für Transporter der ABC-Familie codieren, welche in insgesamt sieben Familien eingeteilt werden (Vasiliou et al., 2009).

Wichtige ABC-Transporter in Bezug auf Krebs sind (vgl. Liu et al., 2018):

- ABCB4 (P-gp-3 bzw. MDR3 genannt)
- ABCC1 (MRP1 – Multidrug-related protein1)
- ABCC4 (MRP4)
- ABCG2 (BCRP – breast cancer resistance protein)

1.3.2 Co-Expressionen von ABC-Transportern

Bereits 1994 postulierte *Zöchbauer et al.*, dass mit Höhe der ABCB1-Expression die Erfolgchancen auf eine CR geringer würden (Zochbauer et al., 1994). Erst kürzlich bestätigte und erweiterte *Liu et al.* diese These, indem sie zeigten, dass nicht nur die Überexpression eines einzelnen Transports die Heilungsaussichten verringern, sondern die Co-Expression mehrere ABC-Transporter (s.o.) mit einem ungünstigen Outcome von Patienten korreliert (Liu et al., 2018). Die Ergebnisse von *Liu et al.* stimmten überein mit der Risikoeinteilung entsprechend der NCCN-Richtlinien (National Comprehensive Cancer Network, USA). Patienten mit einem günstigen Risikoprofil [inv(16), t(16;16) oder t(8;21) bzw. normaler Zytogenetik und NPML1-(Nucleophosmin) Mutation ohne FLT3-ITD (engl.: „FMS-like tyrosine kinase 3 with internal tandem duplication“) oder isolierter Biallelischer CEBPA-(engl.: „CCAAT/enhancer-binding protein, alpha“) Mutation] hatten somit einen geringen Anteil und Patienten mit einem ungünstigen Profil (komplexer Karyotyp oder normale Zytogenetik, aber FLT3-ITD-Mutation positiv) einen ausgeprägten Anteil hochregulierter ABC-Transporter (Liu et al., 2018).

Zusammenfassend kann die Gesamtzahl überexprimierter ABC-Transporter in den AML-Zellen eines Erkrankten als unabhängiger Prognosefaktor für das Therapieergebnis gewertet werden (Liu et al., 2018).

Die Wichtigkeit der Co-Expression von Effluxpumpen könnte auch erklären, warum zielgerichtete Therapieversuche, welche die Effluxeffektivität der ABCB1-Transporter hemmen sollten, um die Chemotherapeutikawirkung zu erhöhen, bisher nicht den erwünschten Erfolg in der Behandlung von AML zeigten (bspw. ECOG E3999-Studie) (Shaffer et al., 2012). Im Falle einer selektiven Hemmung von ABC-Transportern könnten die übrig gebliebenen, anstelle der inhibierten Transmembranpumpe, die schützende Effluxfunktion übernehmen (Chen et al., 2016)

Genau wie ABCB1 und ABCB4 wurden auch ABCC1 und ABCG2 mit dem Efflux von Zytostatikern aus Zellen der AML in Verbindung gebracht (Marzac et al., 2011). Dieser Ausstrom von Arzneimitteln zurück ins Blut limitiert die Effektivität und die Dauer des Einsatzes von Zytostatika wie Anthrazyklinen (Chen et al., 2016).

1.3.3 Zellteilungsaktivität als Resistenzmechanismus

Ein weiterer, seit langer Zeit bekannter Resistenzmechanismus ist, dass LSCs sich zu ca. 85% in der G0/G1-Phase des Zellzyklus befinden und somit inaktiv und ruhend sind (Won et al., 2015, Liu et al., 2013). Sie teilen sich eher langsam im Vergleich zu den gewöhnlichen leukämischen Blasten. Da die meisten klassischen Chemotherapeutika auf aktive sich schnell teilende Zellen abzielen, können LSCs bereits durch diese Eigenschaft resistent gegen Chemotherapeutika und Strahlentherapie sein (Lapidot et al., 1996, Reya et al., 2001, Won et al., 2015).

1.4 Darstellung der Side Population durch Hoechst 33342

Hoechst 33342, ein DNA-bindender Farbstoff, wird zur Anfärbung von Leukämiezellen genutzt (näheres s. Kapitel 2.2.8, S. 36ff.). Aufgrund der Expressionsheterogenität von ABC-Transportern in der Biomembran von Leukämiezellen wird der Hoechst-Farbstoff unterschiedlich stark von den Zellen ausgestoßen bzw. in die DNA eingelagert. Hierbei zeichnet sich im Durchflusszytometer eine besondere Population von Zellen ab, die „Side Population“ (SP) genannt wird (Goodell et al., 1996). Die Zellen innerhalb dieser Fraktion enthalten besonders viele bzw. effektive Pumpen und können sich besonders gut der Leukämie-Therapie entziehen (Boesch et al., 2012, Richard et al., 2013, Wang et al., 2013). Die SP ist Hoechst 33342 niedrig angefärbt. Es konnte nachgewiesen werden, dass hierin enthaltene CD34⁻- und CD34⁺-Zellen (Feuring-Buske and Hogge, 2001, Wulf et al., 2001) in NOD/SCID- (engl.: „Non-Obesed Diabetic“; „Severe Combined

Immunodeficiency“) Mäusen leukämie-induzierend sind (Wang et al., 2013, Roshal et al., 2013).

1.5 Leukämische KG-1a-Zellen

Die KG-1a-Zelllinie ist eine akute myeloische Leukämie des Subtyps M0 (Zhang et al., 2010), welche von einem männlichen 59-jährigen kaukasischen Patienten als Derivat der KG-1-Zelllinie stammt (Mack, 2015). Im Vergleich zu anderen AML-Zelllinien besitzt sie einen relativ hohen Prozentsatz an Hoechst-SP-Zellen, in welchem überwiegend CD34⁺/CD38⁻-Zellen nachgewiesen wurden (Mattes, 2015). KG-1a-Zellen sind daher für die Erforschung der LSC-Biologie sowohl für in-vitro- als auch in-vivo-Versuche angesehene Zellen (Xu et al., 2017). Zusätzlich besitzt sie einen ABC-Membrantransporter zum Ausschleußen von Antikrebsarzneimittel zur erhöhten Chemoresistenz der LSCs (Fardel et al., 1998).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Verhalten der Hoechst-SP unter Inkubation mit Doxo und DSF. Insbesondere bestand die Frage, ob DSF die Resistenzmechanismen der LSCs überwinden und eine Sensitivierung in Kombination mit Doxo bewirkt. Die Wahl der KG-1a-Zelllinie mit ihrer deutlichen SP lag daher für unsere Experimente nahe.

1.6 Anthrazykline und ihr Vertreter Doxorubicin

Eine Gruppe wirksamer Zytostatiker sind die Anthrazykline. Aufgrund ihrer wichtigen Rollen sind Anthrazykline in die Liste der unentbehrlichen Arzneimittel der WHO mit aufgenommen worden (McGowan et al., 2017). Doxo, ein Vertreter der Anthrazyklin-Familie, wird breit in der antitumorösen Behandlung von soliden als auch hämatologischen Malignomen eingesetzt (Peiris et al., 2017, Cortes-Funes and Coronado, 2007).

1.6.1 Wirkmechanismus von Doxorubicin als Topoisomerase-Inhibitor

Seinen Hauptwirkmechanismus, die Bildung zyotoxischer DNA-Doppelstrangbrüche, erzielt Doxo durch eine Komplexbildung mittels Anlagerung an die DNA und den Topoisomerase 2 Isoenzymen alpha (Top2 α) und beta (Top2 β) (Tewey et al., 1984). Beide Isoenzyme unterscheiden sich in ihrem Effekt als DNA-Doxo-Top2-Komplex. Während der Top2 α -Komplex einen Zellzyklus-Arrest in G₁/G₂ (engl.: „Gap1“- und „Gap2-Phase“) mit anschließender Apoptose bewirkt, löst der Top2 β -Komplex eine Funktionsstörung der mitochondrialen Atmungskette über die Hemmung des Peroxisom-

Proliferator-aktivierenden Rezeptors (PPAR) aus (Finck and Kelly, 2007). Die intensive Wirkung an Zellen mit hoher Top2 α -Expression (wie maligne Tumorzellen) bringt (Carpenter and Porter, 2004) – durch den gleichzeitigen Effekt des Top2 β -Komplexes – auch starke dosisabhängige Nebenwirkungen in ruhenden Zellen wie Kardiomyozyten mit sich. Hohe kumulative Dosen können zu Kardiomyopathien und Herzinsuffizienz führen und das Leben von Patienten nach der Krebserkrankung deutlich beeinträchtigen (Hahn et al., 2014). Doxo benötigt jedoch die Top2 β , um überhaupt an die DNA binden zu können (Tewey et al., 1984, McGowan et al., 2017).

Für die Schäden am Herzen sind, neben der Beeinflussung der Topoisomerase 2 (McGowan et al., 2017) und Bildung freier Radikale, auch die Beeinträchtigung der Mitochondrien, Hemmung von Reparaturmechanismen an den Myofibrillen sowie die Inhibierung der Synthese von DNA und Proteinen ursächlich (Sonawane et al., 2018).

1.6.2 Kardiotoxische Nebenwirkungen von Doxorubicin

Bereits in den 1970er Jahren wurden die kardiotoxischen Nebenwirkungen der Anthrazykline deutlich. Die erste Beschreibung einer dosisabhängigen symptomatischen Herzinsuffizienz, welche durch Doxo ausgelöst wurde, erfolgte 1979 (Von Hoff et al., 1979, McGowan et al., 2017). Später veröffentlichte *Swain et al.* eine neuere Arbeit, durch welche der aktuelle kumulative doxo-äquivalente Lebenszeitrichtwert von $\leq 450 \text{mg/m}^2$ (ohne vorherige Brustbestrahlung) geprägt ist (Swain et al., 2003). Es ist schwierig, das Ausmaß der Anthrazyklin-Kardiotoxizität einheitlich in Zahlen zu fassen, da es keine allgemeingültige Definition gibt (McGowan et al., 2017). Man unterscheidet die klinische auffällige Herzinsuffizienz (ca. 2-4%), von dem asymptomatischen Verlust der LVEF (= Linksventrikuläre Ejektionsfraktion) (ca. 9-11%), der Arrhythmie (ca. 12%) und einer Erhöhung kardialer Biomarker (ca. 30-35%) aller behandelten Patienten (McGowan et al., 2017).

Als prädiktive Faktoren für ein erhöhtes kardiotoxisches Risiko bei anthrazyklin-haltiger Therapie sind anerkannt (vgl. Lipshultz et al., 1995):

- a. junges Lebensalter (v.a. < 7 Jahren)
- b. weibliches Geschlecht
- c. hoher Körperfettanteil
- d. hohe kumulative Anthrazyklin-Dosis
- e. Bestrahlung der Brust

1.6.3 Wirkung von Doxorubicin in Bezug auf den Zellzyklus

Doxo greift in den Zellzyklus durch Bildung von Doxo-DNA-Top2-Komplexen ein (Tewey et al., 1984). Dies ist der physiologischen Funktion von Topoisomerasen mit Beteiligung an der Replikation, Transkription, Rekombination sowie der Chromatinveränderung der Zell-DNA geschuldet (Champoux, 2001). Die Top2 α ist in malignen Zellen überexprimiert (s. Kapitel 1.6.2, S. 14), in den Stadien G₂/M (engl.: „Gap2/Mitosis“) des Zellzykluses jedoch nochmals besonders hoch (Carpenter and Porter, 2004). Außer den proapoptotischen Wirkmechanismen von Doxo kann ein durch doxo-induzierter DNA- Einzelstrang- oder Doppelstrangschaden auch zum Zellzyklus-Stillstand von Tumorzellen führen (Kim et al., 2009). Zellen mit geringen DNA-Schäden treten nach einem kurzzeitigen Arrest und gleichzeitiger Reparatur wieder in den Zellzyklus ein. Maligne Zellen mit subletalen, schwerwiegenden DNA-Schäden führen zu einem dauerhaften Zellzyklus-Stillstand (Di Leonardo et al., 1994, Siu et al., 1999). Sowohl an den G₀/G₁ als auch an den G₂-Kontrollpunkten des Zellzyklus können solche doxo-induzierten Stillstände eintreten (Lowe and Lin, 2000).

1.6.4 Relevanz der Verbesserung kardiotoxischer Anthrazyklin-Regime

Die genaue Erforschung der Mechanismen sowie kardioprotektive Maßnahmen sind insofern nützlich, als dass die Anzahl krebsüberlebender Patienten in der Bevölkerung, dank verbesserter Therapieregime stetig zunimmt. In Großbritannien sind die Zahlen krebsüberlebender Kinder in den letzten fünf bis sechs Dekaden um 200% gestiegen (McGowan et al., 2017). Bis zu 60% dieser krebsüberlebenden Kinder werden mit einem Anthrazyklin-enthaltenden Therapieregime behandelt (Smith et al., 2010). Bei Brustkrebspatientinnen, welche neun Jahre lang nach erfolgreicher Therapie kontrolliert wurden, war die häufigste Todesursache nicht das Brustkrebsrezidiv (15,1%), sondern eine kardiovaskuläre Todesursache (15,9%) (Patnaik et al., 2011). Ebenfalls hatten krebsüberlebende im Kindesalter nach einer Beobachtungszeit von 45 Jahren unter allen Todesursachen eine 13%-ige Herztodesrate. Die annualisierte Herztodesrate nach 30 Jahren (0,14%) lag über der des Krebsrezidivs (0,05%) (Mertens et al., 2008).

1.6.5 Kardioprotektion durch Kombinationstherapien und weitere Strategien zur Senkung der Kardiotoxizität von Doxorubicin

Trotz zahlreicher Studien zu kardioprotektiven Behandlungen haben einige vielversprechende Präparate keinen signifikanten Unterschied in klinischen Studien

gezeigt (darunter N-Acetylcystein, (Dresdale et al., 1982); Kalziumantagonisten, (Kraft et al., 1990, Milei et al., 1987); Amifostin (Nazeyrollas et al., 2003, Dragojevic-Simic et al., 2004) und Coenzym Q10 (Iarussi et al., 1994)). Nur wenige Medikamente konnten signifikant die Kardiotoxizität nach einer Therapie mit Doxo senken (McGowan et al., 2017). Zu den erfolgsversprechenderen Ergebnissen zählen Arzneimittel zur Hemmung des Renin-Angiotensinsystems (Enalapril (Bosch et al., 2013, Cardinale et al., 2006, Cardinale et al., 2015)), β -Blocker (Carvedilol (Bosch et al., 2013, Cardinale et al., 2015, El-Shitany et al., 2012) und Nebivolol (Kaya et al., 2013)) oder der Eisenchelator Dexrazoxan (Hasinoff et al., 2003, Asselin et al., 2016, Smith et al., 2010).

Die Einbindung von Doxo in Liposomen führte sowohl zu weniger klinischen als auch subklinischen Kardiotoxizitäten ohne die antineoplastische Wirkung zu reduzieren (Smith et al., 2010).

Es werden auch unkonventionelle Verfahren ausgetestet. Die ERIC-ONC Studie (engl.: „Effect of Remote Ischaemic Conditioning in Oncology Patients“) ist eine verblindet, randomisierte kontrollierte Studie, welche den Effekt von „Remote-Ischaemic-Conditioning“ (RIC – engl. für: Fern-Ischämische Konditionierung) bei Krebspatienten, die eine anthrazyklinhaltige Chemotherapie bekommen, untersucht. Den Patienten wird hierfür wiederkehrend eine Gliedmaße mittels Blutdruckmanschette abgeschnürt (Ischämie-Phase) und reperfundiert. Man erhofft sich dabei eine Senkung der subklinischen Myozytenverletzungen (Chung et al., 2016), indem pro-überlebende Bahnen akquiriert werden, welche die Abläufe der Anthrazyklin-Kardiotoxizitäten verändern (Pickard et al., 2016).

1.6.6 Doxorubicin und ABC-Transporter

Doxo ist ebenfalls ein Substrat, welches dem Ausschleußen durch ABC-Transportern (Huo et al., 2017) in der Biomembran der Leukämiezellen unterliegt. Leukämiezellen, welche Transporter der ABC-Familie überexprimieren, allen voran die LSCs, können sich somit erfolgreich der Therapie durch Doxo entziehen. Durch ein Wiederaufflammen der Erkrankung wird eine Anschlussbehandlung nötig, die häufig ebenfalls mit Anthrazyklinen wie Doxo erfolgt. Hierdurch entstehen erhöhte kumulative Anthrazyklindosen, die das Risiko der bekannten kardiotoxischen Spätfolgen am Herz erhöhen (Creutzig et al., 2013).

Eine Blockade der transmembranen Effluxpumpen könnte die Effizienz von Doxo intrazellulär erhöhen. Zudem würde eine Hemmung der ABC-Transporter in AMLs die Eradikation von LSCs fördern und das Rezidivrisiko senken. Die aus beiden Effekten resultierende Dosisersparung würde neben der Gefahr für Kardiotoxizitäten gleichzeitig Kosten im Gesundheitssystem für Follow ups und Folgebehandlungen senken.

1.7 Disulfiram

1.7.1 Neuverwendung eines etablierten Medikaments

Als Repositionierung wird das Forschen an bereits zugelassenen Medikamenten bezeichnet, welche neben ihrer bisherigen Wirkung vermutlich zusätzliche Effekte im Körper besitzen (Papaioannou et al., 2014). Diese Neuverwendung von Arzneimitteln hat in den letzten Jahren zunehmend Interesse gefunden, da die Entwicklung und die Anwendung neuer Medikamente sehr kostenintensiv und teils langwierig ist (Xu et al., 2017). Ein dabei auch in zellbasierten Hochdurchsatz-Screenings (Iljin et al., 2009) wegen seines antineoplastischen Effektes in zahlreichen Studien auffällig gewordenes Arzneimittel ist Tetraethylthiodisulfid (Antabuse® oder Disulfiram, DSF) (Cen et al., 2004, Cvek, 2012). Das Interesse an DSF ist nicht nur so groß, weil eine Therapie besonders kostengünstig wäre (Cvek, 2012), sondern da unterschiedlichste Malignome, einschließlich tumorinduzierende bzw. Zellen mit Stammzeleigenschaften, sensibel in Versuchen auf DSF reagiert haben (Yip et al., 2011).

1.7.2 Hauptwirkmechanismus von Disulfiram in der Alkoholentwöhnung

Bereits seit über 6 Jahrzehnten als Alkoholentwöhnungsmedikament zugelassen ist DSF ein bekanntes Arzneimittel in der Suchttherapie (Suh et al., 2006). Der alkoholentwöhnende Wirkmechanismus erfolgt hauptsächlich über einen DSF-Metaboliten: Diethyldithiocarbamat (Dithiocarb, DC). DC bewirkt in der Leber die irreversible Inhibierung der ALDH (Shen et al., 2001). Hierbei kommt es beim Konsum von Alkohol zum Akkumulieren statt zum Abbau von Acetaldehyd. Die Folgen sind Symptome wie Übelkeit, Erbrechen, Kreislaufbeschwerden wie Herzrasen und Blutdruckabfall bis hin zum Kreislaufversagen.

1.7.3 Wirkung von Disulfiram in malignen Zellen

Neben der Hemmung der ALDH ist DSF zusätzlich über seinen Metaboliten DC ein Kupfer-(Cu)-Chelator (Tawari et al., 2015, Xu et al., 2017). Seinen antineoplastischen

Effekt erzielt DSF kupferabhängig (Duan et al., 2014, Conticello et al., 2012, Bista et al., 2017). Hohe intrazelluläre Cu-Spiegel in Tumorzellen wirken proliferationsfördernd und sind für die tumorinduzierte Neovaskularisation notwendig (Antoniades et al., 2013). Als DC-Cu-Komplex gelangt DSF vermehrt in Tumorzellen. Hierin wird auch die selektive Wirkung von DSF in Krebszellen gegenüber nicht entarteten Zellen angenommen (Duan et al., 2014). Als Wirkmechanismen werden anerkannt (vgl. Bista et al., 2017), die:

- a. Inhibierung des Proteasoms
- b. Entstehung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies
- c. Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Hemmung

1.7.3.1 Disulfiram als Inhibitor des Proteasoms

2006 zeigten *Chen et al.*, dass die antineoplastische Wirkung von DSF über die Beeinträchtigung des Proteinabbaus am Proteasom der Zelle entsteht (Chen et al., 2006). Während *Chen et al.* sich auf die Hemmung des 20S-Proteasoms bezieht, beschrieben *Lövborg et al.* im selben Jahr eine 26S-Proteasom-Inhibition. Auch wenn die endgültigen Mechanismen noch nicht komplett geklärt sind, so ist man sich einig, dass die Funktion des Proteasoms durch DSF gemindert wird. Diese Inhibierung führt zur Anhäufung fehlgefaltener und in Folge toxisch wirkender Proteine, welche die Aktivierung von Hitzeschockproteinen induzieren können (Papaioannou et al., 2014).

1.7.3.2 Bortezomib als Proteasom-Inhibitor

Neben DSF besitzt auch Bortezomib (BZ) proteasominhibierende Funktionen (Colado et al., 2008). Sein synergistischer Effekt zur normalen Chemotherapie lässt den Anteil besonders resistenter AML-Zellen mit Stammzeleigenschaften verringern (Colado et al., 2008). BZ setzt über die chymotrypsin-ähnliche Wirkung hemmend an der $\beta 5$ -Untereinheit des 26S-Proteasoms an. Die chymotrypsin-ähnliche Aktivität ist die maßgebliche Reaktion für den Proteolyseablauf in einer Zelle (Rajkumar et al., 2005). Jedoch besitzen bspw. AML-Linien auch Resistenzen gegen BZ (Lu and Wang, 2013), sodass alternative Proteasominhibitoren für die Zukunft wichtig sind.

Es gibt Hinweise, dass DSF über einen anderen Mechanismus als BZ am Proteasom wirkt. In Versuchen von *Bista et al.* reagierten BZ-resistente AML-Zellen nahezu ohne Dosissteigerung weiterhin empfindlich auf die Inkubation mit DSF (Bista et al., 2017). Damit wurde gezeigt, dass DSF die Wirkung von BZ in besonders resistenten Zellpopulationen übertreffen kann (Bista et al., 2017).

1.7.3.3 Beeinflussung der p97-ATPase und NPL4 durch Disulfiram

Die p97-ATPase ist ein Coenzym zur Regulierung der Proteasomaktivität. Sie kann bereits ubiquitylierte Proteine schneller zum Proteasom transportieren lassen und somit den Proteinabbau durch das Proteasom beschleunigen. p97 hat zahlreiche Funktionen, welche cofaktorabhängig induziert werden. Einer von vielen solcher Cofaktoren ist „nuclear protein localization 4“ (NPL4). NPL4 unterstützt die Funktion des Endoplasmatischen Retikulum (ER)-assoziierten Proteinabbaus (ERAD, engl.: „endoplasmic-reticulum-associated protein degradation“). Durch den p97-NPL4-Komplex wird im ER die Richtung der Ausschleußung falsch gefalteter Proteine wieder zurück ins Zytosol vorgegeben. Im Zytosol kann es ubiquityliert und proteasomal abgebaut werden (Madsen et al., 2009).

In mehreren Studien (Mamma-, Prostata- und Kolorectales Karzinom) korrelierte eine p97-Überexpression mit einem fortgeschrittenen und metastasierten Tumorstatus (Skrott et al., 2017). Einige Veröffentlichungen nennen daher den p97-NPL4-Weg als ein mögliches zukünftiges therapeutisches, onkologisches Ziel (Anderson et al., 2015, Deshaies, 2014, Skrott et al., 2017).

1.7.3.4 Erhöhung der Reaktiven Sauerstoffspeziesspiegel und deren Folgen

Durch die irreversible Hemmung der ALDH, welche in LSCs überexprimiert ist (Liesveld, 2012) (s. Kapitel 1.2.7, S. 9ff.), kommt es zu hohen ROS Leveln in Leukämiezellen (Hanekamp et al., 2017, Gerber et al., 2012). Hohe Konzentrationen von ROS innerhalb der Krebszelle leiten nach einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und oxidativer Schädigung von Lipiden, Proteinen und der DNA der Zelle, letztendlich deren Apoptosemechanismen ein (Gupte and Mumper, 2009, Xu et al., 2017).

ROS modulieren außerdem den JNK-Signalweg (JNK = C-Jun-N-terminale Kinase). Indem ROS JNK-Inhibitoren durch Oxidation inaktivieren, wird indirekt der proapoptotische JNK-Signalweg aktiviert (Zha et al., 2014). Die vermehrte Bildung von ROS (Chiba et al., 2014) und das Auslösen des JNK-Signalweges durch DSF korrelieren miteinander (Chiba et al., 2014, Liu et al., 2012).

Hinzu kommt die Inhibierung des nuklearen Faktors-kB (NF-kB) (Zha et al., 2014, Lovborg et al., 2006, Xu et al., 2017) und die Beeinflussung des Transkriptionsfaktors NF-E2 verwandten Faktors 2 (= Nrf2, engl.: „nuclear factor-E2-related factor 2“).

Als Überlebensfaktor moduliert NF- κ B bei erhöhten Stressleveln der Zelle Überlebensmechanismen. Der Nrf2-Signalweg löst antioxidative Reaktionen als Folge von zu hohen ROS-Spiegeln innerhalb einer Zelle aus (Zha et al., 2014), um letztendlich die Zelle vor schädlichen Einflüssen zu schützen (Sporn and Liby, 2012). Die Hemmung von NF- κ B und Nrf2 verschiebt somit erneut das Gleichgewicht in Richtung proapoptisch. Erhöhte NF- κ B und Nrf2-Expressionen sind zusätzlich mit vermehrten Resistenzen gegen Chemotherapeutika assoziiert. Eine Hemmung verspricht eine Sensibilisierung von resistenten Krebszellen auf bisherige Chemotherapien. *Xu et al.* zeigten, dass DSF oder DSF/Cu die Nrf2-Spiegel in CD34⁺/CD38⁻/KG1a-Zellen signifikant senken (Xu et al., 2017). *Skrott et al.* berichteten zusätzlich, dass auch die Inhibierung der p97-Segregase und deren Signalweg, die Nrf1 (engl. „Nuclear respiratory factor 1“), welche mit Nrf2 gemeinsam agiert, gehemmt wird. (Skrott et al., 2017).

1.7.3.5 Hemmung der Methylguanin-DNA-Methyltransferase

Die Hemmung der Methylguanin-DNA-Methyltransferase als antineoplastischer Wirkmechanismus von DSF, wie sie *Paranjpe et al.* in ZNS Tumoren festgestellt haben (Paranjpe et al., 2014), ist in der AML derzeit von geringerer Bedeutung, sodass in dieser Arbeit nicht weiter darauf eingegangen wird.

1.7.4 Wirkung von Disulfiram in Bezug auf den Zellzyklus

Tesson et al. zeigten kürzlich an Neuroblastom- (SK-N-BE) und Gliomzelllinien (UWV), dass DSF/Cu die S-Phasenprogression – nach einer zuvor durchgeführten Thymidinblockade in der frühen S-Phase – hemmt. Desweiteren widerlegten sie Vermutungen früherer Arbeiten, dass das Interkalieren von Cu-Komplexen mit der DNA (Li et al., 2014, Lu et al., 2014) oder die Hemmung der DNA-Replikation an der Replikationsgabel (Yakisich et al., 2001) die Zytotoxizität von DSF bzw. DSF/Cu bewirken könnte. Vielmehr stellten sie die These auf, dass enzymatische Regulationsmechanismen der DNA-Synthese durch DSF/Cu hemmend beeinflusst werden (Tesson et al., 2017). Gestützt wird diese Vermutung durch die Eigenschaft von DSF, gemischte Disulfide mit Zellkomponenten zu bilden (Nagendra et al., 1991). DNA-Replikationsenzyme enthalten thiolhaltige Moleküle, welche reaktionsfreudig mit DSF gemischte Disulfide bilden (Sengupta and Holmgren, 2014). Weiterhin werden kleine thiolhaltige Substrate wie Glutathion benötigt, um aus Ribonukleotide Desoxyribonukleotide für die DNA-Synthese zu bilden (Pallardo et al., 2009). Das Fehlen

der Replikationsenzyme als auch der weiteren thiolhaltigen Moleküle können ein Grund für eine Hemmung der DNA-Synthese durch DSF sein (Tesson et al., 2017, Paranjpe and Srivenugopal, 2013). Eine Behandlung mit DSF/Cu führte in beiden Zelllinien zu einer Zunahme der G₂/M-Population, welches sie, auch durch den Nachweis einer geringeren Expression von Gesamt-CDK1 (engl.: „cyclin-dependent kinase 1“), als G₂-Phasen-Stillstand interpretierten. Geringe Konzentrationen des gesamten CDK1 beeinflussen den Übergang in die Mitose-Phase negativ (Johnson et al., 2009). In Kombination mit einer Bestrahlung hemmt DSF/Cu jedoch den strahlungsinduzierten G₂-Phasen-Arrest des Zellzykluses von unsynchronisierten Zellen (Tesson et al., 2017). Bei weiterhin erniedrigten Gesamt-CDK1-Werten wurde vermutet, dass weniger Zellen die S-Phase abschließen konnten, um in die G₂-Phase überzugehen, und der Anteil der G₂-Population somit abnimmt. In synchronisierten Zellen, welche am Übergang der S- in die G₂-Phase behandelt wurden, konnte der gleiche Effekt jedoch nicht reproduziert werden. Die Ausprägung der Zellen im G₂-Arrest war sowohl in alleiniger Bestrahlung als auch in der Kombinationstherapie gleich groß. Es wurde geschlussfolgert, dass DSF/Cu einen zytostatischen Effekt mit Störung der DNA-Synthese in der S-Phase habe, zusätzlich die Expression von CDK1 senke und somit einen G₂-Arrest durch die Unterbindung des Übergangs in die Mitose bewirke (Tesson et al., 2017).

In weiteren Beispielen zeigte DSF eine Sensibilisierung zytostatischer Arzneimittel, welche in Kombinationsbehandlungen zu einer Erhöhung der G₂/M-Phase führte (Paranjpe et al., 2014, Guo et al., 2010).

1.8 Fragestellung der Dissertationsarbeit

Diese Arbeit untersucht schwerpunktmäßig das Verhalten der SP-Fraktion von KG-1a-Zellen in Hoechstfärbetechnik nach singulärer Inkubation von Doxo bzw. DSF über 72 Stunden (h) und in Kombinationsversuchen von Doxo und DSF über 72 und 120h.

Zusätzlich wurden dosis- und zeitabhängige Daten bezüglich des zytotoxischen und proliferationshemmenden Effektes der Wirkstoffe während dieser Versuche erhoben.

Zuletzt wurde das Verhalten der KG-1a-Zellen und ihre Verteilung im Zellzyklus nach Inkubation mit Doxo bzw. DSF und in Kombination untersucht, um zu beantworten, inwiefern die Medikamente in den Zellzyklus eingreifen. Alle Abschnitte zusammen sollen die Frage beantworten, ob die Kombination aus Doxo und DSF die LSCs in Form der Hoechst-SP beeinflussen.

2 Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden nach Aufzählung aller verwendeten Materialien (Verbrauchsgegenstände, Geräte, Chemikalien und Stammlösungen, etc...) die chronologische Herangehensweise eines Versuches und die dabei angewandte Methodik der jeweiligen Unterschritte erläutert.

2.1 Material

2.1.1 Geräte- und Verbrauchsliste

Tabelle 1: Geräte- und Verbrauchsliste

Name des Gerätes	Hersteller
6-Well-Cell-Culture-Plate	Costar
Beheizbares Wasserbad <i>Typ WB7</i>	Memmert
Cell Culture Flasks (50; 250; 550ml)	Greiner Bio-One GmbH
Cellstar Tubes (15; 50ml)	Greiner Bio-One GmbH
Durchflusszytometer FACS LSR II	Becton Dickinson GmbH
Hera cell Incubator (37°C)	Heraeus instruments GmbH
Kühlschrank (+4°C)	Liebherr-International GmbH Deutschland
Parafilm <i>M</i>	Bemis Company, Inc.
Pipettiergerät <i>PipettBoy Acu</i>	Integra Bioscience GmbH
Pipettiergerät <i>PipettBoy Plus</i>	Integra Bioscience GmbH
Pipettenspitzen 10µl	Biozym Scientific GmbH
Pipettenspitzen 200µl	Sarstedt AG & Co.
Pipettenspitzen 1000µl	Greiner Bio-One GmbH
Pipettenspitzen 2; 20; 100; 5000µl	Rainin – Mettler-Toledo GmbH
Polystyrene Round Bottom Tube, 5ml	Falcon
Safe-Lock-Tubes 0,5; 1,5ml	Eppendorf AG
Sterile Plastikpipetten 1; 2; 5; 10; 25; 50ml	Costar
Sterile Werkbank <i>Hera safe</i>	Heraeus instruments GmbH
Verstellbare Pipetten <i>Pipetman</i> 10; 20; 100; 200; 1000µl	Gilson, Inc.
Verstellbare Pipetten <i>Pipet-Lite XLS</i> 2; 20; 100; 5000µl	Rainin – Mettler-Toledo GmbH
Zell-Counter (ABX)	Axonlab AG
Zellsiebe <i>Cell Strainer</i>	BD Biosciences
Zentrifuge Rotina 420R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG

2.1.2 Allgemeine Chemikalien

Tabelle 2: Allgemeine Chemikalien

Name der Chemikalie	Hersteller
Aqua destilliert	B. Braun Melsungen AG
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka Chemie GmbH
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), high glucose 4,5g/l)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dulbecco's Phosphat buffered saline (PBS)	PAA – The cell culture company
FACS Clean	Becton Dickinson GmbH
FACS Flow	Becton Dickinson GmbH
FACS Rinse	Becton Dickinson GmbH
Fetal Bovine (Calve) Serum (FCS)	Gibco Life Technologies
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
L-Glutamin	Biochrom GmbH
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Biochrom GmbH
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)	Biochrom GmbH

2.1.3 Stammlösungen

Tabelle 3: Stammlösungen

Name der Stammlösung	Inhalt
DMEM-Medium	+ 10% FCS + 2% HEPES 20mM + 1% Pen/Strep + 1% L-Glutamin 2mM
Einfriermedium	90% FCS 10% DMSO
Kulturmedium	RPMI 1640 + 20% FCS (Böhm 2009) + 1% Pen/Strep + 1% L-Glutamin 2mM + 2% HEPES 20mM

2.1.4 Stammzellreagenzien und Lebend-Tot-Marker

2.1.4.1 Reagenzien zur Bestimmung der Side Population

Table 4: Reagenzien zur Bestimmung der Side Population

Name des Reagenzes	Hersteller
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Verapamil	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

2.1.4.2 Lebend-Tot-Farbstoff

Table 5: Lebend-Tot-Farbstoff

Name des Reagenzes	Hersteller
Propidium Iodid (PI), mit PBS auf 200µg/ml verdünnt	Fluka Chemie GmbH

2.1.5 Potentielle Therapeutika

Table 6: Potentielle Therapeutika

Name der potentiellen Therapeutika	Hersteller
Doxorubicin-HCl 2 mg/ml (unverdünnt)	Zentrale Zytostatikaherstellung der Apotheke am Universitätsklinikum Tübingen
Doxorubicin-HCl mit NaCl verdünnt auf 0,2 mg/ml	
Tetraethylthiuramdisulfid (= Disulfiram; DSF) mit DMSO verdünnt auf 5mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

2.1.6 EDV-Hilfsmittel

Table 7: EDV-Hilfsmittel

Name der Hilfsmittel	Hersteller
FACS DIVA Software Version 6.1.2	Becton Dickinson
Microsoft Excel	Microsoft
Microsoft Word	Microsoft

2.2 Methoden

Der folgende Abschnitt beinhaltet neben der Auswahl der richtigen Zelllinie, eine Erläuterung zu Zellkulturen im Allgemeinen und den Rahmenbedingungen zur Kultivierung von Leukämiezelllinien. Weiterhin werden die Grundlagen des technischen Messverfahrens eines Durchflusszytometers dargestellt. Anschließend wird die Vorbereitung der Versuchsansätze, die Durchführung der Behandlungsexperimente und die Färbung der Zellen mittels Hoechst 33342 und Lebend-Tot-Farbstoff geschildert,

bevor die technische Auswertung der Rohdaten und die statistische Aufarbeitung erläutert werden.

2.2.1 Auswahl der verwendeten Zelllinie

Für die Untersuchung der SP wurden verschiedene Zelllinien auf die Färbbarkeit mittels Hoechst 33342 getestet. Unter den getesteten Zelllinien, KG-1a-, REH-, Nalm-16-, Malt-4- und SEM-Zelllinien, fiel v.a. bei Zellen der KG-1a Zelllinie ein besonders hoher Anteil an SP auf (Mattes, 2015). KG-1a-Zellen sind Abkömmlinge der Elternpopulation einer akuten myeloischen Leukämie-Zelllinie, der KG-1-Zelllinie (Koeffler et al., 1980).

2.2.2 Was sind Zellkulturen

Zellkulturen sind aus Gewebe- und Organverbänden gewonnene Zellen, welche durch ein Nährmedium erfolgreich in vitro angezchtet werden konnten, mit dem Ziel, eine ausreichende Menge von Zellen für Versuche zur Verfügung zu stellen. Sie bedienen damit den Wunsch der Reproduzierbarkeit naturwissenschaftlicher Versuche. Man unterscheidet primäre, endlich heranziehbare Kulturen von sog. permanenten, zeitlich unendlich kultivierbaren Kulturen.

Primäre Kulturen haben den Nachteil, dass sie nur in einem engen zeitlichen Rahmen für Versuche verwendet und kultiviert werden dürfen, da sie sich innerhalb weniger Generationen genetisch und morphologisch verändern können. Permanente Kulturen haben den Vorteil, dass sie aus transformierten Zellen gewonnen werden. Damit sind „unsterbliche“ Tumorzellen und stabil transfizierte Zellen gemeint. Ihr veränderter Phänotyp ermöglicht durch unbegrenzte Teilungsfähigkeit und den eingeschränkten bzw. vollständigen Verlust der Apoptosefähigkeit ständige Verfügbarkeit bei kaum vorhandenen Veränderungen dieser Zellen. Sie bieten dem Verwender die Möglichkeit für zeitlich aufwendige Versuchsreihen (Schmitz, 2011, S. 76).

Die verwendete KG-1a Zelllinie lässt sich den permanenten Kulturen zuordnen. Da sie als permanente Zellkultur die Adhäsionsfähigkeit verloren haben und dem hämatopoetischen System entstammen, werden sie in Suspension kultiviert.

2.2.3 Pflege von Zellkulturen

2.2.3.1 Allgemeine Lebens- und Umgebungsbedingungen

Um Leukämiezelllinien als Zellsuspensionen kultivieren zu können, gilt es ihre natürlichen biologischen Lebensbedingungen so realistisch wie möglich zu simulieren.

Die von uns verwendete AML-Zelllinie (KG-1a) entstammt dem hämatopoetischen System. Schlussfolgernd sollte das zur Anzucht verwendete Medium alle relevanten Größen des Blutes (gelöste Stoffe, pH-Wert, etc...) und Umgebungsbedingungen des KMs für ein erfolgreiches Wachstum beinhalten.

2.2.3.2 RPMI+ als Nährmedium

RPMI+, welches ganz ursprünglich als RPMI 1640 zur Anzucht von Leukämiezellen als Suspensionskulturen von Moore und Mitarbeitern erfunden wurde, diente als Medium und Blutersatz. Die Grundsubstanz von *Moore* beinhaltet gelöste Aminosäuren, Bikarbonat, D-Glukose und Vitamine. Diese Inhaltsstoffe, ergänzt durch ein Serum, einen Stoff zur Energielieferung und einen geeigneten Puffer zur pH-Stabilisierung, machen es zum idealen Medium, welches alle lebensnotwendigen Nährstoffe enthält.

2.2.3.3 Fetal calf serum (FCS)

Seren beinhalten die natürlichen Bestandteile des Blutes frei von allen zellulären Blutbestandteilen (entspricht Plasma) und ohne Gerinnungsfaktoren (Unterscheidung zum Plasma). Das verwendete FCS wird aus dem Blut fetaler Kälber gewonnen und anschließend seinem natürlichen Gerinnungsprozess ausgesetzt. Dies hat zum Vorteil, dass es neben dem gewünschten Verlust seiner Gerinnungsfaktoren zusätzlich den Wachstumsfaktor PDGF (engl.: platelet-derived growth factor) anreichert, welcher sich positiv auf die Proliferation der Zelllinie auswirkt. Außerdem beinhaltet FCS neben PDGF noch Aminosäuren, Hormone, Vitamine und Zytokine, sodass es eine effektive Ergänzung des Mediums RPMI zur Zellkultivierung darstellt. Auch wenn die jahrelang durchgeführte Hitzeinaktivierung von Seren hinterfragt ist, hat sie doch, durch das Inaktivieren von minimal vorhandenen Bestandteilen des Komplementsystems im Bereich der immunologischen Forschung den größten Vorteil (Schmitz, 2011, S. 118). Das verwendete Serum ist durch eine Temperaturzufuhr von 56°C innerhalb von 30 Minuten inaktiviert.

2.2.3.4 L-Glutamin als Energielieferant

Als Energielieferant wurde dem RPMI noch L-Glutamin zugeführt. Es ist eine nicht-essenzielle Aminosäure und wird in stark proliferierenden Zellkulturen deutlich schneller verbraucht als in langsam teilenden. L-Glutamin ist bei 37°C nur eine bedingte Zeit im

Medium stabil, lässt sich aber bei 4°C für circa vier Wochen lagern (Schmitz, 2011, S. 120).

2.2.3.5 HEPES als organischer Puffer

Um den pH-Wert des hämatopoetischen Systems (7,35 bis 7,45) nicht nur zu simulieren, sondern diesen auch möglichst lange aufrechtzuerhalten, wurde HEPES (Kurzform für 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) als ein organischer Puffer verwendet. Dieser dient, wie das Bikarbonat im RPMI, durch die Neutralisation von freigesetztem CO₂ bei hohen Zellteilungsraten und der Ansäuerung des Mediums durch Abbauprodukte, der pH-Stabilisierung (Schmitz, 2011, S. 120).

2.2.3.6 Schutz vor Kontaminationen

Die Verwendung von Antibiotika wie Penicillin und Streptomycin ist zwar nicht wachstums- dafür allerdings kultivierungsfördernd. Sie wurden hinzugefügt, um Kontaminationen der Zellkulturen zu vermeiden. Penicillin G hemmt durch Beta-Lactamase den Aufbau der bakteriellen Zellwand und wird der Gruppe der klassischen Beta-Lactame zugeordnet. Streptomycin greift dagegen in die Proteinsynthese der Bakterien ein und wird den Aminoglykosiden zugeordnet (Schmitz, 2011, S. 124).

2.2.3.7 Aufbewahrung der Zellkultur

Zur Kultivierung der KG-1a-Zellen wurden 50ml, 250ml und 550ml Cell Culture Flasks (Zellkulturflaschen) verwendet und in einem Inkubator, zur Stimulierung des menschlichen Körpers, bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt.

2.2.3.8 Passagieren von Zellkulturen

Da die angelegte Zellkultur ein in sich aktives, lebendes System darstellt, treten periodisch Veränderungen auf. Diese kommen auch im menschlichen Körper vor und werden v.a. durch Eigenschaften des Blutes und die Funktionen darin gelöster oder gebundener Stoffe kompensiert. Das Transportmedium „Blut“ bringt neue Nährstoffe ins KM, transportiert alte Nährstoffe und Stoffwechselendprodukte und verhindert erfolgreich pH-Wert-Verschiebungen. Durch das Immunsystem werden evtl. Infektionen vermieden.

In der Zellkultur enthält das Medium alle lebenswichtigen Nährstoffe und ersetzt die Funktionen des Blutes. Eine Zellkultur benötigt aus folgenden Gründen regelmäßige Mediumwechsel (Schmitz, 2011):

- a. *Halbwertszeiten* - Halbwertszeiten von Inhaltsstoffen begrenzen ihre Verfügbarkeit im Medium (z.B. Antibiotika und Wachstumsfaktore).
- b. *Metabolisierung* - stoffwechselaktive Zellen setzen die lebensnotwendigen Nährstoffe um.
- c. *pH-Wert-Veränderungen* - Ansäuerung der Zellkultur durch Endprodukte der Metabolisierung.

Das Passagieren von Zellkulturen zu sog. Subkulturen nutzt eine Form des Mediumwechsels, bei welcher nicht das komplette Medium erneuert werden muss, sondern lediglich neues Medium dem Alten hinzugegeben werden kann. Hierfür suspendiert man die Zellkultur gründlich, aber vorsichtig, und bestimmt die aktuelle Zellzahl innerhalb der Kulturflasche. Anschließend wird genauso viel altes Medium (samt Zellen) entnommen, wie beabsichtigt wird frisches, neues Medium hinzuzugeben, um die Zelldichte wieder auf ein optimales Ausgangsniveau zu bringen (Schmitz, 2011, S. 101). Es wurden die Zellzahlen an einem Blutanalysegerät ABX der Firma Axonlab AG bestimmt und die Zellen jeweils montags, mittwochs und freitags und einen Tag vor dem Ansetzen eines Versuches passagiert.

2.2.4 Durchflusszytometrie

2.2.4.1 Messverfahren und Ziel der Durchflusszytometrie

Unter der Durchflusszytometrie versteht man ein Vermessungsverfahren („-metrie“) von heterogenen Zellen („zyto“). Diese werden anfangs über eine Küvette aus ihrem Reagenz im Mikroliterbereich angesaugt, mit Hilfe einer weiteren Flüssigkeit zu einem Hüllstrom verdünnt und beschleunigt, um anschließend in Reihe, als singuläre Zellen verdichtet, an einem Laser vorbei geschleust zu werden („hydrodynamische Fokussierung“). Dieses Laserlicht trifft im 90°-Winkel auf die passierenden Zellen und wird von ihnen entsprechend ihrer Morphologie gebrochen und im Raum verteilt. Das daraus resultierende Streulicht wird an unterschiedlichen Stellen detektiert, in elektronische Impulse verarbeitet und als Datensatz gespeichert. Streulicht, welches hierbei in einem kleinen Winkel zur Richtung des Laserlichts gemessen wird, nennt man „forward scatter“ (FSC) und solches, welches im 90° Winkel in Richtung des Laserlichtes detektiert wird, nennt man „side scatter“ (SSC). Der FSC ist dabei ein Maß für die Größe und der SSC für die Granularität einer Zelle (Sack, 2007, S. 27).

Das Ziel der Durchflusszytometrie, Zellen mit gleichen Eigenschaften in Populationen darzustellen und Rückschlüsse auf ihre Beschaffenheit anhand der Eigenschaften ziehen zu können, lässt sich erst durch Nutzung unterschiedlicher fluoreszenter Farbstoffe und verschiedenfarbiger Laser ermöglichen. Fluoreszente Farbstoffe lassen sich an unterschiedlichen Strukturen der Zellen binden. Anhand der Kopplungsart unterscheidet man grob epitopisch von biochemisch und intrazellulär bindenden fluoreszenten Farbstoffen (Sack, 2007, S. 42).

2.2.4.2 Fluoreszenz

Die Fluoreszenz der Farbstoffe kommt durch die Anregung aus der Energie des Laserlichts zustande. Hierbei werden Elektronen durch ein spezifisches Lichtspektrum in ein höher energetisches Niveau gehoben (Exzitation), woraufhin sie kurze Zeit später unter Wärme- und Lichtabgabe zurück in ihre energieärmere Schale gelangen (Emission). Das dabei emittierte Licht ist energieärmer und besitzt eine größere Wellenlänge als das vorher absorbierte, energiereiche mit niedriger Wellenlänge. Die Helligkeit des fluoreszierenden Lichtes korreliert mit der Dichte der gebundenen Farbstoffe und der Amplitude des Laserspektrums bei Absorption (Sack, 2007, S. 84).

Da jeder fluoreszente Farbstoff sein spezifisches Absorptionsspektrum hat, können viele verschiedene Farbstoffe miteinander in Reihe geschaltet werden (Tandemkonjugate) oder parallel durch unterschiedliche Laser angeregt werden (Sack, 2007, S. 85).

