

---

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

**Konzentrationsabhängige Effekte von Curcumin,  
Salinomycin, Midostaurin und Fenretinide auf die  
Hoechst 33342 Side Population der Zelllinie KG-1a**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Kyoseva, Mariya Georgieva

2019

---

---

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth  
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Ebinger  
2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Bethge

Tag der Disputation: 13.05.2019

---

*Gewidmet*

*meiner Familie, die mich auf meinem  
Weg immer unterstützt hat.*

---

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	9
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Leukämien.....</b>	<b>16</b>
1.1.1 Definition.....	16
1.1.2 Klassifikation .....	16
1.1.3 Epidemiologie und Ätiopathogenese .....	20
1.1.4 Klinik.....	22
1.1.5 Diagnostik.....	23
1.1.6 Prävention .....	24
1.1.7 Prognose und Therapie.....	25
<b>1.2 Hämatopoetische Stammzellen (HSC) .....</b>	<b>29</b>
1.2.1 Bedeutung und Nachweis hämatopoetischer Stammzellen.....	29
1.2.2 Nachweis hämatopoetischer Stammzellen .....	31
<b>1.3 Leukämische Stammzellen (LSC) .....</b>	<b>33</b>
1.3.1 Entstehung und Aufrechterhaltung einer Leukämie.....	33
1.3.2 Rezidive und Resistenzmechanismen von leukämischen Stammzellen.....	35
1.3.3 Therapeutische Konsequenzen .....	36
<b>1.4 Curcumin .....</b>	<b>37</b>
1.1.1 Vorkommen und Herstellung.....	37
1.4.1 Eigenschaften und Wirkungsweise.....	38
<b>1.5 Salinomycin .....</b>	<b>40</b>
1.5.1 Synthese, Eigenschaften und Anwendung .....	40
1.5.2 Wirkungsweise .....	40
<b>1.6 Midostaurin .....</b>	<b>42</b>
1.6.1 Herstellung und Eigenschaften.....	42
1.6.2 Wirkungsweise und bisherige Erkenntnisse .....	42
<b>1.7 Fenretinide .....</b>	<b>44</b>
1.7.1 Herstellung, Eigenschaften und Anwendung .....	44
1.7.2 Wirkungsweise .....	45
<b>1.8 Zielsetzung und Fragestellung .....</b>	<b>47</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>48</b>

---

<b>2.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>48</b>
2.1.1	Geräte und allgemeine Verbrauchsmaterialien.....	48
2.1.2	Stammlösungen.....	53
2.1.3	Stammzellreagenzien.....	53
2.1.4	Software zur Auswertung.....	54
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>55</b>
2.2.1	Zellkultur.....	55
2.2.2	Durchflusszytometrie.....	57
2.2.2.1	Aufbau des FACS-Gerätes und Messung.....	59
2.2.2.2	Kompensation und Kalibrierung.....	62
2.2.2.3	Prinzip der Datenanalyse.....	62
2.2.3	Hoechstfärbung.....	64
2.2.4	Behandlungsversuche mit Curcumin.....	66
2.2.5	Behandlungsversuche mit Salinomycin.....	68
2.2.6	Behandlungsversuche mit Midostaurin.....	70
2.2.7	Behandlungsversuche mit Fenretinide.....	72
2.2.8	Statistische Auswertung.....	74
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>75</b>
3.1	<b>Bestimmung, Eingrenzung und Differenzierung der Zellpopulationen.....</b>	<b>75</b>
3.2	<b>Behandlungsspezifische Effekte von Curcumin auf die</b>	
	<b>Stammzellpopulation der Zelllinie KG-1a.....</b>	<b>81</b>
3.2.1	Differenzielle zytotoxische Effekte von CUR auf KG-1a-Zellen in Abhängigkeit von Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration.....	82
3.2.2	Differenzielle Effekte von CUR auf den Anteil der diploiden SP in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration.....	84
3.2.3	Differenzielle Effekte von CUR auf den Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration.....	86
3.2.4	Differenzielle Effekte von CUR auf den Anteil der tetraploiden SP in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration.....	89
3.2.5	Differenzielle Effekte von CUR auf den Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration.....	91

---

<b>3.3</b>	<b>Behandlungsspezifische Effekte von Salinomycin auf die Stammzellpopulation der Zelllinie KG-1a</b>	<b>93</b>
3.3.1	Differenzielle zytotoxische Effekte von SAL auf KG-1a-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration	93
3.3.2	Differenzielle Effekte von SAL auf den Anteil der diploiden SP in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration	95
3.3.3	Differenzielle Effekte von SAL auf den Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration	98
3.3.4	Differenzielle Effekte von SAL auf den Anteil der tetraploiden SP in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration	100
3.3.5	Differenzielle Effekte von SAL auf den Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration	103
<b>3.4</b>	<b>Behandlungsspezifische Effekte von Midostaurin auf die Stammzellpopulation der Zelllinie KG-1a</b>	<b>105</b>
3.4.1	Differenzielle zytotoxische Effekte von PKC412 auf KG-1a-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration	106
3.4.2	Differenzielle Effekte von PKC412 auf den Anteil der diploiden SP in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration	108
3.4.3	Differenzielle Effekte von PKC412 auf den Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration	111
3.4.4	Differenzielle Effekte von PKC412 auf den Anteil der tetraploiden SP in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration	113
3.4.5	Differenzielle Effekte von PKC412 auf den Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration	115
<b>3.5</b>	<b>Behandlungsspezifische Effekte von Fenretinide auf die Stammzellpopulation der Zelllinie KG-1a</b>	<b>118</b>
3.5.1	Differenzielle zytotoxische Effekte von 4-HPR auf KG-1a-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration	118
3.5.2	Differenzielle Effekte von 4-HPR auf den Anteil der diploiden SP in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration	121

---

3.5.3	Differenzielle Effekte von 4-HPR auf den Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration .....	123
3.5.4	Differenzielle Effekte von 4-HPR auf den Anteil der tetraploiden SP in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration .....	126
3.5.5	Differenzielle Effekte von 4-HPR auf den Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration .....	128
<b>3.6.</b>	<b>Zusammenfassende Gesamtbetrachtung der erhobenen Ergebnisse</b>	
	<b>131</b>	
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>134</b>
<b>4.1</b>	<b>Einführung .....</b>	<b>134</b>
<b>4.2</b>	<b>Bestimmung, Eingrenzung und Differenzierung der SP .....</b>	<b>135</b>
<b>4.3</b>	<b>Effekte von Curcumin auf die Stammzellpopulation der Zelllinie KG-1a</b>	<b>139</b>
4.3.1	Wirkungsweise von Curcumin und seine Bedeutung für die Krebsforschung	139
4.3.2	Differenzielle zytotoxische Effekte von CUR auf KG-1a-Zellen.....	142
4.3.3	Differenzielle Effekte von CUR auf den Anteil diploider und tetraploider SP	143
<b>4.4</b>	<b>Effekte von Salinomycin auf die Stammzellpopulation der Zelllinie KG-1a</b>	<b>146</b>
4.4.1	Wirkungsweise von Salinomycin.....	146
4.4.2	Differenzielle zytotoxische Effekte von SAL auf KG-1a-Zellen.....	148
4.4.3	Differenzielle Effekte von SAL auf den Anteil der diploiden und tetraploiden SP	150
<b>4.5</b>	<b>Effekte von Midostaurin auf die Stammzellpopulation der Zelllinie KG-1a</b>	<b>152</b>
<b>4.6</b>	<b>Effekte von Fenretinide auf die Stammzellpopulation der Zelllinie KG-1a</b>	<b>158</b>
4.6.1	Wirkungsweise von 4-HPR und Bedeutung für die Zytotoxizität auf AML-Zellen	158
4.6.2	Differenzielle Effekte von 4-HPR auf den Anteil der diploiden und tetraploiden SP.....	161

---

4.7 Zusammenfassende Gegenüberstellung der Effekte der vier Substanzen auf die AML-Zellen der KG-1a-Zelllinie und Ausblick .....	163
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>171</b>
<b>Erklärungen zum Eigenanteil.....</b>	<b>186</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>187</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>189</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>219</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>223</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

2n	einfacher Chromosomensatz	3.1
4n	doppelter Chromosomensatz	3.1
4-HPR	N-(4-hydroxyphenyl) retinamide	1.7.1
Abb.	Abbildung	1.2.1
ABC	ATP-binding cassette	1.2.2
ABCB1	ATP binding cassette Subfamily B Member 1	1.3.2
AG	Arbeitsgruppe	4.7
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase	1.2.2
ALL	Akute lymphatische Leukämie	1.1.2
AML	Akute myeloische Leukämie	1.1.2
AP-1	Activator protein 1	4.3.3
Ara-C	Cytosin-Arabinosid	1.1.7
ATO	Arsenic trioxide	1.4.2
ATP	Adenosintriphosphat	1.2.2
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	1.4.2
BCR-ABL	Breakpoint cluster region - Abelson murine leukemia viral oncogene homolog	1.1.3
BCRP1	Breast cancer resistance protein 1	1.2.2
BFU	Burst forming unit	1.2.1
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit	1.1.5
BUS	Busulfan	1.4.2
bzw.	beziehungsweise	1.1.7
ca.	circa	1.1.1

---

CD	Cluster of differentiation	1.1.2
CFU	Colony forming unit	1.2.1
CLL	Chronische lymphatische Leukämie	1.1.2
CLP	Common lymphoid progenitor	1.2.1
CML	Chronische myeloische Leukämie	1.1.2
CMP	Common myeloid progenitor	1.2.1
COX-2	Cyclooxygenase 2	1.4.2
CSC	Cancer stem cell	4.4.1
CT	Computertomographie	1.1.5
CUR	Curcumin	1.4.1
CYP3A4	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	1.6.1
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium	2.1.1
DMSO	Dimethylsulfoxid	2.1.1
DNA	Deoxyribonucleic acid	1.1.3
DNMT1	DNA-Methyltransferase 1	4.3.1
DNR	Daunorubicin	1.4.2
dsDNA	double-stranded deoxyribonucleic acid	1.2.2
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	2.2.1
d.h.	das heißt	1.2.2
EBV	Epstein-Barr-Virus	1.1.3
EDV	Elektronische Datenverarbeitung	2.1.4
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	4.3.3
EPO	Erythropoetin	1.2.1
ER	Endoplasmatisches Retikulum	4.6.1

---

ERK	Extrazellulär regulierte Kinase	1.7.2
etc.	et cetera	1.1.5
FAB	French-American-British	1.1.2
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	2.1.1
FCS	Fötale Kälberserum	2.1.1
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat	2.2.2.1
FLT3	fms-like tyrosine kinase 3	1.6.1
FOLFOX	Folinic acid, fluorouracil and oxaliplatin	4.3.3
FSC	Forward scatter	2.2.2
FSC-A	Forward scatter area	3.1
G	Gravity	2.2.3
GEMM	Granulocytes Erythroblasts Macrophages Megakaryocytes	1.2.1
ggf.	gegebenenfalls	1.1.5
Gy	Gray	1.1.6
h	Hour	2.2.4
HEPES	(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-ethansulfonsäure	2.1.1
HER-2	Human epidermal growth factor receptor 2	4.3.3
HLA	Human Leukocyte Antigen	1.1.5
HMC	Human mast cell	1.6.2
HPR	Hydroxyphenyl retinamide	1.7.1
HSC	Hematopoetic stem cell	1.2
HTLV-1	Humanes T-lymphotropes Virus 1	1.1.3
I $\kappa$ B	Inhibitor of kappa B	4.3.1
IKK	Inhibior of kappa B Kinase	4.3.1

---

IL	Interleukin	1.2.1
ITD	Internal tandem duplication	1.6.2
JAK	Januskinase	4.3.3
JAM-C	Junctional Adhesion Molecule C	4.1
JNK	c-Jun N-terminale Kinase	1.7.2
LDH	Laktatdehydrogenase	1.1.5
LEF1	Lymphoid enhancer binding factor 1	1.5.2
LIC	Leukemia-initiating cells	1.1.3
Lin	Lineage	1.2.2
LP	Langpassfilter	2.2.2.1
LRP6	Low-density lipoprotein receptor related protein 6	1.5.2
LSC	Leukemic stem cell	1.3
LT-HSC	Long-term hematopoetic stem cell	1.2.1
M	Mitose	3.1
MDR1	Multidrug-resistance 1	1.2.2
MDS	Myelodysplastische Syndrome	1.1.2
mg	Milligram	2.1.3
mGy	Milligray	1.1.6
MID	Midostaurin	1.6
Mio.	Million	2.2.3
ml	Milliliter	2.1.1
μl	Mikroliter	2.1.1
MLL	Mixed lineage leukemia	1.1.2
μM	Mikromolar	2.1.1
mM	Milimolar	2.1.1

---

MM	Multiples Myelom	1.1.3
MMP	Matrix-Metalloproteasen	4.3.1
MPP	Multipotent progenitor	1.2.1
MPS	Myeloproliferative Syndrome	1.1.2
MRP8	Myeloid-related-protein 8	1.5.2
MTX	Methotrexat	1.1.7
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells	1.3.3
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen	1.2.1
nm	Nanometer	2.2.2.1
nM	Nanomolar	2.1.1
NO	Nitric oxide	1.4.2
NCX	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> exchanger	4.4.1
PBS	Phosphatpuffersalzlösung	2.1.1
PD	Photo diode	2.2.2
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor	1.6.1
PE	Phycoerythrin	2.2.2.1
PerCP	Peridin Chlorophyll	2.2.2.1
PI	Propidium Iodid	2.1.3
PKC	Proteinkinase C	1.6.1
PLAB	Placental bone morphogenetic protein	4.6.1
PML	Promyelozyten-Leukämie	1.1.2
PMT	Photomultiplier	2.2.2
RAR	Retinsäurerezeptor für all-trans Retinsäure	1.1.2
ROS	Reactive oxygen species	1.7.2

---

RPMI	Rosewell Park Memorial Institute	2.1.1
RXR	Retinoid X Rezeptor	4.6.1
S	Synthese-Phase	3.1
SAL	Salinomycin	1.5.1
SCF	Stem cell factor	1.2.1
sog.	sogenannt	1.1.2
SP	Side Population	1.2.2
SPSS	Statistical Package of the Social Sciences	2.1.4
SSC	Side scatter	2.2.2
SSC-A	Side scatter area	3.1
SSC-H	Side scatter height	3.1
ST-HSC	Short-term hematopoetic stem cell	1.2.1
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	4.3.3
SZT	Stammzelltransplantation	1.1.7
Tab.	Tabelle	1.1.2
TKD	Tyrosine kinase domain	1.6.2
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor	1.6.2
TNF	Tumor necrosis factor	1.2.1
TPO	Thrombopoetin	1.2.1
U	Units	2.1.1
u.a	unter anderem(n)	1.3.2
UV	Ultraviolett	2.2.2.1
v.a.	vor allem	1.1.4
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor	1.6.1
Vol.	Volume	2.2.4

---

WHO	World Health Organisation	1.1.2
Wnt	Wingless Int-Gen	1.5.2
WT	wild typ	1.6.2
ZNS	Zentralnervensystem	1.1.5
z.B.	zum Beispiel	1.1.2
°C	Grad Celsius	2.1.1

## 1. Einleitung

### 1.1 Leukämien

#### 1.1.1 Definition

Der Begriff *Leukämie* bedeutet wörtlich übersetzt „weißes Blut“ und bezieht sich auf eine verbreiterte gelbliche Zwischenschicht (auch *Buffy Coat* genannt), die durch das Zentrifugieren des antikoagulierten Blutes zwischen der roten Erythrozytensäule und dem klaren Blutplasmaüberstand gebildet wird (Herold and Mitarbeiter 2016). Dieser Buffy Coat besteht aus Leukozyten und Thrombozyten und macht beim Gesunden ca. 1 % der Blutprobe aus (Tsai 2015).

Bei Leukämiepatienten kommt es durch die diffuse autonome Proliferation einer neoplastisch veränderten Vorläuferzelle und deren Expansion sowie Akkumulation im peripheren Blut zu einer Beeinträchtigung und Verdrängung gesunder hämatopoetischer Zellen (Herold and Mitarbeiter 2016). Dieser Prozess resultiert in einer Vermehrung unreifer Blasten im Blut, wodurch die verbreiterte Leukozytenmanschette entsteht, die nach dem Zentrifugieren der Blutprobe sichtbar wird.

#### 1.1.2 Klassifikation

In Abhängigkeit davon, welche Zelllinie von der übermäßigen malignen Proliferation morphologisch veränderter blutbildender Zellen betroffen ist, differenziert man zwischen lymphatischen und myeloischen Leukämien. Bei lymphatischen Leukämien kommt es zu einer Reifungsstörung der Lymphozyten. Ist dagegen die Myelozytopoese beeinträchtigt, spricht man von einer myeloischen Leukämie. Als Myelozytopoese wird der Teil der Hämatopoese benannt, der für die Bildung von Erythrozyten (Erythrozytopoese), Granulozyten (Granulozytopoese), Monozyten (Monozytopoese) und Thrombozyten (Thrombozytopoese) verantwortlich

zeichnet. Die am häufigsten betroffenen Zellen der myeloischen Reihe sind Granulozyten, seltener aber auch Erythrozyten oder Thrombozyten.

Eine weitere bedeutsame Differenzierung von Leukämieformen erfolgt hinsichtlich des klinischen Verlaufs. Man unterscheidet zwischen akuten und chronischen Leukämien. Bedingt durch die hohe Proliferationsrate sind akute Leukämien durch einen sowohl raschen als auch oftmals schweren Krankheitsverlauf gekennzeichnet. Demgegenüber verlaufen chronische Leukämien protrahierter und können über eine längere Zeit hinweg unentdeckt bleiben (Dempke 2006).

Unter Berücksichtigung der betroffenen Zelllinie und des klinischen Verlaufs ergeben sich folgende vier Krankheitsgruppen:

- Akute lymphatische Leukämie (ALL)
- Akute myeloische Leukämie (AML)
- Chronische lymphatische Leukämie (CLL)
- Chronische myeloische Leukämie (CML)

Die akuten Formen der Leukämie werden je nach zytomorphologischen Kriterien (AML) oder Differenzierungsgrad der entarteten Zelle (ALL) weiter in Subtypen unterteilt.

Zum Erhalte einer einheitlichen Klassifikation der AML-Subtypen nach dem jeweils dominierenden Zelltyp und Entwicklungsgrad der Zellen im hämatopoetischen System wurde im Jahr 1976 die sog. French-American-British (FAB)-Klassifikation postuliert (Tab. 1). Allerdings berücksichtigt diese allein die Morphologie und Enzymausstattung der Zellen und hat keinen Einfluss auf die Prognose oder Behandlungsalternativen. Einzige Ausnahme von dieser Aussage bildet die Promyelozyten-Leukämie (Dempke 2006).