2.2.4.3 Differenzierung von Signalen

Die unterschiedlichen Fluoreszenzen sowie das Seitwärtsstreulicht werden anschließend durch Farbteilerspigel und Bandpassfiltern ihren Emissionspektren entsprechend voneinander differenziert. Nachgestellte, separate Photomultiplier-Tubes (PMT) detektieren die für ihren sensitiven Bereich optischen Größen, um sie letztendlich in elektronische Impulse umzuwandeln (Sack, 2007, S. 32). Unseren Versuchen vorgezogen untersuchten wir die verwendeten PMTs und optimierten diese in der Anwendung im LSR entsprechend ihres sensitivsten Detektionsbereichs. Die Ergebnisse wurden in Tübingen im Rahmen der Tübingen Innovationstage veröffentlicht (siehe Kapitel 7.4 – Veröffentlichungen – Poster „Datenqualität in der Durchflusszytometrie: Verbesserungen für angewandte Forschung und klinische Anwendungen“).

2.2.4.4 Verwendetes Durchflusszytometer

Das für die Experimente dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer LSR II der Firma Becton Dickinson Bioscience ist im Handel serienmäßig mit drei Lasern ausgestattet und wurde zusätzlich um einen Laser im UV-Bereich erweitert. Die sich daraus ergebenden vier Laserstrahlen in folgenden Wellenlängen:

- 488nm - blauer Laser
- 633nm - roter Laser
- 405nm - violetter Laser
- 355nm - UV-Laser

Wenn das Licht der oben aufgeführten Laser auf die Zellen des hydrodynamischen Stroms trifft, entsteht das bereits vorher erwähnte Streulicht und die Fluoreszenzen, welche anschließend von spezifischen Filtern in ihre Spektren getrennt, durch PMTs detektiert und in verstärkte, elektrische Impulse umgewandelt werden (Sack, 2007, S. 159). Der Ausschlag des elektrischen Signals ist proportional zur Intensität des gemessenen Lichts. Die in dieser Arbeit verwendeten Laser, Filter und PMTs sind grafisch in den folgenden Abbildungen 2.1 bis 2.3 dargestellt.

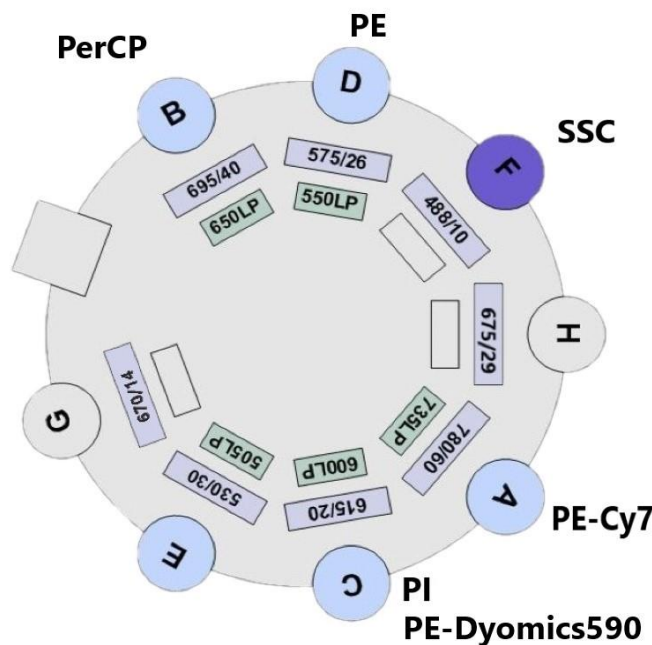


Abbildung 2.1 Cytometer-Konfiguration des blauen Lasers

Das emittierte Licht der gemessenen Zellen durchläuft entsprechend der Buchstabenreihenfolge A bis H erst die Filter (Rechtecke innerer Zirkel), bevor die nachgeschalteten PMTs (Kreise A bis H) die spezifischen Wellenlängen der äußeren Filter (Rechtecke äußerer Zirkel) in unterschiedlicher Intensität messen.

Abkürzungen: LP: Langpassfilter. In Anlehnung an Abbildung aus FACS Diva Software 6.1.3

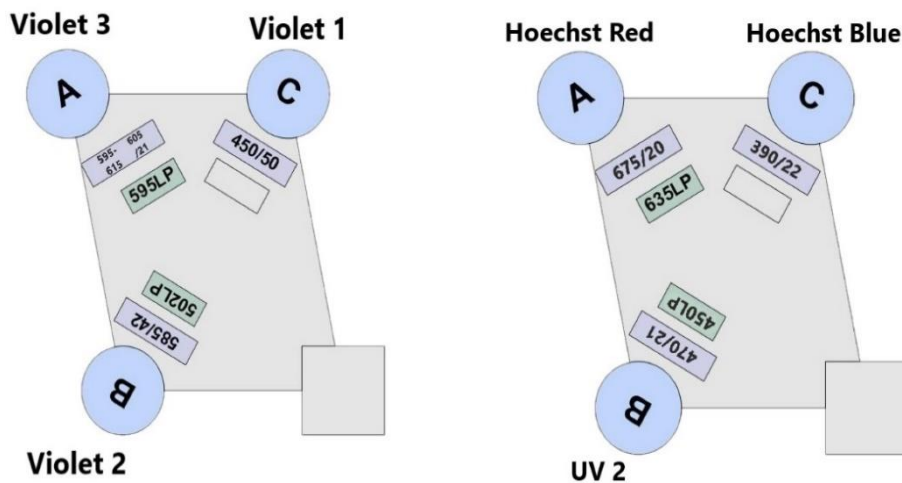


Abbildung 2.2: Cytometer-Konfiguration des UV Lasers und des violetten Lasers

Das emittierte Licht der gemessenen Zellen durchläuft entsprechend der Buchstabenreihenfolge A bis C erst die Filter (Rechtecke innerer Zirkel), bevor die nachgeschalteten PMTs (Kreise A bis C) die spezifischen Wellenlängen der äußeren Filter (Rechtecke äußerer Zirkel) in unterschiedlicher Intensität messen.

Abkürzungen: LP: Langpassfilter. In Anlehnung an Abbildung aus FACS Diva Software 6.1.3

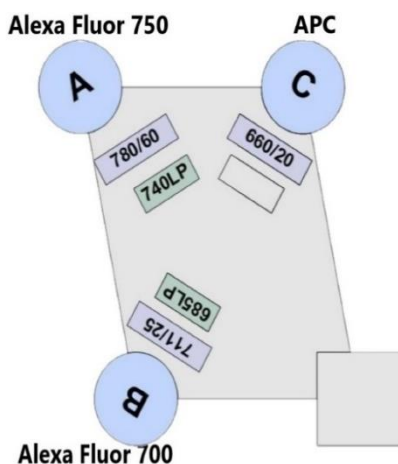


Abbildung 2.3: Cytometer-Konfiguration des roten Lasers

Das emittierte Licht der gemessenen Zellen durchläuft entsprechend der Buchstabenreihenfolge A bis C erst die Filter (Rechtecke innerer Zirkel), bevor die nachgeschalteten PMTs (Kreise A bis C) die spezifischen Wellenlängen der äußeren Filter (Rechtecke äußerer Zirkel) in unterschiedlicher Intensität messen.

Abkürzungen: LP: Langpassfilter. In Anlehnung an Abbildung aus FACS Diva Software 6.1.3

2.2.4.5 Kompensation zweier Fluorochrome

Da Wellenlängen und Lichtspektren fließend ineinander übergehen, können auch zwei Fluorochrome in das Spektrum des jeweils anderen Fluorochroms hineinstrahlen. Diesen Überlappungseffekt, der möglichst minimal nach Nutzung der vorgeschalteten Filter sein sollte, kann man durch Kompensation reduzieren.

Wenn nun das PMT A neben seinem Fluorochrom A auch emittiertes Licht des Fluorochroms B (zu einem geringen Anteil) misst, dann soll die Kompensation bewirken, dass diese falsch positiv detektierten Emissionen B rechnerisch von allen weiteren Ergebnissen des PMTs A subtrahiert werden (Sack, 2007, S. 36). Hierfür muss eine „single stain“-(Einzel-)Färbung der jeweils genutzten Antikörper oder eine „termed fluorescence minus one“-Färbung (mit allen Fluorochromen außer einem) durchgeführt werden (Roederer, 2001).

Die Kompensation ist umso wichtiger je mehr fluoreszierende Farbstoffe verwendet werden und je dichter deren Emissionsspektren zueinander liegen.

2.2.4.6 Darstellung der gemessenen Daten

Die pro Sekunde gemessenen Events werden zeitgleich zur Messung in der zum LSR II zugehörigen FACS Diva Software dargestellt. Die Hauptanalyse findet erst nach Beendigung der Messung statt. Ziel einer jeden Durchflusszytometrie ist die Vermessung einer heterogenen Zellpopulation, die Färbung verschiedener Zelleigenschaften, evtl. die Einteilung in Subpopulationen und die anschließende Beschreibung der dargestellten Eigenschaften, um Rückschlüsse auf die einzelnen Subpopulationen ziehen zu können (Sack, 2007, S. 42).

Das Programm kann die Datensätze in eindimensionalen Histogrammen oder zweidimensionalen Koordinatensystemen darstellen. Histogramme zeigen die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Fluoreszenzhelligkeitsstufen an, während in den zweidimensionalen Koordinatensystemen unterschiedliche Messgrößen gegeneinander aufgetragen werden können (Sack, 2007, S. 42 und 49). Als Darstellungsformen kann man u.a. zwischen Dot-Plots (Punktwolkendarstellung) und Contour-Plots (Höhenliniendarstellung) wählen. Beiden gleich ist, dass die Messparameter entsprechend der Intensitäten auf der x- und der y-Achse dargestellt werden. Jedoch wird die Häufigkeit eines Ereignisses gleicher Intensität bei Dot-Plots durch Nutzung gleicher Farben gekennzeichnet und bei Contour-Plots durch Linienverbindungen (gleiches Prinzip nutzen Höhenlinien auf Landkarten).

2.2.4.7 Gating von Zellen mit bestimmten Eigenschaften

Zellen mit gleichen Eigenschaften, die sich als Populationen auf dem Diagramm darstellen, kann man mittels eines sog. „Gates“ vermessen. Die Vermessung von Regionen oder Populationen bewirkt die direkte Anzeige der absoluten Zahl von Events

innerhalb des Gates oder anderer statistischer Größen. Es ermöglicht außerdem die Bildung einer „Gating-Hierarchie“, in dem man sich den Inhalt eines Gates in einem nächsten Dot-Plot-Diagramm oder Histogramm darstellen lässt. Sinnvoll hintereinander geschaltete Gating-Hierarchien ermöglichen letztendlich eine feinere Eingrenzung von Populationen (Sack, 2007, S. 51).

2.2.5 Vorbereitung von Versuchen

2.2.5.1 Vorversuch zur Findung der geeigneten Zelllinie

In einem Vorversuch wurden Zellen der KG-1a-, REH-, Nalm-16-, Malt-4- und SEM-Zelllinien mit Hoechst 33342 und dem Lebend-Tot-Farbstoff PI angefärbt. In dieser zytometrischen „0h-Vermessung“ wurde vorrangig auf den Anteil an Stammzellen der SP geachtet. Hierbei zeigte sich, dass lediglich Zellen der KG-1a-Zelllinie in der Hoechst-Färbung ausreichend Anteile der SP enthielten, um Effekte daran messen zu können (Mattes, 2015). Als Konsequenz wurden nur KG-1a-Zellen aus dem Kryokonservierungsvorrat des Stickstofftanks der Universitätsklinik aufgetaut, kultiviert und für weitere Therapieansätze vorbereitet.

2.2.5.2 Kryokonservierung

Kryokonservierung von zahlreichen Aliquots einer Zelllinie hat den Vorteil, dass ausreichend Zellen als Reserve für weitere Versuche zur Verfügung stehen und man vor jedem Therapiebeginn von dem Ausgangspunkt der Zelllinie erneut starten kann.

Die Kryokonservierung der KG-1a-Aliquots wurden entsprechend dem nachfolgenden Protokoll durchgeführt (Mack, 2015, S. 22):

1. Maschinelle Zellzahlbestimmung der zu konservierenden Zelllinie.
2. Entnahme einer Gesamtmenge von $60-90 \times 10^6$ Zellen zur Überführung in 50ml Falcons.
3. Zentrifugieren der Zellen für 15 Minuten und Abpipettieren des Überstandes.
4. Hinzufügen von 6ml Einfriermedium (90% FCS und 10% DMSO).
5. Bei mehreren Falcons die Suspensionen aggregieren und resuspendieren.
6. Überführen von 1ml Zellen pro Kryoröhrchen. Es entstehen ca. sechs Aliquots mit je 1ml Inhalt. Anschließend die etikettierten Aliquots verschlossen in den Mr. Frosty stellen.

7. Kryoröhrchen kurzzeitig bei -80°C gefrieren lassen bevor sie endgültig in Stickstofftank umgelagert werden.

2.2.5.3 Auftau-Protokoll kryokonservierter Aliquots

Sobald die oben beschriebenen Kryo-Aliquots aus dem Stickstofftank benötigt wurden, hat man diese entsprechend dem anschließenden Protokoll aufgetaut:

1. Schwenkend den Inhalt des Kryoröhrchen in einem 37°C geheizten Wasserbad langsam erwärmen. Kurz bevor alles geschmolzen ist, Aliquot herausnehmen.
2. Nach dem Überführen der Suspension in 10ml Falcon, schonendes, tröpfchenweises Verdünnen mit im Wasserbad (37°C) aufgewärmten Medium (RPMI) bis eine Gesamtmenge von 10ml erreicht ist. Ausreichend vermischen.
3. Zentrifugieren der Probe für 5min bei 400g.
4. Abgießen des Überstandes und Resuspendieren der Zellen mit ca. 5ml vorgewärmten Medium.
5. Zellzahlbestimmung im ABX Zell-Counter.
6. Anlegen einer Zellkultur mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml.

2.2.6 Ansetzen von RPMI+ mit 20% FCS-Anteil

Für das Ansetzen der Zellkulturen, das Passagieren der Zellen, die Vorbereitung und den Versuchsansatz werden regelmäßig größere Mengen des Zellmediums RPMI+ benötigt. Zur Herstellung von 500ml RPMI+ mit 20% FCS-Anteil werden folgende Bestandteile benötigt:

- 500ml RPMI
- 100ml FCS
- 10ml HEPES (20mM)
- 5ml Penicillin/Streptomycin
- 5ml Glutamin

Die Inhaltsstoffe müssen bereits einen Tag vorher aufgetaut und im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

Am Herstellungstag wird das Medium unter sterilen Bedingungen an der Labor-Bench ergänzt, indem alle Chemikalien in die RPMI-Flasche überführt werden. Es wird mit der Chemikalie mit dem größten Volumen begonnen.

2.2.7 Doxorubicin-Monoversuch

Bei dem Einzelversuch mit dem potentiellen Therapeutikum Doxo wurde dieses als Konzentrationsreihe einer definierten Startmenge von KG-1a-Zellen (3×10^6 Zellen, Dichte: $0,6 \times 10^6$ Zellen/ml) hinzugefügt. Nach 0h, 24h, 48h und 72h erfolgte jeweils eine durchflusszytometrische Messung, um mögliche Effekte darzustellen. Der nachfolgende Abschnitt beschreibt die einzelnen Schritte des Versuches von der Vorbereitung der Versuchsansätze, über die Färbung mit Fluorochromen bis zur FACS-Messung.

Doxorubicin Ansatz

Die Vorbereitung der Versuchsansätze erfolgte unter sterilen Bedingungen an der Labor-Bench. Das nachfolgende Protokoll wurde zur Erstellung des Versuchsansatzes genutzt. Die anschließende 0h-Messung spiegelt dabei den Ausgangspunkt des Inkubationsversuches wider. Die Zellen wurden hierfür, direkt nach der Lagerung der Proben für die späteren Messzeitpunkte (24h, 48h und 72h) im Inkubator, gefärbt und im Durchflusszytometer vermessen.

- 1) Bestimmen der aktuellen Zelldichte der kultivierten und zu verwendenden KG-1a-Zellen.
- 2) Entnahme des entsprechenden Volumens, um eine spätere Zelldichte von $0,6 \times 10^6$ Zellen/ml zu erreichen und Verdünnung der Suspension mit auf Raumtemperatur angewärmten RPMI+ (20% FCS).
- 3) Drei 6-Well-Platten für 24h-, 48h- und 72h-Inkubation beschriften und 6 FACS-Röhrchen für 0h-Messung beschriften.
- 4) Befüllen mit je 5ml KG-1a-Zellsuspension ($0,6 \times 10^6$ Zellen/ml).
- 5) Überführen des Doxorubicin-HCl's (2mg/ml).
- 6) Erstellen einer 10:1 Verdünnung von Doxo (hier: 90µl RPMI : 10µl Doxo).
- 7) Hinzufügen der nachfolgenden Konzentrationenmengen in das entsprechende 0h-, 24h-, 48h-, 72h-Versuchswell.:

Tabelle 8: Doxorubicin-Konzentrationen und verwendete -Volumina

Aufgelistet sind die Doxorubicin Zielkonzentrationen und die hierfür verwendeten Volumina der Doxo-Stocklösung in unverdünnter und verdünnter Form für Zellsuspensionen mit 5ml Volumen. Konzentrationen in Anlehnung an (Elgie et al., 1999)

Abkürzungen: Doxo - Doxorubicin

Doxorubicin-Konzentration	Vol. Doxo
0,0µM Kontrolle	7,25µl Saline
0,125µM	1,81µl (Doxo-10:1-Verdünnung)

0,25µM	3,62µl (Doxo-10:1-Verdünnung)
0,5µM	7,25 µl (Doxo-10:1-Verdünnung)
1,0µM	1,45µl (Doxo unverdünnt)
2,0µM	2,9µl (Doxo unverdünnt)

8) Schwenken und im Inkubator (37,0° C und 5% CO₂) lagern.

2.2.8 Prinzip der Hoechst 33342-Färbung

Der Schwerpunkt dieser Versuche bezieht sich, durch Nutzung des Farbstoffes Hoechst 33342, auf das Färben von LSCs (s. Kapitel 1.2, S. 7ff.). Hoechst 33342 ist ein Bisbenzimid, welches in lebenden Zellen durch die Zellmembran in den Intrazellularraum gelangt, um im Zellkern an AT-sequenzreichen Abschnitten, der kleinen Furche der DNA, zu binden (Rossi et al., 2011). Als fluorochromer Farbstoff wird Hoechst 33342 im Durchflusszytometer bei einer Wellenlänge von 350nm vom UV-Laser angeregt, um anschließend in zwei Wellenlängenbereichen Licht zu emittieren (450nm Hoechst-blue und 675nm Hoechst-red). Hoechst 33342 interkaliert stöchiometrisch mit doppelsträngiger DNA, d.h. seine Fluoreszenzintensität verhält sich proportional zu der Anzahl eingegangener DNA-Bindungen und lässt somit direkte Schlüsse auf den DNA-Gehalt einer Zelle zu (Sack, 2007, S. 605). Die zweidimensionale Darstellung von „Hoechst-blue“ und „Hoechst-red“ lässt mehrere Populationen darstellen, die sich in einer Diagonale scheinbar aufeinander zu bewegen und dabei Stationen des Zellzyklus widerspiegeln (s. Kapitel 3.1.4, S. 52).

2.2.8.1 Herstellung des Hoechst- und Verapamilansatzes

Bei der Herstellung des Hoechst- und Verapamilansatzes lehnten wir uns an die bereits angewandten Herstellungsverfahren früherer Arbeiten an (Mattes, 2015). Zur Herstellung einer Stocklösung mit der Konzentration von 1mg/ml wurden im ersten Schritt 42,5mg Hoechst 33342 in 42,5ml destilliertem H₂O gelöst. Diese Stock-Lösung wurde in verschiedene Aliquots (50µl und 500µl) überführt und bei -20°C eingefroren. Die finale Konzentration von 5µg/ml wurde durch eine 200-fache Verdünnung bei der Färbung der Zellen erreicht (vgl. Protokoll Goodell et al. 1996).

Für den Verapamilansatz wurden 4,9mg Verapamil in 1ml purem Alkohol gelöst und nach Überführung in mehrere Aliquots (100µl) erneut bei -20°C eingefroren. Die finale Konzentration von 50µM, nach dem Protokoll von *Goodell et al.*, wurde durch eine 1:200 Verdünnung erreicht.

2.2.8.2 Hoechst 33342-Färbung von Doxorubicin auf KG-1a-Zellen nach 0h

Nachdem Fertigstellen des Versuchsansatzes zur Inkubation der KG-1a-Zellen mit Doxo folgte die Hoechst-Färbung einer Zellsuspensions-Probe (im weiteren Verlauf als 0h-Messung betitelt), um die für alle Proben gleich geltenden Ausgangswerte festzuhalten. Die nachstehenden Schritte wurden dabei durchgeführt.

- 1) Zentrifugieren (400g, 5min, 23°C) der 0h-Probe, Abgießen des Überstandes und Hinzufügen von 3,5ml DMEM (vorgewärmt bei 37°C im Wasserbad).
- 2) Entnahme von 50µl Suspension zur Zellzahlbestimmung der 0h-Probe.
- 3) Verdünnen auf eine Zelldichte von 1×10^6 KG-1a-Zellen/ml DMEM (Bsp: $3,5 \times 10^6$ KG-1a-Zellen auf 3,5ml).
- 4) Hinzugabe von 200x Hoechst 33342 (Bsp.: $3500\mu\text{l}/200 = 17,5\mu\text{l}$).
- 5) Entnahme von 500µl aus KG-1a-Hoechst-Zellsuspension für Kontrolle mit Verapamil in jeweils ein extra FACS-Röhrchen pro Konzentrationsprobe.
- 6) Hinzugabe von 2,5µl Verapamil je negativ-Kontrolle.
- 7) Inkubation aller Proben im Wasserbad (37°C) für 2h, alle 20min Proben resuspendieren.
- 8) DMEM auf Eis und die Zentrifuge 5min vorher auf 2°C abkühlen lassen.
- 9) Nach Inkubationsende: FACS-Röhrchen kurz auf Eis runterkühlen lassen.
- 10) In kalter Zentrifuge (2°C) zentrifugieren (400g, 5min) und Überstand abgießen.
- 11) Zellen zweimal in 2ml gekühlten DMEM waschen (400g, 3min, 2°C).
- 12) Hinzugabe von 1µl Lebend-Tot-Farbstoff PI.
- 13) LSR-Messung mit Standardfiltern, alleiniger Filterwechsel im UV-Laser (A: 675/20 mit LP 550; B: 470/21 mit LP 450; C: 390/22 LP leer) und einer verwendeten Spannung für den FSC von 475mV und für den SSC von 290mV.

Für eine gute Darstellung der Zellen durch Hoechst 33342-Färbung muss akribisch auf die Einhaltung der exakten Farbstoffkonzentration und Inkubationszeit geachtet werden. Bereits geringfügige Abweichungen beeinflussen die Ergebnisse (Watson et al., 1985, Goodell et al., 1996).

2.2.8.3 Hoechst 33342-Färbung von Doxorubicin auf KG-1a-Zellen nach 24h-, 48h-, 72h-Inkubationszeit

Die nachfolgenden Protokollschritte für die Anfärbung der KG-1a-Zellen nach Doxo-Inkubationszeiten von 24h, 48h und 72h sind ab Schritt 3 vergleichbar zu den bereits

zuvor in 2.2.8.2 genannten Ablauf der 0h-Hoechst-Färbung. Die einleitenden Punkte 1 und 2 müssen durchgeführt werden, da diese Proben in der Zwischenzeit im Inkubator lagerten.

- 1) Schwenken der 6-Well-Platten nach Entnahme aus dem Inkubator (37°C).
- 2) Ernten der Zellen unter Resuspension der Proben und Überführung in beschriftete FACS-Röhrchen.
- 3) Zentrifugieren der FACS-Röhrchen (400g, 5min, 23°C) und Abgießen des Überstandes.
- 4) Zugabe von 3ml DMEM (vorgewärmt im Wasserbad bei 37°C).
- 5) Entnahme von 50µl je Probe zur Zellzahlbestimmung
- 6) Entsprechend der niedrigsten Zelldichte: Verdünnen auf eine Konzentration von 1×10^6 KG-1a-Zellen/ml DMEM (Bsp.: $3,5 \times 10^6$ KG-1a-Zellen auf 3,5ml).
- 7) Anpassen der Zellzahl auf 1×10^6 KG-1a-Zellen/ml DMEM in jedem Röhrchen
- 8) Zugabe von 200x Hoechst je Röhrchen.
- 9) Entnahme von 500µl der KG-1a-Doxo-Hoechst-Probe für Kontrolle mit Verapamil.
- 10) Zugabe von 2,5µl Verapamil je negativ-Kontrolle.
- 11) Inkubation aller Proben im Wasserbad (37°C) für 2h, alle 20min Proben resuspendieren.
- 12) DMEM auf Eis kühlen und die Zentrifuge 5min vor Ende auf 2°C runterkühlen.
- 13) Nach Inkubationsende: alle FACS-Röhrchen kurz auf Eis abkühlen lassen.
- 14) Zentrifugieren aller Proben in gekühlter Zentrifuge (2°C, 400g, 5min) und anschließend den Überstand abgießen.
- 15) Zellen zweimal in 2ml gekühlten DMEM waschen (2°C, 400g, 3min).
- 16) Hinzugabe von 1µl Lebend-Tot-Farbstoff PI.
- 17) LSR-Messung wie in 2.2.8.2 Schritt 13) beschrieben.

2.2.9 Lebend-Tot-Diskriminierung

PI ist ein weiterer DNA-Farbstoff, welcher unspezifisch mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Da er unter physiologischen Bedingungen allerdings nicht die biomolekulare Barriere einer Zellmembran überwinden kann, färbt er nur DNA von toten Zellen mit bereits perforierter Biomembran an. PI wird aufgrund dieser Eigenschaft sehr gerne zur Diskriminierung als Lebend-Tot-Farbstoff genutzt. Hinzu kommt, dass das Hinzufügen

von PI keinen Einfluss auf das Hoechst-Färbungsprofil hat, aber den vorzeitigen Ausschluss von toten Zellen ermöglicht (Goodell et al., 1996). Tote Zellen können durch unspezifische Bindungen von Fluorochromen zu falsch positiven Eventmessungen führen. Das Absorptionsmaximum von PI wird durch Bindung an die DNA von 488nm auf 535nm und sein Emissionsmaximum von 590nm auf 617nm verschoben (Hoppe, 2009).

Jeder Probe wird nach dem letzten Waschen mit 2ml DMEM 1µl eine auf 200µg/ml verdünnte PI-Lösung hinzugefügt.

2.2.10 Disulfiram-Versuche

2.2.10.1 Tetraethylthiuramdisulfid-Ansatz („Disulfiram“, DSF) in DMSO

Bei einer molaren Masse von 296,54g/mol (DSF) benötigt man für eine 5-molare DSF-Stocklösung 1482,7g festes DSF-Pulver. Vorliegend reichte eine 5mM-DSF-Stocklösung. Dementsprechend wurde 1,4827g DSF-Pulver benötigt. Für 5ml einer solchen Lösung entsprechend nur 7,4135mg DSF. Bei der Herstellung des DSF-Stocks wurde folgendes Protokoll ausgearbeitet:

- 1) Abwiegen von 7,4135mg Disulfiram mithilfe einer Vakuum-Waage (tatsächlich wurden 7,7mg abgewogen).
- 2) Lösung des Disulfiram-Pulvers in 5ml DMSO (Anpassung des Volumens auf 5,193ml DMSO für eine 5mM DSF-Lösung bei 7,7mg DSF-Pulver).
- 3) Sterilfiltration der Lösung mittels eines Sterilfilters unter der Labor-Bench.

2.2.10.2 Disulfiram-Monovorversuch

Für die Hoechst-Färbung ist eine Mindestdichte von KG-1a-Zellen nötig (1×10^6 /ml). Um einen ersten Eindruck über die zytotoxische Wirkung auf die KG-1a-Leukämiezellen durch die Behandlung mit DSF zu bekommen, wurde ein Vorversuch über 72h angesetzt. Die KG-1a-Zellen wurden mit DSF-Konzentrationen von 10µM, 5µM, 5/2µM, 5/4µM, 5/8µM, 5/16µM und 5/32µM inkubiert. Zum Zeitpunkt von 0h-, 24h-, 48h- und 72h-Inkubation wurde eine zytometrische Messung zur Bestimmung der Vitalität mittels Lebend-Tot-Färbung durchgeführt. Die folgenden Schritte wurden hierbei eingehalten: Die Vorbereitung des Versuchsansatzes erfolgte unter sterilen Bedingungen an der Labor-Bench.

Schritte 1) und 2) wie in 2.2.6.1 (s. Seite 15) die Schritte 1) und 2).

- 3) Beschriften von 12-Well-Platten für 24h-, 48h-, 72h-Inkubation mit den DSF-Zielkonzentrationen 10µM 5µM 5/2µM 5/4µM 5/8µM 5/16µM und 5/32µM.
- 4) Einstellen mittels Verdünnung einer ausreichenden Menge von KG-1a-Zellen auf eine Zelldichte von $1,2 \times 10^6$ /ml (Endkonzentration $0,6 \times 10^6$ /ml) mit RPMI+ 20% FCS.
- 5) Jeweils 1500µl Medium (RPMI+ 20 % FCS) vorlegen (in Kontrolle nur 1494µl)
- 6) In 10µM-Probe zusätzlich 1488µl RPMI+ (20% FCS) geben (12µl sind für eine 20µM DSF-Konzentration nötig).
- 7) Resuspendieren und Überführen von 1500µl ins jeweils nächste Well (5µM, 2,5µM, etc...).
- 8) Verwerfen der Letzten 1500µl (Kontrolle bleibt frei).
- 9) In Kontrolle 6µl DMSO ergänzen.
- 10) Hinzufügen von 1500µl KG-1a-Zellen ($1,2 \times 10^6$ /ml) in alle Wells und ausreichend, aber schonend, resuspendieren (Endvolumen pro Well 3ml).

Es ergibt sich folgende Konzentrationsreihe:

Tabelle 9: Disulfiram-Konzentrationen und verwendete -Volumina (Vorversuch)

Aufgelistet sind die DSF Zielkonzentrationen und die hierfür verwendeten Volumina der DSF-Stocklösung in unverdünnter Form für Zellsuspensionen mit 3ml Volumen.

In Anlehnung an verwendete Konzentrationen in (Conticello et al., 2012)

Abkürzungen: DSF - Disulfiram

Disulfiram-Konzentration	Vol. DSF in 3ml Well-Inhalt
0,0µM Kontrolle	6µl DMSO
5/32µM	3/32µl DSF
5/16µM	3/16µl DSF
5/8µM	3/8µl DSF
5/4µM	3/4µl DSF
5/2µM	3/2µl DSF
5µM	3µl DSF
10µM	6µl DSF

- 11) Entnahme von 200µl KG-1a-Zellen (Zelldichte $0,6 \times 10^6$ /ml) und Ergänzung von 1µl PI für 0h-Messung

2.2.10.2.1 Disulfiram-Messung nach 24h-Inkubation

In den Vorversuchen zur zytotoxischen Wirkung von DSF auf die KG-1a-Zellen wurde auf die zeitlich aufwendigere Variante einer Hoechst-Färbung verzichtet. Die folgenden

Schritte dienten auch zu den weiteren Messungzeitpunkten des Vorversuches als Protokoll.

- 1) Durchmischen des gesamten Wells manuell und schonende Resuspension.
- 2) Überführen von je 3ml aus den Wells in beschriftete FACS-Röhrchen.
- 3) Zentrifugieren (400g, 3min, 23°C) und Überstand abgießen.
- 4) Ergänzen von 1µl PI pro Röhrchen.
- 5) LSR-Messung zur Bestimmung der Vitalität wie in 2.2.8.2 Schritt 13) beschrieben

Anmerkung nach 24h

Da zytometrisch kaum eine Veränderung der Vitalität festgestellt werden konnte, wurde, bei einer insgesamt niedrigen Gesamtzellzahl, ab der 48h-Messung zusätzlich eine Zellzahlbestimmung vor der Färbung durchgeführt. Die Anfangszellzahl lag bei $1,8 \times 10^6$ KG-1a-Zellen/ml.

2.2.10.2.2 Disulfiram-Messung nach 48h- und 72h-Inkubation

Es wurden die Schritte 1) bis 5) aus Kapitel 2.2.10.2.1 (s. S. 40) durchgeführt. Zwischen Schritt 2) und 3) wurde die in der Anmerkung des letzten Unterkapitels erwähnte maschinelle Zellzahlbestimmung ergänzt, für welche je 50µl Suspension entnommen wurde.

2.2.10.3 Disulfiram-Monoversuch

Bei dem Einzelversuch mit dem potentiellen Therapeutikum DSF wurde dieses als Konzentrationsreihe einer definierten Startmenge von KG-1a-Zellen (3×10^6 Zellen, Dichte: $0,6 \times 10^6$ Zellen/ml) hinzugefügt. Nach 0h, 24h, 48h und 72h-Inkubation wurde jeweils eine zytometrische Messung am LSR II durchgeführt, um mögliche Effekte darstellen zu können. Der nachfolgende Abschnitt beschreibt die einzelnen Schritte des Versuches von der Vorbereitung der Versuchsansätze, über die Färbung mit Fluorochromen bis zur FACS-Messung.

Da die Zellzahl und die Vitalität nicht so rasant abnahm wie im Doxo-Monoversuch, wurde vermutet, dass die Behandlung weniger zytotoxisch auf KG-1a-Zellen wirkt. Die Zelldichte von $0,6 \times 10^6$ Zellen/ml wurde dennoch zur besseren Vergleichbarkeit beibehalten.

2.2.10.4 Disulfiram Ansatz

Die Vorbereitung der Versuchsansätze erfolgte unter sterilen Bedingungen an der Labor-Bench.

Es wurden die Schritte 1) und 2) aus Kapitel 2.2.7 (s. S. 35) durchgeführt und anschließend mit folgendem Protokoll fortgefahren:

- 3) Beschriften von sechs 6-Well-Platten für je 8 Proben für 24h-, 48h-, 72h-Messung (je Well 5ml Inhalt).
- 4) Beschriften von acht 50ml Falcons für DSF-Konzentrationsreihe (vgl. KZV). Endvolumen je Falcon sind 18ml (9ml KG-1a-Zellen und 9ml RPMI+(20% FCS)-DSF-Lösung).
- 5) Einstellen einer ausreichenden Menge KG-1a-Zellen auf $1,2 \times 10^6$ /ml.
- 6) Jeweils 9ml auf Raumtemperatur vorgewärmtes Medium (RPMI+(20% FCS)) vorlegen (Kontrolle 12ml RPMI+(20% FCS)).
- 7) In 10 μ M-Falcon zusätzlich: Hinzugabe von 8928 μ l RPMI+(20% FCS) mit 72 μ l DSF-Stock-Lösung (entspricht 20 μ M-DSF-Konzentration).
- 8) Resuspendieren und Überführen von je 9ml in das nächste 50ml Falcon.
- 9) Verwerfen der letzten 9ml (Kontrolle wird ausgespart).
- 10) Von Kontroll-Falcon erst 48 μ l des 12ml RPMI+(20%FCS)-Mediums entnehmen und 48 μ l DMSO hinzugeben
- 11) Hinzugabe von 9ml KG-1a-Zellen (Dichte: $1,2 \times 10^6$ /ml) je Falcon (in Kontrolle 12ml), anschließend resuspendieren. Durch das vorgelegte RPMI+(20%FCS)-Volumen erhält man eine Enddichte von $0,6 \times 10^6$ /ml.

Es ergibt sich folgende Konzentrationsreihe:

Tabelle 10: Disulfiram-Konzentration und verwendete -Volumina (Hauptversuch)

Aufgelistet sind die DSF Zielkonzentrationen und die hierfür verwendeten Volumina der DSF-Stocklösung in unverdünnter Form für Zellsuspensionen mit 5ml Volumen. In Anlehnung an verwendete Konzentrationen in (Conticello et al., 2012)

Abkürzungen: DSF - Disulfiram

Disulfiram-Konzentration	Vol. DSF in 5ml Well-Inhalt
0,0μM Kontrolle	5/64 μ l DMSO
5/32μM	5/32 μ l DSF
5/16μM	5/16 μ l DSF
5/8μM	5/8 μ l DSF
5/4μM	5/4 μ l DSF

5/2μM	5/2 μ l DSF
5μM	5 μ l DSF
10μM	10 μ l DSF

- 12) Befüllen der 6-Well-Platten: Überführen von 5ml Ansatz (KG-1a-Zellen-DSF-Gemisch) aus den entsprechend beschrifteten Konzentrations-Falcons pro Well, vorher immer resuspendieren.
- 13) Immer erst eine Konzentration auf alle Wells zu Ende verteilen.
- 14) Schwenken und für max. 72h im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubieren.
- 15) Direkt im Anschluss: Überführen von 5ml (KG-1a-DMSO-Gemisch) des Kontroll-Falcons in die FACS-Röhrchen und Vorbereitung der Hoechst-Färbung für 0h-Messung.

2.2.10.5 Hoechst 33342-Färbung von DSF auf KG-1a-Zellen nach 0h-, 24h-, 48h-, 72h-Inkubation

Die nachfolgenden Protokollschritte für die Anfärbung der KG-1a-Zellen nach DSF-Inkubationszeiten von 0h, 24h, 48h und 72h sind vergleichbar mit den bereits in Kapitel 2.2.8.2 (s. S. 37) und Kapitel 2.2.8.3 (s. S. 37) beschriebenen Protokollen für die Anfärbung der Zellen nach Doxo-Inkubation.

- 1) Überführen der 5ml KG-1a-DSF-Versuchssansätze aus der jeweiligen 6-Well-Platte in je ein FACS-Röhrchen. Für die 0h-Messung gilt der in Kapitel 2.2.10.4 beschriebene Schritt 15).
- 2) Alle Röhrchen zentrifugieren (400g, 5min, 23°C) und Überstand abgießen.
- 3) Hinzugabe von 1ml auf Raumtemperatur vorgewärmtes DMEM je Probe, anschließend resuspendieren.

Die folgenden Schritte entsprechen den Schritten 5) bis 16) aus Kapitel 2.2.8.3 (s. S. 37). Lediglich in Schritt 14) wurden die Proben nur 2min gewaschen.

- 16) LSR-Messung wie in Kapitel 2.2.8.2 (s. S. 37) Schritt 13) beschrieben

2.2.11 Doxorubicin-Disulfiram-Kombinationsversuch

In dem Kombinationsversuch mit den potentiellen Therapeutika Doxo und DSF wurde eine Konzentration mit mittelmäßig ausgeprägten Effekten des klinisch angewandten Doxos als feste Größe gewählt. Zusammen mit den mittleren vier DSF-Konzentrationen (5/8 μ M, 5/4 μ M, 5/2 μ M und 5 μ M) wurde diese als Kombinationsbehandlung einer fest definierten Startmenge von KG-1a-Zellen (3x10⁶ Zellen, Dichte: 0,6x10⁶ Zellen/ml)

hinzugefügt. Zur besseren Vergleichbarkeit gegenüber der alleinigen Inkubation mit Doxo wurde eine 0,5µM-Doxo-Kontrolle eingeführt, auf welche die Ergebnisse anschließend normiert sind. Nach 0h, 24h, 48h und 72h wurde jeweils eine zytometrische Messung am LSR II durchgeführt, um mögliche Effekte v.a. an der SP mittels Hoechst-Färbung darstellen zu können.

Der nachfolgende Abschnitt beschreibt die einzelnen Schritte des Versuches von der Vorbereitung der Versuchsansätze, über die Färbung mit Fluorochromen bis zur FACS-Messung.

2.2.11.1 Doxorubicin-Disulfiram-Versuchsansatz

Die Vorbereitung der Versuchsansätze erfolgte unter sterilen Bedingungen an der Labor-Bench.

Es wurden die Schritte 1) bis 4) aus dem Kapitel 2.2.10.4 (s. S. 42) durchgeführt, wobei bei Schritt 3) nur drei 6-Well-Platten und in Schritt 4) sechs 50ml-Falcons beschriftet werden mussten, da die Probenanzahl wie im Doxo-Versuch auf insgesamt sechs angepasst wurde.

- 1) Beschriften von drei 6-Well-Patten für 24h-, 48h-, 72h-Inkubation und sechs 50ml-Falcons für den Konzentrationsansatz.

Tabelle 11: Disulfiram- /Doxorubicin-Konzentrationen und verwendete -Volumina

Aufgelistet sind die DSF- und Doxo-Zielkonzentrationen und die hierfür verwendeten Volumina der DSF- und Doxo-Stocklösungen für Zellsuspensionen mit 5ml Volumen des Kombinationsversuches.

Abkürzungen: DSF – Disulfiram; Doxo – Doxorubicin, Vol. – Volumen

Konzentrationsreihe DSF+Doxo	Vol. DSF in 5ml Well-Inhalt	Vol. Doxo (10:1- Verdünnung) in 5ml Well-Inhalt
Kontrolle (DMSO + Saline)	5µl DMSO	7,25µl Saline
0,5µM-Doxo-Kontrolle	-	7,25µl
5/8µM-DSF+0,5µM-Doxo	5/8µl DSF	7,25µl
5/4µM-DSF+0,5µM-Doxo	5/4µl DSF	7,25µl
5/2µM-DSF+0,5µM-Doxo	5/2µl DSF	7,25µl
5µM-DSF+0,5µM-Doxo	5µl DSF	7,25µl

- 2) In jedes Falcon 9ml auf Raumtemperatur vorgewärmtes RPMI+ (20% FCS) vorlegen (in Kontrolle 12ml).

- 3) In 5µM-Probe zusätzliche 8964µl und 36µl der DSF-Stocklösung (entspricht 10µM-DSF-Konzentration) hinzugeben.
- 4) Entnahme von 9ml RPMI+(20% FCS)-DSF-Gemisch und Überführung ins nächste Falcon (beginnend von höchster Konzentration).
- 5) Letzte Entnahme wird verworfen, Kontrolle wird ausgespart.
- 6) Von Kontroll-Falcon mit 12ml RPMI+(20% FCS) 58,8µl entnehmen und mit 24µl DMSO und 34,8µl Saline ergänzen.
- 7) Einstellen der Zell-Suspension auf eine Dichte von $1,2 \times 10^6$ /ml mit RPMI+(20% FCS).
- 8) Hinzugabe von 9ml KG-1a-Zellen in alle Falcons und gut resuspendieren (in Kontrolle 12ml!).
- 9) Entnahme von je 26,1µl des KG-1a-DSF-RPMI+-Gemischs und Hinzugabe von 26,1µl Doxo (1:10 Verdünnung).
- 10) Befüllen der 6-Well-Platten: Je Well 5ml Ansatz (KG-1a-DSF-Doxo-Gemisch) resuspendieren und überführen.
- 11) Immer erst eine Konzentration zu Ende verteilen.
- 12) Fertige Wells leicht manuell schwenken und für max. 72h in den Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubieren lassen.
- 13) Direkt im Anschluss: Überführen von 5ml (KG-1a-Zellen-DMSO-Saline-Gemisch) aus Kontroll-Falcon in FACS-Röhrchen und Vorbereitung der Hoechst-Färbung für 0h-Messung.

2.2.11.2 Hoechst 33342-Färbung von Doxo (0,5µM) und DSF auf KG-1a-Zellen nach 0h-, 24h-, 48h-, 72h-Inkubation

Die Hoechst 33342- Färbung erfolgte auf der Grundlage der Hoechst 33342-Färbung von DSF auf KG-1a-Zellen nach 0h-, 24h-, 48h-, 72h-Inkubation (s. Kapitel 2.2.10.5, S. 43).

2.2.12 Doxorubicin-Disulfiram-Langzeitkombinationsversuch

Der Langzeitkombinationsversuch ist die Erweiterung des, im vorherigen Unterkapitel beschriebenen, Doxo/DSF-Kombinations-Versuches mit einer Inkubationszeit von 72h, auf eine Inkubationszeit von bis zu 120h. Um die Versorgung der Leukämiezellen über den ganzen Zeitraum zu sichern, wurde nach 48h Inkubation ein Mediumwechsel mit erneuter Anreicherung der Therapeutika vorgenommen. Nach Inkubationszeiten von 0h,

24h, 48h, 72h, 96h und 120h wurde jeweils eine zytometrische Messung am LSR II durchgeführt, um mögliche Effekte darstellen zu können.

Der nachfolgende Abschnitt beschreibt die einzelnen Schritte des Versuches von der Vorbereitung der Versuchsansätze, über die Färbung mit Fluorochromen bis zur FACS-Messung.

2.2.12.1 Doxorubicin-Disulfiram-Langzeitinkubations-Versuchsansatz

Der Versuchsansatz entspricht den in Kapitel 2.2.11.1 (s. S. 44) beschriebenen Punkten. Lediglich durch die Erweiterung der Inkubationszeit haben sich Veränderungen in der Verbrauchsmenge und der einzelnen Volumina ergeben.

Tabelle 12: Veränderungen vom 72h- zum 120h-Kombinationsversuch

Abkürzungen: RPMI – Roswell Park Memorial Institute; FCS – fetal calve serum; DSF – Disulfiram, DMSO - Dimethylsulfoxid

Kombinationsversuch über 72h	Kombinationsversuch über 120h
Drei 6-Well-Platten	Fünf 6-Well-Platten
Vorlegen von 9ml RPMI+(20%FCS) (Kontrolle 12ml)	Vorlegen von 15ml RPMI+(20%FCS) (Kontrolle 18ml)
Entnahme von 36µl RPMI+(20%FCS) und hinzufügen von 36µl DSF-Stammlösung	Entnahme von 60µl RPMI+(20%FCS) und hinzufügen von 60µl DSF-Stammlösung
Ergänzen von zusätzlichen 9ml RPMI+(20%FCS)	Ergänzen von zusätzlichen 15ml RPMI+(20%FCS)
Überführen von 9ml RPMI+(20%FCS)-DSF-Gemisch	Überführen von 15ml RPMI+(20%FCS)-DSF-Gemisch
Entnahme von 58,8µl aus Kontrolle und Ersetzen durch 24µl DMSO und 34,8µl Saline	Entnahme von 41,22µl aus Kontrolle und Ersetzen durch 36µl DMSO und 5,22µl Saline
Entnahme von 26,1µl KG-1a-DSF-Gemisch und Hinzugabe von 26,1µl Doxorubicin (1:10 Verdünnung)	Entnahmen von 4,35µl KG-1a-DSF-Gemisch und Hinzugabe von 4,35µl Doxorubicin (unverdünnt)

2.2.12.2 Hoechst 33342-Färbung von Doxorubicin (0,5µM) und DSF auf KG-1a-Zellen 0h, 24h, 48h, 72h, 96h und 120h

Die Hoechst 33342- Färbung erfolgte auf der Grundlage der „Hoechst 33342-Färbung von DSF auf KG-1a-Zellen 0h, 24h, 48h, 72h“ (s. Kapitel 2.2.10.5, S. 43).

2.2.12.3 Mediumwechsel während des Langzeit-Inkubationsversuches

Die Ausweitung der Inkubation von Doxo und DSF im Langzeitversuch (LZV) birgt das Problem der Mangelernährung der Zellen. Wie im Abschnitt „Passagieren von Zellkulturen“ (s. Kapitel 2.2.3.8, S. 27) beschrieben, wurden die KG-1a-Zellen jeden zweiten Tag gesplittet und mit neuem Nährmedium (RPMI+(20% FCS)) versorgt. Um das Problem der Mangelernährung zu beheben, wurde sich für ein Mediumwechsel nach 48h für die Proben mit einer Inkubationsdauer von 72h, 96h und 120h entschieden. Da beim Passagieren die Zellen zur Hälfte in altem Medium verbleiben und zur anderen Hälfte neues Medium ergänzt wird, wird auch für den Mediumtausch nach 48h ein RPMI+(20%FCS)-Gemisch aus altem und neuem Medium („Alt-Neu-Medium“, Verhältnis 44,4ml alt zu 55,5ml neu) verwendet. Das alte Medium wurde aus KG-1a-Kulturflaschen gewonnen, indem der Inhalt zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und bei 4°C gesammelt wurde.

2.2.12.4 Durchführung des Medium-Tausches für Versuchsansätze mit 72h-, 96h- und 120h-Inkubationszeit

Am Tag des Mediumwechsels wurde altes und neues Medium mit den passenden Medikamentenkonzentrationen versehen, sodass es zu einer zweiten Inkubation kam. Zur Durchführung des Medium-Tausches diente folgendes Protokoll:

- 1) Entnahme des KG-1a-Versuchsansatz, Schwenken, Resuspendieren und komplettes Überführen der Inhalte in beschriftete Falcons
- 2) Zentrifugieren (7min, 400g, 23°C)
- 3) Abpipettieren von 4,5ml Überstand je Röhrchen
- 4) Ergänzen von 4,5ml RPMI+(20% FCS) (Alt-Neu-Medium mit entsprechender Medikamentenkonzentration) je Röhrchen
- 5) Resuspendieren und Überführen in alte 6-Well-Platten

In Schritt 3) werden nur 4,5ml des Überstands abpipettiert, um nicht das Zellpellet zu berühren und unnötig viele Zellen zu aspirieren. Die dadurch verbliebenen 500µl verdünnen das anschließend hinzuzuführende Alt-Neu-RPMI+(20%-FCS)-Medium.

2.2.12.5 Medikamentenkonzentrationsreihe für 48h-Mediumtausch

Um das im vorherigen Unterkapitel erwähnte Verdünnungsproblem zu lösen wurde ein höherer Anteil an neuem Medium und eine höhere Medikamentenkonzentration innerhalb des Alt-Neu-Mediums beachtet. Erst durch die Zusammenführung mit den 500µl im

Falcon des Zellpellets ergibt sich die korrekte Medikamentenkonzentration. Die nachstehenden Schritte beinhalten die Herstellung der Konzentrationsreihe für den Mediumtausch nach 48h-Inkubation:

- 1) Vorbereiten eines Volumens von 100ml Alt-Neu-RPMI+(20%-FCS)-Medium je 48h-Mediumtausch.
- 2) Vorlegen von 7,5ml Mediumgemisch je Konzentrationsfalcon (Endvolumen werden 15ml sein).
- 3) Entnahme von 33,3 μ l Alt-Neu-RPMI+(20%-FCS)-Medium (beginnend mit 5 μ M DSF + 0,5 μ M Doxo-Probe).
- 4) Hinzugabe von 33,3 μ l 5mM-DSF-Stammlösung (Konzentration für ein Volumen mit 16,65ml berechnet, da aufgrund der Verdünnung durch altes Medium im Ursprungsfalcon mit Zellpellet höhere Medikamentenkonzentrationen im Mediumansatz nötig sind).
- 5) Fortführen der Konzentrationsreihe entsprechend der vorherigen Versuche, Überführen von je 7,5ml auf nächstniedrigere Konzentration und Resuspendieren.
- 6) Ergänzung von 2,41 μ l Doxo (Rechnung: 0,145 μ l/ml auf 16,65ml) um 0,5 μ M-Konzentration zu erreichen.
- 7) Hinzufügen von 2,41 μ l Saline und 16,65 μ l DMSO in Kontrolle.

3 Ergebnisse

Das folgende Kapitel beinhaltet die Ergebnisse der Experimente. Es ist in vier Abschnitte gegliedert.

Im ersten Abschnitt wird die Gating-Hierarchie als Ergebnis präsentiert. Die Reihenfolge der gelegten Gates zur Darstellung der SP kann in einer hohen Varianz erfolgen, sodass die gewählte Art und deren Begründung bereits als ein Ergebnis zu werten ist (näheres s. Kapitel 3.1, S. 49ff.).

Die Abschnitte zwei bis vier beinhalten die Analyse der Behandlung leukämischer Stammzellen der KG-1a-Zelllinie mit den Medikamenten Doxo und DSF als Monoversuch und als Kombinationsversuch (über 72h und 120h) in Bezug auf mögliche Proliferationsauswirkungen, Zytotoxizität, den Anteil der diploiden SP und non-diploider SP (= tetraploide SP) und Aussagen zur Verteilung der Zellen im Zellzyklus.

3.1 Gating-Hierarchie zur Darstellung der Side Population leukämischer Stammzellen

Die Gating-Hierarchie ist eine Abfolge bewusst gesetzter Gates (vgl. Abbildung 3.1). Das Setzen von Gates ist eine Methodik, mit welcher man Zell-Populationen erfassen und sich anschließend spezifischer darstellen lassen kann (näheres s. Kapitel 2.2.4, S. 28ff.).

Die gemessenen Parameter der Zellen können in einer Vielzahl von möglichen Varianten

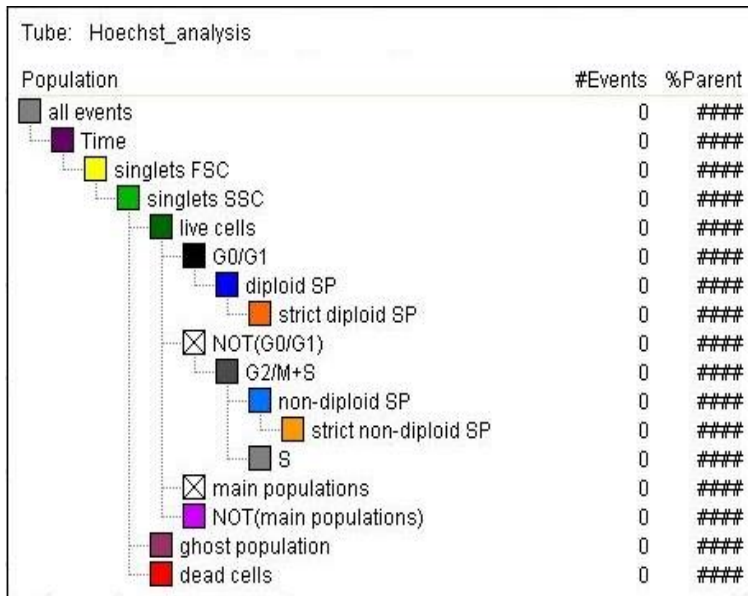


Abbildung 3.1: Gating Hierarchie

Die Gating-Hierarchie zeigt eine festgelegte Reihenfolge von Markierungen verschiedenster Zellpopulationen, die spezifische Aussagen zu Eigenschaften der ausgewählten Zellen erlauben.

Abkürzungen: FSC- forward scatter; SSC – side scatter. G₀/G₁ – Gap 0-/Gap 1-Phase des Zellzyklus; SP – Side Population; G₂/M+S – G₂/M-Phase und S-Phase des Zellzyklus; NOT(...) invertiertes Gate von (...)

auf den zweidimensionalen Dot- bzw. Kontour-Plots angezeigt werden. Eine Gating-Hierarchie ist das Resultat einer vorher angewandten Gating-Strategie. Die Erstellung eines Arbeitsblattes, bestehend aus speziell gewählter Gates, soll in dem folgenden Abschnitt erläutert werden. Es hat zum Ziel, die SP möglichst differenziert darzustellen, um potentielle Effekte auf diese durch die Behandlung mit den Therapeutika analysieren zu können.

3.1.1 Time windows-Gates zur Erfassung sinnvoller Events

Alle durch die PMTs detektierten Events werden in einem Dot-Plot den Merkmalen „Zeit“ (Abszisse) und ihrem Fluoreszieren im „Hoechst-Blue“ (Ordinate) zugeordnet (s. Abbildung 3.2, S. 50). Die ersten Events werden meist in einer gedrosselten Geschwindigkeit gemessen, sodass Einstellungen überprüft werden können.

Die anschließend in einheitlich gesteigerter Geschwindigkeit gemessenen Zellen werden mit einem „Time windows“-Gate erfasst.

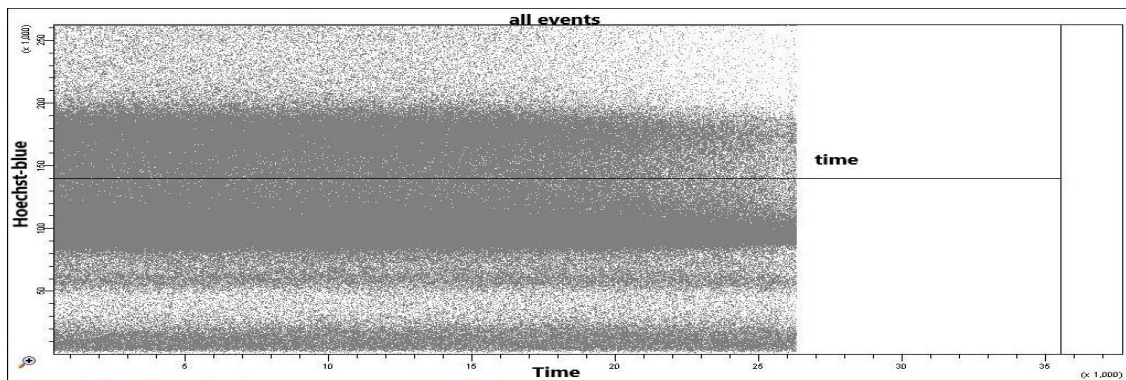


Abbildung 3.2: Erstellung des Time-Gates.

Dot-Plot-Darstellung der „all events“ mit Erstellung des Time-Gates.

3.1.2 Differenzierung von Singlets und Doubletten mit Hilfe des Streulichts

Die ausgewählten Events werden anschließend in den Parametern des Streulichts FSC und SSC gegen sich selbst aufgetragen. FSC und SSC kann zusätzlich in die Größen Area („A“ – die Fläche unter der Kurve), Height („H“ – die Höhe des höchsten Laser-Impulses) und Width („W“ – die Zeit, die die Zelle benötigt, um den Laserpuls zu passieren) eingeteilt werden. Singlets, einzelne Zellen, korrelieren bei einem diploiden DNA-Gehalt in A, H und W, sodass sich bei der Auftragung von FSC-A und FSC-H eine Diagonale bilden sollte. Für Zellen mit einem tetraploiden DNA-Gehalt gilt, dass sie einen doppelt so hohen Wert in A und H aufweisen und lediglich im Parameter W gleichbleiben. Doubletten haben einen doppelt so großes „W“ und „A“. Der Parameter „H“ bleibt dagegen gleich.

An Geräten der Firma BD kann man durch Darstellung der Events in FSC-A und FSC-H ein „Area-Scaling“ durchführen. Dabei werden die Zellen mit den korrelierenden Parametern gegeneinander aufgetragen. Singlets sollten sich in einer Diagonalen präsentieren, während Doubletten einen größeren Area-Wert bei gleichbleibender Höhe besitzen. Erst werden die Singlets im Area-Scaling von FSC-A und FSC-H eingegrenzt. Anschließend werden nochmals die Zellen des Time-window-Gates in SSC-A und SSC-

H angezeigt und ein weiteres Gate zur Bestimmung der „SSC-singlets“ durchgeführt (s. Abbildung 3.3, S. 51).

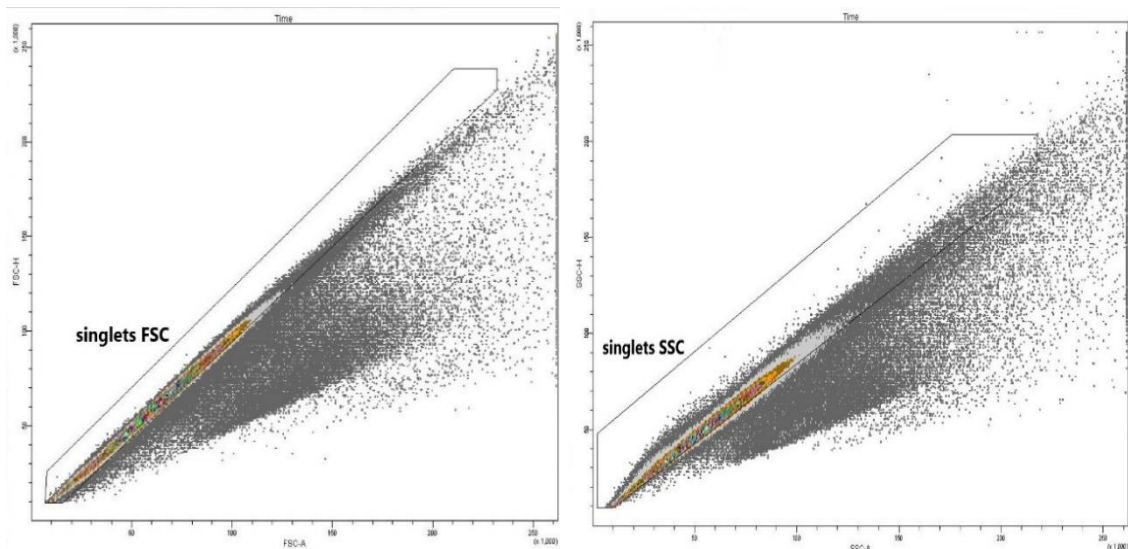


Abbildung 3.3: Singlets - Area-Scaling.

Links: Gating von „singlets FSC“ nach Darstellung der Zellen des Time-Gates im Dot-Plot aufgetragen nach FSC-A (X-Achse) und FSC-H (Y-Achse). Rechts: Gating von „singlets SSC“ im Dot-Plot-Diagramm aufgetragen nach SSC-A (X-Achse) und SSC-H (Y-Achse). „Singlets“ – einzelne Zellen stellen sich auf einer Diagonale im Area-Scaling da.

Abkürzungen: FSC – forward scatter, FSC-A – forward scatter area, FSC-H – forward scatter high, SSC – side scatter, SSC-A – side scatter area, SSC-H – side scatter high

3.1.3 Erfassen des Anteils toter Zellen und lebender Zellen

Durch das weitere Darstellen der „singlets SSC“, mit dem Merkmal des FSC-A auf der Abszisse und dem Lebend/Tot-Farbstoff PI auf der Ordinate, können lebende Zellen von toten abgegrenzt werden. Als „dead-cells“ werden Events betitelt, welche eine PI-Anreicherung vorweisen und somit PI-positiv (PI+) sind. Diese Zellen müssen eine gestörte Biomembran besitzen, damit PI diese passieren und in der DNA interkalieren kann.

„Live cells“ sind dagegen PI-negativ (s. Abbildung 3.4, S. 52). Ganz dicht am Ursprung befinden sich „PI-“ Zellen mit einem sehr niedrigen FSC-A. In diesem Fall wird von untergehenden Zellresten mit allerdings intakter Zellmembran ausgegangen.

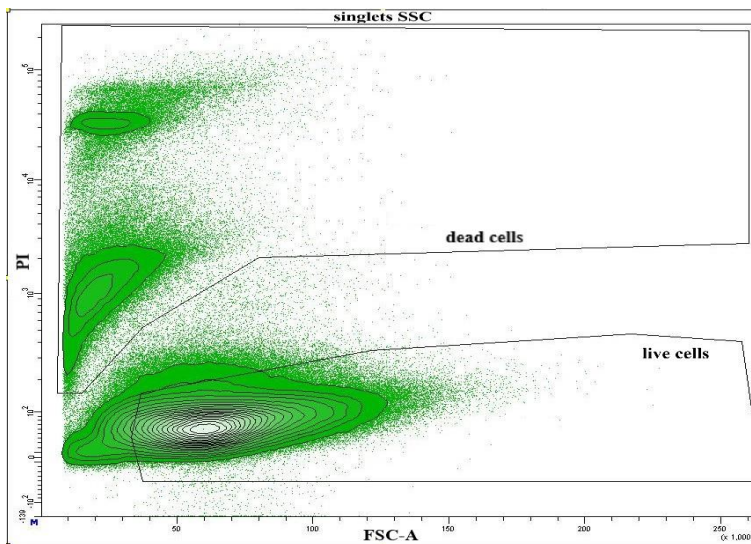


Abbildung 3.4: live- und dead cells-Gating

Live cells- und Dead cells-Gate nach Darstellung im singlets SSC-Kontour-Plot durch Auftragen nach FSC-A (Abszisse) und PI (Ordinate).

Abkürzungen: SSC – side scatter, FSC-A – forward scatter – area, PI – Propidium Iodid

3.1.4 Erfassen der Phasen des Zellzyklus und der Side Population

Die Events aus dem „Live cells“-Gate lassen sich im nächsten Kontour-Plot in Hoechst-Red-A und Hoechst-Blue-A auftragen. Die sich darstellende Diagonale beherbergt zwei Populationen, welche ineinander übergehen und jeweils einen sichelförmigen Schweif besitzen. In der ersten, schwächer fluoreszierenden Population liegt die DNA in der G₀-G₁-Phase noch in einem einfachen Chromosomensatz (2n) vor. Während die zweite

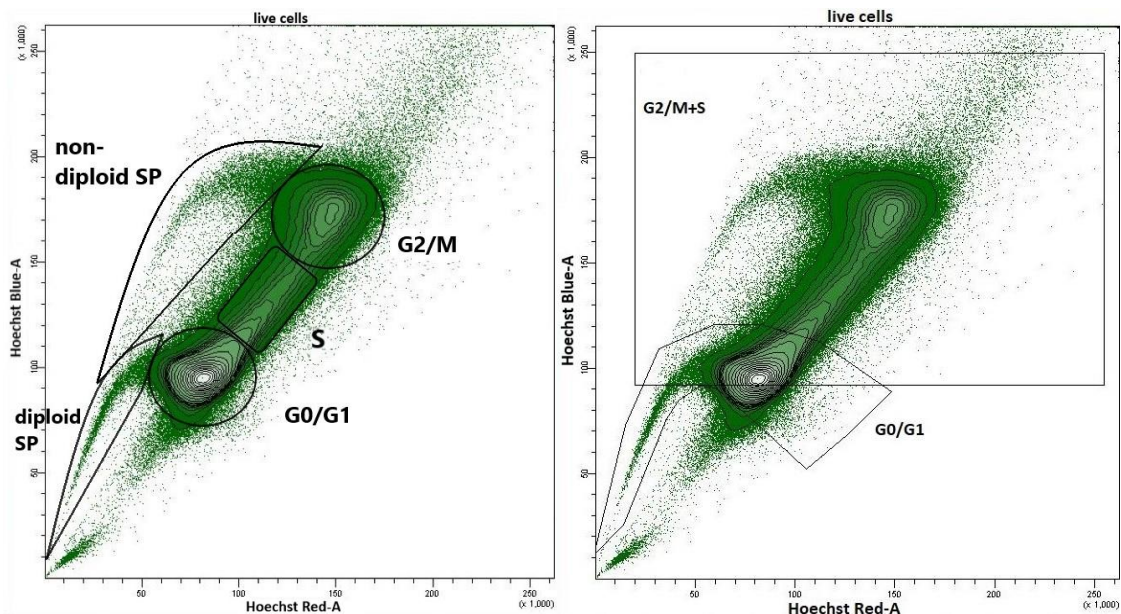


Abbildung 3.5: schematische Darstellung und Gating der Zellzyklusstadien

Links: schematische Zuordnung der Zellzyklusstadien in den darstellenden Populationen nach Auftragung der live cells in einem Kontourplot mit den Achsenbeschriftungen „Hoechst Red-A“ (Abszisse) und „Hoechst Blue-A“ (Ordinate) und Zuordnung der SP-Gates. Rechts: Darstellung der Lage der Gates für die „G₀/G₁-“ und „G₂/M+S-Population“ nach Auftragung der live cells in einem Kontourplot mit den Achsenbeschriftungen „Hoechst Red-A“ (Abszisse) und „Hoechst Blue-A“ (Ordinate).

Abkürzungen: SP – Side Population, G₂- Gap-2-Phase, M – Mitose-Phase, S – Synthese-Phase, G₀ – Gap-0-Phase, G₁ – Gap-1-Phase, Hoechst Blue-A – Hoechst Blue-Area, Hoechst Red-A – Hoechst Red-Area

Population den Übergang der Zellen mit Chromosomen- und DNA-Verdopplung ($4n$) darstellt. Diese zweite, stärker fluoreszierende Population enthält die Phasen S-G₂M (s. Abbildung 3.5, S. 52).

Bei der Färbung von HSC mittels Hoechst 33342 fiel *Goodell et al. 1996* in der simultanen Darstellung der gemessenen Events von Hoechst-Red und Hoechst-Blue eine nicht identifizierbare Subpopulation auf (*Goodell et al., 1996*). Diese unbekannte Fraktion, welche bogenförmig den Hauptpopulationen entsprang und weniger intensiv als die anderen Populationen angefärbt war, wurde Side Population (SP) genannt. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Zellen der SP sehr homogene Oberflächenantigene der HSC besaßen und dabei eine bis zu 1000-fach erhöhte Stammzellaktivität aufwiesen (*Spangrude et al., 1988*). Ihre Wiederherstellungsaktivität gleicht denen von ruhenden Stammzellen. Die geringe Färbbarkeit von SP Zellen liegt der Aktivität eines Membrantransporterproteins der MDR1 (= multidrug-resistance)-Familie oder der MDR-like-Proteinen zugrunde, welches aktiv biochemische Stoffe (z.B. Hoechst 33342, aber auch Medikamente) aus der Zelle pumpt. Dieser physiologische Efflux der Zellen schützt sie vor äußeren Einflüssen. Dabei scheint es, dass je niedriger die Fluoreszenzintensität der Zellen ist, die Zellen naiver in ihrer Differenzierung und höher in ihrer Stammzell-Aktivität sind (*Goodell et al., 1996*).

Verapamil ist bekannt für seine Eigenschaft, Transporter der MDR-Familie effektiv zu hemmen (*Goodell et al., 1996*). Bei gleichzeitiger Färbung der HSC mit Hoechst 33342 und Verapamil lassen sich die membranständigen Pumpen blockieren und die Darstellung der SP-Fraktion unterdrücken.

Um die Hauptpopulation der G₀/G₁-Zellen und ihre SP wird ein G₀/G₁-Gate gelegt. Durch Invertierung des Gates zu „Non- G₀/G₁“ werden alle anderen Zellen abgegrenzt und es erfolgt keine doppelte Zählung. Ebenfalls wird ein „main populations“-Gate, in Form einer Diagonalen, sehr strikt an die Zentren der Hauptpopulationen gesetzt und invertiert. Die Darstellung der „Not (main-populations)“-Events soll im weiteren Verlauf helfen

eine bessere Abgrenzung der SP zu den Hauptpopulationen zu schaffen (s. Abbildung 3.6, S. 54).

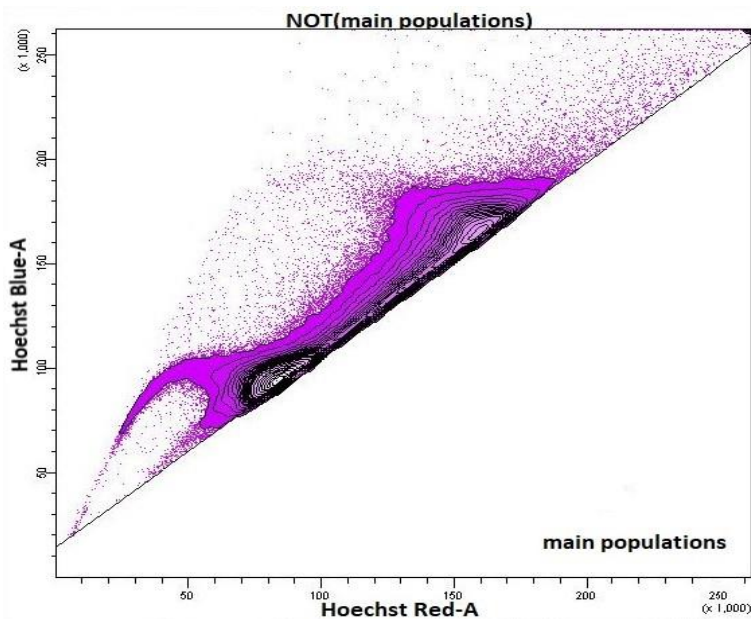


Abbildung 3.6: Darstellung der SP

Darstellung der „NOT(main populations)“ (= Invertiertes Main populations-Gate) durch Auftragung nach Hoechst Red-A und Hoechst Blue-A zur Festlegung der SP-Gates für diploide und non-diploide SP

Abkürzungen: Hoechst Red-A - Hoechst Red-Area, Hoechst Blue-A - Hoechst Blue-A

Die zweite Population beinhaltet Zellen mit einem zweifachen Chromosomensatz. Als tetraploide Zellen gehören sie dem Zellzyklus-Stadien G_2 („Gap 2“) und M („Mitose“) an und strahlen wesentlich intensiver im UV-Kanal. Der ebenfalls am linken Rand entspringende bogenförmige Schweif enthält tetraploide Zellen mit Stammzellkriterien. Zwischen der G_0/G_1 -Population und der G_2/M -Population befinden sich DNA-synthetisierende Zellen des S-Stadiums („Synthese-Stadium“) des Zellzyklus. Da der Übergang fließend ist, wird als erstes ein großes Gate um die Gesamtheit aller Zellen der G_2/M - und S-Stadien gelegt und mit „ $G_2/M+S$ “-Gate betitelt. In einem separaten Kontourplot der $G_2/M+S$ -Zellen wird versucht, die Zellen im S-Stadium durch ein zusätzliches „S-Gate“ zu differenzieren. (s. Abbildung 3.7, S. 55).

3.1.5 Einteilung der Side Population

Die Gates für die SP werden in einem erneuten Hoechst-Red-Blue-Kontourplot festgelegt, in welchem die invertierten Zellen der Main-Populations, die Non-Main-Population-Events, gezeigt werden. In Analogie zu den Ursprungspopulationen der auslaufenden SP werden die Gates als „diploide SP“ für die G_0/G_1 -SP benannt. Die „non-diploid-SP“ beinhaltet, im Sinne einer Invertierung der diploiden SP, tetraploide Zellen mit Stammzeleigenschaften der G_2/M -Population und die davon nicht abgrenzbaren Zellen abseits der S-Phase. Die Lage der entstandenen SP-Gates wird in jeweils einem

Hoechst-Red-Blue-Kontourplot überprüft, in welchem Zellen des G_0/G_1 -Gates für die diploide SP und Zellen des $G_2/M+S$ -Gates für die non-diploide SP angezeigt werden (s. Abbildung 3.7, S. 55).

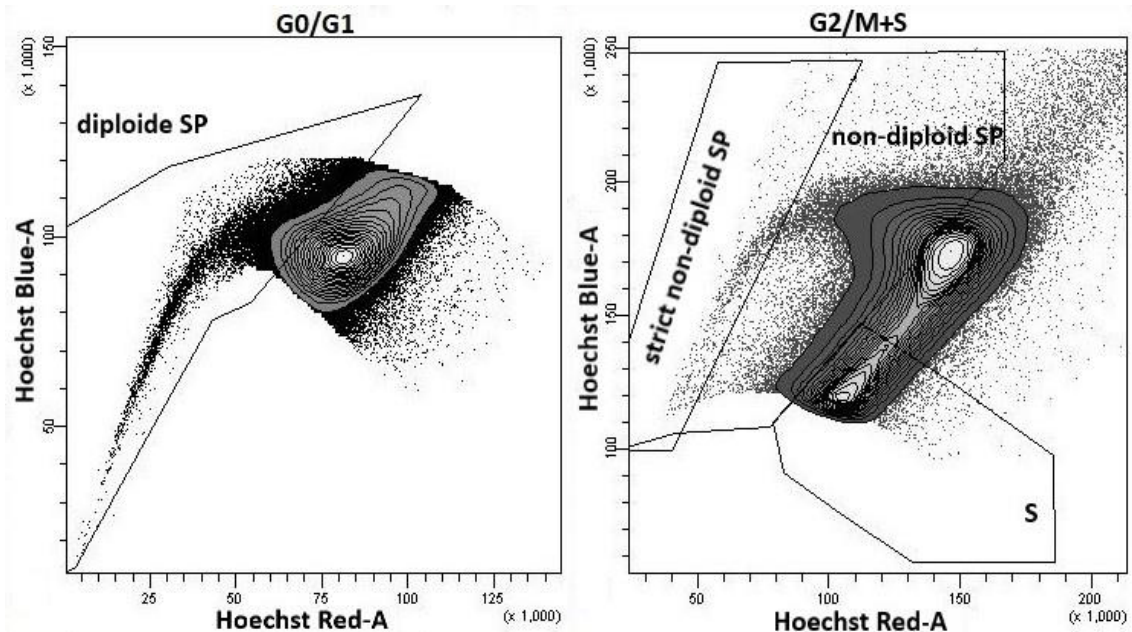


Abbildung 3.7: Überprüfen der SP Gates

Links Überprüfung des diploid SP-Gates nach Anzeige der G_0/G_1 -Zellen in Hoechst Red-A- und Hoechst Blue-A-Kanal.

Rechts: Überprüfung des non-diploid SP-Gates nach Anzeige der $G_2/M+S$ -Zellen und Legung des S-Phase-Gates sowie eines strict non-diploiden SP-Gates in Hoechst Red-A- und Hoechst Blue-A-Kanal.

Ein zusätzliches Gate für die Stammzellen in den letzten Kontourplot liegt strikt an der jeweiligen SP an und enthält nur Zellen mit frühen Stammzellkriterien. Als Begrenzung dient der Zenit des Schweifbogens hin zum kegelförmigen Ausläufer der Hauptpopulation und zusätzlich eine Darstellung der jeweiligen SP in einem zweidimensionalen Histogramm. Die Grenze entspricht der Hälfte des Betrages von Minimum zu Maximum im Histogramm auf der Hoechst-Red-Skala. Die Einteilungen früherer Arbeiten der Arbeitsgruppe in „early“, „intermediate“ und „late“ werden hier geändert (vgl. Mattes und Mack).

3.2 Analyse der Behandlung von leukämischen Zellen der KG-1a-Zelllinie mit Doxorubicin

In der Auswertung der Versuche zur Behandlung von KG-1a-Zellen und den Zellen mit Stammzeleigenschaften mittels Doxo, als etabliertes Leukämie-Medikament, wird zunächst auf mögliche Proliferationsveränderungen und allgemeine zytotoxische Effekte

eingegangen. Anschließend wird benannt, inwiefern sich die Anteile der diploiden und tetraploiden SP in Bezug auf ihre Hauptpopulationen und das Verhältnis zueinander durch die Behandlung verändert haben. Zuletzt werden allgemeine Veränderungen in den differenziert zugeordneten Phasen des Zellzyklus mittels der gegateten Populationen aus der Hoechst-Färbung beschrieben.

3.2.1 Auswertung potenzieller Effekte von Doxorubicin auf die Proliferation leukämischer Zellen der KG-1a-Zelllinie

An jedem Versuchstag werden die Zellen nach der Entnahme aus dem Inkubator zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen einheitlich mit frischem, angewärmtem Medium versehen. Anschließend erfolgt eine Zellzählung am ABX-Zell-Counter. Die dabei gemessene Anzahl an Zellen kann als Index für die proliferative Aktivität der Zellen während der Inkubation mit Doxo in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit angesehen werden.

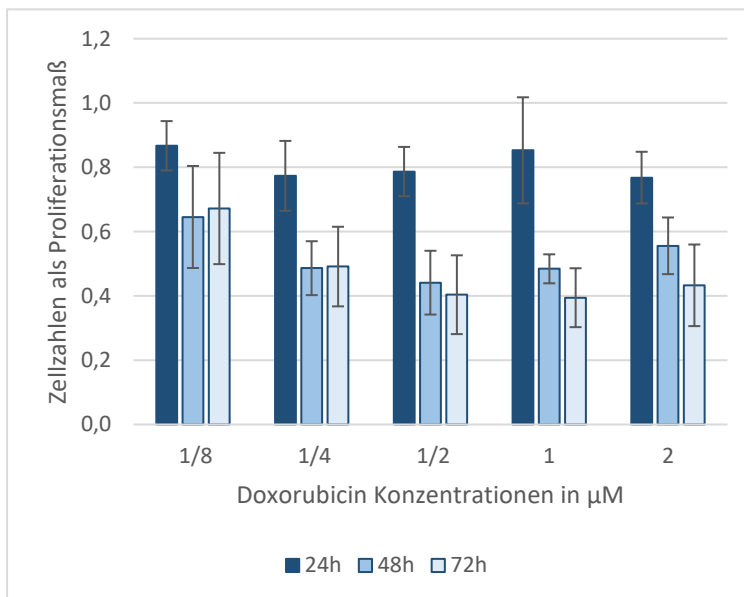


Abbildung 3.8: Zellzahlen als Index der Proliferationsaktivität nach Doxorubicin-Inkubation

Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Zellzahlen durch den ABX-Cell-Counter nach Doxorubicin-Inkubation und Normierung auf die Kontrolle in Abhängigkeit zu den einzelnen Doxo-Konzentrationen. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: µM – Mikromolar, h – Stunden

Die Darstellung der Zellzahlen (s. Abbildung 3.8) lässt, für Doxo-Konzentrationen von 1/4µM und größer, nach 48h einen deutlichen Abfall der Proliferation (über 50%) im Vergleich zur Kontrolle erkennen. Nach 72h ist eine weitere Regression (auf Werte um 0,4) für die Proben mit 1/2µM bis 2µM zu beobachten. In niedrigen Konzentrationen scheint somit keine dauerhafte Schädigung erreicht zu werden.

3.2.2 Auswertung potenzieller zytotoxischer Effekte von Doxorubicin auf leukämische Zellen der KG-1a-Zelllinie

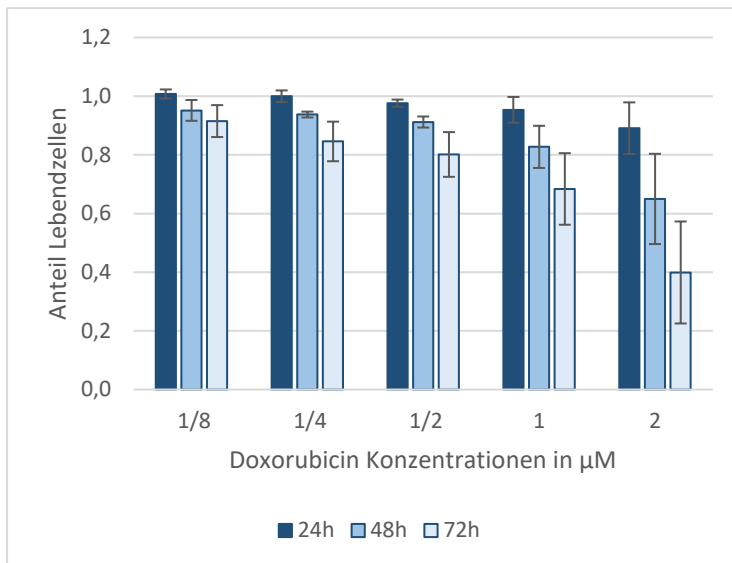


Abbildung 3.9: Lebendzellen nach Doxorubicin-Inkubation

Abgebildet sind die Mittelwerte des Anteils der Lebendzellen nach Doxorubicin-Inkubation und Normierung auf die Kontrolle in Abhängigkeit zu den einzelnen Doxo-Konzentrationen. Die Fehlerbalken zeigen die Werte einer Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: μM – Mikromolar, h – Stunden der Inkubation

In der Analyse eines potenziellen zytotoxischen Effekts von Doxo auf Zellen der KG-1a-Zelllinie werden die Werte des live-cells-Gate und die Werte des dead-cells-Gate zu einem Wert „Gesamtzellen“ zusammengefasst. Der prozentuale Anteil der Lebendzellen (live-cells) an der Gesamtzellanzahl wird als Indikator für den zytotoxischen Effekt von Doxo gewertet.

In der Auswertung des Anteils der Lebendzellen an der Gesamtzellanzahl ist eine konzentrations- und zeitabhängige Reduzierung des Anteils Lebendzellen zu beobachten (s. Abbildung 3.9). Der Anteil Lebendzellen der Kontrollprobe liegt jederzeit über 90% (vgl. Abbildung 7.1 im Anhang). Für die zwei niedrigsten Doxo-Konzentrationen kann nach 24h kaum ein Effekt beobachtet werden. Auch nach 72h liegt der Anteil der Lebendzellen weniger als 20% niedriger als die Kontrollprobe. Die konzentrations- und zeitabhängige Reduzierung der Zellen wird v.a. in den höheren Konzentrationen deutlich. Zwischen $1/2\mu\text{M}$ Doxo und $2\mu\text{M}$ Doxo können die Werte nach 72h bis zu 60% des Kontrollwertes gesenkt werden. Niedrigstwerte erreicht jeweils die $2\mu\text{M}$ Doxo-Probe.

3.2.3 Auswertung potenzieller Effekte von Doxorubicin auf den Anteil der diploiden SP leukämischer Zellen der KG-1a-Zelllinie

Zur Analyse eines möglichen Effektes durch Doxo auf Zellen der diploiden SP werden die gemessenen Werte der diploiden und strict diploiden SP (frühe Vorläuferzellen mit

Stammzeleigenschaften) unter Berücksichtigung der Zytotoxizität in das jeweilige Verhältnis zur G₀/G₁-Population gesetzt.

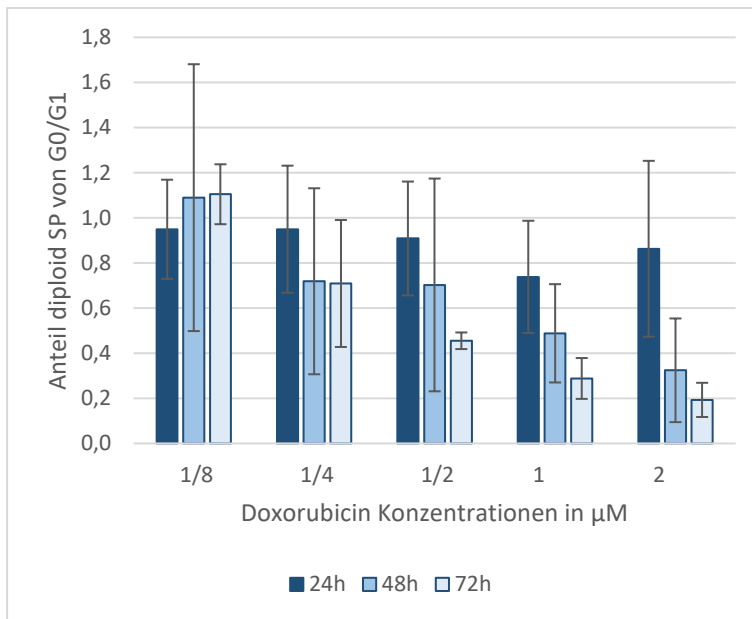


Abbildung 3.10: Anteil diploider SP von G₀/G₁ nach Doxorubicin-Inkubation unter Berücksichtigung der Zytotoxizität

Nach Berücksichtigung der Zytotoxizität zeigt sich ein konzentrations- und zeitabhängige Abnahme des Anteils der diploiden SP in der normierten Darstellung. Die Fehlerbalken stellen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum dar.

Abkürzungen: µM – Mikromolar, h – Stunde, SP – Side Population, G₀ – Gap-0-Phase, G₁ – Gap-1-Phase

Für den Anteil der diploiden SP zeichnet sich eine konzentrations- und zeitabhängige Abnahme insbesondere nach 48h und 72h Inkubationszeit ab (vgl. Abbildung 3.10). Bis auf die niedrigste Doxo-Konzentration (1/8µM-Doxo) sind alle Werte nach Normierung auf die Kontrollprobe niedriger als die Kontrolle. Nach 72h Inkubationszeit ist der Wert der 2µM-Doxo-Probe bei 0,19. Hier wurde ohne Normierung eine Zellzahl von 7,6 diploiden SP-Zellen auf eine Gesamtlebendzellzahl von 1000 leukämischen Zellen im Vergleich zu 44,8 Zellen in der Kontrollprobe bestimmt (Daten nicht gezeigt).

Die Dynamik verändert sich jedoch in der Darstellung des Anteils der strict diploiden SP (s. Abbildung 3.11). Kein Wert der Doxo-Proben ist nach Normierung kleiner als der Vergleichswert der Kontrolle. Es zeigt sich ein glockförmigen Kurvenverlauf dessen Höchstwerte in der 1/2µM-Doxokontrolle bestehen. Niedrigstwerte bilden jeweils die 1/8µM- und 2µM-Probe. Diese sind nach 72h Inkubationszeit nahezu zweifach so groß wie die Werte der Kontrollprobe. Eine mögliche Deutung könnte sein, dass in niedrigen Doxo-Konzentrationen lediglich eine Schädigung der ausgereiften leukämischen Zellen der Hauptpopulationen möglich ist. Erst ab einer Konzentration größer 1/2µM Doxo ist eine zusätzliche Schädigung der frühen Vorläuferzellen mit Stammzeleigenschaften möglich, womit deren Anteil im Verhältnis zur G₀/G₁-Population fällt.

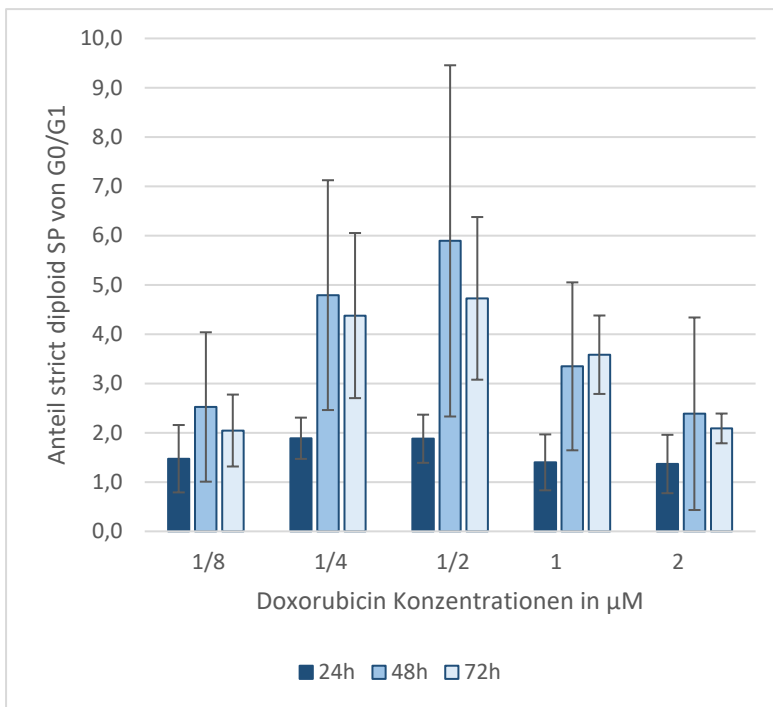


Abbildung 3.11: Anteil strict diploider SP von G_0/G_1 nach Doxorubicin-Inkubation unter Berücksichtigung der Zytotoxizität – Normierung auf Kontrolle

Im Vergleich zur diploiden SP zeigt die Grafik keine deutliche konzentrationsabhängige Abnahme des Anteils der strict diploiden SP. Kein Doxo-Ergebnis liegt unterhalb des Kontrollwertes. Die Fehlerbalken stellen die Werte einer Standardabweichung um den Mittelwert herum dar.

Abkürzungen: μM – Mikromolar, h – Stunde, SP – Side Population, G_0 – Gap-0-Phase, G_1 – Gap-1-Phase

3.2.4 Auswertung potenzieller Effekte von Doxorubicin auf den Anteil der tetraploiden SP leukämischer Zellen der KG-1a-Zelllinie

Für die Analyse eines möglichen Effektes durch Doxo auf tetraploide Zellen mit Stammzeleigenschaften werden die gemessenen Werte der tetraploiden und strict tetraploiden SP in das jeweilige Verhältnis zu den Ergebnissen des $G_2/M+S$ -Gates gesetzt. Als tetraploide SP werden streng genommen auch SP-Anteile bezeichnet, welche aus dem Anteil der S-Population fließend in den Hoechst-Schweif der tetraploiden Zellen übergehen. In der Gating-Hierarchie wurden sie als Zeichen der Invertierung auch als non-diploide Zellen bezeichnet. Zur besseren Abgrenzung wird jedoch im weiteren Verlauf von „tetraploider“ SP gesprochen.

In Bezug auf die $G_2/M+S$ -Population zeigt der Anteil der tetraploiden SP eine vergleichbare Dynamik (vgl. Abbildung 7.2 im Anhang) zu der bereits für den Anteil der strict-diploiden SP beschriebenen (s. Kapitel 3.2.3, S. 57).

Bis auf den 24h-Messwert der $2\mu\text{M}$ -Doxo-Probe ($0,78 \pm 0,40$) sind alle Doxo-Ergebnisse größer als die Kontrollwerte – es kommt zu einer Anreicherung der SP. Die niedrigsten Werte sind jeweils in der $2\mu\text{M}$ -Doxo-Probe.

Nach einer Inkubationszeit von 72h ist das genormte Ergebnis $1,38 \pm 0,62$. Die Messergebnisse nach 48h Inkubationszeit weisen insgesamt trotz klarer Ergebnisse

relativ hohe Schwankungen auf (Gründe für die Schwankungen der SP in der Hoechst Färbemethode, s. Kapitel 4.3.2, S. 86).

Gleiches ist für den Anteil der strict tetraploiden SP mit deutlich höheren Werten festzustellen (vgl. Abbildung 7.3 im Anhang). Der Endwert nach 72h Inkubationszeit liegt in der 2 μ M-Doxo-Probe bei $4,91 \pm 1,46$. Der höchste Mittelwert ist in der 1/2 μ M-Doxo-Probe nach 48h Inkubation ca. 32mal so hoch wie das Ergebnis der Kontrollprobe. Da die Fehlerbalken der 48h-Messwerte trotz klarer Ergebnisse erneut besonders groß sind, ist keine eindeutige Aussage über den Probenverlauf möglich.

3.2.5 Auswertung potenzieller Effekte von Doxorubicin auf das Verhältnis der strict diploiden und strict tetraploiden SP der KG-1a-Zelllinie

Nach Analyse des Verhaltens der strict diploiden und strict tetraploiden SP befasst sich dieses Kapitel mit dem Verhältnis der tetraploiden zur diploiden SP. Hierfür wurde ein Quotient (strict tetraploide SP/strict diploide SP, im weiteren Verlauf: strict 4n/strict 2n) aus den gemessenen Events der jeweiligen Gates bestimmt. Auf eine Normierung wurde in diesem Fall verzichtet, um den tatsächlichen Verhältnissfaktor zwischen den SP besser ablesen zu können.

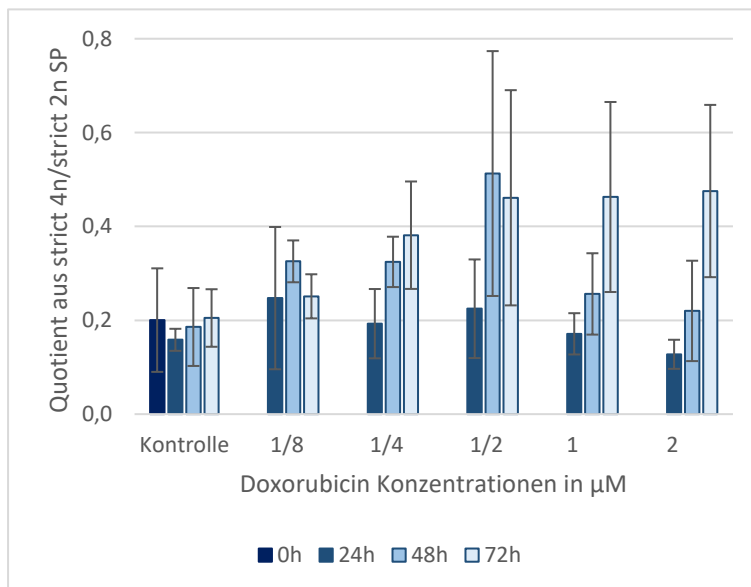


Abbildung 3.12: Quotient aus strict tetraploider und strict diploider SP nach Doxorubicin-Inkubation

Die Grafik zeigt die Verschiebung des Quotienten strict 4n/strict 2n nach 72 Stunden Doxo-Inkubation zu Gunsten der strict 4n Fraktion. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: μ M – Mikromolar, h – Stunden, 4n – tetraploid, 2n – diploid, SP – Side Population

Die Auswertung verdeutlicht, dass zur 0h-Messung mit einem initialen Quotienten von 0,2 ein 4n/2n-Verhältnis von 1:5 vorliegt (s. Abbildung 3.12). Doxoabhängig findet in den ersten 24h eine verstärkte Abnahme des Verhältnisses zu Ungunsten der strict tetraploiden SP statt (vgl. 1/8 μ M: $0,25 \pm 0,15$ und 2 μ M: $0,13 \pm 0,03$).

Bis zur 72h-Messung wandelt sich das Verhältnis und es kommt zu einer Verschiebung zu Gunsten der strict tetraploiden SP bis zu einem Wert von $0,48 \pm 0,18$ in der $2\mu\text{M}$ -Doxo-Probe.

3.2.6 Auswertung potenzieller Effekte von Doxorubicin auf das Verhältnis von KG-1a-Zellen in den Stadien des Zellzyklus nach Hoechst-Färbung

In dem folgenden Kapitel werden die Zellpopulationen G_0/G_1 , S und G_2/M nach Hoechst-Färbung der KG-1a-Zellen in ihren jeweiligen Verhältnissen zur Summe der drei Populationen (Gesamtpopulation) und unter Berücksichtigung der Zytotoxizität betrachtet.