Im Laufe der vergangenen Jahre wurde zunehmend klar, dass diese isolierte Betrachtung der zytomorphologischen Merkmale der entarteten Zellen nicht ausreicht, um die komplexe Biologie der akuten Leukämien tatsächlich zu verstehen. Aus diesem Grund wurde 2008 die WHO-Klassifikation der AML eingeführt. Darin werden neben Morphologie auch genetische und

molekularbiologische Eigenschaften der leukämischen Blasten in Betracht genommen, die eine enorme Relevanz bei der Wahl der optimalen Therapie und auf den Krankheitsverlauf besitzen.

Tabelle 1: FAB-Klassifikation und Immuntypisierung der AML\*

Einteilung	FAB-Subtyp	Häufigkeit	Morphologie	Immunphänotyp
Akute myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung	M0	< 2 %	Undifferenzierte Blasten	CD34+ CD13+ CD33+
Akute Myeloblasten-Leukämie ohne Reifungszeichen	M1	Ca. 15 %	Selten Granula	CD34+ CD13+ CD33+
Akute Myeloblasten-Leukämie mit Reifungszeichen	M2	20-30 %	Azurophile Granula, Auer Stäbchen	CD13+ CD33+ CD15+
Akute Basophilen-Leukämie	M2baso	selten	Wie M2 mit Basophilie	
Akute Promyelozyten-Leukämie	M3	10 %	Viel Granula, viele Auer-Stäbchen	CD13+ CD33+
Akute myelomonozytäre Leukämie	M4	30-40 %	Blasten, die an Myelozyten und Monozyten erinnern	CD13+ CD33+ CD15+
Akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie	M4Eo	selten	Wie M4 mit Eosinophilie	
Akute Monoblasten-Leukämie	M5a M5b	5-10 %	Monozytoide Blasten	CD33+ CD15+
Akute Erythroblasten-Leukämie	M6	selten	Unreife Erythroblasten	CD71+
Akute Megakaryozyten-Leukämie	M7	selten	Unreife Blasten	CD41+ CD42+ CD61+

\* Modifiziert nach (Dempke 2006)

Die Einteilung erfolgt auf dieser Basis in die folgenden vier Gruppen (Vardiman, Lee Harris et al. 2002):

- **AML mit spezifischen chromosomalen Veränderungen:**

AML mit Translokation t(8;21)(q22;q22), (AML1/ETO)

AML mit abnormer Eosinophilien im Knochenmark inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22), (CBFβ/MYH11)

Akute Promyelozyten-Leukämie: t(15;17)(q22;q12), (PML/RAR)

AML mit Mutationen von 11q23 (MLL-Gen )

- **AML mit multilinearer Dysplasie:**

Sekundäre AML nach MDS oder MPS

AML ohne vorausgegangenes MDS oder MPS, aber mit Dysplasien in > 50 % der kernhaltigen Zellen

- **Therapiebedingte AML:**

Nach Therapie mit Alkylanzien oder nach Strahlentherapie

Nach Therapie mit Topoisomerase II – Inhibitoren

Nach Therapie mit anderen Zytostatika

- **Sonstige Formen der AML**

Die Einteilung der ALL wird hingegen in Abhängigkeit von der betroffenen Zellreihe und nach dem Differenzierungsgrad der unreifzelligen Blasten vorgenommen (Dempke 2006):

- **B-Linien-ALL:**

Pro-B-ALL

c-ALL

Prä-B-ALL

- **Reife B-ALL**

- **T-Linien-ALL:**

Pro-T-ALL

Prä-T-ALL

Kortikale T-ALL

Reife T-ALL

Es existiert zudem eine morphologische Einteilung der ALL basierend auf den FAB-Kriterien (Dempke 2006), allerdings besteht diese lediglich aus drei Subgruppen. Zu unterscheiden sind hier:

FAB-L1: Kleinzellige Lymphoblasten-Leukämie. Diese ist durch vorwiegend kleine Blasten charakterisiert.

FAB-L2: Polymorphzellige Leukämie. Diese weist eine heterogene Zellpopulation auf.

FAB-L3: Leukämische Form des Burkitt-Lymphoms, die vorwiegend durch Blasten gekennzeichnet ist.

### **1.1.3 Epidemiologie und Ätiopathogenese**

Leukämien stellen nach aktuellen Zahlen die elfthäufigste neoplastische Erkrankung und die siebthäufigste tumorbedingte Todesursache in Deutschland dar. Bei Männern machen sie 2,8 % und bei Frauen 2,4 % aller Krebserkrankungen aus (Robert-Koch-Institut 2015).

In Deutschland wurde im Jahr 2012 bei insgesamt 12640 Menschen die Erstdiagnose Leukämie gestellt, wovon zu 5 % Kinder und Jugendliche unter 15 Jahre betroffen waren. Kinder weisen mit zunehmendem Alter ein abfallendes Risiko auf, an Leukämie zu erkranken. Dagegen ist ab dem 30. Lebensjahr wiederum eine kontinuierlich ansteigende Erkrankungstendenz zu beobachten, von der Männer stärker betroffen sind als Frauen (Robert-Koch-Institut 2015).

Innerhalb der Gruppe der akuten Leukämien gibt es in Abhängigkeit vom Alter verschiedene Inzidenzraten. Die AML macht bei Erwachsenen 80 % und bei Kindern 20 % der akuten leukämischen Erkrankungen aus und weist ein medianes Erkrankungsalter von 63 Jahren auf. Gegensätzlich dazu beläuft sich die ALL auf 20 % bei Erwachsenen und 80 % bei Kindern (häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter) (Herold and Mitarbeiter 2016).

Die genaue Ursache für eine Leukämie bleibt in den meisten Fällen unklar. Es konnte aber über die Jahre eine Reihe von Risikofaktoren identifiziert werden, die mit der Entstehung einer leukämischen Erkrankung assoziiert werden. DNA-schädigende Noxen wie ionisierende Strahlen (Hiroshima, Nagasaki, aber auch hohe Strahlenexpositionen in therapeutischer Dosis), Giftstoffe oder Zytostatika, die die Stammzellen der Hämatopoese schädigen, erhöhen das Erkrankungsrisiko für sowohl AML als auch ALL. Weitere Risikofaktoren sind hereditäre Erkrankungen wie z.B. Trisomie 21 (20-fach erhöhtes Risiko), Fanconi-Anämie, Bloom-Syndrom oder Li-Fraumeni-Syndrom. Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen manchen viralen Erkrankungen wie z.B. EBV-Infektion oder HTLV-1-Infektion und der Entstehung von akuten Leukämien festgestellt. Einige hämatologische Erkrankungen können ebenfalls prädisponierend für diese zwei Formen der Leukämie sein: Dazu zählen im Einzelnen myelodysplastische Syndrome (MDS), myeloproliferative Syndrome (MPS), aplastische Anämie, multiple Myelome (MM) wie auch die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (Dempke 2006).

Für die Entstehung der chronischen Leukämien spielen Strahlenexposition, Benzol, genetische Faktoren und Umweltfaktoren eine ausschlaggebende Rolle. Jedoch wurde in vielen Fällen ein verändertes Chromosom 22 (Philadelphia Chromosom) als pathogenetische Ursache für die neoplastische Transformation einer Stammzelle identifiziert. Dieses veränderte Chromosom 22 ist das Produkt einer reziproken Translokation  $t(9;22)(q34;q11)$ , die durch die Verlagerung vom ABL-Protoonkogen von Chromosom 9 auf Chromosom 22 sowie die molekulare Charakterisierung des BCR-Gens von Chromosom 22 auf Chromosom 9 entsteht. Das Genprodukt BCR-ABL auf Chromosom 22 kodiert für ein Protein, das durch eine dauerhaft aktivierte Tyrosinkinase zu einer rezeptorunabhängigen Proliferation führt (Siegenthaler and Blum 2006).

Dieselbe BCR-ABL-Translokation lässt sich in 25-30 % der erwachsenen Patienten mit ALL, außerdem in wenigen Fällen bei Patienten mit AML nachweisen, was anschließend mit einer ungünstigeren Prognose einhergeht (Herold and Mitarbeiter 2016).

Als ursächlich für die Entstehung myeloischer Leukämien auf molekularbiologischem Niveau wurden genetische Veränderungen erkannt, die mit einer gestörten Proliferation, Reifung und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen verbunden sind und eine klonale Expansion neoplastisch veränderter unreifer Vorläuferzellen bedingen. Im Rahmen von einer Vielzahl unabhängiger Studien (Minden, Till et al. 1978, Griffin and Lowenberg 1986, Sutherland, Blair et al. 1996) wurde die Existenz einer leukämischen Stammzelle LIC (Leukemia-inducing cell, LIC) erfolgreich nachgewiesen, die aus einer ursprünglich physiologischen hämatopoetischen Stammzelle hervorgeht (siehe Kapitel 1.3.2). Die LIC verfügt über eine ungehemmte Selbsterneuerungsfunktion und kann somit die Existenz des leukämischen Stammklons sicherstellen. Zellen dieses leukämischen Stammklons können sich folgend im blutbildenden Knochenmark ausbreiten und hierdurch die normalen Zellen der Hämatopoese verdrängen (Christ, Feuring-Buske et al. 2007). Die Konsequenzen dieser Verdrängung sind Anämie, Granulozytopenie, Thrombozytopenie, aber auch die Schädigung der Lymphozytopenie mit erhöhter Infektanfälligkeit und Infiltration extramedullärer Organe sowie die Ausschwemmung leukämischer Blasten in das periphere Blutsystem.

#### **1.1.4 Klinik**

In Abhängigkeit vom jeweils vorliegenden Leukämie-Typ sind verschiedene Symptome zu unterscheiden. Das klinische Bild der akuten Leukämien resultiert v.a. aus der Verdrängung gesunder hämatopoetischen Zellen im Knochenmark. Die typischen Leitsymptome (Dempke 2006, Herold and Mitarbeiter 2016) entstehen in diesem Fall in der Folge der Trizytopenie im peripheren Blut:

- Erhöhte Infektanfälligkeit mit Fieber, Schüttelfrost und vermehrtem Schwitzen infolge einer Granulozytopenie.
- Allgemeine Schwäche, Müdigkeit, Leistungsknick, Blässe und Belastungsdyspnoe als Zeichen einer Anämie.

- Petechien, Hämatomneigung, Zahnfleischblutungen bis hin zu einer Verbrauchskoagulopathie (v.a. bei Promyelozytenleukämie) aufgrund einer Thrombozytopenie.

Weitere Symptome wie Lymphknotenschwellungen, Hepatosplenomegalie (v.a. bei Kindern), Knochenschmerzen und Haut-/ Organmanifestationen (kindliche ALL), Meningeosis leucaemica (ALL), Gingivahyperplasie (AML M4 und M5 nach der FAB-Klassifikation) oder Leukostase sind gleichermaßen als typisch für die akuten Formen der Leukämie zu nennen.

Leitsymptome der CLL sind periphere Lymphadenopathie, Splenomegalie, geringe Hepatomegalie und Hauterscheinungen wie Pruritus, chronische Urtikaria, Purpura, Mykosen und Erythrodermien. Nach einem mehrjährigen Verlauf kann es ferner zu einer Hypogammaglobulinämie und dadurch zu einer erhöhten Infektneigung kommen.

Im Gegensatz zu allen anderen Formen der Leukämie unterscheidet man bei der CML folgende drei Krankheitsphasen (Dempke 2006):

- Chronische Phase
- Akzelerationsphase
- Blastenkrise

### **1.1.5 Diagnostik**

Besteht Verdacht auf eine Leukämie, so sind bestimmte diagnostische Maßnahmen (Dempke 2006) indiziert. Dazu zählen:

- Anamnese und körperliche Untersuchung: Es werden zunächst die akuten Beschwerden des Patienten und die Vorerkrankungen sowie potenzielle Risikofaktoren erfasst. Im Rahmen der körperlichen Untersuchung wird besonders auf Leber- und Milzvergrößerung, außerdem auf die Schwellung der peripheren Lymphknoten geachtet.
- Ultraschalluntersuchung des Abdomens, um Organveränderungen auszuschließen.
- Röntgenaufnahme vom Thorax, ggf. Thorax-CT bei T-ALL.

- Blutbild und Differenzialblutbild: Es werden nach einer peripher venösen Blutentnahme die einzelnen Bestandteile des Blutes bestimmt und Unterformen der Leukozyten abgezählt wie auch differenziert.
- Routine-Laboruntersuchungen einschließlich Entzündungsparameter, BSG, Nieren- und Leberwerte, Gerinnungsparameter, Aktivität der Leukozytenphosphatase, LDH, Harnsäure etc..
- ggf. Eiweißelektrophorese und Immunfixation (CLL).
- ggf. Coombs-Test (CLL).
- ggf. Thymidinkinase- und  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Bestimmung (als Prognoseparameter bei CLL).
- ggf. Lymphknotenbiopsie.
- HLA-Typisierung: Diese wird v.a. bei jüngeren Patienten (< 60 Jahre, guter Allgemeinzustand) bei potenziell vorhandenem Spender für Stammzelltransplantation durchgeführt (Dempke 2006).
- Knochenmarkspunktion und anschließende Knochenmarksdiagnostik: Punktionsort ist in den meisten Fällen der Beckenkamm. Knochenmarksausstriche und Histologie aus dem gewonnenen Knochenmark werden auf bestimmte zytologische und zytogenetische (z.B. BCR-ABL-Translokation) Merkmale hin untersucht. Zudem wird eine durchflusszytometrische Immunphänotypisierung zum Nachweis von Oberflächenantigenen realisiert. Abschließend werden molekulargenetische Untersuchungen vorgenommen, um Veränderungen des Erbguts festzustellen.
- Mikrobiologie mit Virusserologie.

Bei entsprechender Symptomatik sind ebenso eine Liquorpunktion und Liquoruntersuchung indiziert. Bei der ALL kann es z.B. zum klinischen Bild einer Meningeosis leucaemica mit den entsprechenden neurologischen Symptomen kommen, die durch den Befall des ZNS hervorgerufen werden (Dempke 2006).

### 1.1.6 Prävention

Bis dato sind keine Maßnahmen zur Vorbeugung von Leukämie bekannt. Dennoch kann das Erkrankungsrisiko gezielt gesenkt werden, indem die

Risikofaktoren für die Entstehung einer Leukämie vermieden werden. Dazu gehören in erster Linie Schäden im Erbgut, die zu einer neoplastischen Transformation der Knochenmarksstammzellen und deren Ausschwemmung ins periphere Blut führen. (Herold and Mitarbeiter 2016).

Chemische Noxen wie Benzol oder Löstmittel besitzen nachweislich eine prädisponierende Wirkung auf die Entstehung der Leukämie. Angesichts dieses Wissens werden diese Substanzen heutzutage nur in geringem Maße und unter strengen Schutzvorkehrungen am Arbeitsplatz eingesetzt. Andere Chemikalien wie Zytostatika (insbesondere Alkylantien, Anthrazykline oder Topoisomerase II-Inhibitoren), die im Rahmen einer Chemotherapie bei Krebserkrankungen zum Einsatz kommen, erhöhen auch das Risiko einer sekundär entstehenden Leukämie. Aus diesem Grund ist zu konstatieren, dass der Nutzen der zytostatischen Therapie für den Patienten die Gefahr der Entstehung einer Zweitneoplasie übersteigen muss.

Zu den weiteren Risikofaktoren zählen ionisierende Strahlen. Nach der Atombombenexplosion von Hiroshima und Nagasaki traten sowohl akute als auch chronische Leukämien gehäuft hervor. Auch Radioaktivität in therapeutischer Dosis kann sich schädigend auf die Hämatopoese auswirken und die Entstehung einer schwerwiegenden Folgeerkrankung begünstigen. Exemplarisch ist das sich verdoppelnde Risiko für Leukämie und chronische Myelose im Rahmen einer Strahlentherapie mit einer Ganzkörperdosis von 1 Gy bei Erwachsenen und 30 mGy bei Feten (Herold and Mitarbeiter 2016).

### **1.1.7 Prognose und Therapie**

Die Behandlung einer Leukämie ist sehr aufwendig und muss risikoadaptiert in Abhängigkeit vom jeweiligen Leukämietyp in bestimmten hämatologisch-onkologischen Zentren nach Therapieprotokollen durchgeführt werden. Ziel der Therapie ist die möglichst vollständige Eradikation des leukämisch veränderten Zellklons mit kompletter Remission und Wiederherstellung der normalen Hämatopoese (Dempke 2006, Herold and Mitarbeiter 2016).

Es werden für die Zielerreichung verschiedene Therapieansätze unterschieden. Dazu zählen symptomatische Therapie, Chemotherapie, allogene

Stammzelltransplantation (SZT) sowie spezielle Therapieoptionen bei einigen Leukämieformen.

Zur symptomatischen Therapie gehören sorgfältige Hygiene, Infektprophylaxe mit Antimykotika und Antibiotika sowie ggf. Erythrozyten-/ Thrombozyten-Substitution bei Erythrozytopenie bzw. Thrombozytopenie. Darüber hinaus sollte eine adäquate Prophylaxe eines Tumorlyse-Syndroms bei Patienten unter zytostatischer Chemotherapie stattfinden. Wichtig ist hierbei eine ausreichende Flüssigkeitssubstitution und die Gabe von Allopurinol und ggf. Rasburicase zur Senkung der Produktion von Harnsäure. Ebenso bedeutsam ist die Therapie einer Hyperurikämie. In seltenen Fällen ist sogar Dialyse notwendig.

Die Chemotherapie als Therapieansatz richtet sich nach dem Typ und dem Alter des zu behandelnden Patienten.

- Akute lymphatische Leukämie

Die akute lymphatische Leukämie stellt eine akut lebensbedrohliche Erkrankung dar und es sollte möglichst schnell nach der Diagnosestellung in spezialisierten Therapiezentren und im Rahmen von klinischen Studien ein Therapiebeginn initiiert werden. Es handelt sich dabei um eine Kombinationstherapie, die aus drei Phasen besteht: Induktionstherapie mit dem Ziel einer Vollremission, Konsolidierungstherapie und Erhaltungstherapie (Dempke 2006, Herold and Mitarbeiter 2016).

Die Induktionstherapie dauert zwei bis vier Wochen und erreicht bei 96-99 % der Kinder und 78-92 % der Erwachsenen mit einer ALL eine mikroskopische Eradikation des leukämischen Zellklons und die Wiederherstellung der normalen Hämatopoese (Inaba, Greaves et al. 2013). Die wesentliche Bestandteile der Induktionstherapie sind Glukokortikoide, Vincristin und ein Anthrazyklinderivat (z.B. Daunorubicin). Eine Infektprophylaxe mit Antimykotika und Antibiotika ist für den Zeitraum der Induktionstherapie von enormer Relevanz, zumal die Patienten währenddessen eine Phase der Knochenmarkaplasie durchlaufen und infolgedessen ein erhöhtes Risiko für Infekte aufgrund der Panzytopenie aufweisen.

Ziele der Konsolidierungstherapie sind die weitere Eliminierung von leukämischen Zellen und die Stabilisierung der Remission. Gegenwärtiger Standard ist eine aus zwei bis drei weiteren Chemotherapiezyklen bestehende Hochdosiskombinationstherapie mit Ara-C, MTX, Asparaginase, Idarubicin, Amsacrin, Mitoxantron und anderen Substanzen (Dempke 2006).