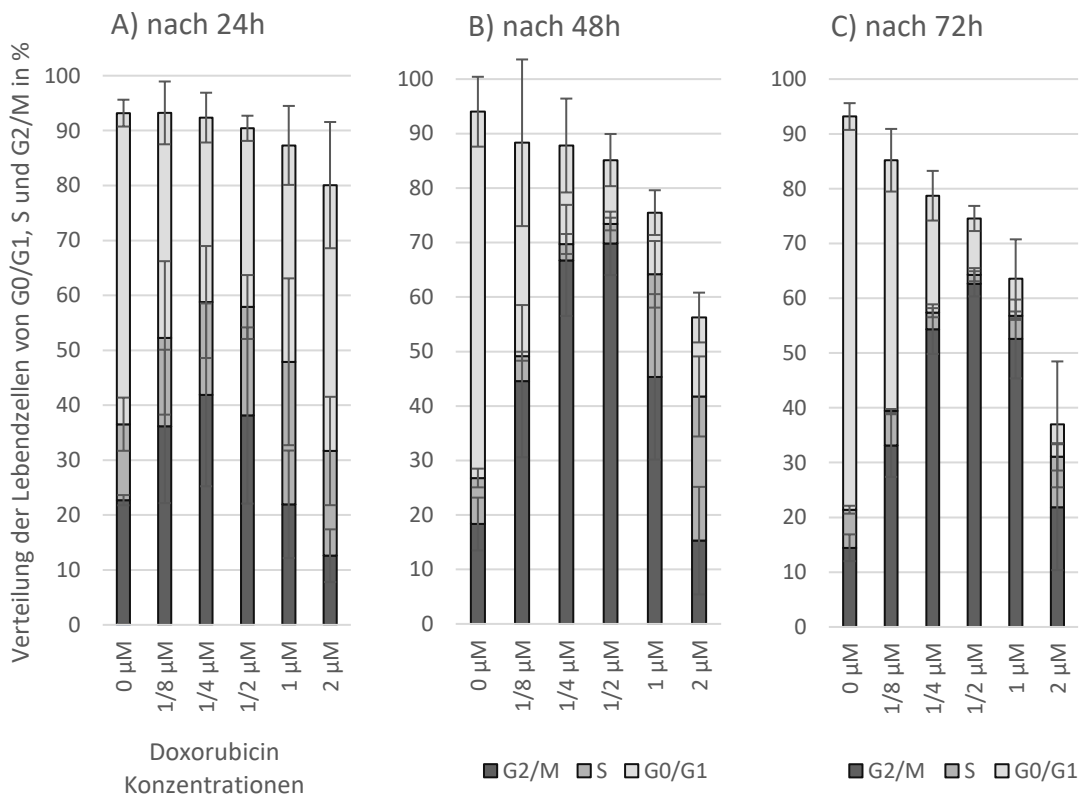


Abbildung 3.13: Prozentuale Verteilung der Populationen G_0/G_1 , S und G_2/M nach Doxorubicin-Inkubation und unter Berücksichtigung der Zytotoxizität.

Abgebildet sind die prozentualen Mittelwerte der Populationen vitaler Zellen im Verhältnis zueinander nach Doxorubicin-Inkubation, A): nach 24h-, B): nach 48h-, C): nach 72h-Inkubation. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: μM – Mikromolar, h – Stunden, G_0 – Gap-0-Phase, G_1 – Gap-1-Phase, G_2 – Gap-2-Phase, M – Mitose-Phase, S – S-Phase

Die Ergebnisse bzgl. des Effektes auf die Verhältnisse der Zellen in den Stadien des Zellzyklus wird durch die Abbildung 3.13 dargestellt.

Die Auswertung der Zellzyklusverhältnisse zeigt in der Kontroll-Probe nach initialem Anstieg (0h-Wert nicht dargestellt) eine stetige Abnahme der G₂/M-Population.

Die Doxo-Konzentrationen weisen hingegen bis zu einer Inkubationszeit von 48h eine dosisabhängige und zeitabhängige Zunahme von G₂/M zwischen Konzentrationen von 1/4 – und 1/2μM-Doxo auf. Nach einer Inkubationszeit von 72h fällt der Anteil der G₂/M-Population in niedrigen Konzentrationen bis 1/2μM-Doxo zeitabhängig und weist eine weitere Zunahme in den 1μM- und 2μM-Proben auf.

Gleichzeitig findet nach Inkubationszeiten von über 48h eine Zunahme der G₀/G₁-Population in den niedrigen Konzentrationen (1/8μM und 1/4μM Doxo) statt.

In den hohen Konzentrationen von 1/2μM bis 2μM wird parallel der Anteil der G₀/G₁-Population stetig prozentual, als auch absolut, zeit- und dosisabhängig reduziert. Die regressive Dynamik des G₀/G₁-Anteils ist in der 2μM-Konzentration am größten (vgl. von 14,5 nach 48h auf 5,9 nach 72h). Die Dynamik der S-Population entspricht mehr der initialen Schädigung (innerhalb der ersten 24h) der Doxo-Konzentrationen in der G₂/M-Population. Je mehr der Anteil in G₂/M zur 24h-Messung fällt, desto höher ist die S-Phase nach einer Inkubationszeit von 48h vertreten. Dieser Anteil fällt zeitabhängig nach 72h Stunden stetig ab, jedoch kann der konzentrationsabhängige Zuwachs der S-Phase nach 48h nicht ausgeglichen werden. Die 72h-Werte fallen bezogen zu ihren 48h-Vorwerten, sodass bis zu einer Konzentration von einschließlich 1μM die 72h-Werte unterhalb der Kontrolle liegen. Die Berücksichtigung der Zytotoxizität zeigt, dass die Zellzahlen der Zellzykluspopulationen der 2μM-Probe für die G₂/M- und G₀/G₁-Phase deutlich niedriger als in den anderen Konzentrationen ausfallen. Die Zellzahl der S-Phase ist in der 1/2μM-Probe am niedrigsten. Dies bestätigt die Vermutung, dass in hohen Konzentrationen der Übertritt von Zellen aus der G₀/G₁-Population entweder stärker stimuliert wird oder aus der S-Phase verzögert in die G₂/M-Phase stattfindet. In der 1/2μM-Probe könnte dieser Effekt bereits beendet sein, sodass die Zellzahlen der S-Phase durch Doxo reduziert werden. Dies gilt ebenfalls für die G₂/M-Population. In der 1μM- und 2μM-Probe werden bis zur 72h-Messung, trotz hoher Zytotoxizität, steigende Zellzahlen in G₂/M registriert.

3.3 Analyse der Behandlung von leukämischen Zellen der KG-1a-Zelllinie mit Disulfiram

In der Auswertung der Versuche zur Behandlung von KG-1a-Zellen und den Zellen mit Stammzeleigenschaften mittels Disulfiram wird gleichfalls erst auf mögliche

Proliferationsveränderungen und allgemeine zytotoxische Effekte eingegangen. Anschließend wird benannt, inwiefern sich die Anteile der diploiden und tetraploiden SP in Bezug auf ihre Hauptpopulationen und das Verhältnis zueinander durch die Behandlung verändert haben. Zuletzt werden allgemeine Veränderungen in den differenziert zugeordneten Phasen des Zellzyklus beschrieben.

In Kapitel 4.3.2 gehen wir darauf ein, dass die Auswertung von Daten der Durchflusszytometrie mit der Zeit neu interpretiert und bewertet werden (s. Kapitel 4.3.2, S. 86). Die en-bloc-Auswertung nach Beendigung der Versuchsreihen zeigte, dass die Daten einer DSF-Testreihe (Versuch 150818) retrospektiv bereits zu Beginn unsauber war und die Zellen weniger vital wirkten. Da der DSF-Monoversuch als Vorversuch zu den Kombinationsversuchen zu werten ist und die Versuche mit festen Konzentrationen bereits abgeschlossen waren, entschieden wir uns die Testreihe aus den Ergebnissen auszuschließen. Dies hat zur Folge, dass die DSF-Ergebnisse aus den Mittelwerten zweier unabhängiger Versuche gebildet wurden.

3.3.1 Auswertung potenzieller Effekte von Disulfiram auf die Proliferation leukämischer Zellen der KG-1a-Zelllinie

Wie im Doxo-Inkubationsversuch (s. Kapitel 3.2.1, S. 56) werden die Zellen nach der Entnahme aus dem Inkubator am ABX-Zell-Counter gezählt. Die dabei gemessene Anzahl an Zellen wird als Index für das Proliferationsmaß der Zellen während der Inkubation mit DSF in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit angesehen.

Die Darstellung der Zellzahlen in Abbildung 3.14 (s. S. 64) lässt erkennen, dass die Mittelwerte aller Proben nahezu zu jedem Zeitpunkt unterhalb der Kontrolle liegen (Ausnahme 5/2 μ M zur 72h-Messung mit 1,03). Während die Werte der Konzentrationen 5/8 μ M, 5/4 μ M und 5/2 μ M zwischen einem Faktor von 0,87 und 1,02 zur Kontrolle liegen, fallen die Ergebnisse für 5 μ M- und 10 μ M-DSF-Konzentrationen nach einer Inkubation von 48h deutlich ab (5 μ M: $0,80 \pm 0,05$; n=2 und 10 μ M: $0,67 \pm 0,18$; n=2). Die stärkste Proliferationshemmung ist zum Endpunkt in der 10 μ M-DSF-Probe mit $0,64 \pm 0,23$.

Interessanterweise scheint in der 5/8 μ M-Probe eine ausgeprägtere Proliferationshemmung über die Zeit zu bestehen als in der 5/4- und 5/2 μ M-Probe.

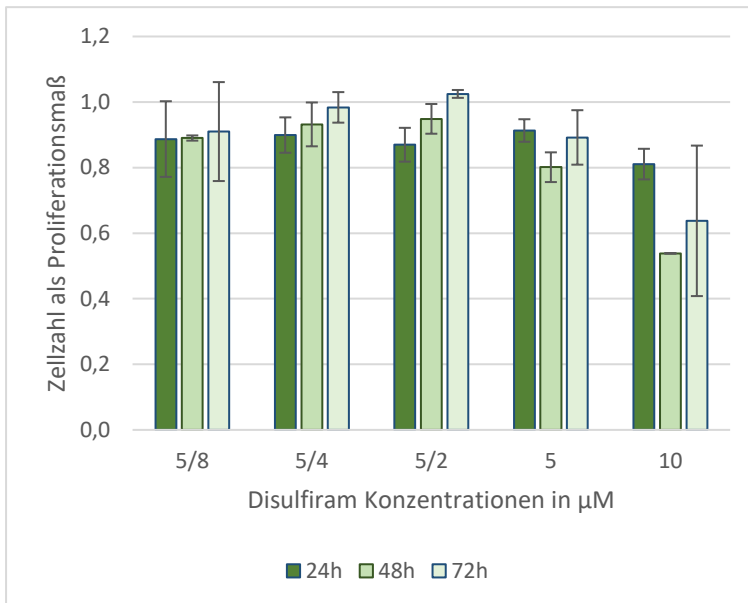


Abbildung 3.14: Zellzahlen als Proliferationsindex nach Disulfiram-Inkubation

Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Zellzahlen durch den ABX-Cell-Counter nach DSF-Inkubation und Normierung auf die Kontrolle in Abhängigkeit zu den einzelnen DSF-Konzentrationen. Deutlicher Abfall des Proliferationsindex zwischen 5- und 10 μ M-DSF-Konzentrationen. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: μ M – Mikromolar, h – Stunden

3.3.2 Auswertung potenzieller zytotoxischer Effekte von Disulfiram auf leukämische Zellen der KG-1a-Zelllinie

In der Analyse eines potenziellen zytotoxischen Effekts von DSF auf Zellen der KG-1a-Zelllinie wird, wie im Doxo-Inkubationsversuch (s. Kapitel 3.2.2, S. 57), der prozentuale Anteil der Lebendzellen (live-cells) an der Gesamtzellzahl als Indikator für den zytotoxischen Effekt von DSF gewertet.

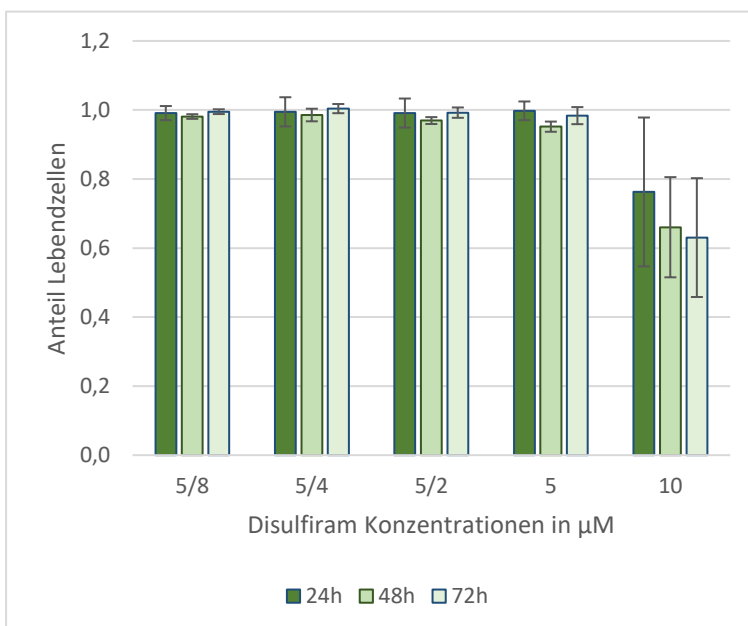


Abbildung 3.15: Anteil Lebendzellen nach Disulfiram-Inkubation

Abgebildet sind die Mittelwerte des Anteils der Lebendzellen nach DSF-Inkubation und Normierung auf die Kontrolle in Abhängigkeit zu den einzelnen DSF-Konzentrationen. Deutliche Abnahme der Lebendzellen mit einer Konzentration von 10 μ M. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: μ M – Mikromolar, h – Stunden

In der Auswertung des Anteils Lebendzellen an der Gesamtzellanzahl sind zu allen drei Messzeitpunkten gleichgroße oder niedrigere Messwerte im Vergleich zur Kontrollprobe zu beobachten (vgl. Abbildung 3.15). Nach 24h ist ein deutlicher Effekt in der höchsten Konzentration (10µM) festzustellen. Nach 48h differenzieren sich die einzelnen Proben konzentrationsabhängig mit steigender Konzentration voneinander (Niedrigstwerte in 5µM und 10µM). Nach 72h liegen, außer der 10µM-Probe, alle Konzentrationen sehr dicht an den Werten der Kontrolle. Dies lässt vermuten, dass die Konzentrationen bis einschließlich zur 5µM-DSF-Konzentration nicht ausreichend hoch sind, um im Monoversuch einen nachhaltigen zytotoxischen Effekt zu erzielen – die Zellen scheinen sich zu erholen. Ein minimaler konzentrationsabhängiger Abfall der Lebendzellen nach 72h ist feststellbar. Die einzige DSF-Konzentration, die über drei Messzeitpunkte stetig am Anteil der Lebendzellen abnimmt, ist die 10µM-DSF-Probe. Ihr Wert liegt nach 72h knapp 40% ($0,63 \pm 0,15$; $n=2$) niedriger als die Kontrollprobe.

3.3.3 Auswertung potenzieller Effekte von Disulfiram auf den Anteil der diploiden SP leukämischer Zellen der KG-1a-Zelllinie

Zur Analyse eines möglichen Effektes durch das Medikament DSF auf Zellen der diploiden SP werden die gemessenen Werte der diploiden und strict diploiden SP in das jeweilige Verhältnis zur G₀/G₁-Population gesetzt.

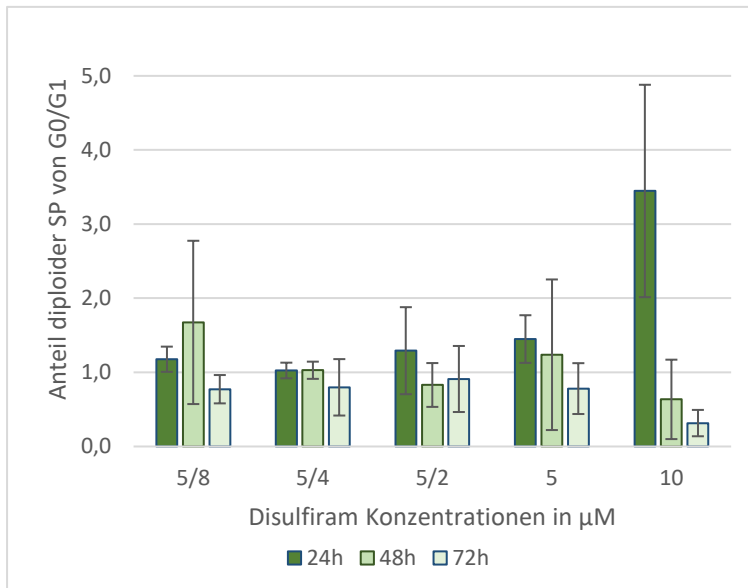


Abbildung 3.16: Anteil diploider SP von G₀/G₁ nach Disulfiram-Inkubation

Die Grafik zeigt die dosisabhängige Reduktion des Anteils diploider SP im Verhältnis zur G₀/G₁-Population nach DSF-Inkubation, unter Berücksichtigung der Zytotoxizität und Normierung auf die Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: µM – Mikromolar, h – Stunden, SP – Side Population, G₀ – Gap-0-Phase, G₁ – Gap 1-Phase

Für den Anteil der diploiden SP zeichnet sich nach 24h ein konzentrationsabhängiger Anstieg ab, dessen Höchstwert in der 10µM-Konzentrations-Probe zu messen ist (vgl. Abbildung 3.16). Zwischen der 5µM- und 10µM-Probe besteht ein deutlicher Sprung von

ca. $1,5 \pm 0,32$; $n=2$ ($5\mu\text{M}$) auf $3,5 \pm 1,43$; $n=2$ ($10\mu\text{M}$). In der 48h-Messung schwanken die Werte relativ stark, sodass keine eindeutige Aussage getroffen werden kann. Insbesondere der Mittelwert der $10\mu\text{M}$ -Probe nimmt deutlich zu seinem 24h-Vorwert ab und ist nun bei $0,64 \pm 0,54$; $n=2$. Die beiden höchsten Konzentrationen ($5\mu\text{M}$ und $10\mu\text{M}$ -Probe) zeigen eine stetige Abnahme der Messwerte. Die Kurvenverläufe lassen zwei eigenständige dosisabhängige Reaktionen an den Zellen der SP und der G_0/G_1 -Population vermuten. Mit steigender DSF-Konzentration kommt es zu einer frühzeitigen Abnahme der G_0/G_1 -Population. Der zytotoxische Effekt an der diploiden SP könnte verzögert und ebenfalls konzentrationsabhängig eintreten. Dies zeigen v.a. die Proben mit den hohen Konzentrationen, da beispielsweise bei weiterhin sinkender G_0/G_1 -Population zur 48h-Messung der Anteil der diploiden SP in der $10\mu\text{M}$ -Probe fällt (vgl. auch Ergebnisse in Kapitel 3.3.6, S. 68). Zum Zeitpunkt der 72h-Messung liegen die Werte, bis auf die $10\mu\text{M}$ -Konzentration, zwischen 0,78 und 0,91. Der $10\mu\text{M}$ -Konzentrationswert ist der Niedrigste der 72h-Messreihe mit ca. $0,32 \pm 0,18$; $n=2$ und ist damit nochmal um 50% effektiver als der Vergleichswert mit der Kontrolle in der 48h-Messung. Alles in allem verdeutlicht die Auswertung eine DSF-dosisabhängige Reduktion des Anteils der diploiden SP an der G_0/G_1 -Zellzahl insbesondere im Bereich zwischen $5\mu\text{M}$ und $10\mu\text{M}$ DSF. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass in der Darstellung nicht-normierter Ergebnisse die Fraktion der diploiden SP über 72h stetig zunimmt (s. Abbildung 7.4 im Anhang).

Die Darstellung der strict diploiden SP zeigt eine ganz ähnliche Dynamik, wenngleich keine Ergebnisse unterhalb der Kontrolle liegen (s. Abbildung 7.5 im Anhang). Unterschiedlich ist, dass für die Analyse der Fraktion der diploiden SP in der $10\mu\text{M}$ -Probe nach 72h eine Reduktion zu verzeichnen ist und zusätzlich die besten Ergebnisse der Konzentrationsreihe zu messen sind. Dagegen findet sich in der Auswertung des Anteils der strict diploiden SP in der $10\mu\text{M}$ -Probe nach 72h statt einer Reduktion jetzt die zweit stärkste Anreicherung (nach der $5\mu\text{M}$ -Probe). Die niedrigste Anreicherung weist die $5/2\mu\text{M}$ -Probe auf ($1,26 \pm 0,19$; $n=2$).

Weiterhin ist festzustellen, dass allein in der $10\mu\text{M}$ -Konzentration eine stetige Abnahme des Anteils der strict diploiden SP über die gesamte Zeit verzeichnet wird. Die absoluten Werte zeigen, dass dies unabhängig zu den sehr konstanten Werten der Kontrolle

(insbesondere nach 48h und 72h) ist. Aufgrund der Dynamik über 72h wären Werte nach 96h und 120h Inkubation sehr interessant in Bezug auf die weitere Entwicklung.

3.3.4 Auswertung potenzieller Effekte von Disulfiram auf den Anteil der tetraploiden SP leukämischer Zellen der KG-1a-Zelllinie

Für die Analyse eines möglichen Effektes durch DSF auf tetraploide Zellen mit Stammzeleigenschaften, werden die gemessenen Werte der tetraploiden und strict tetraploiden SP in das jeweilige Verhältnis zu den Ergebnissen des G₂/M+S-Gates gesetzt.

Die deskriptive Auswertung des Anteils der tetraploiden SP (s. Abbildung 7.6 im Anhang) zeigt nahezu identische Ergebnisse wie bereits die Auswertung der diploiden SP – wenn auch in anderen Verhältnissen. In den niedrigen Konzentrationen schwanken die Ergebnisse nach 24h zwischen 1,10 und 1,20. Die 48h Messung ist aufgrund von starken Schwankungen relativ schwer zu beurteilen. Die Mittelwerte der 72h-Messung liegen nach Normierung zwischen 0,80 und 0,95. Die 10µM-Probe hat hingegen nicht nur bereits nach 24h die höchste Anreicherung der tetraploiden SP (auf ca. $1,35 \pm 0,48$; n=2), sondern neben einem steten Abfall ebenfalls nach 72h-Inkubationszeit den niedrigsten Messwert der Testreihe ($0,68 \pm 0,15$; n=2) bezogen auf die Kontrollprobe.

Ebenso zeigt die Abbildung der strict tetraploiden SP einen zur strict diploiden SP in Kapitel 3.3.3 beschriebenen nahezu identischen Effekt (s. Abbildung 7.7 im Anhang). Alle Messwerte sind zu jedem Messzeitpunkt größer bzw. gleich (5/2µM-Probe) dem Normierungswert der Kontrolle. Der niedrigste Messwert liegt hierbei nicht in der 10µM-DSF-Konzentration nach 72h, sondern in der 5/2µM-DSF-Konzentration nach 48h ($1,0 \pm 0,31$; n=2). Erneut wird die strict tetraploide SP in der 10µM-Probe bereits nach 24h stark angereichert (ca. $10,8 \pm 3,38$; n=2) und fällt bis zum 72h-Messwert stetig bis auf einen Wert von ca. $2,4 (\pm 0,67$; n=2) ab. Dieser Wert ist – vielleicht aufgrund der hohen Vorwerte – zum 72h Messzeitpunkt höher als der Messwert der 5/2µM-DSF-Probe. Für die Ergebnisse der 5µM und 10µM-Proben zeichnet sich insbesondere zum 24h Messzeitpunkt ein exponentieller Kurvenverlauf ab. Hier könnten weitere Konzentrationsstufen aufschlussreich sein.

3.3.5 Auswertung potenzieller Effekte von Disulfiram auf das Verhältnis der strict diploiden und strict tetraploiden SP der KG-1a-Zelllinie

Dieses Kapitel befasst sich mit dem Verhältnis der strict tetraploiden zur strict diploiden SP und dessen Veränderung unter DSF Inkubation. Hierfür wurde der Quotient strict

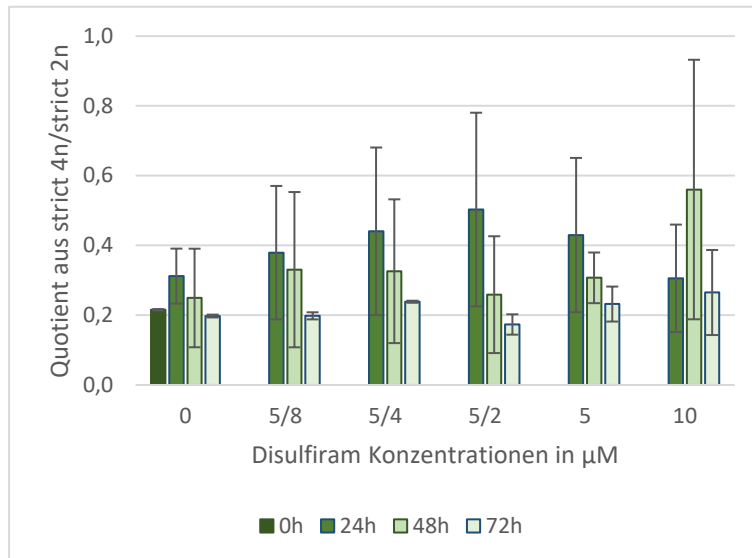


Abbildung 3.17: Quotient aus strict tetraploider und strict diploider SP nach Disulfiram-Inkubation

Die Grafik zeigt den Quotienten strict 4n/ strict 2n nach DSF-Inkubation mit einer leichten Umverteilung zu Gunsten der strict 4n SP. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: μM – Mikromolar, h – Stunden, 4n – tetraploid, 2n – diploid, SP – Side Population

4n/strict 2n aus den gemessenen Events der jeweiligen Gates bestimmt. Zur besseren Lesbarkeit wurde auf eine Normierung verzichtet.

Die ausgewerteten Daten (vgl. Abbildung 3.17) bestätigen das Ausgangsniveau der Kontrollprobe, welches bereits im Doxo-Versuch beschrieben wurde (s. Kapitel 3.2.5, S. 60). Initial liegt ein strict 4n/strict 2n-Quotient von ca. 0,22 ($\pm 0,00$; n=2) vor, welcher sich nach 72h-Inkubation in der Kontrollprobe erneut bei 0,20 ($\pm 0,00$; n=2) einstellt. DSF scheint im Monoversuch keinen ausgeprägten Effekt auf diese Verhältnisverteilung zu haben (insgesamt bei relativ hohen Schwankungen erschwert auszuwerten). Nach einer Inkubationszeit von 72h schwanken alle DSF-Proben konzentrationsunabhängig um einen Quotienten von ca. 0,22 (zwischen 0,17 und 0,27) – dies würde eine leichte Umverteilung zu Gunsten der strict tetraploiden SP beinhalten. Am niedrigsten ist das 72h-Ergebnis der 5/2 μM -Probe mit 0,17 ($\pm 0,03$; n=2).

3.3.6 Auswertung potenzieller Effekte von Disulfiram auf das Verhältnis von KG-1a-Zellen in den Stadien des Zellzyklus nach Hoechst-Färbung

In dem folgenden Kapitel werden die Zellpopulationen G₀/G₁, S und G₂/M nach Hoechst-Färbung der KG-1a-Zellen in ihrem jeweiligen Anteil zur Summe der drei Populationen (Gesamtpopulation) und unter Berücksichtigung der Zytotoxizität betrachtet.

Die Ergebnisse bzgl. des Effektes auf die Verhältnisse der Zellen in den Stadien des Zellzyklus werden durch die Abbildung 3.18 dargestellt.

Die Auswertung der DSF-Monoversuche zeigt bezogen auf die Zellzyklusverhältnisse bis zu einer Konzentration von $5/2\mu\text{M}$ DSF kaum Veränderungen der Anteile im Vergleich zur Kontrollprobe. Jedoch werden zwischen den Ergebnissen der $5/2\mu\text{M}$ -, $5\mu\text{M}$ - und $10\mu\text{M}$ -Probe sowohl zeit- als auch dosisabhängige Unterschiede deutlich. Bis zu einer

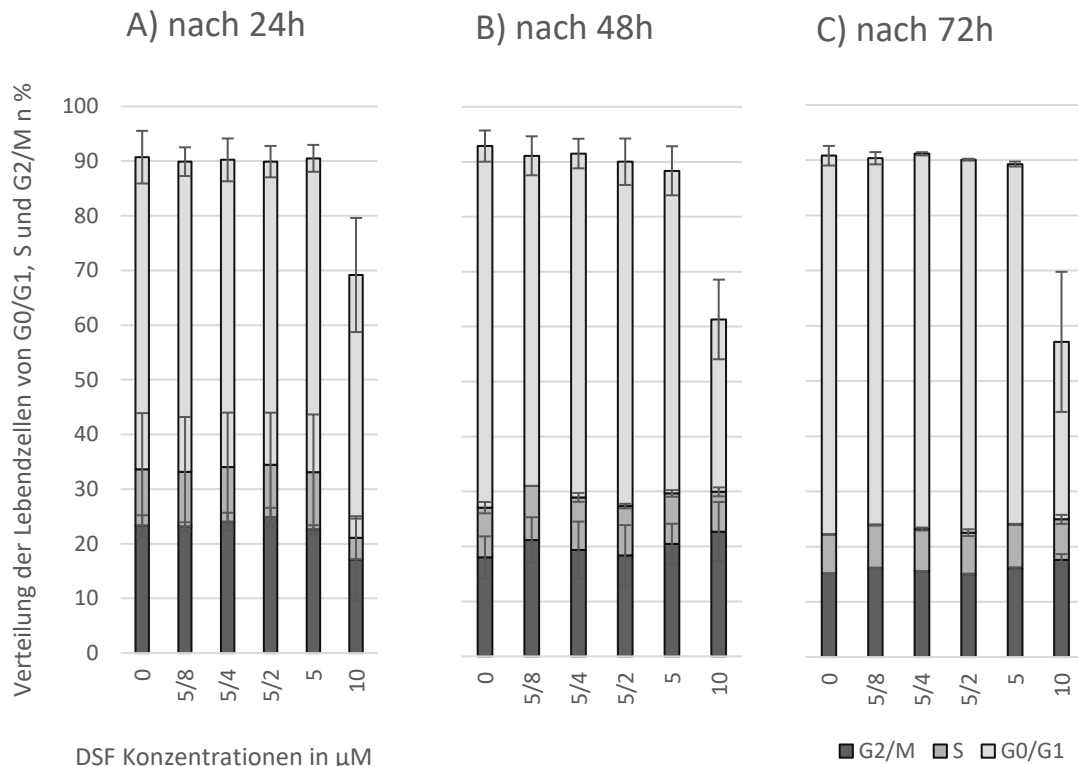


Abbildung 3.18: Prozentuale Verteilung der Populationen G₀/G₁, S und G₂/M nach Disulfiram-Inkubation und unter Berücksichtigung der Zytotoxizität.

Abgebildet sind die prozentualen Mittelwerte der Populationen im Verhältnis zueinander nach DSF-Inkubation, A): nach 24h, B): nach 48h, C): nach 72h. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: DSF – Disulfiram, µM – Mikromolar, SP – Side Population, G₀ – Gap-0-Phase, G₁ – Gap-1-Phase, G₂ – Gap-2-Phase, M – Mitose-Phase, S – S-Phase

Konzentration von $5\mu\text{M}$ DSF wird eine zeitabhängige Zunahme der G₀/G₁-Population sichtbar. Der offensichtlichste Effekt ist zwischen der $5\mu\text{M}$ und $10\mu\text{M}$ -Konzentrationsprobe zu beobachten. Zusammenfassend kann in der $10\mu\text{M}$ -Probe ein initialer Abfall der G₀/G₁-Phase und S-Phase im Vergleich zu dem 0h-Ausgangswert nach 24h beschrieben werden. Diese Reduktion hält in der G₀/G₁-Phase bis zur 48h-Messung an und bleibt dann bis nach 72h auf einer nahezu konstanten Größe ($32,2\% \pm 12,69\%$)

und somit über 50% niedriger als ihr Ausgangswert ($68,6\% \pm 2,09\%$). Die S-Fraktion steigt zeitabhängig bis sie nach 72h ($7,3\% \pm 0,81\%$) auf einem vergleichbaren Level wie die Kontrollprobe ist ($7,1\% \pm 0,01\%$). Die G₂/M-Population ist nach 48h angestiegen und fällt zur 72h-Messung nahezu auf ihr 24h-Ergebnis erneut ab. Mit $17,6\% (\pm 1,04\%)$ ist es nach 72h etwas größer als der Ausgangswert ($15,2\% \pm 1,71\%$) und das 72h-Endergebnis der Kontrollprobe ($15,1\% \pm 0,07\%$).

Schlussendlich ist eine deutlich messbare Zellreduktion ($68,6\%$ auf $32,2\%$) v.a. in der G₀/G₁-Population durch hohe DSF-Konzentrationen zu erreichen.

3.4 Analyse der Kombinationsbehandlung von leukämischen Zellen der KG-1a-Zelllinie mit Doxorubicin und Disulfiram

In der Kombinationsanwendung DSF/Doxo soll untersucht werden, ob die DSF-Inkubation von KG-1a-Zellen zu einem erhöhten Effekt von Doxo im Sinne einer Chemosensibilisierung erfolgt. DSF wirkt in Zellen über Modulation zahlreicher Signalwege und Funktionssysteme (erhöhte ROS-Level, Beeinflussung der ABC-Transporter, Inhibierung des Proteasoms, etc. (s. Kapitel 1.7.3, S. 17ff.)). Eine Sensibilisierung von Doxo könnte Doxo-Konzentrationen in der Behandlung akuter Leukämien mit den bekannten Langzeitnebenwirkungen in Zukunft einsparen. Ein Benefit in der Reduktion der SP würde das Risiko möglicher Frührezidive senken.

In diesem Kapitel wird erneut auf mögliche Proliferationsveränderungen und allgemeine zytotoxische Effekte eingegangen. Anschließend wird benannt, inwiefern sich die Anteile der diploiden und tetraploiden SP in Bezug auf ihre Hauptpopulationen und das Verhältnis zueinander durch die Behandlung verändert haben. Zuletzt werden allgemeine Veränderungen in den differenziert zugeordneten Phasen des Zellzyklus beschrieben. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde in den Kombinationsversuchen eine Probe mit einer Doxo-Konzentration von $1/2\mu\text{M}$ (Doxo-Kontrolle) sowie eine Probe ohne Medikamentenzusatz (Leerkontrolle) mitbehandelt. Um einen evtl. Vorteil der Kombinationsproben gegenüber einer Doxo-Monotherapie feststellen zu können, wurden die Ergebnisse auf die Doxo-Kontrolle normiert.

Die Kombinationsversuche werden als 72h-Kurzzeitversuche (KZV) und 120h-Langzeitversuche (LZV) mit Mediumwechsel nach 48h durchgeführt. Daher findet für jedes Unterkapitel zuerst eine Auswertung des 72h-Versuches statt und zur besseren Gegenüberstellung direkt anschließend die Auswertung des 120h-Versuches. Die

Auswertung des LZV bezieht sich v.a. auf die Messwerte zum Zeitpunkt einer 96h- und 120h-Inkubation. Die Ergebnisse der 72h-Messung werden der Vollständigkeit halber dargestellt, haben aber aufgrund des 24h zurückliegenden Mediumwechsels im 120h-LZV einen geringen Vergleichswert zu den 72h-Werten des KZV, da die Zellen in selbigen komplett ruhen.

Die Werte der zweiten Testreihe (151125) konnten nach 120h Inkubation nicht verwendet werden, da die Ergebnisse deutlich unsauber wurden und nicht auszumessen waren. Die Mittelwerte der 120h Messwerte bestehen somit aus den Ergebnissen zweier unabhängiger Versuche.

3.4.1 Auswertung potenzieller Effekte von Doxorubicin und Disulfiram als Kombinationsbehandlung auf die Proliferation von KG-1a-Zellen

Im DSF- und Doxo-Kombinationsversuch werden die Zellen wie im Doxo- und DSF-Einzelversuch aufgearbeitet, ehe sie am ABX-Zell-Counter gezählt werden.

Die dabei gemessene Anzahl an Zellen kann als Index für das Proliferationsmaß der Zellen während der Inkubation mit DSF in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit angesehen werden (vgl. Kapitel 3.3.2, S. 64 und Kapitel 3.4.2, S. 72).

Die Darstellung der Zellzahlen des KZV in Abbildung 3.19 lässt erkennen, dass die Mittelwerte aller Proben zu nahezu jedem Zeitpunkt oberhalb der Doxo-Kontrolle liegen (außer zum Zeitpunkt der 24h-Messung der $5/2\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ -Probe). Die Werte der Kombinationsproben liegen mit Werten um 1 sehr dicht um den Normierungswert der Doxo-Kontrolle, während die Zellzahlen der Leerkontrolle stetig steigen. Somit wird deutlich, dass sowohl niedrige als auch höhere DSF-Konzentrationen eine Proliferationshemmung wie die der alleinigen Doxo-Gabe bewirken. Lediglich die $5/2\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ -Probe erzielt Ergebnisse, die teils niedriger als die der Doxo-Kontrolle liegen (jederzeit Niedrigstwerte der Konzentrationsreihe).

Im Vergleich zeigen die Zellzahlen des LZVs, dass die Mittelwerte nach 24h unterhalb, nach 48h ebenfalls oberhalb (vgl. KZV) und anschließend nach zweiter Medikamentengabe nach 96h und 120h minimal unterhalb des Doxo-Kontrollwertes liegen. Es deutet sich ein DSF-konzentrationsabhängiger Abfall der Zellzahlen an. Wobei die $5/8\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ -Probe mit auffällig niedrigen Werten, neben der $5/2\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ -Probe mit den niedrigsten Werten im KZV, aus dem Muster fällt.

Eine zweite Kombinationsgabe und eine Inkubation bis zu 120h scheint eine verstärkte Proliferationshemmung im Vergleich zur alleinigen zweimaligen Doxo-Gabe v.a. für die 5/8 μ M+1/2 μ M- und 5/2 μ M+1/2 μ M-Konzentrationen zu bewirken.

3.4.2 Auswertung potenzieller zytotoxischer Effekte von Doxorubicin und Disulfiram als Kombinationsbehandlung an KG-1a-Zellen

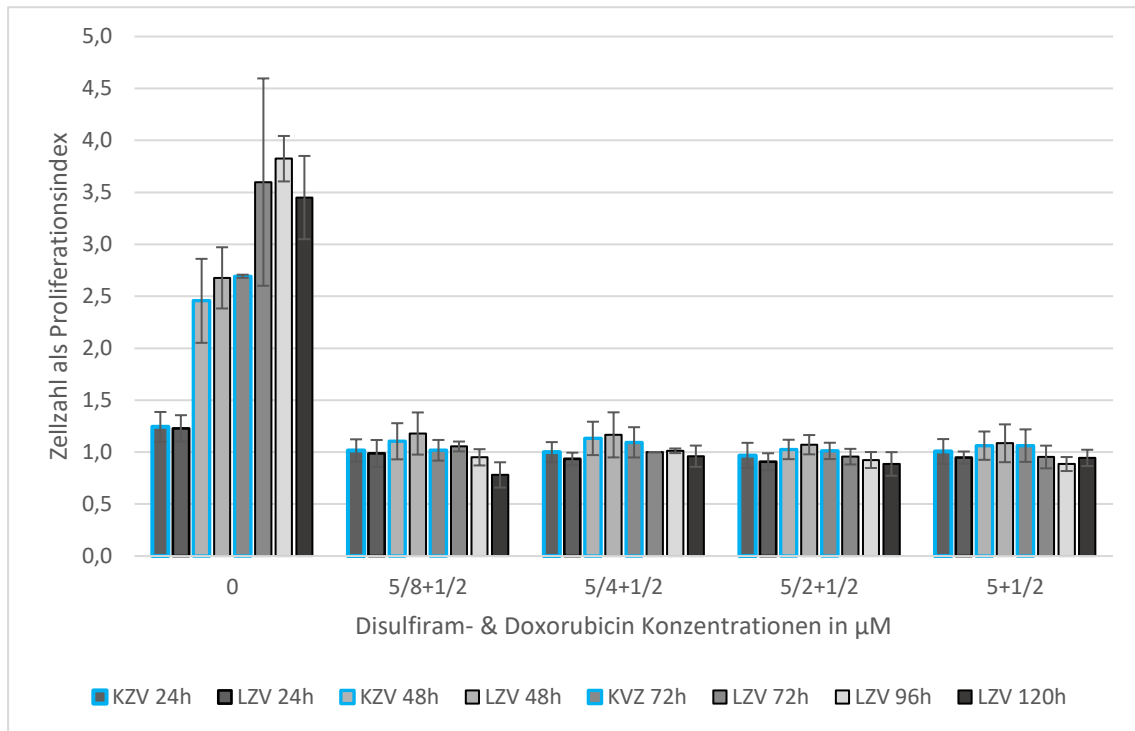


Abbildung 3.19: Zellzahlen als Proliferationsindex nach 72h- und 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation

Dargestellt sind die Mittelwerte der durch den ABX-Cell-Counter gemessenen Zellzahlen nach 72h- (hellblau umrandete Säulen) und 120h-DSF/Doxo-Inkubation (schwarz umrandete Säulen) und Normierung auf die 1/2 μ M-Doxo-Kontrolle in Abhängigkeit zu den einzelnen, variierenden DSF- und fester 1/2 μ M-Doxo-Konzentration. Zum besseren Vergleich sind die Messergebnisse des KZV und LZV zum gleichen Messzeitpunkt nebeneinander und in der gleichen Grundfarbe dargestellt. Der 72h-Messwert ist aufgrund der Manipulation im 120h-Kombinationsversuch nicht vergleichbar mit den Werten des 72h-KZV. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: μ M – Mikromolar, h – Stunden, KZV – 72h-Kurzzeitversuch, LZV – 120h-Langzeitversuch

In der Analyse eines potenziellen zytotoxischen Effekts in der Kombinationsbehandlung mit DSF und Doxo auf Zellen der KG-1a-Zelllinie wird, wie bereits in den Analysen zuvor, der prozentuale Anteil der Lebendzellen (live-cells) an der Gesamtzellanzahl als Indikator für den zytotoxischen Effekt gewertet.

Die Analyse des Anteils Lebendzellen an der Gesamtzellzahl zeigt, dass durch die Kombinationsgabe von Doxo mit DSF, keine höhere Zytotoxizität nach 72h-Inkubation

erzielt wird (s. Abbildung 3.20). Ein minimaler Effekt wird nach 24h verzeichnet. Im LZV liegen nach 96h alle Kombinationsversuche unterhalb der Werte der Doxo-Kontrolle. Eine auffallend stärkere Zytotoxizität ist erst in der 5/2 μ M+1/2 μ M- nach 96h und in der 5 μ M+1/2 μ M-Probe nach 96h und 120h sichtbar. Niedrigere Konzentrationen als 5 μ M+1/2 μ M liegen zum 120h-Endzeitpunkt oberhalb des Doxo-Kontroll-Normierungswertes.

Die niedrigstwerte liegen zu allen Messzeitpunkten in der 5 μ M+1/2 μ M-Probe.

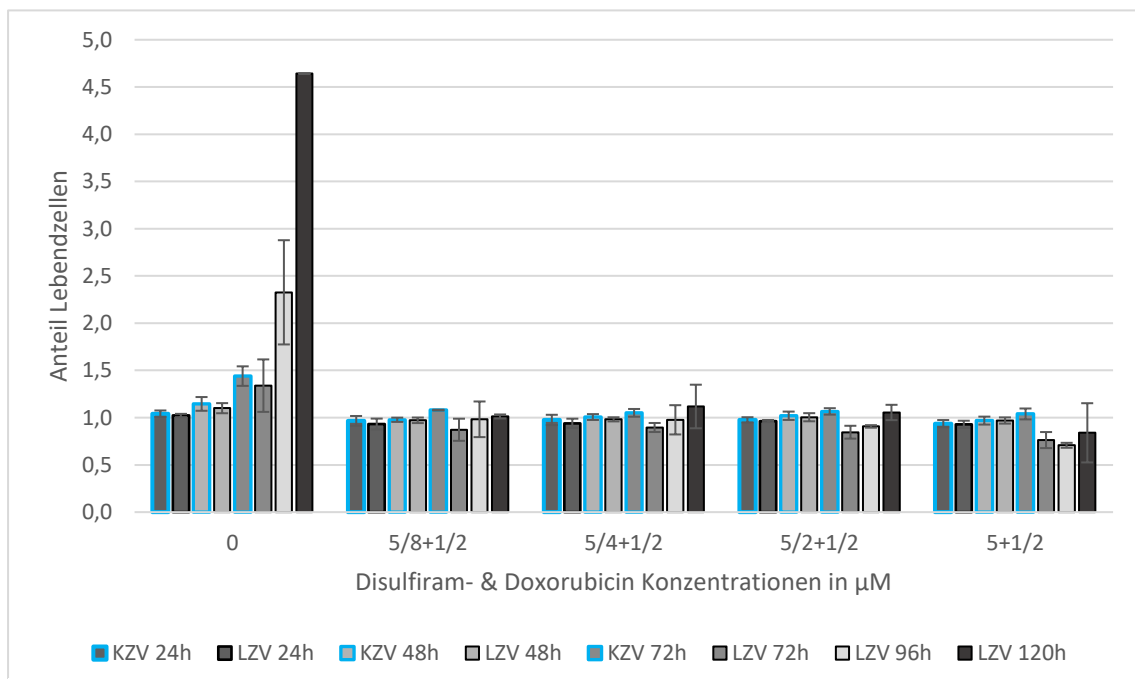


Abbildung 3.20: Anteil Lebendzellen nach 72h- und 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation

Abgebildet sind die Mittelwerte des Anteils der Lebendzellen nach 72h- (hellblau umrandete Säulen) und 120h-DSF-Doxo-Inkubation (schwarz umrandete Säulen) und Normierung auf die 1/2 μ M-Doxo-Kontrolle in Abhängigkeit zu den einzelnen, variierenden DSF- und fester 1/2 μ M-Doxo-Konzentration. Zum besseren Vergleich sind die Messergebnisse des KZV und LZV zum gleichen Messzeitpunkt nebeneinander und in der gleichen Grundfarbe dargestellt. Der 72h-Messwert ist aufgrund der Manipulation im LZV nicht vergleichbar mit den Werten des KZVs. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: μ M – Mikromolar, h – Stunden, KZV – 72h-Kurzzeitversuch, LZV – 120h-Langzeitversuch

3.4.3 Auswertung potenzieller Effekte von Doxorubicin und Disulfiram als Kombinationsbehandlung auf den Anteil diploider SP von KG-1a-Zellen

Zur Analyse möglicher Effekte durch die Kombinationsgabe aus DSF und Doxo auf Zellen der diploiden SP werden die gemessenen Werte der diploiden und strict diploiden SP in das jeweilige Verhältnis zur G₀/G₁-Population gesetzt.

Für den Anteil der diploiden SP zeichnet sich im KZV der Kombinationsproben nach 24h ein geringer dosisabhängiger Effekt ab (vgl. Abbildung 3.21).