Um Rezidive zu vermeiden, wird bei der ALL eine Erhaltungstherapie mit wöchentlicher Gabe von MTX und täglicher Gabe von 6-Mercaptopurin eingeleitet. Gegebenenfalls können zusätzlich Vincristin und Dexamethason die Erhaltungstherapie ergänzen (Inaba, Greaves et al. 2013).

Es treten nach der Therapie aber weiterhin häufig Rezidive auf, weshalb in einigen Fällen eine Rezidivtherapie indiziert wird. Diese richtet sich nach dem Allgemeinzustand des Patienten, der vorausgegangenen Behandlung und dem Zeitpunkt der Rezidivmanifestation.

Eine entscheidende Rolle bei der ALL-Therapie spielt die ZNS-Prophylaxe mittels intrathekaler und systemischer Applikation von MTX. In manchen Fällen wird ebenfalls eine ZNS-Bestrahlung vorgenommen.

- Akute myeloische Leukämie

Die Therapie der AML wird ähnlich der Therapie der ALL risikoadaptiert nach Protokollen durchgeführt und erstreckt sich auf drei Phasen.

Goldstandard der Induktionstherapie ist eine Kombination aus Ara-C (Cytarabin) und einem Anthrazyklin (Daunorubicin oder Idarubicin). Auf diesem Wege kann bei jungen Erwachsenen eine Remission von bis zu 80 % verwirklicht werden (Dempke 2006).

Die Konsolidierungstherapie richtet sich nach dem Ansprechen der Induktionstherapie und dem Karyotyp. Bei Patienten mit einem niedrigen Risikoprofil werden drei bis vier Zyklen Ara-C eingesetzt. Demgegenüber kommt bei Patienten mit intermediärem oder hohem Risiko eine allogene Stammzelltransplantation in Frage (Dempke 2006).

Die Erhaltungstherapie wird nach Protokollen verschiedener Studien umgesetzt.

- Chronisch lymphatische Leukämie

Die Therapie der CLL orientiert sich in ihrer Durchführung am Stadium der Erkrankung. Patienten mit CLL in einem früheren Stadium benötigen keine Therapie und werden allein bei Anzeichen einer raschen Progression behandelt. Dagegen sind Fludarabin, Cyclophosphamid und Rituximab heute Goldstandard in der Therapie der fortgeschrittenen chronisch lymphatischen Leukämie (Dempke 2006).

- Chronisch myeloische Leukämie

Mittel der Wahl in der Erstlinientherapie von CML-Patienten mit einer gesicherten BCR-ABL Translokation in der chronischen Phase ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor (Imatinib, Nilotinib oder Dasatinib). Beim Auftreten von Resistenzen kann die Erstlinientherapie um einen der neuen Thyrosinkinase-Inhibitoren (Bosutinib, Ponatinib) erweitert werden. Eine Kombination von Imatinib und Interferon- $\alpha$  2b hat sich als ebenso sinnvoll erwiesen und dadurch können sogar höhere Remissionsraten bei zugleich guter Verträglichkeit erzielt werden (Burchert, Muller et al. 2010).

Sollte durch die konventionelle Therapie keine ausreichende Remission erreicht werden, kann bei Hochrisikopatienten eine allogene Stammzelltransplantation in Erwägung gezogen werden. Die dafür notwendige Indikation wird basierend auf einer individuellen Risikoabschätzung gestellt. Voraussetzungen (Dempke 2006) für eine SZT sind beispielweise Infektfreiheit, ein Alter unter 60 Jahren, Abwesenheit von schweren Komorbiditäten und Remission zum Zeitpunkt der SZT. Nach Erreichen der ersten Vollremission stehen solchen Patienten zwei Möglichkeiten zum Erhalt der Remission zur Verfügung: Bei Vorhandensein eines histokompatiblen Spenders ist eine myeloablative allogene Stammzelltransplantation von hämatopoetischen Stammzellen denkbar. Hierbei wird eine „Konditionierung“ durch intensive zytostatische Therapie und anschließende hochdosierte Ganzkörperbestrahlung durchgeführt. Auf diese Weise werden eine Eradikation der Leukämie und eine Immunsuppression realisiert. Eine Alternative dazu stellt die nicht-myeloablative allogene SZT dar. Es wird hierbei auf die hochdosierte Ganzkörperbestrahlung verzichtet, woraus

ein höheres Risiko der Transplantatabstoßung resultiert, dafür wird aber die therapieassoziierte Mortalität minimiert (Herold and Mitarbeiter 2016).

Insgesamt hat sich die Prognose von Leukämiepatienten in den vergangenen 40 Jahren signifikant verbessert. Die Überlebensaussichten variieren aber ungeachtet dieser positiveren Tendenzen weiterhin sehr stark je nach Leukämietyp, Alter und Geschlecht des Patienten, Immunphänotyp, Milzgröße etc.. Als wichtigster Prognosefaktor wurde das Ansprechen auf die individuelle risikoadaptierte Therapie identifiziert.

## **1.2 Hämatopoetische Stammzellen (HSC)**

### **1.2.1 Bedeutung und Nachweis hämatopoetischer Stammzellen**

Die physiologische Blutbildung ist ein äußerst dynamischer Prozess: Täglich werden  $2,4 \times 10^8$  Erythrozyten und  $4 \times 10^6$  nichtlymphoide periphere Blutzellen neu gebildet, um die physiologische Homöostase aufrecht zu erhalten (Cheshier, Morrison et al. 1999). Für diese stetige Neubildung von Blutzellen sind multipotente hämatopoetische Stammzellen im roten Knochenmark verantwortlich, die einerseits die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen, andererseits in der Lage sind, reife Blutzellen durch Differenzierung zu erzeugen. Der erstmalige Nachweis der Existenz solcher multipotenter hämatopoetischen Stammzellen gelang Till und McCulloch im Jahre 1961, indem sie Testobjekten (Mäusen) Knochenmarkszellen nach vorausgegangener intensiver Bestrahlung transplantiert haben. Dies hat gezeigt, dass die Mäuse dazu fähig sind, aus den injizierten Knochenmarkszellen erneut eine proliferative gesunde Hämatopoese aufzubauen (Till and McCulloch 1961).

Heute wird davon ausgegangen, dass sich die multipotenten hämatopoetischen Stammzellen in drei wesentliche Populationen aufteilen: Langzeit-repopulierenden Stammzellen (LT-HSC), Kurzzeit-repopulierenden Stammzellen (ST-HSC) und multipotente Progenitoren (MPP). Die LT-HSC besitzen eine lebenslang vorhandene Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Self-

Renewal), um ihre Anzahl auf Lebenszeit konstant zu halten. Aus diesen entstehen wiederum die ST-HSC, die lediglich über eine vorübergehend vorhandene Selbsterneuerungsfähigkeit verfügen (Reya, Morrison et al. 2001). Im Laufe der weiteren physiologischen Differenzierung kommt es bei dem ausdifferenzierenden Teil der hämatopoetischen Stammzellen zum Verlust des Selbsterneuerungspotenzials. Im Gegensatz dazu steigen aber ihr Proliferationspotenzial und ihre Expansioneigenschaft an (Rieger and Schroeder 2007). So fehlt zum Beispiel MPPs die Fähigkeit zur Selbsterregung.

Aus den MPPs differenzieren sich zwei Gruppen von Vorläuferzelllinien: die myeloische Vorläuferzelllinie (CMP/ CFU-GEMM) und die lymphatische Vorläuferzelllinie (CLP). Diese sind bereits auf eine bestimmte Zelllinie festgelegt. Aus den myeloischen Vorläuferzellen entstehen nach mehreren Differenzierungsstufen Erythrozyten, Thrombozyten, Makrophagen und neutrophile/ basophile/ eosinophile Granulozyten. Kontrastiv dazu reifen die lymphatischen Vorläuferzellen zu B-Zell/ T-Zell-Lymphozyten und NK-Zellen. Eine Illustration der Zelldifferenzierung über den Verlauf der Hämatopoese findet sich in der nachstehenden Abbildung 1.

Hämatopoetische Stammzellen spielen eine zentrale Rolle in der Therapie diverser hämatologischer Erkrankungen, welche mit einer Knochenmarksschädigung bzw. Knochenmarksinsuffizienz einhergehen. Dazu zählen bestimmte angeborene oder später erworbene hämatologische Systemerkrankungen, immunologische Störungen, maligne hämatologische Tumorerkrankungen sowie bereits angeborene Stoffwechselerkrankungen (Huber, Heiden et al. 1999).

Die Stammzelltransplantation ist ein Therapieverfahren, das in der Behandlung von Erkrankungen des hämatopoetischen oder des Immunsystems schon seit vielen Jahren zum Einsatz kommt. Für eine Reihe von Patienten stellt die SZT die einzige kurative Behandlungsoption dar. Durch eine Stammzelltransplantation und vorausgehende Chemo- oder Radiotherapie kann der Behandlungserfolg in der Therapie chemosensibler Malignomen signifikant erhöht werden (Huber, Heiden et al. 1999).