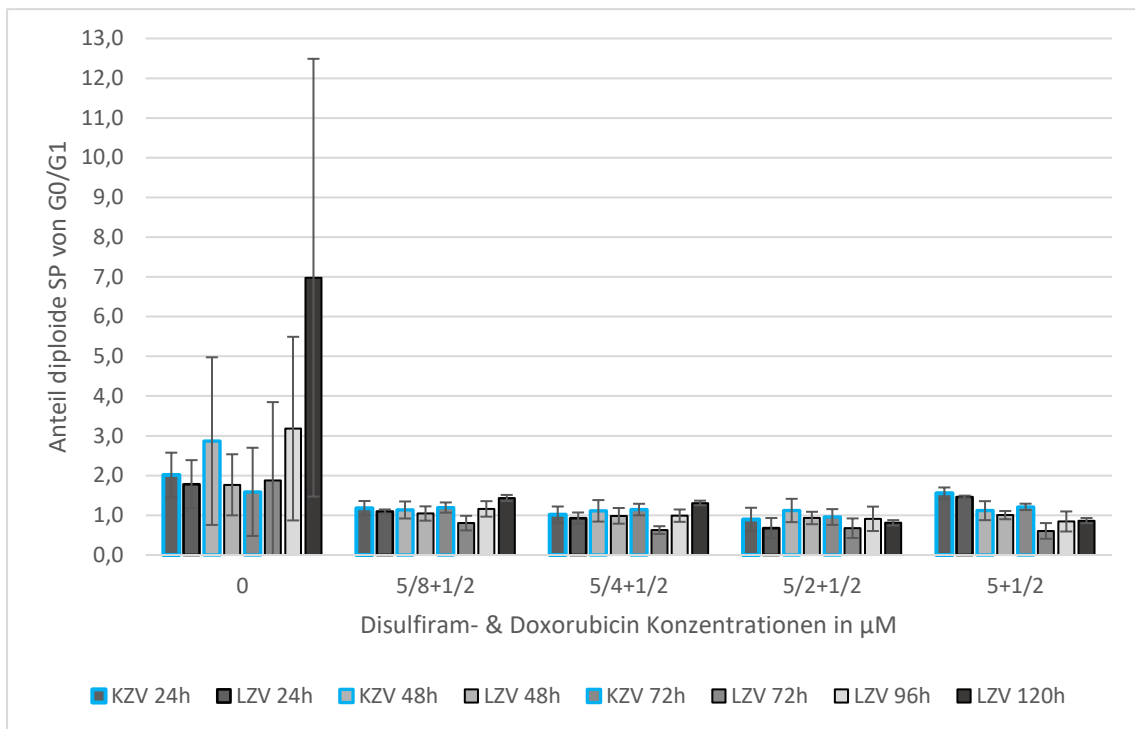


Abbildung 3.21: Anteil diploider-SP von G₀/G₁ nach 72h- und 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation – Normierung auf 1/2µM-Doxo-Kontrolle

Die Grafik zeigt den Anteil der diploiden SP im Verhältnis zur G₀/G₁-Population nach 72h- (hellblau umrandete Säulen) und 120h-DSF/Doxo-Inkubation (schwarz umrandete Säulen) nach Berücksichtigung der Zytotoxizität und Normierung auf die 1/2µM-Doxo-Kontrolle in Abhängigkeit zu den einzelnen, variierenden DSF- und fester 1/2µM-Doxo-Konzentration. Zum besseren Vergleich sind die Messergebnisse des KZV und LZV zum gleichen Messzeitpunkt nebeneinander und in der gleichen Grundfarbe dargestellt. Der 72h-Messwert ist aufgrund der Manipulation im LZV nicht vergleichbar mit den Werten des 72h-KZV. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: µM – Mikromolar, h – Stunden, SP – Side Population, KZV – 72h-Kurzzeitversuch, LZV – 120h-Langzeitversuch

Die Werte fallen von $1,20 \pm 0,18$; n=6 (5/8µM+1/2µM) bis auf $0,9 \pm 0,29$; n=6 (5/2µM+1/2µM) ab. In der Probe mit der höchsten DSF-Konzentration (5µM+1/2µM) reichert sich die diploide SP jedoch auf einen Anteil von $1,55 \pm 0,15$; n=6 an. Diese Dynamik bestätigt sich in den 24h-Ergebnissen des LZVs, wobei der niedrigste Wert hier sogar $0,68 \pm 0,25$ ist.

Nach 48h fallen interessanterweise die Werte in der 5µM+1/2µM-Probe sowohl im KZV als auch im LZV deutlich ab, sodass sie ähnlich große Werte wie die 5/2µM+1/2µM-Probe erreichen. Es wurde eine DSF-abhängige, verstärkte Abnahme der Zellen der

G₀/G₁-Fraktion vermutet wie sie bereits in dem DSF-Monoversuch für höhere Konzentrationen in den ersten 24h gemessen wurde. Dies hätte einen relativen Anstieg der diploiden SP zur Folge. Jedoch kann diese Veränderung der G₀/G₁-Population in der Auswertung der Zellzyklusphasen nicht bestätigt werden – stattdessen steigt der Anteil der G₀/G₁-Fraktion. Dieses Resultat konnte wiederum in den Ergebnissen für höhere Doxo-Dosen (1μM und 2μM) nachgewiesen werden (s. Kapitel 3.2.6, S. 61).

Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Kombination einen synergistischen Effekt stärkerer Doxo-Konzentrationen im Sinne einer Chemosensibilisierung erreicht.

Im LZV kann man nach 96h einen dosisabhängigen Abfall der diploiden SP von $1,16 \pm 0,19$ bis auf einen Wert von $0,84 \pm 0,25$ in der 5μM+1/2μM-Probe vermessen. Und nach einer Inkubationszeit von 120h mit zweiter Kombinationsgabe ist erneut der niedrigste SP-Anteil in der 5/2μM+1/2μM-Probe mit $0,81 \pm 0,07$; n=2 zu verzeichnen, die 5μM+1/2μM-Kombination liegt bei $0,87 \pm 0,07$; n=2.

Erst die nicht-normierte Darstellung macht deutlich, dass die absoluten Zellzahlen der diploiden SP weiter sinken (vgl. Abbildung 7.8 im Anhang). Der 0h-Ausgangswert ist bei 3,4 (KZV) und 3,5 (LZV) Zellen bei einer Verteilung auf 100 Zellen und unter Berücksichtigung der Zytotoxizität. Der niedrigste Endwert für den KZV ist nach 72h Inkubationszeit am niedrigsten in der 5/2μM+1/2μM-Probe und beträgt 1,04 (vgl. mit 1,08 der 1/2μM-Doxo-Kontrollprobe und 1,76 in der Leerkontrolle). Der niedrigste Endwert wird im LZV ebenfalls in der 5/2μM+1/2μM-Kombination mit 0,64 Zellen gemessen (vgl. mit 0,79 der 1/2μM-Doxo-Kontrolle und 5,24 in der Leerkontrolle).

In der Auswertung des Anteils der strict-diploiden SP ist offensichtlich, dass trotz Kombinationsgabe eine Anreicherung der strikt gegateten SP (unreife Vorläuferzellen mit Stammeigenschaften) im Vergleich zur Leerkontrolle bewirkt wird (vgl. Abbildung 7.9 im Anhang). Dies gilt sowohl für die Ergebnisse des KZV als auch des LZV.

Bezugnehmend auf mögliche Vorteile einer Kombinationsbehandlung mit DSF und Doxo statt einer Doxo-Monogabe zeigt sich, nach Normierung und Berücksichtigung der Zytotoxizität im KZV nach 72h Inkubation, nur ein minimaler Vorteil ($0,93 \pm 0,23$) in niedrigdosierter DSF-Kombination (5/4μM+1/2μM-Probe). Die höheren DSF-Konzentrationen bewirken eine zusätzliche Anreicherung der strict-diploiden SP.

Hingegen zeigt der LZV mit zweiter Medikamentengabe v.a. nach einer Inkubationszeit von 96h ein DSF-dosisabhängiges Absinken bis zu einer DSF-Konzentration von $5/2\mu\text{M}$ ($0,81 \pm 0,14$). Nach 120h Inkubation ist erneut das niedrigste Ergebnis in der $5/2\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ -Probe zu verzeichnen ($0,79 \pm 0,01$; $n=2$), jedoch ist ein dosisabhängiger Effekt nicht eindeutig nachweisbar.

Erst in der nicht-normierten Darstellung der Ergebnisse wird deutlich wie sehr die strict-diploide SP in absoluten Zahlen allein von der 96h Messung zur 120h Messung hin absinkt (vgl. Abbildung 7.10 im Anhang). Dies erklärt auch die Annäherung der normierten Werte der Leerkontrollprobe an den Wert der Doxo-Kontrolle, während diese zuvor weit voneinander entfernt waren.

Es könnte sich um Zellteilungseffekte und eine Zunahme der G_0/G_1 -Population (120h) ausgereifter, nicht-naiver Zellen handeln. Jedoch zeigt die Auswertung der Zellstadien in Kapitel 3.4.6 (S. 80), dass die Zellen im G_0/G_1 -Stadium auch zur 120h Messung fallen. Entweder ist der Übertritt nach Zellteilung geringer als das Zellsterben in G_0/G_1 oder es handelt sich um eine tatsächliche Reduktion strict diploider SP-Zellen.

Die Kombinationsanwendung von Doxo und DSF bewirkt einen zusätzlichen Benefit zur Reduktion der strict diploiden SP gegenüber der Doxo-Monogabe.

Jedoch muss erneut beachtet werden, dass diese Darstellung eine punktuelle Aussage wiedergibt. Mit Blick auf die Vorwerte lässt sich für die $5\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ -Probe eine größere Negativentwicklung der Vorwerte als für die $5/2\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ -Probe beobachten (s. Kapitel 4.3.6, S. 97ff.).

3.4.4 Auswertung potenzieller Effekte von Doxorubicin und Disulfiram als Kombinationsbehandlung auf den Anteil tetraploider SP von KG-1a-Zellen

Zur Analyse möglicher Effekte durch die Kombinationsbehandlung der Medikamente Doxo und DSF auf Zellen der tetraploiden SP werden die gemessenen Werte der tetraploiden und strict tetraploiden SP in das jeweilige Verhältnis zur $G_2/M+S$ -Population gesetzt.

Die Auswertung der tetraploiden SP im Verhältnis zur G₂/M+S-Fraktion unter Berücksichtigung der Zytotoxizität zeigt eine deutliche Anreicherung der tetraploiden SP sowohl im KZV nach 72h als auch im LZV nach 120h Inkubation im Vergleich zur Leerkontrollprobe (s. Abbildung 3.22). Im KZV sind die Ergebnisse häufig niedriger als

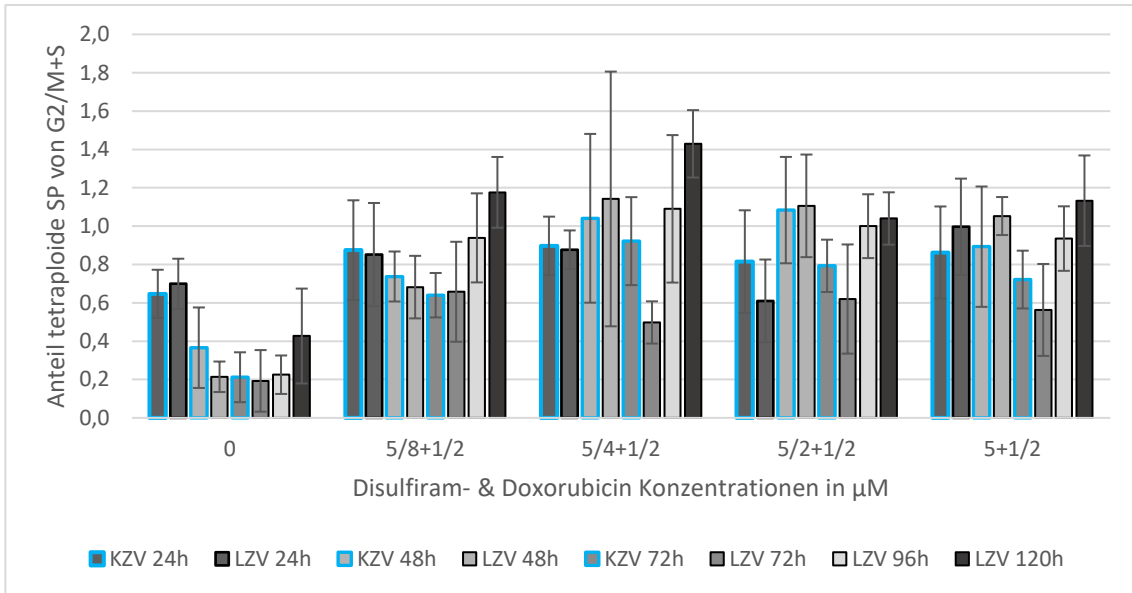


Abbildung 3.22: Anteil tetraploider SP von G₀/G₁ nach 72h- und 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation

Die Grafik zeigt den Anteil der tetraploider SP im Verhältnis zur G₀/G₁-Population nach 72h- (hellblau umrandete Säulen) und 120h-DSF-Doxo-Inkubation (schwarz umrandete Säulen) nach Berücksichtigung der Zytotoxizität und Normierung auf die 1/2µM-Doxo-Kontrolle in Abhängigkeit zu den einzelnen, variierenden DSF- und fester 1/2µM-Doxo-Konzentration. Zum besseren Vergleich sind die Messergebnisse des KZV und LZV zum gleichen Messzeitpunkt nebeneinander und in der gleichen Grundfarbe dargestellt. Der 72h-Messwert ist aufgrund der Manipulation im LZV nicht vergleichbar mit den Werten des 72h-KZV. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: µM – Mikromolar, h – Stunden, SP – Side Population, KZV – 72h-Kurzzeitversuch, LZV – 120h-Langzeitversuch

ihr 1/2µM-Doxovergleichswert. Zum 72h- Endpunkt sind alle KZV-Werte der Kombinationsproben unterhalb der Doxo-Kontrolle – am deutlichsten ist das Ergebnis der 5/8µM+1/2µM-Probe (0,64 ± 0,12).

Für eine ausgeprägte Aktivität in den Proben mit höheren Konzentrationen spricht, dass in ihren 48h-Vorwerten der Anteil der SP stärker angereichert war (vgl. 5/2µM+1/2µM-Probe). Nach Anstieg der tetraploiden SP bis zu einer DSF-Konzentration von 5/4µM (0,92 ± 0,23) scheint bei DSF-Konzentrationen größer als 5/4µM die Zellzahl der tetraploiden SP geschädigt zu werden - ihr Minimum findet sich in der 5µM+1/2µM-Probe (0,72 ± 0,15).

Diese Beobachtung kann in der 96h Messung des LZV gefestigt werden – jedoch nicht in den 120h Messwerten, deren Mittelwert allerdings nur aus zwei Testreihen gebildet wurde und daher schwankungsanfälliger ist. Hier fällt der $5\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ etwas höher aus und fällt nicht dosisabhängig. Das Niedrigstergebnis zum 120h-Endpunkt des LZVs liegt für die tetraploide SP in der $5/2\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ -Probe bei ca. $1,04 (\pm 0,14; n=2)$ im Vergleich zur Doxo-Kontrolle. Ebenfalls ist offensichtlich, dass im LZV nach 120h und zweiter Medikamentengabe alle Kombinationsproben die tetraploide SP mehr anreichern als die $1/2\mu\text{M}$ -Doxo-Kontrollprobe.

Die Zellzahlen der strict tetraploiden SP zeigen keinen deutlichen Vorteil im Vergleich zur $1/2\mu\text{M}$ -Doxo-Kontrolle (s. Abbildung 7.11 im Anhang). Im KZV ist nach 72h Inkubation allein die $5/4\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ -Probe mit $0,9 (\pm 0,49)$ niedriger als die Doxo-Kontrolle.

Die strict tetraploide SP zeigt im LZV nach 96h in allen Kombinationsproben nahezu gleiche Ergebnisse (zwischen 1,1- und ca. 1,2-fache der Doxo-Kontrolle). Allein der Anteil der $5\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ -Probe weist einen Sprung bis ca. $1,55 (\pm 0,37)$ auf. Nach 120h Inkubation ist der Niedrigstwert in der $5/2\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ -Probe mit $1,2 (\pm 0,36; n=2)$. Zeitgleich findet in niedrigen Konzentrationen, bezogen auf die Doxo-Kontrolle, eine Anreicherung und in höheren Konzentrationen (ab der $5/2\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ -Probe) eine Reduzierung des Anteils strict tetraploider SP statt. Wir vermuten, dass in den niedrigen Konzentrationen die DSF-Dosierung nicht ausreichend hoch ist, um neben der Hauptpopulation einen zytotoxischen Effekt ebenfalls an dem Anteil strict tetraploider SP zu bewirken, sodass eine Anreicherung der strict tetraploiden SP wie im Doxo-Monoversuch hier nur weiter gesteigert zu beobachten ist. Dies könnte ebenfalls bedeuten, dass zu niedrige DSF-Konzentrationen für die Versuchsreihen gewählt wurden. Der höchste Wert wird in der $5\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ -Probe gemessen. Jedoch wird in dieser Probe auch die stärkste Negativentwicklung in Bezug auf die Vorwerte festgestellt.

Wenn man alle gemessenen Werte in eine Zellverteilung von 100 Zellen anwendet, dann lässt sich für den Endzeitpunkt im KZV eine Anreicherung der strict tetraploiden SP in allen Probereihen im Vergleich zu der Ausgangszahl feststellen. Hingegen liegt die Zahl nach 120h, dem Endzeitpunkt des LZV, in allen Proben niedriger als der 0h-Ausgangswert.

3.4.5 Auswertung potenzieller Effekte von Doxorubicin und Disulfiram als Kombinationsbehandlung auf das Verhältnis strict diploider und strict tetraploider SP von KG-1a-Zellen

Die Auswertung erfolgt wie bereits im Kapitel 3.2.6 des Monoversuchs von Doxo beschrieben. Hierfür wurde der strict 4n/strict 2n Quotient bestimmt. Zur besseren Lesbarkeit wurde auf eine Normierung verzichtet (vgl. Abbildung 3.23).

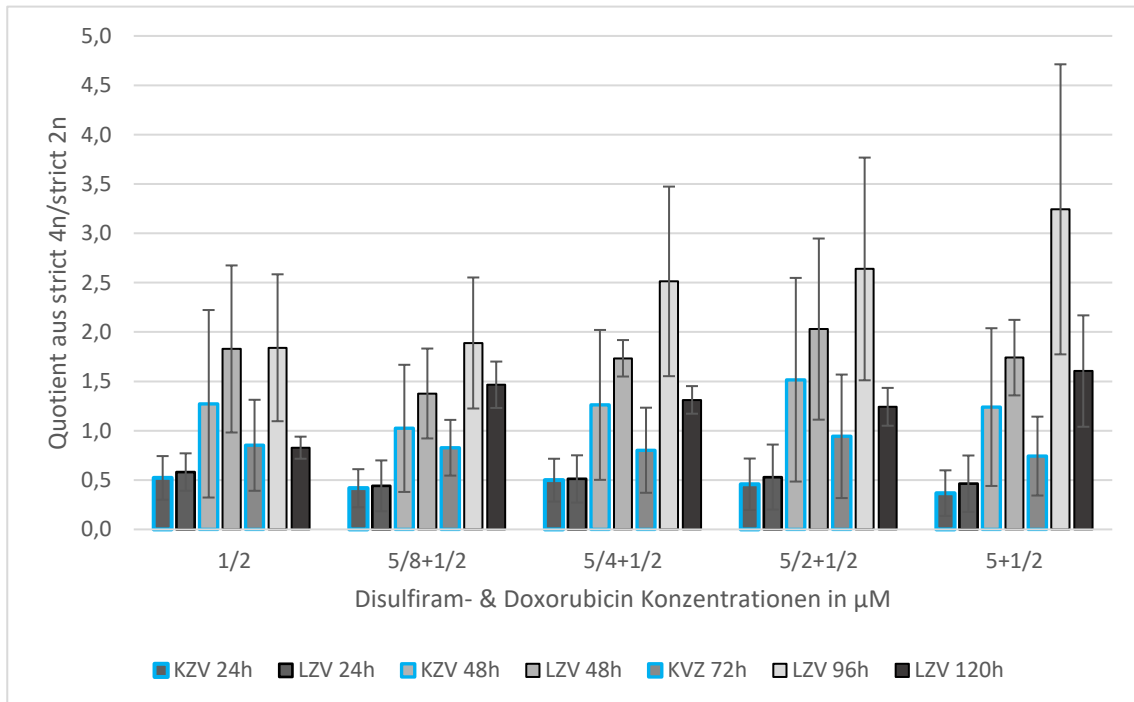


Abbildung 3.23: Quotient aus strict tetraploider und strict diploider SP (strict 4n/ strict 2n) nach 72h- und 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation

Die Grafik zeigt den Quotienten strict 4n/ strict 2n nach 72h- (hellblau umrandete Säulen) und 120h-DSF/Doxo-Inkubation (schwarz umrandete Säulen) mit fester 1/2μM-Doxo-Kontrolle und in Kombinationsversuchen mit variierender DSF-Konzentration. Zum besseren Vergleich sind die Messergebnisse des KZV und LZV zum gleichen Messzeitpunkt nebeneinander und in der gleichen Grundfarbe dargestellt. Der 72h-Messwert ist aufgrund der Manipulation im 120h-Kombinationsversuch nicht vergleichbar mit den Werten des 72h-KZV und wurde zur besseren Lesbarkeit nicht dargestellt. Ebenso wurden die Ergebnisse der Leerkontrollprobe nicht dargestellt, welche die Ergebnisse des DSF-Versuches nahezu bestätigten (0h-Werte mit 0,23 (KZV) und 0,24 (LZV); KZV nach 72h: 0,20 und im LZV nach 120h: 0,18). Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: μM – Mikromolar, h - Stunden, 4n – tetraploid, 2n – diploid, SP – Side Population KZV – 72h-Kurzzeitversuch, LZV – 120h-Langzeitversuch

In der Auswertung wurde sichtbar, dass die Kombinationsbehandlung mit Doxo und DSF im KZV allenfalls einen geringen Vorteil gegenüber der alleinigen Behandlung mit Doxo vorweist (1/2μM Doxo nach 24h: 0,52 ± 0,22; n=6; 72h: 0,85 ± 0,46; n=3 und 5μM+1/2μM nach 24h: 0,37 ± 0,23; n=6; nach 72h: 0,74 ± 0,40; n=3). Eine genauere Aussage bzw. ein deutlicherer Effekt ist durch relativ hohe Schwankungen beeinträchtigt.

In den LZVs ist insbesondere nach zweiter Medikamentengabe, ab einer Inkubationszeit von 96h, eine DSF-konzentrationsabhängige Erhöhung des Quotienten zu Gunsten der tetraploiden SP zu beobachten. In der weiteren Dynamik fallen die Quotienten jeweils zur 120h-Messung ab und sind alle größer als das strict 4n/strict 2n-Verhältnis der Doxo-Kontrolle.

An den Inkubationsendpunkten besitzt die 1/2 μ M-Doxo-Probe einen strict 4n/strict 2n-Quotienten von 0,85 (\pm 0,46; nach 72h im KZV), während die Kombinationsproben nahezu DSF-konzentrationsabhängig bis zu einem Niedrigstwert von 0,74 (\pm 0,40) in der DSF-Höchstkonzentration unterhalb der Kontrolle liegen. Nach 120h Inkubationszeit hat die Doxo-Kontrolle einen Quotienten von 0,83 (\pm 0,11; n=2) und die LZV-Kombinationsproben liegen alle oberhalb dieses Wertes. Die 5 μ M+1/2 μ M-Probe hat einen Quotienten von 1,60 (\pm 0,56; n=2). Das Ergebnis der 5/2 μ M+1/2 μ M-Kombinationsprobe hingegen ist mit sehr kleinen Schwankungen nochmals repräsentativer und liegt bei 1,24 (\pm 0,19; n=2).

3.4.6 Auswertung potenzieller Effekte von Doxorubicin und Disulfiram auf das Verhältnis der Zellzyklusstadien von KG-1a-Zellen nach Hoechst-Färbung

In dem folgenden Kapitel werden die Zellpopulationen G₀/G₁, S und G₂/M nach Hoechst-Färbung der KG-1a-Zellen in ihrem jeweiligen Anteil zur Summe der drei Populationen (Gesamtpopulation) und unter Berücksichtigung der Zytotoxizität betrachtet.

Die Ergebnisse bzgl. des Effektes auf die Verhältnisse der Zellen in den Stadien des Zellzyklus wird durch die Abbildung 3.24 (s. S. 81) dargestellt. Sie verdeutlicht die Hauptausdünnung in den ersten 48h in der G₀/G₁- und S-Phase nicht nur nach singularärer Doxo-Inkubation, sondern auch in Kombination mit steigenden DSF-Konzentrationen. Es wird aufgezeigt, dass bei gemeinsamer fixer Doxo-Konzentration niedrige DSF-Konzentrationen die G₀/G₁-Population verhältnismäßig anreichern (bezogen auf den Doxo-Kontrollwert) bzw. Zellen in der G₀/G₁-Population zurückgehalten werden oder ein geringerer Phasenübertritt in und aus der S-Phase stattfindet (vgl. Kapitel 1.7.4, S. 20). In höheren DSF-Konzentrationen passt sich der Effekt der Kombinationsproben den Doxo-Ergebnissen der G₀/G₁-Reduktion und eines G₂/M-Arrestes an und übersteigt diese in der 5 μ M+1/2 μ M-Probe sogar – im Sinne einer G₂/M-Reduktion, sodass ein eigener zytotoxischer Effekt von DSF oberhalb von 5/2 μ M in Kombinationsbehandlungen nicht auszuschließen ist.

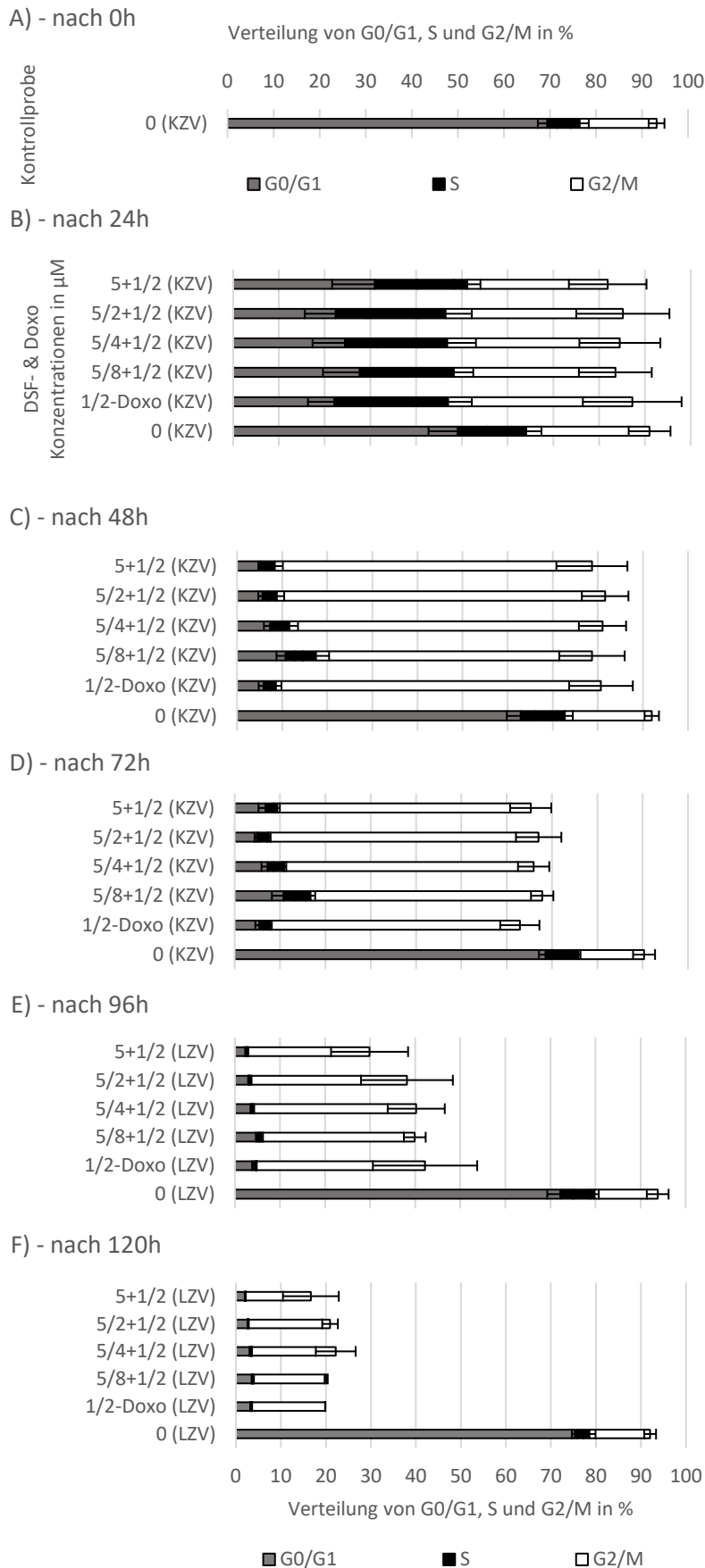


Abbildung 3.24: Anteil der prozentualen Mittelwerte der Populationen G_0/G_1 , S und G_2/M zueinander nach 72h- und nach 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation.

Abgebildet sind die prozentualen Mittelwerte der Populationen im Verhältnis zueinander nach Disulfiram- und Doxorubicin-Inkubation unter Berücksichtigung der Zytotoxizität. Der Übersicht halber wurden die Ergebnisse der ersten 72h des KZVs und nach 72h die Ergebnisse des LZVs dargestellt.

A): KZV nach 0h-; B): nach 24h-, C): KZV nach 48h-, D): KZV nach 72h-DSF- und Doxo-Inkubation D): LZV nach 96h- und E): LZV nach 120h-DSF- und Doxo-Inkubation. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: μM – Mikromolar, G_0 – Gap-0-Phase, G_1 – G1-Phase, G_2 – Gap-2-Phase, M – Mitose-Phase, S – S-Phase

Nach der 48h-Messung befinden sich die Zellen der G₀/G₁- und S-Phase in Summe bis zur 72h-Messung nahezu in einem „steady state“. Die Hauptaktivität der Reduktion findet nun in den Zellen der G₂/M-Population statt. Der Anteil der G₂/M-Population nimmt entsprechend ab.

Der gleiche Effekt zeigt sich auch im LZV nach zweiter Medikamentengabe. Bis zur 96h-Messung findet v.a. eine Reduktion in den Populationen der G₀/G₁- und S-Phase statt. In der Darstellung nach 120h-Inkubation ist nochmals ein deutlicher Abfall in der G₂/M-Phase zu beobachten. Die niedrigsten Werte für die G₀/G₁- und S-Population sind in der 5µM+1/2µM-Probe.

4 Diskussion

4.1 Einführung

In den letzten Jahrzehnten hat sich zwar die Prognose der AML deutlich gebessert, jedoch liegt ihr OS weiterhin bei ca. 65 – 75% (Cooper et al., 2012, Gamiš et al., 2014, Creutzig et al., 2013). Limitierender Faktor sind insbesondere Frührezidive (Gamiš et al., 2013), welche u.a. von einer besonders therapieresistenten Zellgruppe mit hämatopoetischen Stammzeleigenschaften, den leukämischen Stammzellen (LSCs), ausgehen (Honoki, 2010).

LSCs besitzen unterschiedliche Resistenzmechanismen. Die Exprimierung von ABC-(MDR-)Transportern in Biomembranen der Zelle gehört hierzu. Sie bewirken das Ausschleußen von Substraten wie Medikamenten und sind in LSCs, im Vergleich zu dem Hauptanteil ausgereifter leukämischer Blasten, besonders stark ausgeprägt (Shaffer et al., 2012). Dieser Mechanismus erhöht wiederum die nötigen Konzentrationen von Anthrazyklinen wie Doxo, ein potentes Zytostatikum, welche jedoch kardiotoxische Langzeitnebenwirkungen besitzen und daher nur dosislimitiert angewendet werden (Swain et al., 2003, Huo et al., 2017). Eine zweite Resistenzeigenschaft von LSCs ist die Quieszenz.

Als Medikament zur Neuverwendung ist DSF, welches zuvor über ein halbes Jahrhundert Anwendung in der Alkoholentwöhnung gefunden hatte, in den letzten zwei Jahrzehnten in den Fokus onkologischer Forschung geraten (Xu et al., 2017). Über die Chelatbildungseigenschaft mit Kupfer und anderen Schwermetallen sammelt sich DSF nach Komplexbildung aufgrund erhöhter Cu-Spiegel selektiver in Tumorzellen an

(Antoniades et al., 2013, Duan et al., 2014). Hier wirkt es an unterschiedlichen Stellen enzymhemmend. Das ROS-System aber auch das Proteasom werden insbesondere bezüglich des Zellstoffwechsels negativ moduliert und ein erhöhter Stresslevel in der Zelle erzeugt. Nachfolgende Signalwege werden gehemmt (NF- κ B und Nrf2). Ebenfalls wird die ALDH inhibiert und Hitzeschockproteine freigesetzt, sodass die Gesamtheit zu einer Überlastung und Einleitung proapoptotischer Signale führt. In zahlreichen Studien wies DSF seither das Potential zur Senkung der Tumorzelllast als auch der Stammzellfraktion in Zellkulturen auf.

Sowohl die hohe Zahl Frührezidive in der Therapie der pädiatrischen AML mit ihrem Ursprung aus der CD34⁺/CD38⁻-LSC-Fraktion, als auch die zunehmende Anzahl Langzeitüberlebender mit kardiologischen Nebenwirkungen nach Anwendung hoher Anthrazyklindosierungen veranlasste in dieser Arbeit die Prüfung von Doxo und DSF an leukämischen Vorläuferzellen.

Als leukämische Zellkultur wurde die KG-1a-Zelllinie gewählt. Mit ihrem hohen Anteil CD34⁺/CD38⁻-LSCs lässt sich diese unter Nutzung der Hoechst-Färbemethode im Durchflusszytometer als SP darstellen und analysieren. Nach Einzelanwendung der Medikamente (Doxo und DSF) in Zellkulturexperimenten mit Inkubationszeiten bis 72h wird neben Proliferationsveränderungen und der Zytotoxizität der Schwerpunkt auf die Veränderung der SP in Kombinationsversuchen mit bis zu 120h Inkubation gelegt. Wie verändert sich diese in der Kombinationsverwendung von Doxo und DSF? Ist eine Einsparung von Doxo-Konzentrationen durch die Kombinationsbehandlung möglich? Zusätzlich wurden das Verhalten und die Verteilung der Zellzyklusphasen anhand der Hoechst-Populationen ausgewertet.

4.2 Aktuelle Studien zur Kombination aus DSF/Cu

In den letzten Jahren sind zunehmend Studien veröffentlicht worden, welche sich mit dem Effekt von DSF in Kombination mit Cu an Zellen unterschiedlichster Tumorentitäten beschäftigt haben (Duan et al., 2014, Xu et al., 2011, Xu et al., 2017, Allensworth et al., 2015, Skrott et al., 2017, Liu et al., 2016, Jin et al., 2018, Papaioannou et al., 2014). Cu wurde in diesen Versuchen überwiegend als Kupfersulfat (CuSO₄; (Allensworth et al., 2015)), Kupfergluconat (CuGlu; (Skrott et al., 2017, Liu et al., 2016)) oder Kupferchlorid (CuCl₂; (Duan et al., 2014, Xu et al., 2017, Papaioannou et al., 2014, Guo et al., 2010)) angewandt. Die Ergebnisse nach Anwendung von DSF/Cu waren außergewöhnlich

positiv und vielversprechend in Bezug auf Cu-abhängig gesteigerte Zytotoxizität, Apoptoseinduktion und Reduktion der koloniebildenden Einheiten (= CFU, colony forming units) sowohl an der Tumormasse als auch an Zellen mit Stammzeleigenschaften. Mehrfach wurde auch von einer Chemosensibilisierung durch DSF/Cu in Kombinationsanwendungen mit etablierten Zytostatika berichtet. Da diese Studien häufig DSF allein mit der DSF/Cu-Kombination vergleichen, sind sie wichtige Bezugspunkte für unsere Diskussion. Gleichzeitig wollen wir nicht die Ergebnisse unbeachtet lassen, welche im direkten Vergleich durch die DSF/Cu-Kombinationsanwendung erzielt wurden. Diese Erwähnungen ergänzen unsere Ergebnisse sinnvoll und erlauben eine umfassendere Diskussion unter Berücksichtigung aktueller Aspekte und zukünftiger Fragestellungen.

Ein wichtiger Meilenstein für das Verständnis der antineoplastischen Wirkung von DSF/Cu ist die Arbeit von *Skrott et al.* gewesen. Sie zeigten, dass der aktive Metabolit von DSF, DC, einen Komplex mit Metallen, insbesondere Cu, bildet. Dieser DC/Cu-Komplex bindet NPL4. NPL4 stellt eine wichtige Segregase zur Umsetzung ubiquitylierter Proteine dar. Durch die Bindung kommt es zur Anhäufung des Komplexes und schließlich zum Ausfall des lebenswichtigen p97-NPL4-UFD1-Weges (UFD1; engl.: „ubiquitin fusion degradation 1“) – was in seiner Konsequenz zum Zelltod führt (Skrott et al., 2017). Weiterhin wiesen sie in einer nachfolgenden Veröffentlichung nach, dass die DSF-Wirkung durch Cu-Substitution zusätzlich gesteigert werden kann und die DSF-Zytotoxizität nicht durch die physiologischen Cu-Spiegel limitiert sein muss. Durch die Chelatbindungseigenschaft von DC erfolgt eine Cu-Transporter-unabhängige Cu-Aufnahme ins Zytosol maligner Zellen und eine verstärkte Schädigung dieser selbst (Skrott et al., 2019).

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Im Folgenden werden, die in Kapitel 3 diskriptiv aufgeführten Ergebnisse diskutiert. Nach initialer Beurteilung der Versuchsbedingungen werden anschließend die Daten aus den Zellzählungen als Proliferationshinweis und die Zytotoxizitätsergebnisse mit früheren Studien verglichen. Im Weiteren werden die Auswertungen der Zellzyklusverteilungen bewertet, bevor final auf die SP-Veränderungen und den SP-Quotienten eingegangen wird.

4.3.1 Vorteile und Einschränkungen von in-vitro-Modellen

Die Nutzung von in-vitro-Modellen stellt in der ethisch vertretbaren Erforschung von Medikamenten, insbesondere neuer Krebsmedikamente, häufig den ersten Schritt dar.

Durch ihren relativ einfachen Aufbau ergeben sich sowohl Vor- als auch Nachteile. Die Anwendung von permanenten Zellkulturen ermöglicht bspw. die Erhebung vieler Daten in kurzer Zeit sowie eine einfachere Reproduzierbarkeit der in-vitro-Experimente im Vergleich zu in-vivo-Mausmodellen (Schmitz, 2011, S. 76). Gleichzeitig bestehen permanente Zellkulturen aus transformierten Zellen, welche neben einer geringeren Apoptoseeigung sich an weiteren Stellen von den Abläufen physiologischer Zellen unterscheiden. Zusätzlich bietet gerade die Eigenschaft der Transformation in den verwendeten Zellen ein erhöhtes Risiko erneute Mutationen zu erwerben. Diese Mutationen dürften die Vergleichbarkeit, solange sie nicht entdeckt werden, erschweren (Saedniae 2015).

Die in unserer Arbeit verwendete KG-1a-Zelllinie ist gerade durch ihre Varianz zur Ursprungszelllinie der KG-1-Zellen auffällig geworden (Mattes, 2015). Um weitere Transformationen oder erworbene Abnormalitäten möglichst gering zu halten, ist die Kryokonservierung eines Zellpools als Methodik etabliert. Dies ermöglicht in regelmäßigen Abständen zum Ursprungsstatus zurückzukehren (s. Kapitel 2.2.5.2, S. 33ff.). Es bleibt jedoch ein Restrisiko bestehen.

Weiterhin fehlt in in-vitro-Versuchen der komplexe Zusammenhang der Metabolisierung von Arzneimitteln, welcher erst bei in-vivo-Modellen untersucht werden kann. Kürzlich wurde am Beispiel von DSF ein Missverständnis zahlreicher jüngster Publikationen aufgearbeitet. Diese haben, ggf. vereinfachend, geäußert, dass DSF in-vitro die Hemmung der ALDH in Zellen mit Stammzeleigenschaften auslöse. Die ALDH-Inhibition wird nachweislich jedoch erst durch einen in der Leber synthetisierten Metaboliten von DSF bewirkt, sodass dieser Effekt nicht in in-vitro-Versuchen zu beobachten sein dürfte (Skrott et al., 2019).

In-vitro-Modelle stellen somit nur Teilaspekte der komplexen Zusammenhänge eines Organismus dar. Nichtsdestotrotz ermöglichen sie erste Daten bspw. zur Zytotoxizität der Zielzellen. Bei gleichzeitiger Senkung der benötigten Anzahl von Tieren für nachfolgende in-vivo-Versuche bleibt ihre Anwendung somit gerechtfertigt.

4.3.2 Einschränkungen der Durchflusszytometrie sowie Darstellung der SP mittels Hoechstfärbung

Die Durchflusszytometrie erlaubt die metrische Erfassung und Einteilung von Zellen in Populationen und Subpopulationen anhand markierter Eigenschaften mittels Auswertung zuvor definierter Lichtemissionen (s. Kapitel 2.2.4, S. 28ff.). Wie wir bereits im Kapitel 3.1 darlegten, ist die Reihenfolge des Erfassens epitopisch und intrazellulär fluoreszierender Zelleigenschaften mittels Gates und die anschließende Wahl der Darstellung der ausgemessenen Events entscheidend für das Erlangen der gesuchten Daten (s. Kapitel 3.1, S. 49ff.). Ebenfalls ist das Setzen der Gategrenzen eine sehr subjektive sowie erfahrungsgeprägte Arbeit.

Um möglichst geringe Schwankungen in der Erhebung der FACS-Daten zu erzielen führten wir daher neben der Erstellung eines regelmäßig angewandten Worksheets mit bereits festgelegten Gatereihenfolgen, eine erneute en-bloc-Auswertung der FACS-Rohdaten durch. Dies war nötig, da wir bereits zu diesem Zeitpunkt bemerkten, dass die regelmäßigen Beobachtungen und Auswertungen der Daten eine Neuinterpretation früher erfasster Events bewirkten. Als Folge wurde die en-bloc-Auswertung von nur einer Person durchgeführt, um interpersonell differenzielle Einschätzungen ausschließen zu können.

Die SP-Darstellung mittels Hoechstfärbung ist in unserer Zellvermessung ein Schritt, welcher bekannterweise ein hohes Schwankungspotential aufweist. Dies liegt sowohl an dem ihm zugrunde liegenden Biomechanismus: dem ABC-transporterabhängigen aktiven Efflux des Hoechstfarbstoffes, als auch seines erhöhten Vorkommens in naiven Vorläuferzellen mit Stammzeleigenschaften von Leukämiezellen – der SP. Kultivierungsbedingungen wie Nährstoffressourcen, Serum, pH-Wert, Sauerstoffgehalt sowie Zelldichte können zu Schwankungen der SP-Ausprägung innerhalb einer Zelllinie führen. Zusätzlich kann die SP-Darstellung durch Temperatur, Färbezeit, Hoechstkonzentration und unregelmäßigem Suspendieren variieren (Shimoda et al., 2018). Gleichfalls kann die SP-Fraktion künstlich durch niedrig dosierte Langzeitinkubationen (bspw. durch Doxo) und entsprechender Genexpressionserhöhung angereichert werden (s. Kapitel 4.3.6, S. 97ff.). In früheren Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe wurde die SP noch in weitere Stadien eingeteilt. Die hierbei entstandenen Stadien „Early SP“, „Intermediate SP“ und „Late SP“ nahmen in ihrer Betitelung den

Reifegrad der Vorläuferzellen mit Stammzellcharakteristika auf. Frühe, unreife Vorläuferzellen liegen dabei im SP-Schweif sehr nahe am Achsenursprung. Die Late SP geht dagegen nahtlos in den linken Rand der Hauptpopulation über. In der deskriptiven Statistik ist jedoch festzustellen, dass die Early SP sehr wenige absolute Events misst und die daraus resultierenden Ergebnisse durch sehr hohe Schwankungen ungenau zu interpretieren sind. Deshalb wird die Early SP und Intermediate SP als „Zellpopulation mit frühen Stammzellkriterien“ benannt bzw. technisch als „strict SP“ gated. Vorteil dieser Einteilung ist, dass die, im fließenden Übergang zur Late SP enthaltenen, Zellen der Hauptpopulationen in der Analyse der „Zellpopulation mit frühen Stammzellkriterien“ nicht verfälschend enthalten sind (Mattes, 2015, Mack, 2015). Der in dieser Arbeit gewählte Terminus der strict SP ist begründet in seiner technischen Darstellung der Gates. Im biologisch-medizinischen Kontext ist eine strict SP jedoch nicht geläufig. Im weiteren Verlauf der Diskussion wird daher der Begriff „unreife SP“ äquivalent zur „strict SP“ verwendet.

4.3.3 Zusätzliche proliferationshemmende Wirkung von Doxo und DSF erst im Langzeitkombinationsversuch nachweisbar

4.3.3.1 Proliferationsverhalten im DSF/Doxo Kombinationsversuch

Die Versuche zeigten im KZV der Kombinationsanwendung von DSF und Doxo keine zusätzliche Hemmung der Proliferation durch die Kombinationsgabe von DSF und Doxo im Vergleich zur Doxo-Kontrollprobe. Lediglich die Ergebnisse der 5/2 μ M+1/2 μ M-Probe entsprachen (Kombinationsproben werden folgend mit DSF-+Doxo-Konzentrationen beschrieben) nahezu den Werten der Doxo-Kontrolle.

Dagegen lagen im DSF/Doxo-LZV die Proliferationswerte gleich in mehreren Proben (5/8 μ M+1/2 μ M-, 5/2 μ M+1/2 μ M- und 5 μ M+1/2 μ M-Dosierung) niedriger als in der Doxo-Kontrolle. Die stärkste Proliferationshemmung konnte nach 120h in der 5/8 μ M+1/2 μ M-Probe festgestellt werden. Somit erzielt die zweimalige Gabe von DSF und Doxo in Kombination biphasisch in niedrigeren, aber auch in den höheren DSF-Konzentrationen nach 96h und 120h eine zusätzliche Proliferationshemmung im Vergleich zur zweimaligen Doxo-Monoanwendung.

4.3.3.2 Proliferationsverhalten im DSF Monoversuch

Dies ist insofern interessant, da wir zuvor im DSF Monoversuch zeigten, dass eine ausgeprägte Proliferationshemmung erst mit hohen Konzentrationen von 5- und 10 μ M DSF erreicht wird und diese nach 72h Inkubationszeit eine Anpassungstendenz zu den Werten der Kontrollprobe vorweist. Ein biphasischer Effekt wurde in der 5/8 μ M-Probe vermutet, war jedoch nicht eindeutig nachweisbar (s. Kapitel 3.2.1, S. 56).

4.3.3.3 Proliferationsverhalten im Doxo Monoversuch

Nach Inkubation mit Doxo konnte keine streng dosisabhängige Proliferationshemmung nachgewiesen werden (stärkster Effekt nach 24h in 1/4 μ M, nach 48h in 1/2 μ M und nach 72h in 1 μ M zu beobachten). Ein zeitabhängiger Effekt wurde hingegen für die einzelnen Konzentrationen v.a. in den höheren Konzentrationen sichtbar. Die Ergebnisse stimmen mit bereits beschriebenen Beobachtungen von *Lüpertz et al. 2010* überein. Diese wiesen in ihrem Experiment an Hct116-Darmkrebszellen einen dosisabhängigen Effekt von Doxo nach. Die Zellen zeigten bei kontinuierlicher Inkubation mit niedrigen Doxo-Konzentrationen einen seneszenz-ähnlichen Zustand, welcher ab Konzentrationen größer 1 μ M in einen dauerhaften Arrest in der G₂-Phase des Zellzyklus überging. Trotz Erhöhung der Doxo-Konzentrationen (bis 10 μ M) konnte keine Zunahme der Apoptoseraten erzielt werden, jedoch bewirkten Konzentrationen ab 5 μ M Doxo einen zusätzlichen G₀/G₁-Arrest (Lupertz et al., 2010). *Sliwinska et al.* berichten ebenfalls von Hct116-Zellen, welche nach Inkubation mit niedrigen Doxo-Konzentrationen zum Großteil keine Mitose durchlaufen und in die Seneszenz eintreten. Ein geringer Teil scheint der Seneszenz entgehen zu können, diese Zellen treten verändert in die Mitosephase ein und bilden teils aneuploide Generationen aus (Sliwinska et al., 2009). Die Beobachtungen von *Lüpertz et al.* und *Sliwinska et al.* erklären die Zunahme der Zellzahlen als Proliferationsmaß in niedrigen Doxo-Konzentrationen nach 72h Inkubation und die dicht beieinander liegenden Werte zwischen Konzentrationen von 1/2- bis 2 μ M-Doxo. Unsere Ergebnisse unterscheiden sich jedoch von denen von *Lüpertz et al.* da sich in den hier untersuchten leukämischen KG-1a-Zellen bereits ab einer Konzentration von 1/2 μ M-Doxo kaum eine zusätzliche Veränderung in der Proliferation, zumindest beim Messen mit einem ABX-Cell-Counter, zeigte. Hierbei gilt zu beachten, dass die Anwendung eines ABX-Cell-Counter eine einfache Methode ist, um ein Indiz für die Hemmung der Proliferation zu bekommen, jedoch keinem sicheren Nachweis

entspricht. Weiterhin sind Unterschiede der Tumorentität zwischen Darmkrebszellen und leukämischen Zelllinie zu erwarten.