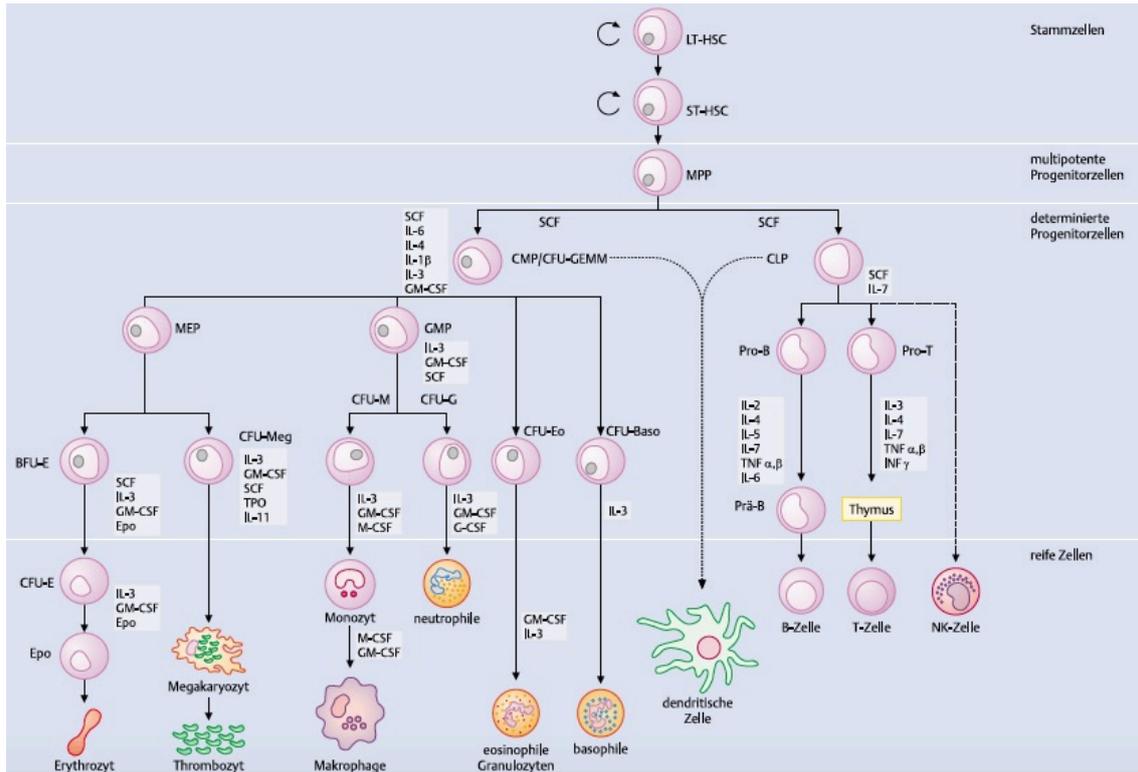


Abb. 1: Hämatopoese

Abkürzungen: LT/ ST-HSC: Long/ Short term hematopoietic stem cells; MPP: multipotent progenitors; SCF: Stem cell factor; CMP/ CLP: common myeloid/ lymphoid progenitors; CFU-GEMM: colony forming unit, forming granulocytes, erythroblasts, macrophages and megakaryocytes, BFU: burst forming unit; IL: Interleukin, TNF: Tumor necrosis factor; TPO: Thrombopoietin; EPO: Erythropoietin

Quelle: (Siegenthaler and Blum 2006)

### 1.2.2 Nachweis hämatopoetischer Stammzellen

Ausgehend vom heutigen Wissensstand tragen hämatopoetische Stammzellen spezifische Oberflächenantigene auf die Zelloberfläche, die als „Cluster of Differentiation“ (CD) bezeichnet und nummeriert werden. Dadurch lassen sich sowohl die verschiedenen Zellpopulationen als auch unterschiedliche Entwicklungsstadien beschreiben (Ogawa 2002).

Mitte der 1980er Jahre wurde das Membranprotein CD34 als Marker für hämatopoetische Stammzellen gefunden. Die Subpopulation der CD34<sup>+</sup>-Zellen zeigt sich sehr heterogen und enthält Vorläuferzellen sowohl der myeloischen als auch lymphatischen Zellreihe (Berenson, Andrews et al. 1988). Heutzutage

sind zudem diverse andere Oberflächenantigene bekannt, darunter auch CD38. Verschiedene Studien (Terstappen, Huang et al. 1991, Tajima, Deguchi et al. 2001) haben die synchrone Expression von CD34 und CD38 untersucht und den Beweis dafür erbracht, dass das Verhältnis zwischen den beiden Markern reziprok ausfällt; d.h. CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen zeigen signifikant mehr Stammzeleigenschaften als CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>-Zellen oder CD34<sup>-</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen (Ogawa 2002). Eine weitere Studie (Goodell, Rosenzweig et al. 1997) hat gezeigt, dass hämatopoetische Stammzellen als Lineage negative (lin<sup>-</sup>) anzusehen sind, da die Oberflächen-Lineage-Marker allein von Zellen exprimiert werden, die bereits für eine Zelllinie determiniert sind und somit kein Selbsterneuerungspotenzial mehr besitzen.

Jedoch wurde bis dato kein verlässliches Oberflächenantigen für den direkten und spezifischen Nachweis hämatopoetischer Stammzellen identifiziert. Aus diesem Grund wurde nach Alternativen für den Nachweis von HSC gesucht: Eine stellt die Fluoreszenzanalyse mittels des Farbstoffs Hoechst 33342 dar. Hoechst 33342, ein Bisbenzimid, ist ein Nukleinsäure-Farbstoff, der im Zellkern an double-stranded DNA (dsDNA) bindet und häufig für Zellzyklusanalysen sowie zur Unterscheidung kondensierter pyknotischer Zellkerne in apoptotischen Zellen zur Anwendung kommt (Goodell, Brose et al. 1996). In einer Reihe von Studien (Goodell, Brose et al. 1996, Goodell, Rosenzweig et al. 1997, Kim, Turnquist et al. 2002) zeigte sich, dass eine kleine homogene Zellpopulation den Farbstoff deutlich schwächer anreichert. Als Grund für die messbar geringere Fluoreszenz wurden P-Glykoproteine in der Zellmembran bestimmter Zellen erkannt, die einen Beitrag zur raschen Ausscheidung des Hoechst 33342 Farbstoffes leisten (Goodell, Brose et al. 1996). Dies ist insbesondere Transmembranproteinen möglich, die eine ATP-binding cassette (ABC) besitzen. Dazu zählen multidrug-resistance 1-(MDR1) und breast cancer resistance protein 1-(BCRP1) Transporter (Andre, Witte et al. 2015). Diese Transportproteine sind in der Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika überaus bedeutsam (Chen, Chin et al. 1986).

Jene Zellen, welche in der Lage sind, den Hoechst Farbstoff so schnell auszuscheiden, werden als Side Population (SP) bezeichnet. In vielen Studien

wurde bewiesen, dass die Zellen der SP Eigenschaften von HSCs aufweisen. Diese kleine Population ist analog zu HSCs in der Lage, Langzeit-Zellkolonien zu bilden und dadurch ein neues proliferierendes hämatopoetisches System aufzubauen. Es zeigte sich, dass die meisten Zellen der SP CD34<sup>-</sup> sind, und sie werden daher als sehr naive LT-HSC betrachtet (Goodell, Rosenzweig et al. 1997).

Eine weitere Alternative, um HSC nachzuweisen, stellt die durchflusszytometrische Bestimmung der Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) dar. Hierbei handelt es sich um eine Oxidoreduktase, die intrazelluläre Aldehyde oxidiert und in Stammzellen besonders hohe Aktivität aufweist. Dieses Enzym ist elementar bei der Oxidation von Alkoholen sowie Vitamin A und trägt zur Entwicklung von Resistenzmechanismen insbesondere gegenüber chemotherapeutisch eingesetzten Cyclophosphamiden bei (Pearce, Taussig et al. 2005).

Im Zuge der Inkubation mit dem Reagenzstoff Aldefluor® können Zellpopulationen identifiziert werden, die ALDH exprimieren. Diese können anschließend durchflusszytometrisch quantitativ detektiert werden. Frühere Studien haben ans Licht gebracht, dass ALDH-Zellpopulationen CD34 koexprimieren und viele naive Zellen aufweisen (lin<sup>-</sup>) (Storms, Trujillo et al. 1999, Storms, Green et al. 2005). Diese Zellpopulationen weisen die funktionellen Charakteristika von primitiven HSC auf, einschließlich deren Phänotyp und CFU-Eigenschaften. Bedingt dadurch sind sie fähig, multiple Zelllinien zu entwickeln (Fallon, Gentry et al. 2003).

## **1.3 Leukämische Stammzellen (LSC)**

### **1.3.1 Entstehung und Aufrechterhaltung einer Leukämie**

Die Fähigkeit zur schnellen Regeneration ist eine der wichtigsten Eigenschaften des menschlichen hämatopoetischen Systems. Diese ist wesentlich, um eine konstante Anzahl an Zellen im Blut aufrechtzuerhalten. Wie oben schon diskutiert wurde, sind aber nicht alle Blutzellen zur ständigen Neubildung fähig.

Nur HSCs besitzen die Kombination der Fähigkeiten zur Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung. Folglich ist der Gedanke naheliegend, dass in der leukämischen Onkogenese Zellpopulationen mit Stammzeleigenschaften eine zentrale Rolle übernehmen müssen. Dieser Sachverhalt ist Gegenstand vieler Studien, die sich mit Stammzellbiologie und Onkogenese beschäftigen (Minden, Till et al. 1978, Sutherland, Blair et al. 1996).