4.3.4 Zusätzliche Zytotoxizität erst im LZV mit hohen DSF-Konzentrationen

4.3.4.1 Konzentrationsabhängige Zytotoxizitätssteigerung im Doxo-Monoversuch

Nach Testung der Proliferationshemmung mittels ABX-Cellcounter konnte ein dosis- und zeitabhängiger Effekt von Doxo mit Abfall der Anzahl an Lebendzellen in KG-1a-Zellen in der Durchflusszytometrie mittels PI-Färbung festgestellt werden. Dieser ist ab Konzentrationen von 1/2- bis 2 μ M Doxo besonders deutlich sichtbar (bestes Ergebnis zeitunabhängig in der 2 μ M-Probe, nach 72h: Abfall auf 40%).

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde der Anteil toter Zellen direkt an der gemessenen Zahl von Singlets bewertet (vgl. Mattes 2015). In dieser Arbeit definierten wir den zytotoxischen Effekt entsprechend der Abnahme Lebendzellen bezogen auf die Summe von toten und lebenden Zellen in Auftragung nach den Kriterien PI und FSC. Die Definition der Zytotoxizität ist auch in weiteren Studien unterschiedlich gewählt, was eine Vergleichbarkeit der einzelnen Studien erschwert. *Carrion et al.* wählten bspw. in ihrer Veröffentlichung die Darstellung der Zytotoxizität nach Berechnung des IC50-Wertes, welcher mittels Trypan-Blau-Färbung ermittelt wurde. Sie berichteten, nach 72h dauerhafter Doxo-Inkubation von KG-1a-Zellen, einen IC50-Wert von 75nM (\pm 7nM). Dieser Wert entspricht einer Konzentration von 0,075 μ M Doxo, welche niedriger als unsere verwendeten Konzentrationen ist (1/8 μ M = 0,125 μ M) und deutlich effektiver im Vergleich wirkt (Carrion et al., 2004). Im MTT-Assay wird allein zwischen toten und nicht-toten Zellen unterschieden, gleichzeitig werden alle Zellen berücksichtigt. In unserer zytometrischen Darstellung wurden aus den gemessenen Werten erst die Singlets gated und in der anschließenden Darstellung sowohl die Lebendzellen als auch die toten Zellen bestimmt. Hierbei wurden die apoptotischen Zellen und Zellfragmente weiter ursprungsnahe bereits ausgeschlossen. Eine Hinzunahme dieser Zellen in die Gesamtzellzahl zur Errechnung des Anteils Lebendzellen bzw. einen direkten Bezug der gateden Lebendzellen auf die Singlets hätte die Ergebnisse für den Anteil Lebendzellen nochmals niedriger ausfallen lassen (Daten nicht gezeigt).

Da der Trypan-Blau- und der MTT-Assay in internationalen Studien breite Anwendung finden, sollte in zukünftigen Arbeiten zur besseren Vergleichbarkeit auf diese ergänzend zur Durchflusszytometrie zurückgegriffen werden.

Bereits 1979 berichteten *Buick et al.* von sehr variablen Doxo-Konzentrationen zum Erlangen desgleichen Zytotoxizitätseffektes an AML-Zelllinien. Sie gaben zum Erreichen ihrer D10 (= Dosis bei der noch 10% der Ausgangszellen leben) ein Konzentrationspektrum von 0,47 bis 20,8 µg/ml an (Buick et al., 1979) und *Müller et al.* gaben eine ID50 von 0,32µg/ml (Range 0,02 – 1,2µg/ml, Mittelwert $0,38 \pm 0,29$; n = 36) an (Müller et al., 1992). Die in dieser Arbeit verwendete Konzentration von 0,5µM Doxo entspricht ca. 0,27µg/ml.

Unsere Ergebnisse passen außerdem zu Werten aus Versuchen von *Conticello et al.*, welche neben DSF und DSF/Cu-Versuchen eine 5µM-Doxo-Konzentration an AML-Zelllinien testeten. Sie erzielten mit ihrer Doxo-Konzentration nach 24h ca. 70% und nach 48h Inkubation etwas weniger als 80% Zellreduktion. Es gab allerdings keine 2µM-Doxokonzentration, welche einen besseren Vergleich zu der vorliegenden Arbeit zugelassen hätte (Conticello et al., 2012).

In der Literatur werden Spitzenplasmakonzentrationen von 1,5µM Doxo in der Induktionschemotherapie der AML als gängig berichtet (Lagadinou et al., 2008). Dagegen stellten *LüPERTZ et al.* in ihren Versuchen an Darmkrebszellen fest, dass eine Erhöhung der Doxo Konzentration größer als 1µM zu keiner Zunahme der toten Zellfraktion führte. Wir sahen uns hierdurch bestätigt, für die Kombinationsproben eine geringere Doxokonzentration zu wählen, um das Ziel einer Dosiseinsparung bei gleichem antitumorösem Effekt und zukünftig geringeren Nebenwirkungen zu erzielen. Zumal seit langem bekannt ist, dass die Einsparung von Doxo-Konzentrationen zur Verringerung der Akuttoxizitäten, insbesondere an den physiologischen hämatopoetischen Vorläuferzellen und am KM, bei gleichzeitig erhaltener antineoplastischer Wirkung erzielt werden kann. Dies wurde in in-vivo-Versuchen durch Senkung der DNA-Synthese auf 60% der leukämischen Blasten nachgewiesen, während die Synthese der normalen Blutbildung nur um 10% reduziert wurde. In den gleichen Versuchen wurde gezeigt, dass eine Anwendung des s-phaseswirksamen Cytarabin einen synergistischen Effekt vorweist und geringere Doxo-Konzentrationen zukünftig benötigt werden (Sonneveld et al., 1981).

4.3.4.2 Konzentrationsabhängige Zytotoxizitätssteigerung im DSF-Monoversuch

Trotz Hinweise auf eine Proliferationshemmung in der 5/8µM-Probe gibt es keinen Hinweis auf einen korrelierenden zytotoxischen Effekt in niedrigen DSF-Konzentrationen. Im DSF-Versuch wurde deutlich, dass der zytostatische Effekt mit

steigender DSF-Konzentration länger anhielt. Bis zu einer DSF-Konzentration von 5µM schien die Dosis im Monoversuch nicht ausreichend zu sein, um auch einen hemmenden zytotoxischen Effekt an Zellen der KG-1a-Zelllinie zu bewirken. Der maximale Effekt war in der 10µM-Probe nach 72h mit stetig fallenden Werten ablesbar.

In Diskrepanz zu unseren Ergebnissen berichteten *Xu et al.*, unter Verwendung des MTT-Assays, von einem IC₅₀-Wert von 0,54µM DSF (± 0,18µM) nach 24h Inkubation an einer FACS-angereicherten CD34⁺/CD38⁻-Fraktion aus KG-1a-Zellen (*Xu et al.*, 2017). Dieser Wert steht in deutlichem Kontrast zu unseren Ergebnissen, in welchen selbst die höchste DSF-Konzentration nach 72h Inkubation keine Zytotoxizität unter 50% erreichte. Wir hinterfragten die Methoden und kamen für solch hohe Diskrepanzen zu folgenden Erklärungen:

a. Veränderungen durch die Hoechstfärbemethode

aa. Durch den Farbstoff selbst: Hoechst 33342 erhöht allenfalls minimal die Zytotoxizität, somit müssten in unseren Versuchen statt höherer, niedrigere Ergebnisse erzielt werden.

bb. Durch die Mindestzellzahl: Wir vermuteten, dass die hohe Zellzahl zur Qualitätssicherung der Hoechstfärbemethode (mindestens 2x10⁶ Zellen) die Zytotoxizität verfälschen könnte, da das Verhältnis von Zellen zu Wirkstoff unverhältnismäßig hoch ist. Eine Überprüfung stellte aber sicher, dass unsere verwendete Zelldichte (0,6x10⁶ Zellen/ml) die empfohlene Zelldichte nicht überschreitet (<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-421>, Stand: 18.01.2020). *Xu et al.* macht hier keine Angaben zu ihrer genutzten Zelldichte. Wir gehen jedoch davon aus, dass sie nicht wesentlich niedriger lagen.

b. Veränderungen in der verwendeten KG-1a-Zelllinien

Wie in Kapitel 4.3.1 diskutiert, besteht bei transformierten Zelllinien immer ein gewisses Restrisiko zum Erwerb neuer Mutationen (vgl. Kapitel 4.3.1, S. 85). Dies ist von uns durch das Auftauen kryokonservierter Zellen möglichst geringgehalten worden. Jedoch ist dies nach Ausschluss der vorher genannten Möglichkeiten die wahrscheinlichste Begründung der unterschiedlichen Ergebnisse.

Duan et al. zeigten an NSCLC Zelllinien (NCI-H2009- und A549-Zellen), dass DSF Konzentrationen von 12- und 50µM im Monoversuch zum Erreichen der IC₅₀ nötig

gewesen sind. Diese konnten nach Kombination von DSF mit 0,2 μ M Cu auf eine IC₅₀ von 0,2 μ M reduziert werden (Duan et al., 2014).

Erst kürzlich veröffentlichten *Shah O'Brien et al.* die Beobachtung eines unterschiedlichen Ansprechens sowie eines Effektsprungs zwischen 5- und 10 μ M DSF-Konzentrationen an Zellen eines Kopf-Hals-Tumors (Shah O'Brien et al., 2019). Weiterhin berichteten sie, dass für ein effektives Ansprechen bzw. einer erhöhten Apoptoseinduktion ein intakter PERK-Arm (PERK, engl.: protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase) der ungefalteten Proteinantwort (engl. unfolded protein response, UPR) nötig sei, womit sie gleichzeitig die Frage unterschiedlicher zytotoxischer Ergebnisse in gleichen Tumorarten beantworteten.

Unabhängig der Diskrepanz der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Veröffentlichung von *Xu et al.* wurde in Bezug auf DSF-Versuchen von einem biphasischen Zytotoxizitätsverlauf an SK-N-BE- (Neuroblastom) und UVW/NAT- (Gliom)-Zellen berichtet. Die in niedrigen Konzentrationen (< 4 μ M DSF, am deutlichsten bei 1,7 μ M) erreichten Effekte wurden hierbei als Cu-abhängige Reaktionen und die im Verlauf bei DSF-Steigerung (> 10 μ M DSF, IC₁₀: 17 μ M) beginnenden Effekte als ROS-induziert gewertet (Rae et al., 2013). Die Autoren verdeutlichten weiter, dass ein ungünstiges Verhältnis von DSF und Cu die Cu-abhängige Potenzierung des DSFs umkehre. Hierauf gingen auch *Skrott et al.* ein, indem sie einen von *Tacconi et al.* beschriebenen Plateau-effekt bei steigender Konzentration von DSF kommentierten. Sie postulierten, dass das von *Tacconi et al.* beschriebene Plateau durch die Ausschöpfung der natürlichen Cu-Vorkommen des verwendeten Kulturmediums entstünde. Dies wiesen sie anschließend durch Cu-Substitution und erhöhter Zytotoxizität des DSF/Cu nach (Skrott et al., 2019, Tacconi et al., 2017).

Wir überprüften daraufhin den natürlichen Cu-Gehalt unserer verwendeten Kulturmedien durch die Herstellerangaben – diese enthielten kein Cu. Abgesehen davon liegen die in der vorliegenden Arbeit gewählten DSF-Konzentrationen, wenn auch gering, oberhalb der IC₅₀-Konzentration von *Xu et al.*, deren natürlichen Cu-Gehalt der verwendeten Medien wir überprüften, jedoch keine Aussage über den Cu-Gehalt erhielten (Xu et al., 2017).

In Zusammenschau der Informationen ist davon auszugehen, dass wir nur den ROS-abhängigen Effekt der DSF-Inkubationen darstellten. Dieser trat mit nahezu deckungsgleichen Konzentrationen wie bei *Rae et al.* ein (Rae et al., 2013).

Nun könnte argumentiert werden, dass die ROS-abhängige Zytotoxizität mit noch höheren Dosierungen hätte untersucht werden müssen. Dazu schreiben unterschiedliche Quellen von in-vivo-Studien, dass mit mehreren Gaben von 250mg oder der Einmaleinnahme der Tageshöchstdosis von 500mg DSF Plasmaspiegel unter $2\mu\text{M}$ erreicht werden (Brar et al., 2004, Rae et al., 2013, Conticello et al., 2013, Spillier et al., 2019). Man geht insofern davon aus, dass DSF-Effekte im physiologischen Setting ROS-unabhängig sind (Rae et al., 2013). DSF-Konzentrationen größer als $10\mu\text{M}$ spiegeln folglich zunehmend unphysiologische Ergebnisse wider. Ziel sollte es daher sein, den DSF-Effekt aus unphysiologisch hohen Konzentrationen in physiologische Bereiche zu senken. Dies wurde durch Kombinationsversuche mit CuGlu, CuSO_4 oder CuCl_2 in zahlreichen in-vitro- und in-vivo-Experimenten erreicht (Duan et al., 2014, Xu et al., 2017, Chen et al., 2006, Yip et al., 2011, Allensworth et al., 2015, Skrott et al., 2017, Bista et al., 2017, Liu et al., 2012).

Wir konnten nachweisen, dass eine ausgeprägte Zellreduktion von KG-1a-Zellen erst in hohen DSF-Konzentrationen zu erreichen ist. Zudem bestehen starke Hinweise, dass eine Kombinationsanwendung von DSF/Cu deutlich niedrigere DSF-Konzentrationen ermöglichen würden. Ob diese in Kombinationsgaben mit Doxo einen synergistischen Effekt bewirken, gilt es zu prüfen.

4.3.4.3 Zytotoxizitätssteigerung erst im DSF/Doxo-Langzeitkombinationsversuch

Für die Kombinationsversuche von DSF und Doxo wurde bzgl. der Zytotoxizität kein Vorteil in der Verwendung einer Kombinationsgabe aus DSF und Doxo im KZV im Vergleich zur Doxo-Monogabe nachweisbar. Hingegen konnte eine Steigerung der Zytotoxizität im DSF/Doxo-LZV erzielt werden. Es zeigte sich, dass zum 120h-Endzeitpunkt der Wert der $5\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ -Probe ($0,84 \pm 0,31$; $n=2$) unterhalb der Doxo-Kontrolle lag und somit eine ausgeprägtere Zytotoxizität aufwies. Die zweimalige Gabe von hohen DSF-Konzentrationen in Kombination mit Doxo hat daher einen zusätzlichen Nutzen im Vergleich zur alleinigen Doxo-Behandlung in Bezug auf die bloße Zellreduktion von KG-1a-Leukämiezellen.

Es gibt bisher wenige Daten aus DSF- und Doxo-Kombinationsversuchen. *Xu et al.* beobachteten 2011 u.a. eine deutlich erhöhte Zytotoxizität von HL60-Zellen einer AML-Zelllinie nach Inkubation von DSF/Cu mit Doxo. Zudem konnten sie nachweisen, dass DSF/Cu zuvor Doxo-resistente Zellen nach Behandlung mit DSF/Cu auf Doxo sensibilisierte (*Xu et al.*, 2011).

Unsere Ergebnisse lassen offen, ob die besseren Ergebnisse durch höhere akkumulierende Konzentrationen erreicht wurden oder durch die Fraktionierung in zwei zeitlich versetzte Gaben. Es bleibt zu klären, ob es einen Vorteil im Vergleich zur einmaligen Gabe mit doppelt so hohen Konzentrationen gibt.

4.3.5 Zusätzliche Reduktion der G₂/M-Phase durch DSF/Doxo-Kombination

4.3.5.1 Zellzyklusverteilung im Doxo-Monoversuch

In unseren Auswertungen zu den Zellzyklusveränderungen durch Doxo-Inkubation an KG-1a-Zellen zeigten wir, dass diese konzentrationsabhängig zwei Verhaltensmuster aufweisen:

a. Bis zu einer Konzentration von einschließlich $1/2\mu\text{M}$ -Doxo konnte ein kurzfristiger (bis zur 48h-Messung) Anstieg der G₂/M-Population und ein verzögerter Übertritt von Zellen der S-Population beobachtet werden. Das beobachtete Verhalten entspricht am ehesten subletal geschädigten Zellen. Diese treten nach einem Ruhestopp zur DNA-Reparatur erneut in die G₀/G₁-Phase des Zellzyklus ein (steigende G₀/G₁-Werte der $1/8$ - und $1/4\mu\text{M}$ -Konzentration).

b. Für Doxo-Konzentrationen größer $1/2\mu\text{M}$ zeigten wir bis zur 72h-Messung stetig wachsende G₂/M-Populationen – im Sinne eines G₂/M-Arrests. Insgesamt bewirkt Doxo eine deutliche dosis- und zeitabhängige Reduktion der Zellen der G₀/G₁- und S-Phase.

Lüpertz et al. beschrieben ebenfalls in Versuchen an Hct116-Darmkrebszellen ein dreistufiges Zellverhalten nach Schädigung durch unterschiedlich hohe Doxo-Konzentrationen. Unsere Ergebnisse decken sich in zwei Punkten mit den Beobachtungen von *Lüpertz et al.*. Bei mittleren Doxo-Konzentrationen (ab $1\mu\text{M}$) und kontinuierlicher Inkubation beschrieben sie, den von uns ebenfalls nachgewiesenen G₂/M-Phasenarrest. Doxo-Konzentrationen niedriger als $1\mu\text{M}$ bewirkten gleichfalls den vorübergehenden Phasenstillstand und Wiedereintritt in den Zellzyklus. Für Doxo-Konzentrationen größer $5\mu\text{M}$ beschrieben sie einen seneszenz-ähnlichen Phänotyp mit G₀/G₁-Arrest. Diese Konzentrationen wurden in unseren Tests nicht angewandt.

Neben der Überlegung des Wiedereintritts nach dem Reparaturstopp äußerte *Mattes* die These, dass ein medikamenteninduzierter Stimulus sowohl die Anreicherung der diploiden SP als auch die zeitlich folgende Erhöhung der G₀/G₁-Population erklären könnte (*Mattes*, 2015). Wir prüften unsere Daten dahingehend und halten diese Theorie ebenfalls für plausibel. Unreife, stammzellähnliche Leukämiezellen wie die therapieresistenten SP-Zellen werden durch ihre dauerhafte Selbsterneuerungs- und Teilungsfähigkeit für Leukämie-Rezidive als ursächlich angesehen (*Honoki*, 2010, *Shaffer et al.*, 2012). Wenn ein Zytostatikum mit hohem Zytotoxizitätsprofil einen Großteil der Leukämiezellen eliminiert, scheint es naheliegend, dass es ein Feedbacksignal an unreife Vorläuferzellen gibt, welches sie aus ihrer Quieszenz in die mitogene Zellteilung zum Zweck der Repopulation eintreten lässt. Gegen diese Theorie spricht jedoch, dass die SP-Fraktion zahlenmäßig und prozentual äußerst gering ausfällt, sodass eine kurzfristige Ausreifung, wie in unserem Messungsintervall, kaum merklich auffallen dürfte. Abgesehen davon könnten beide Theorien jedoch auch parallel existieren. Da *Lipertz et al.* keine SP-Zellen untersucht hat, wurde dieser Aspekt nicht aufgegriffen.

4.3.5.2 Zellzyklusverteilung im DSF-Monoversuch

Im DSF-Monoversuch wurde deutlich, dass DSF in alleiniger Anwendung erst in hohen Konzentrationen sichtbare Effekte im Verhältnis der Stadien des Zellzyklus bewirkt. In Konzentrationen von 5- und 10µM zeigte sich, passend zu den Ergebnissen der Zytotoxizität, eine Reduktion der Zellzahl der G₀/G₁-Population. Veränderungen der S-Population sind nur in der 10µM-Konzentration zu beobachten. Hier zeigte sich initial eine deutliche Reduktion sowie eine stete Zunahme der Fraktion in den Folgemessungen. *Tesson et al.* stellten die Hypothese auf, dass DSF allein als auch in Kombination mit Cu, durch ihre Eigenschaft gemischte Disulfide mit Zellbestandteilen zu bilden, eine Inhibierung regulatorischer Enzyme der DNA-Synthese bewirke (*Tesson et al.*, 2017). In niedrigeren DSF-Konzentrationen verhalten sich die Ergebnisse der S- und G₂/M-Phase sehr kongruent zur Kontrollprobe. Die 10µM-Probe bewirkt zum Versuchsendpunkt eine geringe Zunahme der G₂/M-Fraktion im Vergleich zu den anderen Proben. In Versuchen von *Johnson et al.* wurde dies mit Nachweis geringerer Gesamt-CDK1-Expressionen als Hinweis eines G₂/M-Arrestes interpretiert (*Johnson et al.*, 2009, *Tesson et al.*, 2017).

An Melanomzellen wurde 2004 eine geringe Reduktion der G₀/G₁-Phase sowie eine stetige Zunahme des S-Phasenanteils nach Anwendung von DSF nachgewiesen. Diese Effekte wurden, bis hin zum S-Phasen Arrest, durch die Hinzunahme von Cu potenziert, sodass keine Zellen in der G₂/M-Phase nachzuweisen waren (Brar et al., 2004).

4.3.5.3 Zellzyklusverteilung im DSF/Doxo-Kombinationsversuch

In den Kombinationsversuchen aus DSF und Doxo wiesen wir nach, dass mit steigender DSF-Konzentration eine Abnahme der Zellzahlen in der G₀/G₁-Zellzyklusphase von KG-1a-Zellen erzielt wird. Diese hat im KZV nach 72h Inkubationszeit ihren Tiefpunkt in der 5/2µM+1/2µM-Probe ($0,91 \pm 0,09$). Bei zweimaliger Gabe und einer verlängerten Inkubationszeit von 120h wird im LZV die G₀/G₁-Zellzahl zusätzlich dosisabhängig reduziert. Ihr Tiefpunkt liegt dann in der 5µM+1/2µM-Probe ($0,63 \pm 0,03$; n=2). Einen G₀/G₁-Arrest wie er von *Lüpertz et al.* bei kontinuierlicher Gabe hoher Doxo-Konzentrationen (> 5µM Doxo) an Hct116-Darmkrebszellen beschrieben wurde, konnten wir allenfalls zum 72h-Messzeitpunkt in der Kombinationsprobe mit der höchsten DSF-Konzentration (5µM+1/2µM) beobachten, dies bestätigte sich jedoch nicht im LZV. Im Zellzyklusverhalten können wir bei DSF-Konzentrationen bis 5µM somit keine Doxo-Sensibilisierung sehen, die den gleichen Effekt hätte wie 5µM Doxo im Versuch von *Lüpertz et al.* an Darmkrebszellen (Lüpertz et al., 2010).

Außerdem konnte verdeutlicht werden, dass niedrige DSF-Konzentrationen einen Rückhalt bzw. geringeren Übertritt von Zellen der G₀/G₁-Population bewirken und somit der Übertritt in die S- und G₂/M-Populationen verringert wird. Ungewöhnlich ist, dass dies bei konstanter Doxo-Konzentration mit steigenden DSF-Konzentrationen abnimmt und sich dem reinen Effekt der Doxo-Kontrolle anpasst. Wir vermuten eine Form von subletalen Schäden, die durch niedrige DSF-Konzentrationen stattfinden und anschließend den Wiedereintritt in den Zellzyklus ermöglichen. Vorstellbar ist auch der zuvor im DSF-Monoversuch bei hohen DSF-Konzentrationen beobachtete Hemmungsmechanismus von Regulationsenzymen der DNA-Synthese, welcher in Kombinationsbehandlungen verfrüht in niedrigen DSF-Konzentrationen sichtbar und anschließend durch einen Anstieg der Zytotoxizität überlagert wird.

Weiterhin zeigten wir, dass es in den ersten 48h zu einem doxotypischen G₂/M-Arrest kommt. Die G₂/M-Fraktion fällt zur 72h-Messung jedoch deutlich ab. Dies wiederholt sich im LZV erneut zur 120h-Messung. Jedoch konnten hier durch zweimalige

Medikamentengabe zum Messzeitpunkt nach 96h und 120h in Kombinationsproben mit hohen DSF-Konzentrationen (ab $5/2\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ -Probe) niedrigere Zellzahlen in allen Populationen als in der Doxo-Kontrollprobe erzielt werden. Wir interpretierten dies als zusätzlichen Effekt von Doxo durch DSF-Sensibilisierung in Kombinationsversuchen an allen Zellen unabhängig ihrer Zellzyklusphase. DSF führt somit zu einer erhöhten Zytoreduktion durch Doxo selbst in der G₂/M-Arrestphase. Die Ergebnisse knüpfen somit auch an *Brar et al.* 2004 an (s. Kapitel 4.3.4, S. 89ff). Wenn DSF neben einer G₀/G₁-Reduktion einen Arrest in der S-Phase bewirkt, kann eine zusätzliche Schädigung durch Doxo hier erfolgen und es treten weniger Zellen in die G₂/M-Phase über. Die Beobachtungen stehen somit in Übereinstimmung früherer Experimente, welche eine DSF-induzierte Sensibilisierung etablierter Zytostatika aufwiesen (Skrott et al., 2017, Xu et al., 2017, Paranjpe et al., 2014, Guo et al., 2010, Duan et al., 2014, Allensworth et al., 2015).

4.3.6 Zusätzliche Reduktion der unreifen diploiden SP und Erhöhung der unreifen tetraploiden SP durch die DSF/Doxo-Kombinationsanwendung

Als Fraktion von naiven Vorläuferzellen mit Stammzeleigenschaften besitzt die Hoechst-SP mehrere Schutzmechanismen, welche sie resistent bzgl. der zytotoxischen Wirkung zahlreicher Substrate macht. Neben einer vermehrten Quieszenz zählt hierzu insbesondere die namensgebende Überexprimierung von ABC-Transportern der Zellmembran, welche neben Hoechst auch zahlreiche Zytostatika erfolgreich aus der Zelle pumpt und die Zellfraktion als Nebenpopulation in der Hoechstfärbemethode darstellt. Ebenfalls besitzen Zellen mit Stammzeleigenschaften erhöhte antioxidative Puffersysteme, welche sie vor hohen ROS-Leveln und dem bei Schwellenüberschreitung resultierenden Eintritt in die Apoptose schützen. Diese sind zum Beispiel eine erhöhte Expressierung von ALDH oder der NF-κB bzw. Nrf2 (Hanekamp et al., 2017, Zha et al., 2014, Xu et al., 2017).

In Experimenten an vier Lungencarcinom-Zelllinien (H460, HTB-58, H2170 und H441) wurde beobachtet, dass SP-Zellen auf sieben etablierte Zytostatika (u.a. Doxo für H2170) deutlich resistenter reagierten als ihre dazugehörige Hauptpopulation (Ho et al., 2007).

In weiteren Beispielen wurde gezeigt, dass die Standardbehandlung mit etablierten Zytostatika zu einer Anreicherung der SP-Fraktion führte (Maliyakkal et al., 2015, Bleau et al., 2009).

4.3.6.1 SP-Veränderung im Doxo-Monoversuch

Wir konnten diese Erkenntnisse durch die Inkubation der KG-1a-Zellen mit Doxo bestätigen. Zwar ließ sich dosis- und zeitabhängig (insbesondere ab einer Inkubationszeit von 48h) die Reduktion des Anteils diploider SP nachweisen, allerdings wurde der Anteil unreifer diploider SP durch Doxo angereichert. Die Anreicherung steigerte sich dosisabhängig bis zu einer Doxokonzentration von $1/2\mu\text{M}$. Jede Dosiserhöhung darüber hinaus führte zu einer geringer werdenden Steigerung. Wir vermuten dahinter eine zusätzliche Schädigung der unreifen diploiden SP-Fraktion in Konzentrationen ab $1/2\mu\text{M}$ -Doxo.

In Gegenüberstellung zum Effekt an der diploiden SP trat in der tetraploiden SP direkt die zuvor beschriebene anreichernde Wirkung der unreifen diploiden SP ein. Allein zum 24h-Messzeitpunkt lag der Anteil tetraploider SP der $2\mu\text{M}$ -Doxo-Probe (ca. $0,78 \pm 0,40$) nach Normierung unterhalb der Kontrollprobe. Nach 72h Inkubation fand in derselben Probe eine Anreicherung auf $1,38 (\pm 0,62)$ statt. Für die therapieresistenteren Zellen der unreifen tetraploiden SP wurden bei vergleichbarer zeitabhängiger Dynamik keine Reduktion der SP unterhalb der Werte der Kontrollprobe nachgewiesen. Doxo bewirkt somit eine Anreicherung sowohl der tetraploiden als auch unreifen tetraploiden SP.

Uns sind zum aktuellen Zeitpunkt keine Studien bekannt, die Bezug auf die SP-Anreicherung von KG-1a-Zellen unter Doxo-Einfluss nehmen (Stand: 10. Januar 2020). Dadurch, dass sich die SP anreicherte, knüpften unsere Ergebnisse des Doxo-Monoversuches an zuvor Veröffentlichtes an. *Patrawala et al.* zeigten an HL60-Leukämiezellen mit gering ausgeprägtem SP-Anteil, dass Langzeitinkubationen mit niedrigkonzentriertem Doxo SP-reiche Zellsuspensionen hervorbringen können (*Patrawala et al., 2005*). Neben hämatologischen Malignomen wurde ebenfalls an Brustkrebszellen vom MCF-7-Typ nach Inkubation mit Doxo demonstriert, dass Gene zur Arzneimittelresistenz überexprimiert wurden und die Zelllinie anschließend eine erhöhte SP-Fraktion aufwies (*Calcagno et al., 2010*). Die leukämische SP-Fraktion ist ebenfalls reich an $\text{CD}34^+/\text{CD}38^-$ Zellen. Für $\text{CD}34^+/\text{CD}38^-$ ALDH^{int} Zellen (= $\text{CD}34^+/\text{CD}38^-$ -Zellen mit geringer ALDH-Expression) ist wiederum gezeigt worden, dass ihr Anteil bei Patienten in CR in MRD-Messungen nach Therapie deutlich erhöht ist im Vergleich zum Ausgangsniveau (0,15% auf 34% bei CR des Gesamtblastenlast). Die Hauptmasse der Zellen konnte in diesen Versuchen um das ca. 200-fache reduziert

werden, während die CD34⁺/CD38⁻-ALDH^{int}-Zellen nur um das 13-fache gesenkt werden konnten (Gerber et al., 2012).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Doxo in Monotherapie zu einer Anreicherung der unreifen SP-Fraktion führt. Insbesondere durch die Kardiotoxizität ist die Anwendung höherer Doxokonzentrationen, welche eine geringere Zunahme der unreifen SP mit möglicher SP-Schädigung zeigten, limitiert. Obwohl die unreife SP bei 1/2µM am höchsten angereichert wurde, verwendeten wir diese Konzentration in den Kombinationsversuchen, um eine Dosisreduktion zu erreichen. Eine höhere SP-Reduktion wäre vermutlich mit einer 1µM-Doxokonzentration erzielt worden, jedoch könnte dies auch Überlagerungseffekte durch einen verstärkten G₂/M-Phasenarrest bewirken.

4.3.6.2 SP-Veränderung im DSF-Monoversuch

In den DSF-Versuchen wurde nach 72h Inkubation in allen Proben eine Reduktion sowohl der diploiden als auch der tetraploiden SP-Fraktion nachgewiesen. Der niedrigste Wert für den Anteil der diploiden SP ($0,32 \pm 0,18$; n=2) wurde nach 72h ebenso wie für die tetraploide SP ($0,68 \pm 0,15$; n=2) in der 10µM-Probe gemessen. Durch die Ergebnisse der Zellzyklusauswertung konnten wir ebenfalls nachweisen, dass das Ergebnis eine reele Reduktion der diploiden SP-Fraktion ist (s. Kapitel 3.3.6, S. 68ff), da zum 72h-Messzeitpunkt gleichzeitig der Wert der G₀/G₁-Fraktion sank und somit keine relative Verfälschung bestand. Die Ergebnisse ergänzen unsere Beobachtung der Zytotoxizitätsbestimmung, in welcher erst höhere DSF-Konzentrationen (5- und 10µM) relevante zytotoxische Effekte bewirken, indem sie aufweisen, dass selbst bei geringer Zytotoxizität eine Reduktion der G₀/G₁-Hauptpopulation und der heranreifenden diploiden sowie tetraploiden SP erfolgt. Die zeitliche Dynamik der Ergebnisse ließ die Vermutung zu, dass in den ersten 24h eine Schädigung ausgereifter Zellen und anschließend eine Schädigung heranreifender Zellen der diploiden und tetraploiden SP Fraktion stattfindet.

Für den Anteil der unreifen SP (diploid und tetraploid) konnte unabhängig von der DSF-Konzentration keine Reduktion festgestellt werden. Nach 72h Inkubation ist der niedrigste Anteil unreifer diploider SP ($1,26; \pm 0,19$; n=2) in der 5/2µM-DSF-Probe gemessen worden. Zuvor bestand in der gleichen Probe zum 48h Messzeitpunkt ein identisch hoher Wert zur Kontrollprobe ($1,01; \pm 0,40$; n=2). Jedoch wird in dieser

punktuellen Darstellung nicht die stark fallende Dynamik der 10 μ M-Probe berücksichtigt. Die deutliche Anreicherung der unreifen tetraploiden SP nach 24h (ca. $10,8 \pm 3,3$) fiel anschließend nach 72h stetig ab (ca. $2,40 \pm 0,67$). Aufgrund des im Zytotoxizitätsabschnitt erhärteten Verdachts, dass diese Dynamik ROS-abhängig induziert wird, gehen wir davon aus, dass in höheren DSF-Konzentrationen eine ausgeprägtere Schädigung der unreifen SP nachzuweisen wäre. Die Vermutung wird dadurch untermauert, dass DSF neben der Erhöhung der ROS-Level ebenfalls eine Hemmung der NF-kB und des Nrf2 bewirkt, welche beide eine Apoptoseinduktion veranlassen ((s. Kapitel 1.7.3, S. 17ff.); (Zha et al., 2014, Xu et al., 2017, Lovborg et al., 2006)). Unsere Ergebnisse sind ebenfalls Indizien dafür, dass zuerst eine Schädigung der ausgereiften leukämischen Zellen der Hauptpopulationen stattfindet (ersten 24h), anschließend ist zusätzlich eine Reduktion der heranreifenden Vorläuferzellen (diploide und tetraploide SP) nachweisbar. Die Abnahme dieser zwei Fraktionen in den ersten 48h führt zu einer parallelen Anreicherung des Anteils unreifer diploider und unreifer tetraploider SP. Bis zur 72h-Messung lässt sich eine konzentrationsabhängige Dynamik der Reduktion des angereicherten unreifen diploiden SP Anteils nachweisen. Diese DSF-konzentrationsabhängige Negativedynamik ist für uns der Hinweis, dass eine DSF-abhängige Schädigung der leukämischen SP stattfindet. Zum aktuellen Zeitpunkt liegen uns keine Daten vor, in welchen DSF auf das Verhalten speziell der SP einer AML untersucht wurde (Stand 11. Januar 2020). *Xu et al.* berichtete von einer DSF/Cu-induzierten Reduktion von CD34⁺/CD38⁻-Zellen mit Stammzeleigenschaften der KG-1a-Zelllinie, welche zuvor künstlich durch FACS aufgesättigt wurden. Wie wir zuvor schilderten, ist die SP reich an CD34⁺/CD38⁻-Zellen, sodass die Wirkung, welche von *Xu et al.* beschrieben wurde, auch unsere Beobachtungen und Deutungen bekräftigt (Xu et al., 2017).

4.3.6.3 SP-Veränderung im DSF/Doxo-Kombinationsversuch

Nach geringer Reduktion ($0,96 \pm 0,20$; nach Normierung in der 5/2 μ M+1/2 μ M-Probe) des Anteils diploider SP nach 72h im KZV konnten wir im LZV der DSF/Doxo-Kombinationsanwendung zum 120h-Endpunkt eine zusätzliche Reduktion in der gleichen Probe ($0,81 \pm 0,07$; n=2) im Vergleich zur Doxo-Kontrolle nachweisen. Einen Benefit konnten wir außerdem in der Reduktion der tetraploiden SP in allen Proben nach 72h Inkubation im KZV feststellen. Die deutlichste Abnahme fand hier in der niedrigsten

($5/8\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ mit $0,64 \pm 0,12$) als auch in der höchsten DSF-Konzentration ($5\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ mit $0,72 \pm 0,15$) statt. Insbesondere für die tetraploide SP sind die Ergebnisse der Kombinationsversuche hervorzuheben, weil wir zuvor in den Einzelversuchen eine Anreicherung v.a. der tetraploiden SP durch Doxo verzeichnet haben. Der hier nachgewiesene Effekt ist somit offensichtlich durch DSF induziert. Zusätzlich konnte mit steigender DSF-Konzentration eine Dynamikzunahme gezeigt werden, die sich in einer initialen Anreicherung der tetraploiden SP abzeichnete, welche nach 72h in allen Kombinationsproben niedriger lag als in der $1/2\mu\text{M}$ -Doxo-Kontrolle. Die Ergebnisse können durch die von uns beschriebenen Veränderungen des Zellzyklus durch DSF begründet werden. In dem Kapitel 4.3.5.2 verdeutlichen wir, dass DSF zu einem G_0/G_1 - und S-Phasenrückhalt aufgrund der Hemmung regulatorischen DNA-Synthesepoteine führt (s. Kapitel 4.3.5.2, S. 95). Da die tetraploide SP als heranreifende Vorläuferzellen im Übergang zu der Hauptpopulation liegen, wirkt es sich ebenfalls auf diese Subpopulation mit aus. Interessanterweise konnte zum Endpunkt des LZV keine zusätzliche Reduktion des Anteils tetraploider SP in Bezug auf die Doxo-Kontrolle durch eine zweite Medikamentengabe erzielt werden. Das Niedrigstergebnis lag zum Endpunkt des LZV in der $5/2\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ -Probe ($1,04 \pm 0,20$, $n=2$). Dies könnte am ehesten mit einem medikamenten-induzierten Arrest in der G_2/M -Phase des Zellzyklus im Zusammenhang stehen (s. Kapitel 3.4.6, S. 80ff.).

Die Analyse des Anteils unreifer diploider und unreifer tetraploider SP zeigte eine Anreicherung nahezu aller Testreihen bezogen auf die unreife SP der Leerkontrolle. Diese Ergebnisse schließen an den Messwerten der Doxo-Monoversuche an, in welchen eine Anreicherung der unreifen diploiden SP durch Doxo stattfindet.

Der größte Benefit gegenüber der Doxo-Kontrolle wurde sowohl für die unreife diploide als auch unreife tetraploide SP im KZV nach 72h in der $5/4\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ -Probe gemessen ($0,93 \pm 0,24$ und $0,92 \pm 0,49$). Auch im LZV wird in der unreifen diploiden SP noch ein Vorteil gemessen. Hier liegt das niedrigste Ergebnis jedoch sowohl nach 96h ($0,81 \pm 0,14$) als auch nach 120h Inkubation ($0,80 \pm 0,01$; $n=2$) in der $5/2\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ -Probe. Nach 120h fällt in allen Testreihen der Anteil unreifer diploider SP so intensiv, dass sowohl in der $5/2\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ - als auch in der $5\mu\text{M}+1/2\mu\text{M}$ -Probe niedrigere Ergebnisse als in der Leerkontrolle erreicht werden. Für die unreife tetraploide SP im KZV zeigt sich mit Erhöhung der DSF-Dosis eine Anreicherung der unreifen tetraploiden SP. Ebenfalls

findet im LZV eine zusätzliche Anreicherung des Anteils unreifer tetraploider SP in den Kombinationsproben statt. Das niedrigste Ergebnis wurde nach 120h Inkubation in der 5/2 μ M+1/2 μ M-Probe mit $1,2 \pm 0,36$ (n=2) festgestellt.

Dies untermauert nochmals die zuvor gestellte These, dass ein DSF-abhängiger Rückhalt in der G₀/G₁- und S-Phase sich auf die Hauptpopulation der G₂/M-Phase auswirkt, jedoch nicht auf den Anteil der unreifen tetraploiden SP. Im Gegenteil: Diese befinden sich zuvor noch im Status der Quieszenz und können durch den Stimulus der Medikamente zum Verlassen ihres Ruhezustandes getrieben werden, um eine Repopulation vorzunehmen. Dies interpretieren wir als einen Ansatzpunkt zur weiteren Zellreduktion.

In Zusammenschau aller erhobener Ergebnisse deuten wir das beschriebene als Hinweis eines synergistischen Effektes, welcher im Sinne einer Chemosensibilisierung von Doxo durch DSF zu werten ist. Dies erklärt die besten Ergebnisse der diploiden SP-Reduktion im KZV durch geringe DSF-Konzentrationen. Die zusätzliche Effektsteigerung nach zweimaliger Kombinationsgabe im LZV lässt sich ebenfalls am ehesten als gesteigerte Dosiswirkung des Doxos unter erhöhten DSF-Konzentrationen werten, sodass hier der Effekt nochmals potenziert werden kann. Wir wissen von Doxo, dass es nach Interkalierung an der DNA über die Topoisomerase 2 Isoenzyme wie DSF zu erhöhten ROS-Leveln in der Zelle führt (Tewey et al., 1984). Die ROS-Level werden in den Kombinationsversuchen zusätzlich durch DSF erhöht und können durch die ebenfalls DSF-induzierte Hemmung der NF- κ B und des Nrf2 nicht abgefangen werden. Alle Faktoren leiten die Apoptose vermehrt ein. Die DSF-abhängige ROS-Schädigung der Zellen sollte in Doxo-Kombination entsprechend bereits mit niedrigeren DSF-Konzentrationen eintreten als im DSF-Monoversuch. Weiterhin sind ausgereifte Zellen durch die weniger exprimierten Resistenzmechanismen anfälliger für diese Veränderungen, sodass es in allen Versuchsproben erst zur Schädigung der Hauptpopulationen und mit steigender Konzentration auch zur Schädigung der heranreifenden und letztendlich der unreifen SP kommt.

In Zusammenschau mit unseren Ergebnissen können wir die Beobachtung von *Gerber et al.* nachvollziehen (s.Kapitel 4.3.6.1, S. 99), da auch unsere Hauptpopulationen deutlich reduziert wurden und mit höheren Konzentrationen oder längerer Beobachtung ohne Medikamentenzugabe weiter fallende Werte zu erwarten wären, während die unreife diploide SP sich nur mäßig reduzieren ließ.

Es bleibt fraglich, ob die Konzentrationen sich akkumulieren und höhere DSF und Doxo-Konzentrationen nötig gewesen wären oder gerade die Mehrfachgabe den Vorteil bringt. Außerdem gilt es zu hinterfragen, ob die Dosisbegrenzung von Doxo auf $1/2\mu\text{M}$ zu hoch gewählt wurde und Experimente mit $1\mu\text{M}$ deutlichere Effekte gezeigt hätten.

4.3.7 DSF-abhängige Erhöhung des Quotienten aus unreifer tetraploider und unreifer diploider SP mit dosisabhängiger Reduktionsdynamik in Kombinationsversuchen

Unsere Analyse zeigte für die Monoversuche von Doxo und DSF jeweils einen Anstieg der unreifen tetraploiden SP. Dieser stellte sich im DSF-Versuch durch eine geringe Zunahme des Quotienten und im Doxo-Monoversuch prominenter durch eine klar dosisabhängige Zunahme dar (siehe Kapitel 3.2.5, S. 60 und Kapitel 3.3.5, S. 68). Der Quotient der (Leer-)Kontrollprobe lag hingegen sowohl in den Einzel- als auch in den Kombinationsversuchen zu Beginn und nach 72h bei 0,20. Weiter konnten wir im KZV der Kombinationsanwendung eine Minimierung der Doxo-bekanntem Quotientenerhöhung erzielen. Im vorausgehenden Kapitel (s. Kapitel 4.3.6, S. 97ff.) wiesen wir nach, dass die DSF/Doxo-Kombinationsanwendung eine zusätzliche Reduktion der unreifen diploiden SP und eine Erhöhung der unreifen tetraploiden SP bewirkt. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen des SP-Verhältnisses wider: Eine alleinige zweite Doxo-Gabe im LZV bewirkte keine Zunahmen des strict $4n$ -Anteils (vgl. nach 72h $0,85 \pm 0,28$ und 120h $0,83 \pm 0,11$). In Kombination bewirkt sie jedoch einen DSF-abhängigen Anstieg des Quotienten zu Gunsten des Anteils unreifer tetraploider SP. Diese zeigen eine zeit- und dosisabhängige, fallende Dynamik zu ihren Vorwerten. Alle Quotienten der Kombinationsproben lagen nach 120h oberhalb von 1,0, sodass der Anteil unreifer tetraploider SP größer als der Anteil unreifer diploider SP war.

Die Ergebnisse knüpfen an dem zuvor beschriebenen an und erhärten die Vermutung einer Chemosensibilisierung von Doxo durch hohe DSF-Konzentrationen (hier $5\mu\text{M}$).

- a. Dies wird in der Reduktion des Quotienten im KZV nach 72h unter das Niveau der Doxo-Kontrolle deutlich.
- b. Der Quotient verändert sich nach zweimaliger Doxo-Gabe zum Endpunkt des LZV und nicht im Vergleich zum Endpunkt des KZV.

- c. Die DSF-dosisabhängige Anreicherung des Quotienten steigt im LZV zum 96h-Messzeitpunkt, ebenfalls nimmt die Reduktionsdynamik nach 120h desselben Quotienten in Bezug auf die 96h-Vorwerte zu.

Bezüglich des dritten Punktes wiesen wir zuvor nach, dass die Kombination aus Doxo und DSF zu einer Reduktion der unreifen diploiden SP führt (s. Kapitel 4.3.6, S. 97). Außerdem zeigten wir, dass eine Kombinationsbehandlung zu einer Anreicherung der unreifen tetraploiden SP führt. Beide Veränderungen sind allerdings Gründe für eine Vergrößerung der Quotientenwerte. Die im Quotienten gezeigte dosisabhängig fallende Dynamik verdeutlicht jedoch, dass DSF mit steigender Konzentration einen reduzierenden Einfluss sowohl auf die unreife diploide als auch unreife tetraploide SP hat. Unsere Versuchszeiten wurden am ehesten nicht ausreichend lang gewählt.

In seiner Arbeit zu ATO-Versuchen an der KG-1a-Zelllinie diskutiert *Mattes 2015* bereits den SP-Quotienten. Dieser verhielt sich jedoch mit steigenden tetraploiden - und steigenden diploiden SP-Werten anders als unserer SP-Quotient. Er nahm Bezug auf den medikamenteninduzierten G₂/M-Zellzyklusphasen Arrest, in welchem ggf. die tetraploide SP ebenfalls miteingeschlossen wird (Mattes, 2015).

4.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen neben der Bestätigung zuvor veröffentlichter Daten über die zytotoxische Wirkung von Doxo und DSF, dass die Kombinationsanwendung von DSF und Doxo synergistische Effekte nicht nur in der Reduktion der Hauptpopulationen des Zellzykluses, sondern gleichfalls in der Reduktion der äußerst therapieresistenten und rezidivauslösenden SP zeigt.

In Zusammenschau der breiten aktuellen Studienlage in Bezug auf eine Ergänzung der DSF-Anwendung um eine Cu-Substitution wird die Vermutung erhärtet, dass sich das aussichtsreiche Potenzial von DSF nochmals Cu-abhängig steigern lässt. Dies gilt auch für die Anwendung an AML-Zelllinien.

Seine vielversprechende Renaissance konnte DSF durch seine jahrzehntelange, relativ nebenwirkungsarme Anwendung in der Alkoholentwöhnungstherapie und damit verbundenen geringen Therapiekosten in der Onkologie ebnen. Gleichzeitig setzen seine Metabolite an unterschiedlichen und attraktiven Angriffspunkten (ROS-System, ALDH- und P-gp-Expression, NPL4-p97-Segregase) der Tumorbilogie an und hebeln hierbei auch grundsätzliche Resistenzmechanismen von CSCs aus. Weiterhin erfüllt DSF durch

seine hohe Anreicherung in malignen Zellen, aufgrund der erhöhten intrazellulären Cu-Konzentration von malignen Zellen und der Chelatbindung von Kupfer, die Kriterien der Wirkungsselektivität.