Es wurde anfangs vermutet, dass die leukämischen Zellen eine relativ homogene Zellpopulation darstellen, die zur Koloniebildung fähig ist. Diese Annahme erwies sich 1986 als falsch, nachdem Griffin und Löwenberg herausfanden, dass unter der unreifen leukämischen Blasten tatsächlich nur ein kleiner Anteil zur Koloniebildung fähig war (Griffin and Lowenberg 1986). Andere Studien haben gezeigt, dass eine kleine Gruppe unreifer AML-Blasten Stammzeleigenschaften aufweisen, weshalb sie als leukämische Stammzellen (LSC) identifiziert wurden (Sutherland, Blair et al. 1996). Diese Zellen sorgen für die Aufrechterhaltung einer Leukämie. Dabei geht man von einem hierarchischen Modell der Differenzierung der LSC von naiven Zellen zur reifen leukämischen Blasten aus (Bonnet and Dick 1997, Hope, Jin et al. 2004).

Früher gab es Grund zur Annahme, dass die Entstehung einer Leukämie durch Mutationen in HSCs bedingt ist. Ausgangspunkt dieser Überlegung war, dass HSCs durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, Proliferation und aufgrund ihrer langen Lebensdauer anfälliger gegenüber Mutationen sind (Passegue, Jamieson et al. 2003).

Angesichts des Umstandes, dass LSCs ähnliche Eigenschaften wie HSCs aufweisen, nämlich das Selbsterneuerungspotenzial besitzen und die Fähigkeit zur Proliferation und Differenzierung mitbringen, kommt es im Rahmen einer Leukämie zur Anreicherung leukämischer Blasten im peripheren Blut. Diese ähneln in ihrer Genese den physiologischen Blutzellen, aber aufgrund der fehlerhaften Differenzierung innerhalb der leukämischen Reihe verfügen diese nicht mehr über die Funktionen reifer Blutzellen (Guzman and Jordan 2004).

Neuere Studien haben allerdings herausgearbeitet, dass nicht nur LSCs über die Fähigkeit zur Selbsterregung verfügen und dadurch die Erkrankung

aufrechterhalten können. Auch reife Zellen besitzen zum Teil die Fähigkeit zur Aktivierung jener Gene, welche für die Stammzeleigenschaften kodieren. Diese können dann durch bestimmte Einflussfaktoren aktiviert werden und wären wiederum in der Lage, den Status von Stammzellen zu erlangen und dadurch eine Leukämie auslösen sowie aufrechtzuerhalten. Diese Zellen werden als Leukämie-induzierte Zellen (leukemia-initiating cells, LIC) bezeichnet (Ravandi and Estrov 2006).

### **1.3.2 Rezidive und Resistenzmechanismen von leukämischen Stammzellen**

Die chemotherapeutische Resistenz ist auch heutzutage eine große Herausforderung in der Therapie einer Leukämie: Es existieren verschiedene Mechanismen, die zu einer Chemoresistenz führen können, u.a. können Patienten initial schlecht auf eine zytotoxische Chemotherapie ansprechen oder aber nach einer initialen Remission einen Relaps erfahren. Die Identifizierung der mannigfaltigen Resistenzmechanismen ist Gegenstand vieler Studien, die zeigen konnten, dass HSCs bestimmte Eigenschaften aufweisen, die sie vor potenziellen Angriffen wie z.B. Induktion der Zytotoxizität schützen. Es hat sich zudem herausgestellt, dass LSCs ähnliche Eigenschaften vorweisen, die sie weniger sensibel gegenüber der Chemotherapie machen. Zu diesen Eigenschaften zählen DNA-Reparaturmechanismen, Resistenzmechanismen gegenüber Medikamenten und Toxinen durch die Expression von ATP-assoziierten Transportern sowie Resistenzmechanismen gegenüber apoptotischen Stimuli (Ravandi and Estrov 2006).

Zu den genannten ATP-assoziierten Transportproteinen zählen vor allem P-Glykoproteine, die auf dem MDR1-Gen oder ABCB1-Gen kodiert sind, sowie BCRP1-Transporterproteine. Diese Transportproteine sind verantwortlich für diverse Resistenzerscheinungen gegenüber Chemotherapeutika wie Anthracycline, Alkaloide oder Methotrexat (MTX) in der Therapie der akuten Leukämie. Diverse Studien (Dean, Fojo et al. 2005, Doxani, Voulgarelis et al. 2013) haben darlegen können, dass P-Glykoproteine als Prognosefaktor für die komplette Remission und Überlebenschancen bei erwachsenen Patienten mit

AML entscheidend sind. Allerdings ist diese Assoziation altersabhängig und besitzt keinen prognostischen Wert in der Behandlung der kindlichen AML (Steinbach and Legrand 2007). Andere Studien (Steinbach, Sell et al. 2002, Steinbach and Legrand 2007) haben sich mit dem Einfluss von BCRP als Prognosefaktor für die Überlebenswahrscheinlichkeit von Leukämiepatienten beschäftigt. Alle Erhebungen offenbarten eine reziproke Korrelation zwischen dem Maß der Expression des Transportproteins und der Überlebenswahrscheinlichkeit (Steinbach, Sell et al. 2002, Benderra, Faussat et al. 2004, Benderra, Faussat et al. 2005, Uggla, Stahl et al. 2005, Steinbach and Legrand 2007). Eine weitere Studie von Steinbach et al. zeigte im Jahre 2002 sogar, dass die Expression von BCRP-Genen in der kindlichen AML mit einem schlechteren Ansprechen auf die Induktionstherapie einhergeht (Steinbach, Sell et al. 2002).

Ein anderer Grund für die Widerstandsfähigkeit leukämischer Stammzellen gegenüber Zytostatika beruht darauf, dass sich LCSs ähnlich wie HSCs vorwiegend in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus und somit in einem Ruhezustand befinden. Resultierend daraus können sie von zellzyklusspezifischen Chemotherapeutika nicht erreicht werden, die ihren optimalen Angriffszeitpunkt in der M- und S-Phase des Zellzyklus haben (Ravandi and Estrov 2006).

Abschließend muss auch bedacht werden, dass ebenso sekundäre Mutationen als Ausdruck entwickelter selektiven Resistenz gegenüber einer Chemotherapie eine Rolle spielen, da diese den LCSs einen noch resistenteren Phänotyp verleihen (Ravandi and Estrov 2006).

### **1.3.3 Therapeutische Konsequenzen**

Anhand der im Vorangegangenen dargelegten Erkenntnisse wurden über die Jahre verschiedene therapeutische Ansätze entwickelt, um die leukämische Stammzellen spezifisch anzugreifen.

Im Hinblick darauf, dass LCSs und HSCs – wie schon oben besprochen – über ähnliche Charakteristika und Transportproteine verfügen, ist es schwer, einen therapeutischen Ansatz zu finden, in dem nur die LCSs das Angriffsziel der Medikamente sind und die HSCs hingegen verschont bleiben (Ravandi and

Estrov 2006). Aus diesem Grund wurde nach Transkriptionsfaktoren und Signalwege gesucht, die allein in LSCs zu finden sind, damit eine gezielte Therapie durchgeführt werden kann. Eine Studie von Guzman et al. zeigte, dass der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B in LSCs grundsätzlich aktiviert ist, dafür aber in HSCs kaum noch exprimiert wird (Guzman, Neering et al. 2001). Die therapeutische Konsequenz, die aus dieser Erkenntnis resultierte, ist der Einsatz eines NF- $\kappa$ B Inhibitors namens Parthenolid in der AML-Therapie. Dieser NF- $\kappa$ B Inhibitor ist in der Lage dazu, eine Apoptose in AML- und CML-LSCs und Progenitorzellen zu induzieren, gleichzeitig aber die HSCs zu schonen (Ravandi and Estrov 2006).

Andere Forscher haben sich ebenfalls mit der wichtigen Suche nach spezifischen Angriffsmechanismen befasst, die nur leukämische Zellen attackieren. Unter anderem sind hier Konopleva und Jordan zu nennen. In einem Artikel aus dem Jahre 2011 stellten sie fünf Strategien dazu vor, wie das leukämische Microinviroment therapeutisch angegriffen werden kann. Dazu gehören im Einzelnen (Konopleva and Jordan 2011):

1. Angreifen der wichtigsten Signalwege für Selbsterneuerung in LSCs.
2. Blockade der Überlebens-Signalwege in LSCs.
3. Beeinträchtigung von Andocken und Adhäsion durch Interferenz mit Chemokinen und Adhäsionsmolekülen.
4. Anvisieren des hypoxischen Milieus des leukämischen Microinviroment als Therapieziel.
5. Inhibition abnormal aktivierter Signalwege.

## **1.4 Curcumin**

### **1.4.1 Vorkommen und Herstellung**

Curcumin (CUR) ist ein sekundärer pflanzlicher Farbstoff, der aus dem Rhizom der Kurkuma-Pflanze extrahiert werden kann. Die Kurkuma-Pflanze selbst gehört zur Familie der Ingwergewächse und stammt aus dem südasiatischen Raum. Neben natürlicher Extraktion kann Curcumin aber auch synthetisch oder

fermentativ unter Einsatz von Bakterien hergestellt werden (Howells, Delage et al. 2016).

#### **1.4.1 Eigenschaften und Wirkungsweise**

Curcumin ist als Farbstoff wenig lichtbeständig und zeigt lipophile Eigenschaften. Eine weitreichende Verwendung findet er v.a. in der Lebensmittelindustrie. Curcumin ist als Lebensmittelfarbstoff für einige Lebensmittel wie Margarine, Nudeln, Marmelade, Senf, Curry-Gewürz und andere zugelassen.