Wir empfehlen die Ergänzung unserer Versuche durch Anwendung einer DSF/Cu-Lösung und erneute Kontrolle des SP-Verhaltens unter Kombination mit Doxo in in-vitro- als auch in-vivo-Versuchen an AML-Zellen. In in-vivo-Modellen könnte die ALDH-Inhibition von LSCs durch Metabolisierung von DSF eine zusätzliche Reduktion der LSCs bzw. SP bewirken. Dies könnte eine notwendige Doxo-Konzentrationseinsparung zur Folge haben. Wenngleich eine maximale Dosisreduktion von Doxo aus kardiotoxischer Sicht wünschenswert ist, muss berücksichtigt werden, dass eine ausreichende Zytotoxizität an Tumorzellen durch Doxo bestehen bleibt, um die Resistenzmechanismen von SP-Zellen nicht überzuexprimieren wie es im Beispiel von *Patrawala et al.* der Fall gewesen ist (Patrawala et al., 2005). Eine aktuelle Studie weist daraufhin, dass die Anwendung von niedrigdosiertem DSF auch organprotektive Aspekte aufzeigt, welche ebenso Vorteile für doxoinduzierte Kardiotoxizitäten bedeuten (Sonawane et al., 2018). Zahlreiche Kardioprotektoren wurden bereits untersucht, wovon Dexrazoxan die vielversprechendsten Ergebnisse liefert. Dexrazoxan ist durch die FDA für die Doxo-Therapie des Mammakarzinoms als Kardioprotektor zugelassen worden. Als Kardioprotektor könnte DSF neben einer effektiveren Induktionstherapie somit auch eine der Hauptlangzeitnebenwirkungen AML-Überlebender zukünftig verbessern.

5 Zusammenfassung

Nach deutlicher Verbesserung der Prognose in den letzten Jahrzehnten ist das OS der kindlichen AML bei 65-75% zuletzt nahezu stagniert. Begrenzt werden weitere Therapieerfolge u.a. durch eine therapieresistente Zellfraktion mit hämatopoetischen Stammzeleigenschaften (LSCs), welche als eine der Ursachen für Frührezidive der AML angesehen werden.

LSCs befinden sich überwiegend in der Quieszenz, welche sie weniger anfällig für etablierte Zytostatika machen. Als weiterer Resistenzmechanismus ist die Dichte an ABC-Transportern der Biomembran überexprimiert. Dies ermöglicht es ihnen Medikamentenkonzentrationen intrazellulär niedrig zu halten, indem sie Substrate aktiv aus der Zelle pumpen. Außerdem besitzen LSCs ausgeprägte antioxidative

Schutzmechanismen, welche sie vor einem vorzeitigen Eintritt in proapoptotische Signalwege bewahren.

Sowohl die Therapie von Frührezidiven als auch die Resistenzmechanismen führen zu erhöhten Gesamtdosen von Zytostatika wie Doxo (ein Anthrazyklin). Doxo ist aufgrund kardiotoxischer Langzeitnebenwirkungen nur dosislimitiert anzuwenden.

Im Rahmen der Repositionierung von Medikamenten ist DSF mit antineoplastischen Nebeneffekten auffällig geworden. DSF wurde zuvor über 60 Jahre in der Entwöhnungsphase von Alkoholkranken mit geringem Nebenwirkungsprofil angewandt. DSF gelangt als Chelatbildner mit Metallionen wie Cu selektiv vermehrt in Zellen von Malignomen. Intrazellulär wirkt DSF in-vitro über den NPL4-p97-Signalweg proteotoxisch, erhöht die ROS-Level der Zelle, indem es Nrf2 und NF- κ B hemmt, und bewirkt zusätzlich in in-vivo-Modellen eine ALDH-Hemmung. In zahlreichen Studien an Tumoren unterschiedlichster Entität wirkte DSF sowohl an der Hauptpopulation als auch an den Zellen mit Stammzeleigenschaften zytotoxisch.

Unsere Arbeit untersucht den Einfluss von DSF in Kombination mit Doxo nach Inkubation (72h mit einmaliger und 120h Inkubation mit zweimaliger Medikamentengabe) auf KG-1a-Zellen in Bezug auf Proliferations-, Zytotoxizitäts- und Zellzyklusverhalten und der Veränderung der Hoechst-SP. Die Hoechst-SP von KG-1a-Zellen ist die zytometrische Darstellung einer Subpopulation mit hohem Anteil CD34⁺/CD38⁻-LSCs nach Färbung mit dem Farbstoff Hoechst-33342. Diese präsentieren sich durch den Efflux des Hoechst-Farbstoffes aus den leukämischen Vorläuferzellen als bogenförmiger Schweif angrenzend an die Hauptpopulationen.

Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen, dass DSF/Doxo-Kombinationen synergistische Effekte an KG-1a-Zellen erzielen. Anders als in vergleichbaren Arbeiten können wir den Benefit einer Kombinationsanwendung erst in höheren DSF-Konzentrationen (5/2 μ M und 5 μ M) und häufig erst nach zweimaliger Medikamentengabe nachweisen. Wir erklären dies durch den alleinigen ROS-abhängigen schädigenden Effekt, welcher erst in hohen DSF-Konzentrationen eintritt. Hier weisen wir einen zusätzlichen Nutzen bzgl. des proliferations- und zytotoxischen Verhaltens im Vergleich zur Doxo-Monoanwendung mit 1/2 μ M-Doxo nach. Bezogen auf die Zellzyklusverteilung findet eine DSF-dosisabhängige Reduktion der G₀/G₁- und S-Zellzahl sowohl im KZV als auch LZV statt. Ebenfalls kann die Beobachtung eines verzögerten Zellübertritts aus der G₀/G₁- und S-

Phase in die G₂/M-Phase beobachtet werden. Dieser wird zuvor im Sinne einer DSF-abhängigen Hemmung von DNA-syntheseregulierenden Enzymen beschrieben. In hohen DSF-Konzentrationen (ab 5/2μM DSF) liegen im LZV die Zellzahlen aller Populationen unterhalb der alleinigen Doxo-Anwendung.

Weiterhin zeigen wir, dass bei zweizeitiger Gabe die Kombinationsanwendung den Anteil unreifer diploider SP (strikt gegatete naive Vorläuferzellen mit Stammzelleigenschaften) zusätzlich zur alleinigen Doxo-Anwendung senkt. In den höchsten DSF-Konzentrationen fallen die Werte nach 120h Inkubation unter die Werte der Leerkontrolle, sodass keine Anreicherung, sondern eine tatsächliche Reduktion der unreifen diploiden SP vorliegt. Für die unreife tetraploide SP findet hingegen keine Reduktion, sondern in allen DSF/Doxo-Kombinationsproben eine gesteigerte Anreicherung statt.

In vielen Studien konnte kürzlich eine Cu-abhängige Erhöhung der DSF-Zytotoxizität nachgewiesen werden. Diese Veröffentlichungen in Zusammenschau mit unseren Ergebnissen ermutigen dazu, den Effekt von DSF/Cu in Kombination mit Doxo an KG-1a-Zellen sowohl an in-vitro- als auch in-vivo-Modellen zu erweitern. Sie sind vielversprechend bzgl. einer deutlichen DSF- und Doxo-Dosiseinsparung bei paralleler Erhöhung der Zytotoxizität und Reduktion der SP-Fraktion. DSF/Cu in Kombination mit Doxo hat das Potenzial durch erhöhte Reduktion der SP-Fraktion von AML-Zelllinien die Rate an Frührezidiven bei paralleler Doxo-Dosiseinsparung zu senken. Dies würde eine bessere Prognose der kindlichen AML bedeuten und die Langzeitnebenwirkung sowie die Lebensqualität AML-Überlebender wesentlich verbessern.

6 Literaturverzeichnis

- ABRAHAMSSON, J., FORESTIER, E., HELDRUP, J., JAHNUKAINEN, K., JONSSON, O. G., LAUSEN, B., PALLE, J., ZELLER, B. & HASLE, H. 2011. Response-Guided Induction Therapy in Pediatric Acute Myeloid Leukemia With Excellent Remission Rate. *Journal of Clinical Oncology*, 29, 310-315.
- ADAMS, J. M. & STRASSER, A. 2008. Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? *Cancer Res*, 68, 4018-21.
- ALLENSWORTH, J. L., EVANS, M. K., BERTUCCI, F., ALDRICH, A. J., FESTA, R. A., FINETTI, P., UENO, N. T., SAFI, R., MCDONNELL, D. P., THIELE, D. J., VAN LAERE, S. & DEVI, G. R. 2015. Disulfiram (DSF) acts as a copper ionophore to induce copper-dependent oxidative stress and mediate anti-tumor efficacy in inflammatory breast cancer. *Mol Oncol*, 9, 1155-68.
- ANDERSON, D. J., LE MOIGNE, R., DJAKOVIC, S., KUMAR, B., RICE, J., WONG, S., WANG, J., YAO, B., VALLE, E., KISS VON SOLY, S., MADRIAGA, A., SORIANO, F., MENON, M. K., WU, Z. Y., KAMPMANN, M., CHEN, Y., WEISSMAN, J. S., AFTAB, B. T., YAKES, F. M., SHAWVER, L., ZHOU, H. J., WUSTROW, D. & ROLFE, M. 2015. Targeting the AAA ATPase p97 as an Approach to Treat Cancer through Disruption of Protein Homeostasis. *Cancer Cell*, 28, 653-665.
- ANTONIADES, V., SIOGA, A., DIETRICH, E. M., MEDITSKOU, S., EKONOMOU, L. & ANTONIADES, K. 2013. Is copper chelation an effective anti-angiogenic strategy for cancer treatment? *Med Hypotheses*, 81, 1159-63.
- ARBER, D. A., ORAZI, A., HASSERJIAN, R., THIELE, J., BOROWITZ, M. J., LE BEAU, M. M., BLOOMFIELD, C. D., CAZZOLA, M. & VARDIMAN, J. W. 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127, 2391-405.
- ASSELIN, B. L., DEVIDAS, M., CHEN, L., FRANCO, V. I., PULLEN, J., BOROWITZ, M. J., HUTCHISON, R. E., RAVINDRANATH, Y., ARMENIAN, S. H., CAMITTA, B. M. & LIPSHULTZ, S. E. 2016. Cardioprotection and Safety of Dexrazoxane in Patients Treated for Newly Diagnosed T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia or Advanced-Stage Lymphoblastic Non-Hodgkin Lymphoma: A Report of the Children's Oncology Group Randomized Trial Pediatric Oncology Group 9404. *J Clin Oncol*, 34, 854-62.
- BACHAS, C., SCHUURHUIS, G. J., ASSARAF, Y. G., KWIDAMA, Z. J., KELDER, A., WOUTERS, F., SNEL, A. N., KASPERS, G. J. & CLOOS, J. 2012. The role of minor subpopulations within the leukemic blast compartment of AML patients at initial diagnosis in the development of relapse. *Leukemia*, 26, 1313-20.
- BISTA, R., LEE, D. W., PEPPER, O. B., AZORSA, D. O., ARCECI, R. J. & ALEEM, E. 2017. Disulfiram overcomes bortezomib and cytarabine resistance in Down-syndrome-associated acute myeloid leukemia cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 36, 22.
- BLEAU, A. M., HAMBARDZUMYAN, D., OZAWA, T., FOMCHENKO, E. I., HUSE, J. T., BRENNAN, C. W. & HOLLAND, E. C. 2009. PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell*, 4, 226-35.

- BOESCH, M., REIMER, D., RUMPOLD, H., ZEIMET, A. G., SOPPER, S. & WOLF, D. 2012. DyeCycle Violet used for side population detection is a substrate of P-glycoprotein. *Cytometry A*, 81, 517-22.
- BOSCH, X., ROVIRA, M., SITGES, M., DOMENECH, A., ORTIZ-PEREZ, J. T., DE CARALT, T. M., MORALES-RUIZ, M., PEREA, R. J., MONZO, M. & ESTEVE, J. 2013. Enalapril and carvedilol for preventing chemotherapy-induced left ventricular systolic dysfunction in patients with malignant hemopathies: the OVERCOME trial (preventiOn of left Ventricular dysfunction with Enalapril and caRvedilol in patients submitted to intensive ChemOtherapy for the treatment of Malignant hEmopathies). *J Am Coll Cardiol*, 61, 2355-62.
- BRAR, S. S., GRIGG, C., WILSON, K. S., HOLDER, W. D., JR., DREAU, D., AUSTIN, C., FOSTER, M., GHIO, A. J., WHORTON, A. R., STOWELL, G. W., WHITTALL, L. B., WHITTLE, R. R., WHITE, D. P. & KENNEDY, T. P. 2004. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. *Mol Cancer Ther*, 3, 1049-60.
- BUICK, R. N., MESSNER, H. A., TILL, J. E. & MCCULLOCH, E. A. 1979. Cytotoxicity of adriamycin and daunorubicin for normal and leukemia progenitor cells of man. *J Natl Cancer Inst*, 62, 249-55.
- BUSS, E. C. & HO, A. D. 2011. Leukemia stem cells. *Int J Cancer*, 129, 2328-36.
- CALCAGNO, A. M., SALCIDO, C. D., GILLET, J. P., WU, C. P., FOSTEL, J. M., MUMAU, M. D., GOTTESMAN, M. M., VARTICOVSKI, L. & AMBUDKAR, S. V. 2010. Prolonged drug selection of breast cancer cells and enrichment of cancer stem cell characteristics. *J Natl Cancer Inst*, 102, 1637-52.
- CARDINALE, D., COLOMBO, A., BACCHIANI, G., TEDESCHI, I., MERONI, C. A., VEGLIA, F., CIVELLI, M., LAMANTIA, G., COLOMBO, N., CURIGLIANO, G., FIORENTINI, C. & CIPOLLA, C. M. 2015. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. *Circulation*, 131, 1981-8.
- CARDINALE, D., COLOMBO, A., SANDRI, M. T., LAMANTIA, G., COLOMBO, N., CIVELLI, M., MARTINELLI, G., VEGLIA, F., FIORENTINI, C. & CIPOLLA, C. M. 2006. Prevention of high-dose chemotherapy-induced cardiotoxicity in high-risk patients by angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation*, 114, 2474-81.
- CARPENTER, A. J. & PORTER, A. C. 2004. Construction, characterization, and complementation of a conditional-lethal DNA topoisomerase IIalpha mutant human cell line. *Mol Biol Cell*, 15, 5700-11.
- CARRION, C., DE MADARIAGA, M. A. & DOMINGO, J. C. 2004. In vitro cytotoxic study of immunoliposomal doxorubicin targeted to human CD34(+) leukemic cells. *Life Sci*, 75, 313-28.
- CEN, D., BRAYTON, D., SHAHANDEH, B., MEYSKENS, F. L., JR. & FARMER, P. J. 2004. Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. *J Med Chem*, 47, 6914-20.
- CHAMPOUX, J. J. 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*, 70, 369-413.
- CHEN, D., CUI, Q. C., YANG, H. & DOU, Q. P. 2006. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast

- cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Res*, 66, 10425-33.
- CHEN, Z., SHI, T., ZHANG, L., ZHU, P., DENG, M., HUANG, C., HU, T., JIANG, L. & LI, J. 2016. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett*, 370, 153-64.
- CHIBA, T., SUZUKI, E., YUKI, K., ZEN, Y., OSHIMA, M., MIYAGI, S., SARAYA, A., KOIDE, S., MOTOYAMA, T., OGASAWARA, S., OOKA, Y., TAWADA, A., NAKATSURA, T., HAYASHI, T., YAMASHITA, T., KANEKO, S., MIYAZAKI, M., IWAMA, A. & YOKOSUKA, O. 2014. Disulfiram eradicates tumor-initiating hepatocellular carcinoma cells in ROS-p38 MAPK pathway-dependent and -independent manners. *PLoS One*, 9, e84807.
- CHUNG, R., MAULIK, A., HAMARNEH, A., HOCHHAUSER, D., HAUSENLOY, D. J., WALKER, J. M. & YELLON, D. M. 2016. Effect of Remote Ischaemic Conditioning in Oncology Patients Undergoing Chemotherapy: Rationale and Design of the ERIC-ONC Study--A Single-Center, Blinded, Randomized Controlled Trial. *Clin Cardiol*, 39, 72-82.
- COLADO, E., ALVAREZ-FERNANDEZ, S., MAISO, P., MARTIN-SANCHEZ, J., VIDRIALES, M. B., GARAYOA, M., OCIO, E. M., MONTERO, J. C., PANDIELLA, A. & SAN MIGUEL, J. F. 2008. The effect of the proteasome inhibitor bortezomib on acute myeloid leukemia cells and drug resistance associated with the CD34+ immature phenotype. *Haematologica*, 93, 57-66.
- CONTICELLO, C., GIUFFRIDA, R., PARRINELLO, N., BUCCHERI, S., ADAMO, L., SCIUTO, M. R., COLAROSSO, C., AIELLO, E., CHIARENZA, A., ROMANO, A., SALOMONE, E., GULISANO, M., GIUSTOLISI, R. & DI RAIMONDO, F. 2013. CD200 expression in patients with Multiple Myeloma: another piece of the puzzle. *Leuk Res*, 37, 1616-21.
- CONTICELLO, C., MARTINETTI, D., ADAMO, L., BUCCHERI, S., GIUFFRIDA, R., PARRINELLO, N., LOMBARDO, L., ANASTASI, G., AMATO, G., CAVALLI, M., CHIARENZA, A., DE MARIA, R., GIUSTOLISI, R., GULISANO, M. & DI RAIMONDO, F. 2012. Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human hematological malignancies. *Int J Cancer*, 131, 2197-203.
- COOPER, T. M., FRANKLIN, J., GERBING, R. B., ALONZO, T. A., HURWITZ, C., RAIMONDI, S. C., HIRSCH, B., SMITH, F. O., MATHEW, P., ARCECI, R. J., FEUSNER, J., IANNONE, R., LAVEY, R. S., MESHINCHI, S. & GAMIS, A. 2012. AAML03P1, a pilot study of the safety of gemtuzumab ozogamicin in combination with chemotherapy for newly diagnosed childhood acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer*, 118, 761-9.
- CORDON-CARDO, C., O'BRIEN, J. P., CASALS, D., RITTMAN-GRAUER, L., BIEDLER, J. L., MELAMED, M. R. & BERTINO, J. R. 1989. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 695-8.
- CORTES-FUNES, H. & CORONADO, C. 2007. Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. *Cardiovasc Toxicol*, 7, 56-60.
- CREUTZIG, U., VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M., GIBSON, B., DWORZAK, M. N., ADACHI, S., DE BONT, E., HARBOTT, J., HASLE, H., JOHNSTON, D., KINOSHITA, A., LEHRNBECHER, T., LEVERGER, G., MEJSTRIKOVA,

- E., MESHINCHI, S., PESSION, A., RAIMONDI, S. C., SUNG, L., STARY, J., ZWAAN, C. M., KASPERS, G. J. L. & REINHARDT, D. 2012. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood*, 120, 3187-3205.
- CREUTZIG, U., ZIMMERMANN, M., BOURQUIN, J. P., DWORZAK, M. N., FLEISCHHACK, G., GRAF, N., KLINGEBIEL, T., KREMENS, B., LEHRNBECHER, T., VON NEUHOFF, C., RITTER, J., SANDER, A., SCHRAUDER, A., VON STACKELBERG, A., STARY, J. & REINHARDT, D. 2013. Randomized trial comparing liposomal daunorubicin with idarubicin as induction for pediatric acute myeloid leukemia: results from Study AML-BFM 2004. *Blood*, 122, 37-43.
- CVEK, B. 2012. Nonprofit drugs as the salvation of the world's healthcare systems: the case of Antabuse (disulfiram). *Drug Discov Today*, 17, 409-12.
- DE ROOIJ, J. D., ZWAAN, C. M. & VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. 2015. Pediatric AML: From Biology to Clinical Management. *J Clin Med*, 4, 127-49.
- DESHAIES, R. J. 2014. Proteotoxic crisis, the ubiquitin-proteasome system, and cancer therapy. *BMC Biol*, 12, 94.
- DILEONARDO, A., LINKE, S. P., CLARKIN, K. & WAHL, G. M. 1994. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes & Development*, 8, 2540-2551.
- DING, L., LEY, T. J., LARSON, D. E., MILLER, C. A., KOBOLDT, D. C., WELCH, J. S., RITCHEY, J. K., YOUNG, M. A., LAMPRECHT, T., MCLELLAN, M. D., MCMICHAEL, J. F., WALLIS, J. W., LU, C., SHEN, D., HARRIS, C. C., DOOLING, D. J., FULTON, R. S., FULTON, L. L., CHEN, K., SCHMIDT, H., KALICKI-VEIZER, J., MAGRINI, V. J., COOK, L., MCGRATH, S. D., VICKERY, T. L., WENDL, M. C., HEATH, S., WATSON, M. A., LINK, D. C., TOMASSON, M. H., SHANNON, W. D., PAYTON, J. E., KULKARNI, S., WESTERVELT, P., WALTER, M. J., GRAUBERT, T. A., MARDIS, E. R., WILSON, R. K. & DIPERSIO, J. F. 2012. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 481, 506-10.
- DORES, G. M., DEVESA, S. S., CURTIS, R. E., LINET, M. S. & MORTON, L. M. 2012. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. *Blood*, 119, 34-43.
- DRAGOJEVIC-SIMIC, V. M., DOBRIC, S. L., BOKONJIC, D. R., VUCINIC, Z. M., SINOVEC, S. M., JACEVIC, V. M. & DOGOVIC, N. P. 2004. Amifostine protection against doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Anticancer Drugs*, 15, 169-78.
- DRESDALE, A. R., BARR, L. H., BONOW, R. O., MATHISEN, D. J., MYERS, C. E., SCHWARTZ, D. E., D'ANGELO, T. & ROSENBERG, S. A. 1982. Prospective randomized study of the role of N-acetyl cysteine in reversing doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Am J Clin Oncol*, 5, 657-63.
- DUAN, L., SHEN, H., ZHAO, G., YANG, R., CAI, X., ZHANG, L., JIN, C. & HUANG, Y. 2014. Inhibitory effect of Disulfiram/copper complex on non-small cell lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 446, 1010-6.
- EL-SHITANY, N. A., TOLBA, O. A., EL-SHANSHORY, M. R. & EL-HAWARY, E. E. 2012. Protective effect of carvedilol on adriamycin-induced left ventricular dysfunction in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Card Fail*, 18, 607-13.

- ELGIE, A. W., SARGENT, J. M., WILLIAMSON, C. J., LEWANDOWICZ, G. M. & TAYLOR, C. G. 1999. Comparison of P-glycoprotein expression and function with in vitro sensitivity to anthracyclines in AML. *Adv Exp Med Biol*, 457, 29-33.
- FARDEL, O., PAYEN, L., COURTOIS, A., DRENOU, B., FAUCHET, R. & RAULT, B. 1998. Differential expression and activity of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein in CD34-positive KG1a leukemic cells. *Int J Oncol*, 12, 315-9.
- FEURING-BUSKE, M. & HOGGE, D. E. 2001. Hoechst 33342 efflux identifies a subpopulation of cytogenetically normal CD34(+)CD38(-) progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 97, 3882-9.
- FINCK, B. N. & KELLY, D. P. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation*, 115, 2540-8.
- GAMIS, A. S., ALONZO, T. A., MESHINCHI, S., SUNG, L., GERBING, R. B., RAIMONDI, S. C., HIRSCH, B. A., KAHWASH, S. B., HEEREMAMCKENNEY, A., WINTER, L., GLICK, K., DAVIES, S. M., BYRON, P., SMITH, F. O. & APLENC, R. 2014. Gemtuzumab ozogamicin in children and adolescents with de novo acute myeloid leukemia improves event-free survival by reducing relapse risk: results from the randomized phase III Children's Oncology Group trial AAML0531. *J Clin Oncol*, 32, 3021-32.
- GAMIS, A. S., ALONZO, T. A., PERENTESIS, J. P. & MESHINCHI, S. 2013. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: acute myeloid leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 60, 964-71.
- GERBER, J. M., SMITH, B. D., NGWANG, B., ZHANG, H., VALA, M. S., MORSBERGER, L., GALKIN, S., COLLECTOR, M. I., PERKINS, B., LEVIS, M. J., GRIFFIN, C. A., SHARKIS, S. J., BOROWITZ, M. J., KARP, J. E. & JONES, R. J. 2012. A clinically relevant population of leukemic CD34(+)CD38(-) cells in acute myeloid leukemia. *Blood*, 119, 3571-7.
- GETTA, B. M., DEVLIN, S., MALOY, M. A., MOHANTY, A., ARCILA, M., TALLMAN, M. S., LEVINE, R. L., GIRALT, S. A. & ROSHAL, M. 2016. Multicolor Flow Cytometry and Multi-Gene Next Generation Sequencing Are Complimentary and Highly Predictive for Relapse in Acute Myeloid Leukemia Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant. *Blood*, 128, 834-834.
- GIBSON, B. E., WEBB, D. K., HOWMAN, A. J., DE GRAAF, S. S., HARRISON, C. J. & WHEATLEY, K. 2011. Results of a randomized trial in children with Acute Myeloid Leukaemia: medical research council AML12 trial. *Br J Haematol*, 155, 366-76.
- GOODELL, M. A., BROSE, K., PARADIS, G., CONNER, A. S. & MULLIGAN, R. C. 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*, 183, 1797-806.
- GUO, X., XU, B., PANDEY, S., GOESSL, E., BROWN, J., ARMESILLA, A. L., DARLING, J. L. & WANG, W. 2010. Disulfiram/copper complex inhibiting NFkappaB activity and potentiating cytotoxic effect of gemcitabine on colon and breast cancer cell lines. *Cancer Lett*, 290, 104-13.
- GUPTA, P. B., CHAFFER, C. L. & WEINBERG, R. A. 2009. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med*, 15, 1010-2.
- GUPTE, A. & MUMPER, R. J. 2009. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat Rev*, 35, 32-46.

- HAHN, V. S., LENIHAN, D. J. & KY, B. 2014. Cancer therapy-induced cardiotoxicity: basic mechanisms and potential cardioprotective therapies. *J Am Heart Assoc*, 3, e000665.
- HANEKAMP, D., CLOOS, J. & SCHUURHUIS, G. J. 2017. Leukemic stem cells: identification and clinical application. *Int J Hematol*, 105, 549-557.
- HASINOFF, B. B., PATEL, D. & WU, X. 2003. The oral iron chelator ICL670A (deferasirox) does not protect myocytes against doxorubicin. *Free Radic Biol Med*, 35, 1469-79.
- HO, A. D. & WAGNER, W. 2006. Bone marrow niche and leukemia. *Ernst Schering Found Symp Proc*, 125-39.
- HO, M. M., NG, A. V., LAM, S. & HUNG, J. Y. 2007. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res*, 67, 4827-33.
- HONOKI, K. 2010. Do stem-like cells play a role in drug resistance of sarcomas? *Expert Rev Anticancer Ther*, 10, 261-70.
- HOPPE, T. 2009. Untersuchungen zur Entwicklungsphysiologie und molekularen Phylogenetik ausgewählter Vertreter der Myxomyceten und zur Photosynthese fähiger Eugleniden (Organismenreich Protoctista).
- HUO, Q., ZHU, J., NIU, Y., SHI, H., GONG, Y., LI, Y., SONG, H. & LIU, Y. 2017. pH-triggered surface charge-switchable polymer micelles for the co-delivery of paclitaxel/disulfiram and overcoming multidrug resistance in cancer. *Int J Nanomedicine*, 12, 8631-8647.
- IARUSSI, D., AURICCHIO, U., AGRETTO, A., MURANO, A., GIULIANO, M., CASALE, F., INDOLFI, P. & IACONO, A. 1994. Protective effect of coenzyme Q10 on anthracyclines cardiotoxicity: control study in children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma. *Mol Aspects Med*, 15 Suppl, s207-12.
- ILJIN, K., KETOLA, K., VAINIO, P., HALONEN, P., KOHONEN, P., FEY, V., GRAFSTROM, R. C., PERALA, M. & KALLIONIEMI, O. 2009. High-throughput cell-based screening of 4910 known drugs and drug-like small molecules identifies disulfiram as an inhibitor of prostate cancer cell growth. *Clin Cancer Res*, 15, 6070-8.
- JANUCHOWSKI, R., WOJTOWICZ, K., ANDRZEJEWSKA, M. & ZABEL, M. 2014. Expression of MDR1 and MDR3 gene products in paclitaxel-, doxorubicin- and vincristine-resistant cell lines. *Biomed Pharmacother*, 68, 111-7.
- JIN, N., ZHU, X., CHENG, F. & ZHANG, L. 2018. Disulfiram/copper targets stem cell-like ALDH(+) population of multiple myeloma by inhibition of ALDH1A1 and Hedgehog pathway. *J Cell Biochem*, 119, 6882-6893.
- JOHNSON, N., CAI, D., KENNEDY, R. D., PATHANIA, S., ARORA, M., LI, Y. C., D'ANDREA, A. D., PARVIN, J. D. & SHAPIRO, G. I. 2009. Cdk1 participates in BRCA1-dependent S phase checkpoint control in response to DNA damage. *Mol Cell*, 35, 327-39.
- KASPERS, G. J. L., ZIMMERMANN, M., REINHARDT, D., GIBSON, B., TAMMINGA, R., ALEINIKOVA, O., ARMENDARIZ, H., DWORZAK, M., HA, S., HOVI, L., MASCHAN, A., BARUCHEL, A., BERTRAND, Y., RAZZOUK, B., RIZZARI, C., SMISEK, P., SMITH, O., STARK, B. & CREUTZIG, U. 2009. Addition of Liposomal Daunorubicin (DaunoXome®) to FLAG Significantly Improves Treatment Response in Pediatric Relapsed AML:

- Final Results From the International Randomised Phase III Study Relapsed AML 2001/01. *Blood*, 114, 18-18.
- KAYA, M. G., OZKAN, M., GUNEBAKMAZ, O., AKKAYA, H., KAYA, E. G., AKPEK, M., KALAY, N., DIKILITAS, M., YARLIOGLUES, M., KARACA, H., BERK, V., ARDIC, I., ERGIN, A. & LAM, Y. Y. 2013. Protective effects of nebivolol against anthracycline-induced cardiomyopathy: a randomized control study. *Int J Cardiol*, 167, 2306-10.
- KHAN, N., FREEMAN, S. D., VIRGO, P., COUZENS, S., RICHARDSON, P., THOMAS, I., GRECH, A., VYAS, P., GRIMWADE, D., RUSSELL, N. H., BURNETT, A. K. & HILLS, R. K. 2015. An immunophenotypic pre-treatment predictor for poor response to induction chemotherapy in older acute myeloid leukaemia patients: blood frequency of CD34+ CD38 low blasts. *Br J Haematol*, 170, 80-4.
- KIM, H. S., LEE, Y. S. & KIM, D. K. 2009. Doxorubicin Exerts Cytotoxic Effects through Cell Cycle Arrest and Fas-Mediated Cell Death. *Pharmacology*, 84, 300-309.
- KOEFLER, H. P., BILLING, R., LUSIS, A. J., SPARKES, R. & GOLDE, D. W. 1980. An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1). *Blood*, 56, 265-73.
- KRAFT, J., GRILLE, W., APPELT, M., HOSSFELD, D. K., EICHELBAUM, M., KOSLOWSKI, B., QUABECK, K., KUSE, R., BUCHNER, T., HIDDEMANN, W. & ET AL. 1990. Effects of verapamil on anthracycline-induced cardiomyopathy: preliminary results of a prospective multicenter trial. *Haematol Blood Transfus*, 33, 566-70.
- KRONKE, J., BULLINGER, L., TELEANU, V., TSCHURTZ, F., GAIDZIK, V. I., KUHN, M. W., RUCKER, F. G., HOLZMANN, K., PASCHKA, P., KAPPSCHWORER, S., SPATH, D., KINDLER, T., SCHITTENHELM, M., KRAUTER, J., GANSER, A., GOHRING, G., SCHLEGELBERGER, B., SCHLENK, R. F., DOHNER, H. & DOHNER, K. 2013. Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Blood*, 122, 100-8.
- LAGADINO, E. D., ZIROS, P. G., TSOPRA, O. A., DIMAS, K., KOKKINO, D., THANOPOULOU, E., KARAKANTZA, M., PANTAZIS, P., SPYRIDONIDIS, A. & ZOUMBOS, N. C. 2008. c-Jun N-terminal kinase activation failure is a new mechanism of anthracycline resistance in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 22, 1899-908.
- LAPIDOT, T., GRUNBERGER, T., VORMOOR, J., ESTROV, Z., KOLLET, O., BUNIN, N., ZAIZOV, R., WILLIAMS, D. E. & FREEDMAN, M. H. 1996. Identification of human juvenile chronic myelogenous leukemia stem cells capable of initiating the disease in primary and secondary SCID mice. *Blood*, 88, 2655-64.
- LI, M., KONG, L. L., GOU, Y., YANG, F. & LIANG, H. 2014. DNA binding, cytotoxicity and apoptosis induction activity of a mixed-ligand copper(II) complex with taurine Schiff base and imidazole. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 128, 686-93.
- LIESVELD, J. 2012. Targeting myelogenous leukemia stem cells: role of the circulation. *Front Oncol*, 2, 86.
- LIPSHULTZ, S. E., ALVAREZ, J. A. & SCULLY, R. E. 2008. Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Heart*, 94, 525-33.

- LIPSHULTZ, S. E., LIPSITZ, S. R., MONE, S. M., GOORIN, A. M., SALLAN, S. E., SANDERS, S. P., ORAV, E. J., GELBER, R. D. & COLAN, S. D. 1995. Female sex and higher drug dose as risk factors for late cardiotoxic effects of doxorubicin therapy for childhood cancer. *N Engl J Med*, 332, 1738-43.
- LIU, B., LI, L. J., GONG, X., ZHANG, W., ZHANG, H. & ZHAO, L. 2018. Co-expression of ATP binding cassette transporters is associated with poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Oncol Lett*, 15, 6671-6677.
- LIU, P., BROWN, S., GOKTUG, T., CHANNATHODIYIL, P., KANNAPPAN, V., HUGNOT, J. P., GUICHET, P. O., BIAN, X., ARMESILLA, A. L., DARLING, J. L. & WANG, W. 2012. Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells. *Br J Cancer*, 107, 1488-97.
- LIU, X., WANG, L., CUI, W., YUAN, X., LIN, L., CAO, Q., WANG, N., LI, Y., GUO, W., ZHANG, X., WU, C. & YANG, J. 2016. Targeting ALDH1A1 by disulfiram/copper complex inhibits non-small cell lung cancer recurrence driven by ALDH-positive cancer stem cells. *Oncotarget*, 7, 58516-58530.
- LIU, Y., CHEN, F., WANG, S., GUO, X., SHI, P., WANG, W. & XU, B. 2013. Low-dose triptolide in combination with idarubicin induces apoptosis in AML leukemic stem-like KG1a cell line by modulation of the intrinsic and extrinsic factors. *Cell Death Dis*, 4, e948.
- LOVBORG, H., OBERG, F., RICKARDSON, L., GULLBO, J., NYGREN, P. & LARSSON, R. 2006. Inhibition of proteasome activity, nuclear factor-KappaB translocation and cell survival by the antialcoholism drug disulfiram. *Int J Cancer*, 118, 1577-80.
- LOWE, S. W. & LIN, A. W. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21, 485-95.
- LU, J., SUN, Q., LI, J. L., JIANG, L., GU, W., LIU, X., TIAN, J. L. & YAN, S. P. 2014. Two water-soluble copper(II) complexes: synthesis, characterization, DNA cleavage, protein binding activities and in vitro anticancer activity studies. *J Inorg Biochem*, 137, 46-56.
- LU, S. & WANG, J. 2013. The resistance mechanisms of proteasome inhibitor bortezomib. *Biomark Res*, 1, 13.
- LUPERTZ, R., WATJEN, W., KAHL, R. & CHOVOLOU, Y. 2010. Dose- and time-dependent effects of doxorubicin on cytotoxicity, cell cycle and apoptotic cell death in human colon cancer cells. *Toxicology*, 271, 115-21.
- MACK, S. R. 2015. *Selektive Reduktion immaturer leukämischer Vorläuferzellen -am Modell der AML Zell-Linie KG-1a-*. Eberhard Karls Universität Tübingen.
- MADSEN, L., SEEGER, M., SEMPLE, C. A. & HARTMANN-PETERSEN, R. 2009. New ATPase regulators--p97 goes to the PUB. *Int J Biochem Cell Biol*, 41, 2380-8.
- MALIYAKKAL, N., APPADATH BEERAN, A., BALAJI, S. A., UDUPA, N., RANGANATH PAI, S. & RANGARAJAN, A. 2015. Effects of *Withania somnifera* and *Tinospora cordifolia* extracts on the side population phenotype of human epithelial cancer cells: toward targeting multidrug resistance in cancer. *Integr Cancer Ther*, 14, 156-71.
- MARZAC, C., GARRIDO, E., TANG, R., FAVA, F., HIRSCH, P., DE BENEDICTIS, C., CORRE, E., LAPUSAN, S., LALLEMAND, J. Y., MARIE, J. P., JACQUET, E. & LEGRAND, O. 2011. ATP Binding Cassette transporters associated with chemoresistance: transcriptional profiling in extreme cohorts and their prognostic

- impact in a cohort of 281 acute myeloid leukemia patients. *Haematologica*, 96, 1293-301.
- MATTES, M. 2015. *Manipulation der Zellpopulation mit differenziellen Stammzellkriterien in definierten Zelllinien akuter Leukämien*. Eberhard Karls Universität Tübingen.
- MCGOWAN, J. V., CHUNG, R., MAULIK, A., PIOTROWSKA, I., WALKER, J. M. & YELLON, D. M. 2017. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovasc Drugs Ther*, 31, 63-75.
- MERTENS, A. C., LIU, Q., NEGLIA, J. P., WASILEWSKI, K., LEISENRING, W., ARMSTRONG, G. T., ROBISON, L. L. & YASUI, Y. 2008. Cause-specific late mortality among 5-year survivors of childhood cancer: the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst*, 100, 1368-79.
- MILEI, J., MARANTZ, A., ALE, J., VAZQUEZ, A. & BUCETA, J. E. 1987. Prevention of adriamycin-induced cardiotoxicity by prenylamine: a pilot double blind study. *Cancer Drug Deliv*, 4, 129-36.
- MÜLLER, M. R., LENNARTZ, K., BOOGEN, C., NOWROUSIAN, M. R., RAJEWISKY, M. F. & SEEBER, S. 1992. Cytotoxicity of adriamycin, idarubicin, and vincristine in acute myeloid leukemia: Chemosensitization by verapamil in relation to P-glycoprotein expression. *Annals of Hematology*, 65, 206-212.
- MULROONEY, D. A., YEAZEL, M. W., KAWASHIMA, T., MERTENS, A. C., MITBY, P., STOVALL, M., DONALDSON, S. S., GREEN, D. M., SKLAR, C. A., ROBISON, L. L. & LEISENRING, W. M. 2009. Cardiac outcomes in a cohort of adult survivors of childhood and adolescent cancer: retrospective analysis of the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *Bmj*, 339, b4606.
- NAGENDRA, S. N., SHETTY, K. T., SUBHASH, M. N. & GURU, S. C. 1991. Role of glutathione reductase system in disulfiram conversion to diethyldithiocarbamate. *Life Sci*, 49, 23-8.
- NAZEYROLLAS, P., FRANCES, C., PREVOST, A., COSTA, B., LORENZATO, M., KANTELIP, J. P., ELAERTS, J. & MILLART, H. 2003. Efficiency of amifostine as a protection against doxorubicin toxicity in rats during a 12-day treatment. *Anticancer Res*, 23, 405-9.
- NG, S. W., MITCHELL, A., KENNEDY, J. A., CHEN, W. C., MCLEOD, J., IBRAHIMOVA, N., ARRUDA, A., POPESCU, A., GUPTA, V., SCHIMMER, A. D., SCHUH, A. C., YEE, K. W., BULLINGER, L., HEROLD, T., GORLICH, D., BUCHNER, T., HIDDEMANN, W., BERDEL, W. E., WORMANN, B., CHEOK, M., PREUDHOMME, C., DOMBRET, H., METZELER, K., BUSKE, C., LOWENBERG, B., VALK, P. J., ZANDSTRA, P. W., MINDEN, M. D., DICK, J. E. & WANG, J. C. 2016. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature*, 540, 433-437.
- NIEMEYER, C. & EGGERT, A. 2018. *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*, Springer Berlin Heidelberg.
- OSSENKOPPELE, G. & SCHUURHUIS, G. J. 2016. MRD in AML: does it already guide therapy decision-making? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2016, 356-365.
- PALLARDO, F. V., MARKOVIC, J., GARCIA, J. L. & VINA, J. 2009. Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. *Mol Aspects Med*, 30, 77-85.

- PANTZIARKA, P., BOUCHE, G., MEHEUS, L., SUKHATME, V., SUKHATME, V. P. & VIKAS, P. 2014. The Repurposing Drugs in Oncology (ReDO) Project. *Ecancermedicalscience*, 8, 442.
- PAPAIOANNOU, M., MYLONAS, I., KAST, R. E. & BRUNING, A. 2014. Disulfiram/copper causes redox-related proteotoxicity and concomitant heat shock response in ovarian cancer cells that is augmented by auranofin-mediated thioredoxin inhibition. *Oncoscience*, 1, 21-9.
- PARANJPE, A. & SRIVENUGOPAL, K. S. 2013. Degradation of NF-kappaB, p53 and other regulatory redox-sensitive proteins by thiol-conjugating and -nitrosylating drugs in human tumor cells. *Carcinogenesis*, 34, 990-1000.
- PARANJPE, A., ZHANG, R., ALI-OSMAN, F., BOBUSTUC, G. C. & SRIVENUGOPAL, K. S. 2014. Disulfiram is a direct and potent inhibitor of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in brain tumor cells and mouse brain and markedly increases the alkylating DNA damage. *Carcinogenesis*, 35, 692-702.
- PATNAIK, J. L., BYERS, T., DIGUISEPPI, C., DABELEA, D. & DENBERG, T. D. 2011. Cardiovascular disease competes with breast cancer as the leading cause of death for older females diagnosed with breast cancer: a retrospective cohort study. *Breast Cancer Res*, 13, R64.
- PATRAWALA, L., CALHOUN, T., SCHNEIDER-BROUSSARD, R., ZHOU, J., CLAYPOOL, K. & TANG, D. G. 2005. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res*, 65, 6207-19.
- PEIRIS, D., SPECTOR, A. F., LOMAX-BROWNE, H., AZIMI, T., RAMESH, B., LOIZIDOU, M., WELCH, H. & DWEK, M. V. 2017. Cellular glycosylation affects Herceptin binding and sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin and growth factors. *Sci Rep*, 7, 43006.
- PICKARD, J. M., DAVIDSON, S. M., HAUSENLOY, D. J. & YELLON, D. M. 2016. Co-dependence of the neural and humoral pathways in the mechanism of remote ischemic conditioning. *Basic Res Cardiol*, 111, 50.
- RAE, C., TESSON, M., BABICH, J. W., BOYD, M., SORENSEN, A. & MAIRS, R. J. 2013. The role of copper in disulfiram-induced toxicity and radiosensitization of cancer cells. *J Nucl Med*, 54, 953-60.
- RAJKUMAR, S. V., RICHARDSON, P. G., HIDESHIMA, T. & ANDERSON, K. C. 2005. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J Clin Oncol*, 23, 630-9.
- REYA, T., MORRISON, S. J., CLARKE, M. F. & WEISSMAN, I. L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414, 105-11.
- RICHARD, V., NAIR, M. G., SANTHOSH KUMAR, T. R. & PILLAI, M. R. 2013. Side population cells as prototype of chemoresistant, tumor-initiating cells. *Biomed Res Int*, 2013, 517237.
- ROEDERER, M. 2001. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry*, 45, 194-205.
- ROSHAL, M., CHIEN, S., OTHUS, M., WOOD, B. L., FANG, M., APPELBAUM, F. R., ESTEY, E. H., PAPAYANNOPOULOU, T. & BECKER, P. S. 2013. The proportion of CD34(+)CD38(low or neg) myeloblasts, but not side population frequency, predicts initial response to induction therapy in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 27, 728-31.

- ROSSI, L., CHALLEN, G. A., SIRIN, O., LIN, K. K. & GOODELL, M. A. 2011. Hematopoietic stem cell characterization and isolation. *Methods Mol Biol*, 750, 47-59.
- RUBNITZ, J. E. 2017. Current Management of Childhood Acute Myeloid Leukemia. *Paediatr Drugs*, 19, 1-10.
- SACK, U. 2007. *Zelluläre Diagnostik : Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie ; 163 Tabellen*, Basel; Freiburg [Breisgau; Paris; London; New York; Bangalore; Bangkok; Singapore; Tokyo; Sydney, Karger.
- SANDER, A., ZIMMERMANN, M., DWORZAK, M., FLEISCHHACK, G., VON NEUHOFF, C., REINHARDT, D., KASPERS, G. J. & CREUTZIG, U. 2010. Consequent and intensified relapse therapy improved survival in pediatric AML: results of relapse treatment in 379 patients of three consecutive AML-BFM trials. *Leukemia*, 24, 1422-8.
- SCHMITZ, S. 2011. *Der Experimentator : Zellkultur*, Dordrecht, Springer.
- SENGUPTA, R. & HOLMGREN, A. 2014. Thioredoxin and glutaredoxin-mediated redox regulation of ribonucleotide reductase. *World J Biol Chem*, 5, 68-74.
- SHAFFER, B. C., GILLET, J. P., PATEL, C., BAER, M. R., BATES, S. E. & GOTTESMAN, M. M. 2012. Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML. *Drug Resist Updat*, 15, 62-9.
- SHAH O'BRIEN, P., XI, Y., MILLER, J. R., BROWNELL, A. L., ZENG, Q., YOO, G. H., GARSHOTT, D. M., O'BRIEN, M. B., GALINATO, A. E., CAI, P., NARULA, N., CALLAGHAN, M. U., KAUFMAN, R. J. & FRIBLEY, A. M. 2019. Disulfiram (Antabuse) Activates ROS-Dependent ER Stress and Apoptosis in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Medicine*, 8, 611.
- SHEN, M. L., JOHNSON, K. L., MAYS, D. C., LIPSKY, J. J. & NAYLOR, S. 2001. Determination of in vivo adducts of disulfiram with mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochem Pharmacol*, 61, 537-45.
- SHIMODA, M., OTA, M. & OKADA, Y. 2018. Isolation of Cancer Stem Cells by Side Population Method. *Methods Mol Biol*, 1692, 49-59.
- SHIPLEY, J. L. & BUTERA, J. N. 2009. Acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol*, 37, 649-58.
- SIEVERS, E. L., LANGE, B. J., ALONZO, T. A., GERBING, R. B., BERNSTEIN, I. D., SMITH, F. O., ARCECI, R. J., WOODS, W. G. & LOKEN, M. R. 2003. Immunophenotypic evidence of leukemia after induction therapy predicts relapse: results from a prospective Children's Cancer Group study of 252 patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 101, 3398-406.
- SIEVERS, E. L., LANGE, B. J., BUCKLEY, J. D., SMITH, F. O., WELLS, D. A., DAIGNEAULT-CREECH, C. A., SHULTS, K. E., BERNSTEIN, I. D. & LOKEN, M. R. 1996. Prediction of relapse of pediatric acute myeloid leukemia by use of multidimensional flow cytometry. *J Natl Cancer Inst*, 88, 1483-8.
- SIU, W. Y., YAM, C. H. & POON, R. Y. C. 1999. G1 versus G2 cell cycle arrest after adriamycin-induced damage in mouse Swiss3T3 cells. *FEBS Letters*, 461, 299-305.
- SKROTT, Z., MAJERA, D., GURSKY, J., BUCHTOVA, T., HAJDUCH, M., MISTRİK, M. & BARTEK, J. 2019. Disulfiram's anti-cancer activity reflects targeting NPL4, not inhibition of aldehyde dehydrogenase. *Oncogene*, 38, 6711-6722.

- SKROTT, Z., MISTRIK, M., ANDERSEN, K. K., FRIIS, S., MAJERA, D., GURSKY, J., OZDIAN, T., BARTKOVA, J., TURI, Z., MOUDRY, P., KRAUS, M., MICHALOVA, M., VACLAVKOVA, J., DZUBAK, P., VROBEL, I., POUCKOVA, P., SEDLACEK, J., MIKLOVICOVA, A., KUTT, A., LI, J., MATTOVA, J., DRIESSEN, C., DOU, Q. P., OLSEN, J., HAJDUCH, M., CVEK, B., DESHAIES, R. J. & BARTEK, J. 2017. Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adaptor NPL4. *Nature*, 552, 194-199.
- SLIWINSKA, M. A., MOSIENIAK, G., WOLANIN, K., BABIK, A., PIWOCKA, K., MAGALSKA, A., SZCZEPANOWSKA, J., FRONK, J. & SIKORA, E. 2009. Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells. *Mech Ageing Dev*, 130, 24-32.
- SMITH, L. A., CORNELIUS, V. R., PLUMMER, C. J., LEVITT, G., VERRILL, M., CANNEY, P. & JONES, A. 2010. Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMC Cancer*, 10, 337.
- SONAWANE, V. K., MAHAJAN, U. B., SHINDE, S. D., CHATTERJEE, S., CHAUDHARI, S. S., BHANGALE, H. A., OJHA, S., GOYAL, S. N., KUNDU, C. N. & PATIL, C. R. 2018. A Chemosensitizer Drug: Disulfiram Prevents Doxorubicin-Induced Cardiac Dysfunction and Oxidative Stress in Rats. *Cardiovasc Toxicol*, 18, 459-470.
- SONNEVELD, P., MULDER, J. & VAN BEKKUM, D. W. 1981. Cytotoxicity of doxorubicin for normal hematopoietic and acute myeloid leukemia cells of the rat. *Cancer Chemother Pharmacol*, 5, 167-73.
- SPANGRUDE, G. J., HEIMFELD, S. & WEISSMAN, I. L. 1988. Purification and Characterization of Mouse Hematopoietic Stem-Cells. *Science*, 241, 58-62.
- SPILLIER, Q., VERTOMMEN, D., RAVEZ, S., MARTEAU, R., THEMANS, Q., CORBET, C., FERON, O., WOUTERS, J. & FREDERICK, R. 2019. Anti-alcohol abuse drug disulfiram inhibits human PHGDH via disruption of its active tetrameric form through a specific cysteine oxidation. *Sci Rep*, 9, 4737.
- SPORN, M. B. & LIBY, K. T. 2012. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer*, 12, 564-71.
- SUH, J. J., PETTINATI, H. M., KAMPMAN, K. M. & O'BRIEN, C. P. 2006. The status of disulfiram: a half of a century later. *J Clin Psychopharmacol*, 26, 290-302.
- SWAIN, S. M., WHALEY, F. S. & EWER, M. S. 2003. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer*, 97, 2869-79.
- TACCONI, E. M., LAI, X., FOLIO, C., PORRU, M., ZONDERLAND, G., BADIE, S., MICHL, J., SECHI, I., ROGIER, M., MATÍA GARCÍA, V., BATRA, A. S., RUEDA, O. M., BOUWMAN, P., JONKERS, J., RYAN, A., REINA-SANMARTIN, B., HUI, J., TANG, N., BRUNA, A., BIROCCIO, A. & TARSOUNAS, M. 2017. BRCA1 and BRCA2 tumor suppressors protect against endogenous acetaldehyde toxicity. *EMBO Molecular Medicine*, 9, 1398-1414.
- TAUSSIG, D. C., MIRAKI-MOUD, F., ANJOS-AFONSO, F., PEARCE, D. J., ALLEN, K., RIDLER, C., LILLINGTON, D., OAKERVEE, H., CAVENAGH, J., AGRAWAL, S. G., LISTER, T. A., GRIBBEN, J. G. & BONNET, D. 2008. Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. *Blood*, 112, 568-75.

- TAWARI, P. E., WANG, Z., NAJLAH, M., TSANG, C. W., KANNAPPAN, V., LIU, P., MCCONVILLE, C., HE, B., ARMESILLA, A. L. & WANG, W. 2015. The cytotoxic mechanisms of disulfiram and copper(ii) in cancer cells. *Toxicol Res (Camb)*, 4, 1439-1442.
- TERWIJN, M., ZEIJLEMAKER, W., KELDER, A., RUTTEN, A. P., SNEL, A. N., SCHOLTEN, W. J., PABST, T., VERHOEF, G., LOWENBERG, B., ZWEEGMAN, S., OSSENKOPPELE, G. J. & SCHUURHUIS, G. J. 2014. Leukemic stem cell frequency: a strong biomarker for clinical outcome in acute myeloid leukemia. *PLoS One*, 9, e107587.
- TESSON, M., ANSELMINI, G., BELL, C. & MAIRS, R. 2017. Cell cycle specific radiosensitisation by the disulfiram and copper complex. *Oncotarget*, 8, 65900-65916.
- TEWEY, K. M., ROWE, T. C., YANG, L., HALLIGAN, B. D. & LIU, L. F. 1984. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*, 226, 466-8.
- VAN DER PAL, H. J., VAN DALEN, E. C., VAN DELDEN, E., VAN DIJK, I. W., KOK, W. E., GESKUS, R. B., SIESWERDA, E., OLDENBURGER, F., KONING, C. C., VAN LEEUWEN, F. E., CARON, H. N. & KREMER, L. C. 2012. High risk of symptomatic cardiac events in childhood cancer survivors. *J Clin Oncol*, 30, 1429-37.
- VAN DER VELDEN, V. H., VAN DER SLUIJS-GELING, A., GIBSON, B. E., TE MARVELDE, J. G., HOOGEVEEN, P. G., HOP, W. C., WHEATLEY, K., BIERINGS, M. B., SCHUURHUIS, G. J., DE GRAAF, S. S., VAN WERING, E. R. & VAN DONGEN, J. J. 2010. Clinical significance of flowcytometric minimal residual disease detection in pediatric acute myeloid leukemia patients treated according to the DCOG ANLL97/MRC AML12 protocol. *Leukemia*, 24, 1599-606.
- VAN RHENEN, A., FELLER, N., KELDER, A., WESTRA, A. H., ROMBOUTS, E., ZWEEGMAN, S., VAN DER POL, M. A., WAISFISZ, Q., OSSENKOPPELE, G. J. & SCHUURHUIS, G. J. 2005. High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. *Clin Cancer Res*, 11, 6520-7.
- VASILIOU, V., VASILIOU, K. & NEBERT, D. W. 2009. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human genomics*, 3, 281-290.
- VON HOFF, D. D., LAYARD, M. W., BASA, P., DAVIS, H. L., JR., VON HOFF, A. L., ROZENCWEIG, M. & MUGGIA, F. M. 1979. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med*, 91, 710-7.
- WANG, Y., YIN, C., FENG, L., MA, L., WEI, Y. & SHENG, G. 2013. Sorting, identification and enrichment of side population cells in THP-1 acute monocytic leukemia cells. *Oncol Rep*, 29, 1923-31.
- WATSON, J. V., NAKEFF, A., CHAMBERS, S. H. & SMITH, P. J. 1985. Flow cytometric fluorescence emission spectrum analysis of Hoechst-33342-stained DNA in chicken thymocytes. *Cytometry*, 6, 310-5.
- WITTE, K. E., AHLERS, J., SCHAFER, I., ANDRE, M., KERST, G., SCHEEL-WALTER, H. G., SCHWARZE, C. P., PFEIFFER, M., LANG, P., HANDGRETINGER, R. & EBINGER, M. 2011. High proportion of leukemic stem cells at diagnosis is correlated with unfavorable prognosis in childhood acute myeloid leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*, 28, 91-9.

- WON, E. J., KIM, H. R., PARK, R. Y., CHOI, S. Y., SHIN, J. H., SUH, S. P., RYANG, D. W., SZARDENINGS, M. & SHIN, M. G. 2015. Direct confirmation of quiescence of CD34+CD38- leukemia stem cell populations using single cell culture, their molecular signature and clinicopathological implications. *BMC Cancer*, 15, 217.
- WULF, G. G., WANG, R. Y., KUEHNLE, I., WEIDNER, D., MARINI, F., BRENNER, M. K., ANDREEFF, M. & GOODELL, M. A. 2001. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood*, 98, 1166-73.
- XU, B., SHI, P., FOMBON, I. S., ZHANG, Y., HUANG, F., WANG, W. & ZHOU, S. 2011. Disulfiram/copper complex activated JNK/c-jun pathway and sensitized cytotoxicity of doxorubicin in doxorubicin resistant leukemia HL60 cells. *Blood Cells Mol Dis*, 47, 264-9.
- XU, B., WANG, S., LI, R., CHEN, K., HE, L., DENG, M., KANNAPPAN, V., ZHA, J., DONG, H. & WANG, W. 2017. Disulfiram/copper selectively eradicates AML leukemia stem cells in vitro and in vivo by simultaneous induction of ROS-JNK and inhibition of NF-kappaB and Nrf2. *Cell Death Dis*, 8, e2797.
- YAKISICH, J. S., SIDEN, A., ENEROTH, P. & CRUZ, M. 2001. Disulfiram is a potent in vitro inhibitor of DNA topoisomerases. *Biochem Biophys Res Commun*, 289, 586-90.
- YIP, N. C., FOMBON, I. S., LIU, P., BROWN, S., KANNAPPAN, V., ARMESILLA, A. L., XU, B., CASSIDY, J., DARLING, J. L. & WANG, W. 2011. Disulfiram modulated ROS-MAPK and NFkappaB pathways and targeted breast cancer cells with cancer stem cell-like properties. *Br J Cancer*, 104, 1564-74.
- ZHA, J., CHEN, F., DONG, H., SHI, P., YAO, Y., ZHANG, Y., LI, R., WANG, S., LI, P., WANG, W. & XU, B. 2014. Disulfiram targeting lymphoid malignant cell lines via ROS-JNK activation as well as Nrf2 and NF-kB pathway inhibition. *J Transl Med*, 12, 163.
- ZHANG, L., YANG, S., HE, Y. J., SHAO, H. Y., WANG, L., CHEN, H., GAO, Y. J., QING, F. X., CHEN, X. C., ZHAO, L. Y. & TAN, S. 2010. Fluorouracil selectively enriches stem-like leukemic cells in a leukemic cell line. *Int J Biol Sci*, 6, 419-27.
- ZOCHBAUER, S., GSUR, A., BRUNNER, R., KYRLE, P. A., LECHNER, K. & PIRKER, R. 1994. P-glycoprotein expression as unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 8, 974-7.

7 Anhang

7.1 Doxorubicin Monoversuch ergänzende Darstellungen

7.1.1 Alternative Abbildung nicht-normierter Ergebnisse der Lebendzellen

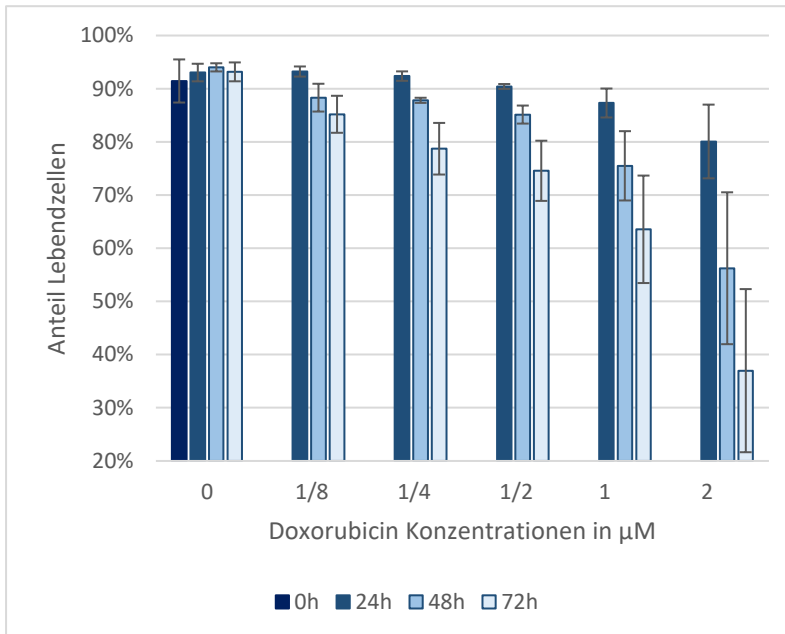


Abbildung 7.1: Lebendzellen nach Doxorubicin-Inkubation – alternative Darstellung

Abgebildet sind die Mittelwerte des Anteils der Lebendzellen nach Doxo-Inkubation (ohne Normierung) in Abhängigkeit zu den einzelnen Doxo-Konzentrationen. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: μM – Mikromolar, h – Stunden der Inkubation

7.1.2 Abbildung normierter Ergebnisse der tetraploiden SP

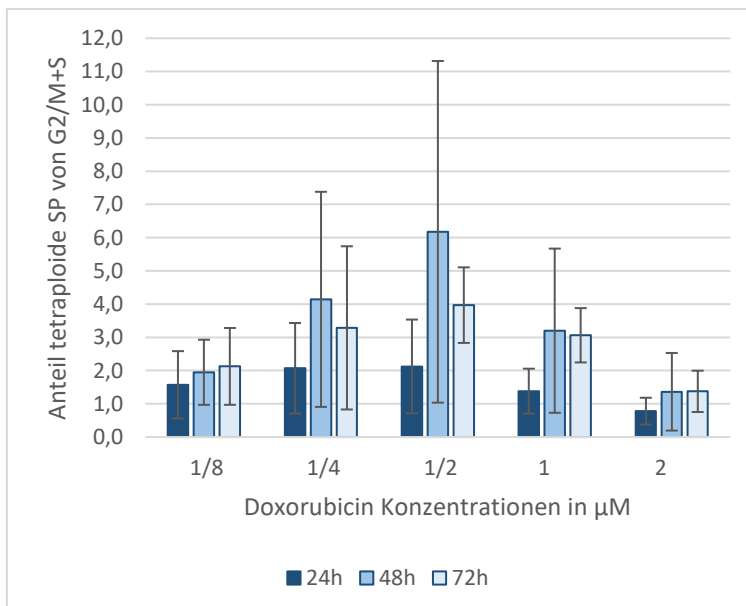


Abbildung 7.2: Anteil tetraploider SP von $G_2/M+S$ nach Doxorubicin-Inkubation

Die Grafik zeigt den Anteil der tetraploiden SP im Verhältnis zur $G_2/M+S$ -Population nach Doxo-Inkubation, und Normierung auf die Kontrolle unter Berücksichtigung der Zytotoxizität. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: μM – Mikromolar, h – Stunden, SP – Side Population, G_2 – Gap-2-Phase, M – Mitose-Phase, S – S-Phase

7.1.3 Abbildung normierter Ergebnisse der strict tetraploiden SP

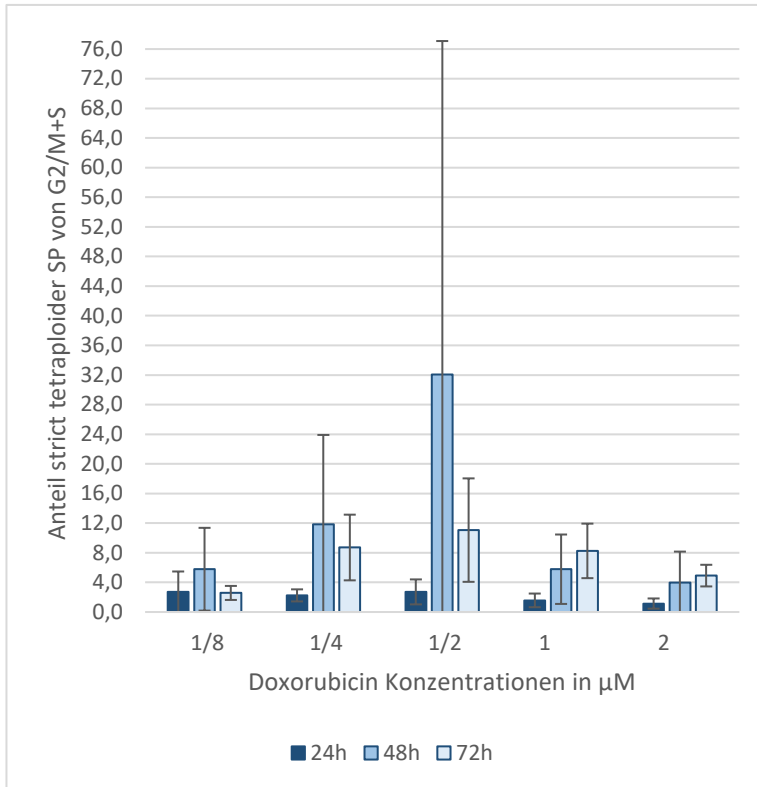


Abbildung 7.3: Anteil strict tetraploider SP von $G_2/M+S$ nach Doxorubicin-Inkubation

Die Grafik zeigt den Anteil der strict tetraploiden SP im Verhältnis zur $G_2/M+S$ -Population nach Doxo-Inkubation und Normierung auf die Kontrolle unter Berücksichtigung der Zytotoxizität. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: μM – Mikromolar, h – Stunden, SP – Side Population, G_2 – Gap-2-Phase, M – Mitose-Phase, S – S-Phase

7.2 Disulfiram Monoversuch ergänzende Darstellungen

7.2.1 Abbildung nicht-normierter Ergebnisse der diploiden SP

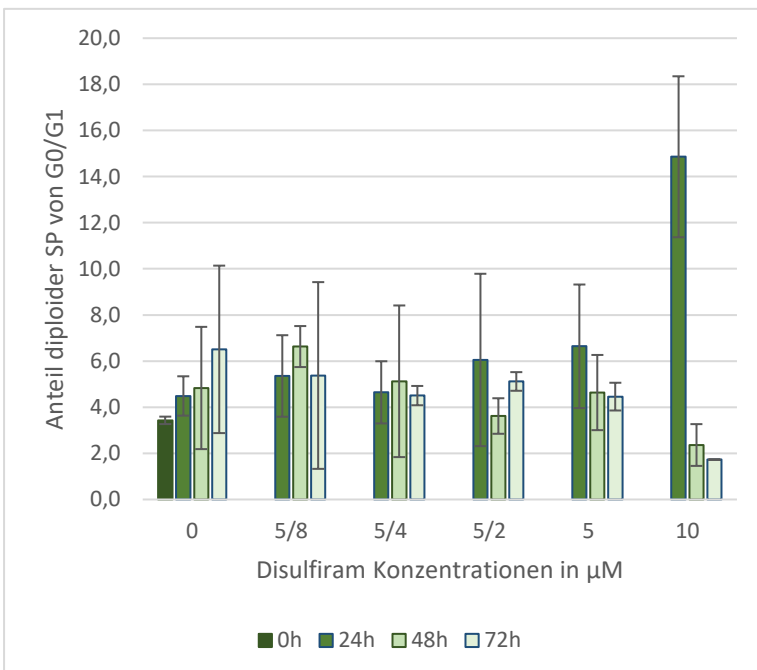


Abbildung 7.4: Anteil diploider SP von G_0/G_1 nach Disulfiram-Inkubation – alternative Darstellung

Die Grafik zeigt den Anteil der diploiden SP im Verhältnis zur G_0/G_1 -Population nach DSF-Inkubation und unter Berücksichtigung der Zytotoxizität mit Verteilung auf 100 Zellen. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: μM – Mikromolar, h – Stunden, SP – Side Population, G_0 – Gap-0-Phase, G_1 – Gap 1-Phase

7.2.2 Alternative Abbildung nicht-normierter Ergebnisse der strict diploiden SP

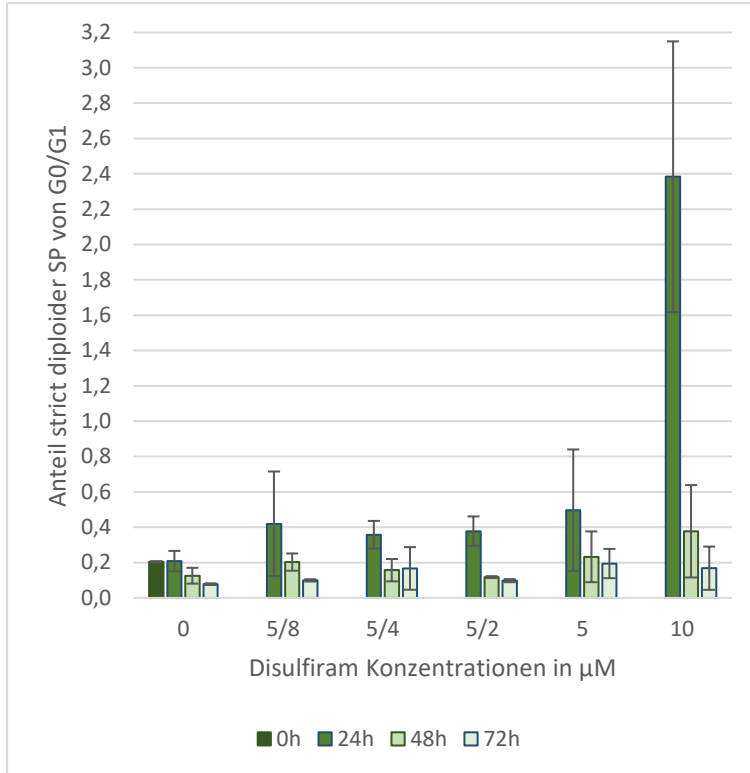


Abbildung 7.5: Anteil strict diploider SP von G0/G1 nach Disulfiram-Inkubation – alternative Darstellung

Die Grafik zeigt den Anteil der diploiden SP im Verhältnis zur G0/G1-Population nach DSF-Inkubation und unter Berücksichtigung der Zytotoxizität mit Verteilung auf 100 Zellen. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: µM – Mikromolar, h – Stunden, SP – Side Population, G0 – Gap-0-Phase, G1 – Gap 1-Phase

7.2.3 Abbildung normierter Ergebnisse der tetraploiden SP

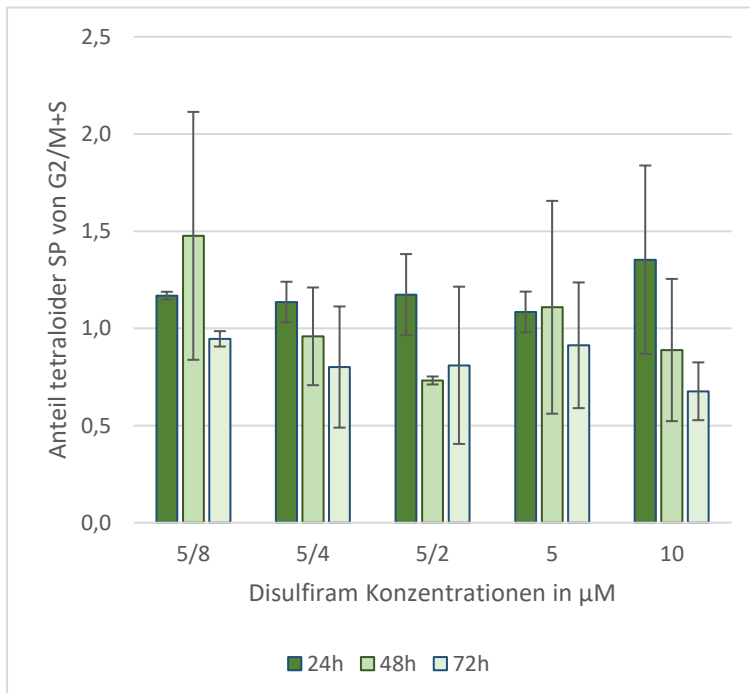


Abbildung 7.6: Anteil tetraploider SP von G2/M+S nach Disulfiram-Inkubation

Die Grafik zeigt den Anteil der tetraploiden SP im Verhältnis zur G2/M+S-Population nach DSF-Inkubation, unter Berücksichtigung der Zytotoxizität und Normierung auf die Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: µM – Mikromolar, h – Stunden, SP – Side Population, G2 – Gap-2-Phase, M – Mitose-Phase, S – S-Phase

7.2.4 Abbildung normierter Ergebnisse der strict tetraploiden SP

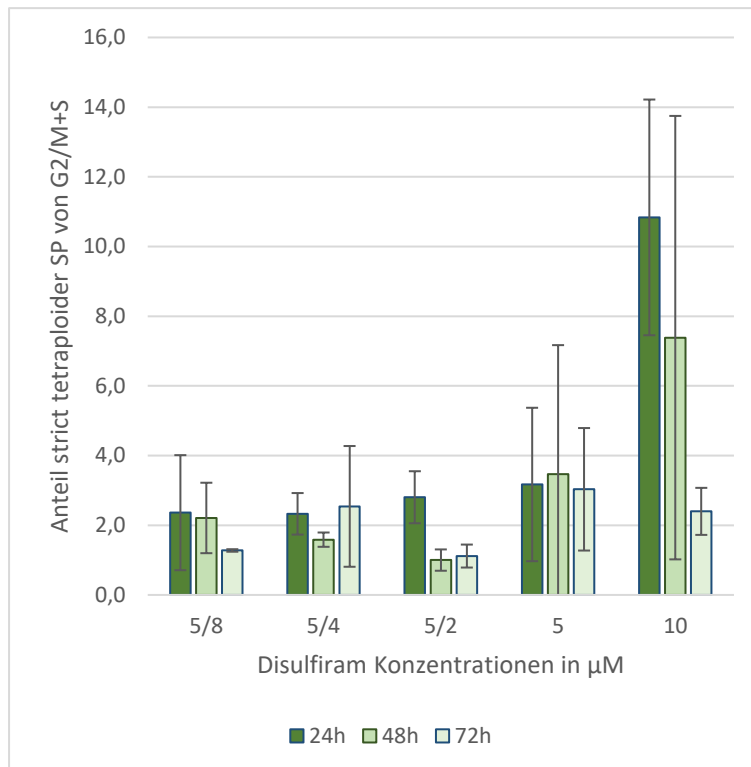


Abbildung 7.7: Anteil strict tetraploider SP von G₂/M+S nach Disulfiram-Inkubation

Die Grafik zeigt den Anteil der tetraploiden SP im Verhältnis zur G₂/M+S-Population nach DSF-Inkubation, unter Berücksichtigung der Zytotoxizität und Normierung auf die Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: μM – Mikromolar, h – Stunden, SP – Side Population, G₂ – Gap-2-Phase, M – Mitose-Phase, S – S-Phase

7.3 Disulfiram/Doxorubicin Kombinationsversuch ergänzende Darstellungen

7.3.1 Alternative Abbildung nicht-normierter Ergebnisse der diploiden SP

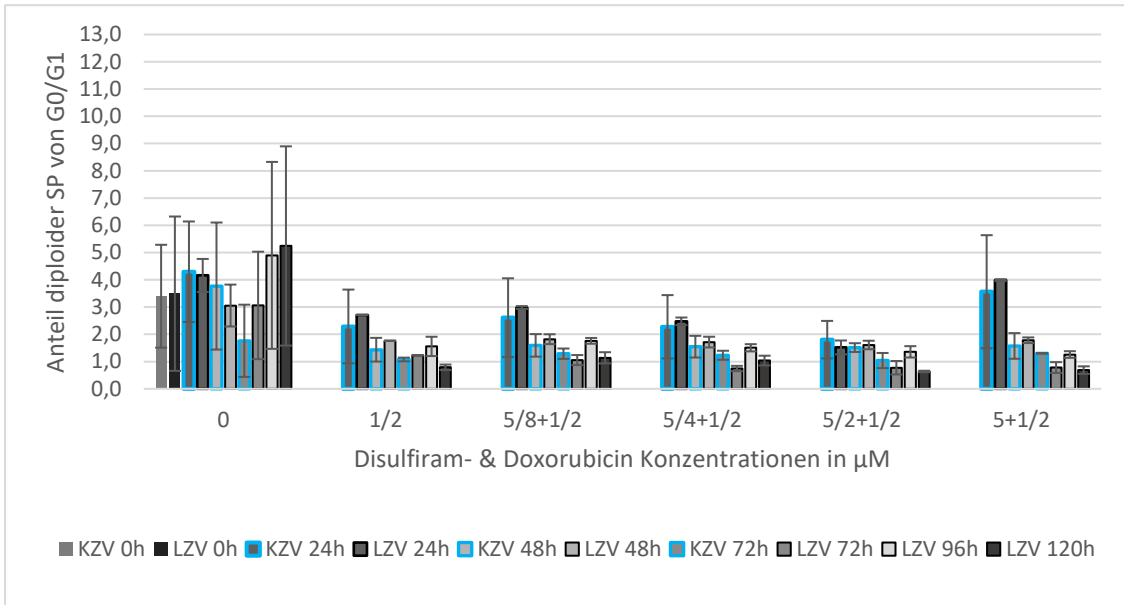


Abbildung 7.8: Anteil diploider-SP von G₀/G₁ nach 72h- und 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation – alternative Darstellung

Die Grafik zeigt den Anteil der diploiden SP im Verhältnis zur G₀/G₁-Population nach 72h- (hellblau umrandete Säulen) und 120h-DSF-Doxo-Inkubation (schwarz umrandete Säulen) nach Berücksichtigung der Zytotoxizität mit Verteilung auf 100 Zellen, in Abhängigkeit zu den einzelnen, variierenden DSF- und fester 1/2μM-Doxo-Konzentration. Zum besseren Vergleich sind die Messergebnisse des KZV und LZV zum gleichen Messzeitpunkt nebeneinander und in der gleichen Grundfarbe dargestellt. Der 72h-Messwert ist aufgrund der Manipulation im LZV nicht vergleichbar mit den Werten des 72h-KZV. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: μM – Mikromolar, h – Stunden, SP – Side Population, KZV – 72h-Kurzzeitversuch, LZV – 120h-Langzeitversuch, G₀ – Gap-0-Phase, G₁ – Gap-1-Phase

7.3.2 Abbildung normierter Ergebnisse der strict diploiden SP

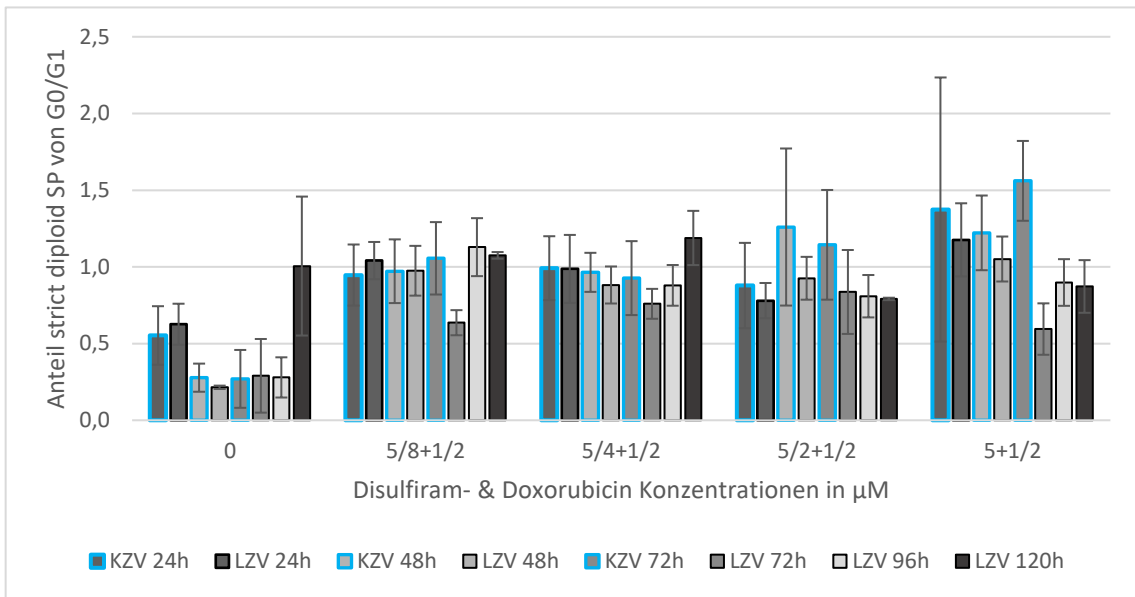


Abbildung 7.9: Anteil strict diploider-SP von G_0/G_1 nach 72h- und 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation – Normierung auf $1/2\mu\text{M}$ -Doxo-Kontrolle

Die Grafik zeigt den Anteil der strict diploiden SP im Verhältnis zur G_0/G_1 -Population nach 72h- (hellblau umrandete Säulen) und 120h-DSF-Doxo-Inkubation (schwarz umrandete Säulen) nach Berücksichtigung der Zytotoxizität und Normierung auf die $1/2\mu\text{M}$ -Doxo-Kontrolle in Abhängigkeit zu den einzelnen, variierenden DSF- und fester $1/2\mu\text{M}$ -Doxo-Konzentration. Zum besseren Vergleich sind die Messergebnisse des KZV und LZV zum gleichen Messzeitpunkt nebeneinander und in der gleichen Grundfarbe dargestellt. Der 72h-Messwert ist aufgrund der Manipulation im LZV nicht vergleichbar mit den Werten des 72h-KZV. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: μM – Mikromolar, h – Stunden, SP – Side Population, KZV – 72h-Kurzzeitversuch, LZV – 120h-Langzeitversuch; G_0 – Gap-0-Phase, G_1 – Gap-1-Phase

7.3.3 Alternative Abbildung nicht-normierter Ergebnisse der strict diploiden SP

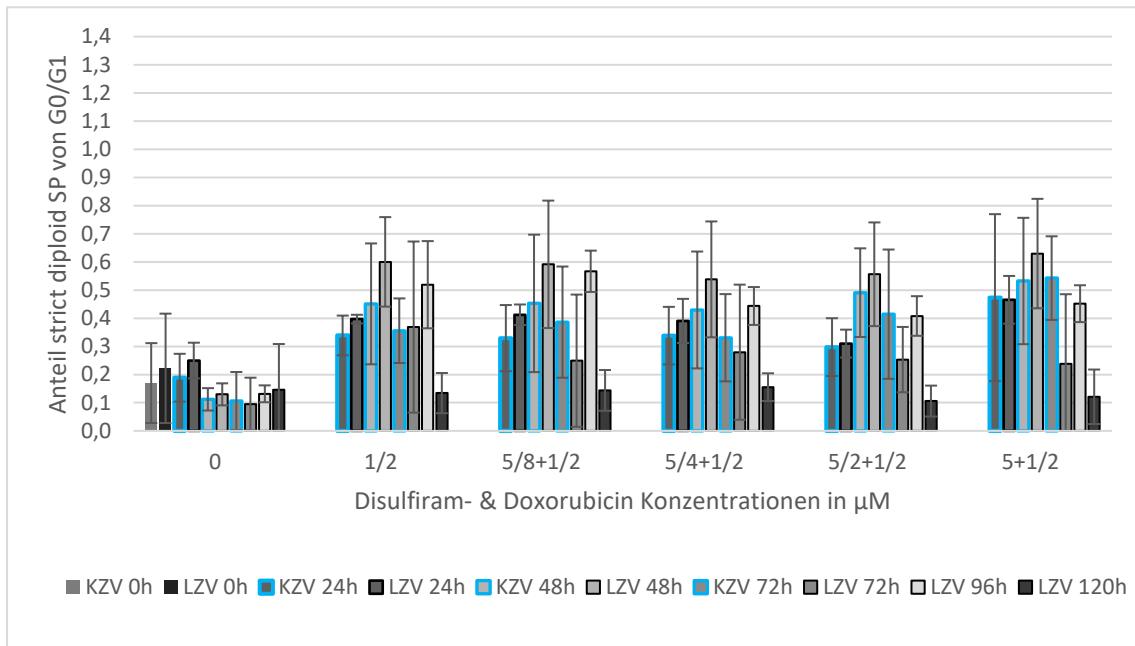


Abbildung 7.10: Anteil strict diploider-SP von G_0/G_1 nach 72h- und 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation – alternative Darstellung

Die Grafik zeigt den Anteil der strict diploiden SP im Verhältnis zur G_0/G_1 -Population nach 72h- (hellblau umrandete Säulen) und 120h-DSF-Doxo-Inkubation (schwarz umrandete Säulen) nach Berücksichtigung der Zytotoxizität mit Verteilung auf 100 Zellen, in Abhängigkeit zu den einzelnen, variierenden DSF- und fester $1/2\mu\text{M}$ -Doxo-Konzentration. Zum besseren Vergleich sind die Messergebnisse des KZV und LZV zum gleichen Messzeitpunkt nebeneinander und in der gleichen Grundfarbe dargestellt. Der 72h-Messwert ist aufgrund der Manipulation im LZV nicht vergleichbar mit den Werten des 72h-KZV. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: μM – Mikromolar, h – Stunden, SP – Side Population, KZV – 72h-Kurzzeitversuch, LZV – 120h-Langzeitversuch, G_0 – Gap-0-Phase, G_1 – Gap-1-Phase

7.3.4 Abbildung normierter Ergebnisse der strict tetraploiden SP

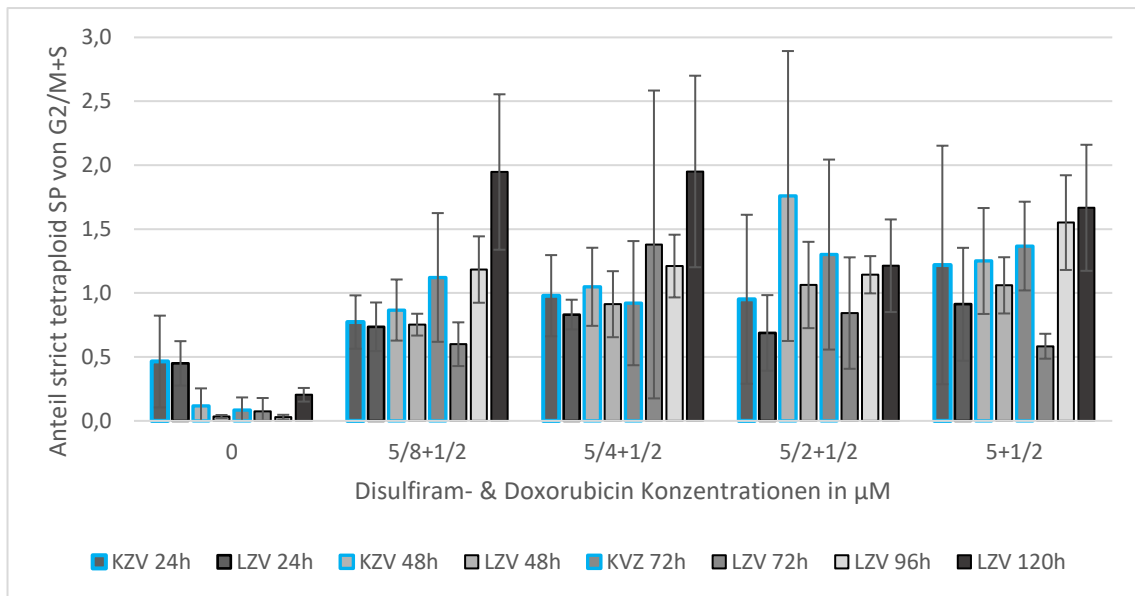


Abbildung 7.11: Anteil strict tetraploider SP von G2/M+S nach 72h- und 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation – Normierung auf 1/2 μM -Doxo-Kontrolle

Die Grafik zeigt den Anteil der strict diploiden SP im Verhältnis zur G2/M+S-Population nach 72h- (hellblau umrandete Säulen) und 120h-DSF-Doxo-Inkubation (schwarz umrandete Säulen) nach Berücksichtigung der Zytotoxizität und Normierung auf die 1/2 μM -Doxo-Kontrolle in Abhängigkeit zu den einzelnen, variierenden DSF- und fester 1/2 μM -Doxo-Konzentration. Zum besseren Vergleich sind die Messergebnisse des KZV und LZV zum gleichen Messzeitpunkt nebeneinander und in der gleichen Grundfarbe dargestellt. Der 72h-Messwert ist aufgrund der Manipulation im LZV nicht vergleichbar mit den Werten des 72h-KZV. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: μM – Mikromolar, h – Stunden, SP – Side Population, KZV – 72h-Kurzzeitversuch, LZV – 120h-Langzeitversuch, G₂ – Gap-2-Phase, M – Mitose-Phase, S – S-Phase

7.3.5 Abbildung nicht-normierter Ergebnisse der strict tetraploiden SP

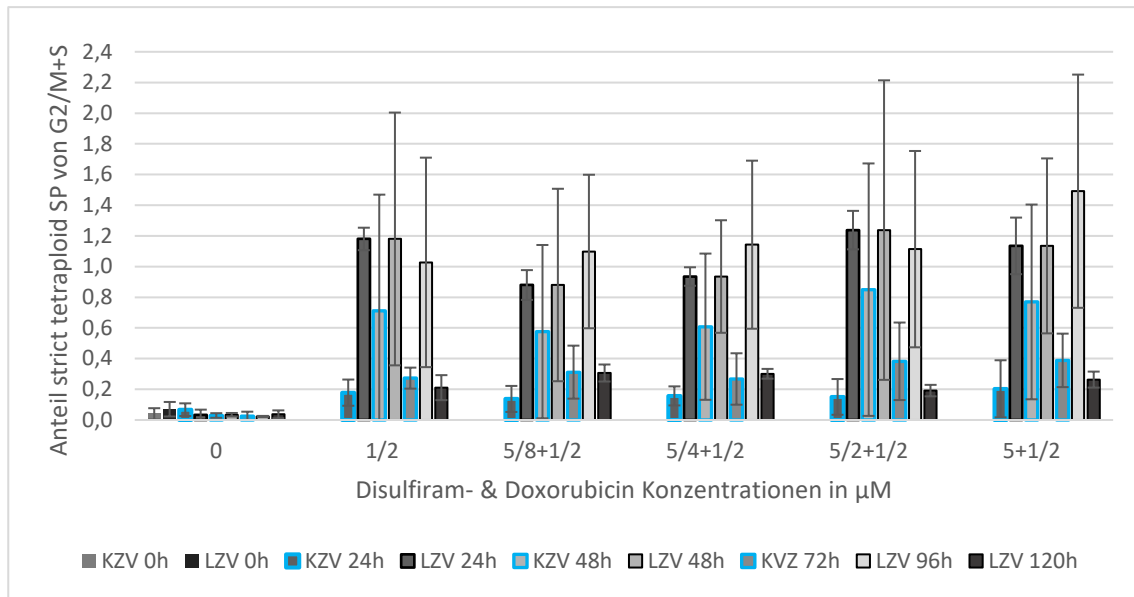


Abbildung 7.12: Anteil strict diploider-SP von G2/M+S nach 72h- und 120h-Disulfiram- & Doxorubicin-Inkubation – alternative Darstellung

Die Grafik zeigt den Anteil der strict diploiden SP im Verhältnis zur G2/M+S-Population nach 72h- (hellblau umrandete Säulen) und 120h-DSF-Doxo-Inkubation (schwarz umrandete Säulen) nach Berücksichtigung der Zytotoxizität mit Verteilung auf 100 Zellen, in Abhängigkeit zu den einzelnen, variierenden DSF- und fester 1/2µM-Doxo-Konzentration. Zum besseren Vergleich sind die Messergebnisse des KZV und LZV zum gleichen Messzeitpunkt nebeneinander und in der gleichen Grundfarbe dargestellt. Der 72h-Messwert ist aufgrund der Manipulation im LZV nicht vergleichbar mit den Werten des 72h-KZV. Die Fehlerbalken zeigen die Werte eine Standardabweichung um den Mittelwert herum an.

Abkürzungen: µM – Mikromolar, h – Stunden, SP – Side Population, KZV – 72h-Kurzzeitversuch, LZV – 120h-Langzeitversuch, G₂ – Gap-2-Phase, M – Mitose-Phase, S – S-Phase

7.4 Veröffentlichungen

Poster (Co-Autorenschaft)

Kai-Erik Witte, David Baumann, Manuela Kübler, Salesia-Franziska Werner, Martin Ebinger und Rupert Handgretinger (2015) „Datenqualität in der Durchflusszytometrie: Verbesserungen für angewandte Forschung und klinische Anwendungen“ - Tübinger Innovationstage: Zukunftstechnologien Neckar-Alb, Medizintechnik Tag, Tübingen 2015, Deutschland.

8 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die vorliegende Dissertationsarbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen unter Betreuung von PD Dr. med. Martin Ebinger durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. Ebinger, Dipl. Biol. Kai Witte und Dr. rer. nat. Ann-Christin Krahl. Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Kai Witte und Dr. Ann-Christin Krahl von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Darstellung und Auswertung erfolgten eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

9 Danksagung

Mein Dank gilt der Universitätskinderklinik Tübingen, welche unter der Leitung von Prof. Dr. R. Handgretinger die Aufnahme als Doktorand und Umsetzung dieser wissenschaftlichen Arbeit in ihren Räumlichkeiten und die Verwendung der Materialien ermöglichte.

Einen besonders großen Dank möchte ich PD Dr. M. Ebinger für die Betreuung dieser Dissertationsschrift aussprechen. Durch seine ruhige und tiefreichend verständnisvolle Art waren die Treffen zur Begleitung der Dissertation überdurchschnittlich gut, konstruktiv und motivierend. Neben dem inhaltlichen Austausch von Strategien und Lösungsansetzen wurde auch viel Vertrauen und Interesse an meinem persönlichen Werdegang vermittelt – für die daraus resultierenden Gedanken und Entscheidungen bin ich unglaublich dankbar.

Vielen Dank auch an Dipl. Biol. Kai Witte für die Einarbeitung in den Laborräumen sowie am FACS.

Von Herzen möchte ich mich bei Dr. Ann-Christin Krahl für ihre umfassende Unterstützung und offene, zugewandte Art über die gesamte Zeit bedanken. Der fachliche Austausch hielt sogar nach Beendigung der Versuche an. Jedes schnelle Beantworten meiner Fragen über den kurzen Dienstweg empfand ich als nicht selbstverständlich.

Nicht unerwähnt soll auch der freundliche Umgang zwischen den Arbeitsgruppen (insbesondere mit Dr. Marina Schmidt) und den Mitarbeitern des Routinelabors bleiben.

Mein größter Dank gebührt meiner Ehefrau Cornelia Baumann, welche nicht nur ihre eigene Promotion zurückstellte, sondern immer wieder aufs Neue mir den Rücken freihielt, mich unterstützte und motivierte, und unsere Kinder betreute, während ich die Dissertation vervollständigte. Ich kann mich nicht ausreichend genug erkenntlich zeigen, für das was sie in dieser Zeit leistete. Ebenfalls bedanke ich mich für alle persönliche Begleitung – sei es im Gespräch oder im unterstützenden Gebet – insbesondere durch meine (Schwieger-)Eltern als auch durch Mitglieder meiner christlichen Gemeinde.

Gott sei Lob und Dank für jede einzelne Unterstützung!

10 Lebenslauf

Name	David Baumann
Geburtsdatum und - ort	15.12.1988 in Dresden
Schulbildung	2000-2003 Gymnasium am Distelberg Güstrow 2003-2006 Walter-Rathenau-Oberschule Berlin 2006-2008 Ernst-Barlach-Gymnasium Güstrow
Besondere Lernleistungen	2007 „Usus ossis et instrumentum reversionis“ - Jahresarbeit - Fachbereich Biologie 2008 Jugend Forscht: „Reinigungsleistung der Ultraschallreinigung chirurgischer Sägeblätter“ (3. Platz)
Ausbildungen	2009 Ausbildung Rettungssanitäter (NAW-Berlin) 02/2010 – 06/2011 Ausbildung Medizinischer Fachangestellter
Studium	2012 – 2018 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen 04/2014 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 10/2017 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 12/2018 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Praktisches Jahr	11/2017 – 09/2018: Universitätsklinikum Tübingen
Famulaturen	08/2014 – 09/2014: Schlosspark-Klinik Berlin 08/2015 – 09/2015: Klinik für Kinder- und Jugend- medizin am Universitätsklinikum Tübingen 09/2015: Allgemeinmediziner - Ottendorf-Okrilla 03/2016: Allgemeinmediziner – Berlin Köpenick 08/2016 – 09/2016: Klinik für Radioonkologie am Universitätsklinikum Tübingen
Berufserfahrung	06/2011 - 04/2012: MFA in der interdisziplinären Gemeinschaftspraxis Dres. Lutze, Ramsbacher und Haffke, Berlin Charlottenburg

Seit 03/2019: Arzt in Weiterbildung in der Klinik für Radioonkologie am Universitätsklinikum Tübingen

Co-Autorenschaften

06/2015: Poster zum Thema „Datenqualität in der Durchflusszytometrie: Verbesserungen für angewandte Forschung und klinische Anwendungen“ auf dem MT-Kongress am UKT

05/2019: „Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Rectal Cancer-Novel Biomarker of Tumor Immunogenicity During Radiotherapy or Confounding Variable?“