Curcumin besitzt neben seinen Eigenschaften als Aromaträger in Gewürzen aber auch medizinisch relevante Einsatzmöglichkeiten: Neueste Forschungen haben gezeigt, dass CUR eine antioxidative, antiinflammatorische und antikanzerogene Wirkung aufweist. Seine entzündungshemmende Wirkung entfaltet CUR durch die Hemmung proinflammatorischer Enzyme wie Cyclooxygenase 2 (COX 2), Lipoxygenase und NO-Synthase, wodurch es zu einer verminderten Synthese von hochwirksamen Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine und Leukotriene kommt. Als NF-κB abhängiger Inflammationsmediator ist COX 2 zudem ein potenzielles Angriffsziel vieler antikanzeregener Therapieansätze. Einige epidemiologische Studien (Singh and Aggarwal 1995, Notarbartolo, Poma et al. 2005, Bachmeier, Nerlich et al. 2007) haben sich mit der Rolle von CUR in Bezug auf die NF-κB-abhängige Tumorprogression befasst, insbesondere nach dem Erlangen der Erkenntnis, dass NF-κB Signalwege für die Proliferation, Differenzierung und Apoptose in Tumorzellen verantwortlich zeichnen. Diese Studien haben gezeigt, dass eine Behandlung mit CUR die Lebensfähigkeit von Tumorzellen reduziert und eine Apoptose mittels Beeinträchtigung der Aktivierung des NF-κB Signalwege induziert, insbesondere im Hinblick auf die Therapie von Metastasen bei Mamma-Karzinom und Prostatakarzinom (Bachmeier, Nerlich et al. 2007, Killian, Kronschi et al. 2012).

Des Weiteren wurde herausgefunden, dass CUR in der Lage ist, die Rückkopplung zwischen den NF-κB abhängigen Zytokinen und dem NF-κB Signalweg selbst zu unterbrechen, die für die Aktivierung einiger für die

Metastasierung relevanten Mediatoren zuständig ist (Killian, Kronski et al. 2012).

Die Diskussion über die Wirkung von CUR auf leukämische Zellen hat auch vor diesem Hintergrund gerade während der letzten Jahre zugenommen. Nachdem CUR in früheren Studien eine antikanzerogene Wirkung durch die Beeinträchtigung der Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren und Signalwege sowie Kinasen und Zytokine gezeigt hat, die für das tumorinduzierte Zellwachstum und die Differenzierung wichtig ist, haben Forscher dessen Wirkung auf LSCs und noch spezifischer auf KG-1a Zellen in den Mittelpunkt ihrer Untersuchungen gerückt. In diversen Studien wurde vor Augen geführt, dass CUR besonders in Kombination mit anderen Substanzen wie z.B. Busulfan (BUS), Arsenic trioxide (ATO) oder Daunorubicin (DNR) ein starkes antileukämisches Potenzial besitzt. Weng, Zeng et al. zeigten 2015 in einer Studie, dass CUR dazu fähig ist, die BUS-induzierte Apoptose in KG-1a Zellen durch die Inhibition oder Downregulation von Survivin-Protein zu verstärken. Dieses Protein wirkt in Tumorzellen apoptosehemmend und wird von KG-1a Zellen in einem sehr hohen Maß exprimiert. Die Ergebnisse der Studie ergaben eine signifikante prozentuelle Reduktion der KG-1a Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus nach Behandlung mit CUR und BUS (Weng, Zeng et al. 2015).

Ein ähnlicher synergetischer Effekt zwischen CUR und ATO wurde 2016 von Zeng, Weng et al. dokumentiert: Die Kombination aus CUR und ATO hat zu einer signifikanten Apoptoseinduktion geführt und eine deutliche zytotoxische Wirkung auf SKM-1 und KG-1a Zellen erkennen lassen. Diese Studienergebnisse haben damit bestätigt, dass die Suppression von Survivin-Protein die Sensitivität von SKM-1 und KG-1a Zellen gegenüber ATO erhöht (Zeng, Weng et al. 2016).

Eine weitere Studie von Rao, Xu et al. erbrachte den Beleg für einen ähnlichen synergetisch antiproliferativen Effekt von CUR + DNR in KG-1a Zellen. Die Kombination aus diesen beiden Substanzen ergab eine intensivierete

Downregulation vom anti-apoptischen Protein Bcl-2 in CD34<sup>+</sup> AML Zellen (Rao, Xu et al. 2011).

Auch weitere Forschungen haben die pro-apoptische Wirkung von CUR auf Tumorzellen bestätigen können, insbesondere in Kombination mit anderen Substanzen (Sokoloski, Shyam et al. 1997, Sanchez, Simon et al. 2010).

## **1.5 Salinomycin**

### **1.5.1 Synthese, Eigenschaften und Anwendung**

Salinomycin (SAL) ist ein Polyether-Antibiotikum aus der Gruppe der Ionophore und kann aus dem Actinobakterium *Streptomyces albus* isoliert werden. Ionophoren sind lipophile Chelatoren, die durch ihre anionische Form die Fähigkeit besitzen, Kationen, insbesondere Kalium, entlang diverser Biomembranen zu transportieren. Besondere Bedeutung haben hierunter mitochondriale und zytoplasmatische Biomembranen (Mitani, Yamanishi et al. 1975, Mitani, Yamanishi et al. 1976). Aufgrund seiner hohen Selektivität für Kalium ist es SAL möglich, mit der Funktion von Kaliumkanälen in Krebsstammzellen zu interferieren. Es findet Einsatz in der Chemotherapie bestimmter malignen Tumoren (Beug 2009).

SAL verfügt dank seiner antibakteriellen, antiviralen, antiparasitären und antifungalen Eigenschaften über ein sehr breites Wirkungsspektrum gegen gram-positive Bakterien, Mykobakterien, Malaria-Spezies wie Plasmodium falciparum, Eimeria Spezies sowie Parasiten, die eine Kokzidose verursachen können (Riccioni, Dupuis et al. 2010). Aus diesem Grund findet SAL neben seinem Einsatz in der Chemotherapie breite Anwendung als Futtermittelzusatzstoff zur Vorbeugung von Kokzidose in der Tierhaltung, insbesondere bei Hühnern.

### **1.5.2 Wirkungsweise**

Der exakte Wirkmechanismus von SAL auf Krebsstammzellen ist bis heute nicht ganz eindeutig. Diverse Forschungsgruppen haben sich mit diesem

Thema befasst und dabei verschiedene Modelle der Wirkungsweise von SAL erstellt. Fuchs, Heinold et al. haben sich etwa mit der Interferenz zwischen SAL und ABC-Transporter auseinandergesetzt. ABC-Transporter sind ähnlich wie SAL in der Lage, Transmembranmakromoleküle zu binden, die diverse Substrate aus dem Zytosol hinaustransportieren. Infolgedessen liegt die Überlegung nahe, dass SAL kein potenzielles Substrat für die ABC-Transporter sein kann. Die Studie hat sogar herausfinden können, dass SAL ein potenter Inhibitor von ABC-Transportern wie P-Glykoprotein, BCRP und MRP8 in KG-1a Zellen ist und dadurch Apoptose durch Zellarrest induzieren kann (Fuchs, Heinold et al. 2009, Fuchs, Daniel et al. 2010, Naujokat and Steinhart 2012).

Krebsstammzellen besitzen aber auch andere Mechanismen, um der Apoptose zu entkommen und zu proliferieren. Ein Beispiel dafür ist der Wnt/  $\beta$ -catenin-Signalweg, der in Krebszellen wachstumsfördernd wirken kann. Lu, Choi et al. haben in einer Studie hierzu darlegen können, dass SAL den Wnt/  $\beta$ -catenin-Signalweg in CLL durch Reduktion der Expression des Wnt-Korezeptors LRP6 sowie die Downregulation von T-Zell Transkriptionsfaktor und LEF1-Protein antagonisieren können. Dadurch ist die Bildung von Proteinen wie Myc, Cyclin D1 und einigen antiapoptotischen Proteine nicht mehr möglich und die Apoptose in CLL-Zellen kann eingeleitet werden (Lu, Choi et al. 2011, Naujokat and Steinhart 2012).

Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass SAL Kalium-Ionophor ist und einen erhöhten Kaliumefflux aus Mitochondrien und Zytoplasma begünstigt. Bedingt dadurch ist SAL fähig, mit der Funktion von Kaliumkanälen in Krebszellen zu interferieren. Eine erhöhte Expression von Kaliumkanälen wurde in CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-AML Zellen nachgewiesen. Durch die durch SAL-bedingte gesteigerte Kaliumausschleusung wird die intrazelluläre Kaliumkonzentration erhöht, wodurch wiederum Apoptose und Zytotoxizität in Krebszellen erzielt werden können (Mitani, Yamanishi et al. 1976, Bortner, Hughes et al. 1997, Naujokat and Steinhart 2012).

Letztlich ist zu erwähnen, dass SAL die oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien zu hemmen und dadurch die Apoptose von Krebsstammzellen

zu induzieren vermag (Mitani, Yamanishi et al. 1976, Naujokat and Steinhart 2012).

## **1.6 Midostaurin**

### **1.6.1 Herstellung und Eigenschaften**

Midostaurin (MID, auch unter dem Namen PKC412 bekannt) ist ein Staurosporin Analogon, der semi-synthetisch aus dem Bakterium *Streptomyces staurosporeus* hergestellt werden kann. Als Multi-Target-Inhibitor kann PKC412 eine Inhibition an mehreren Enzymen zugleich hervorrufen. Dazu gehören Serin/ Threonin-Kinasen und Tyrosin-Kinasen wie Proteinkinase C (PKC), VEGFR (vascular, endothelial growth factor receptor), FLT3 (fms-like tyrosin kinase), PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) und Stammzellrezeptor c-KIT (Chi, Ly et al. 2012).

Oral verabreichtes PKC412 wird in der Leber CYP3A4-abhängig in zwei pharmakologisch aktiven Metaboliten metabolisiert. Die Maximalkonzentration von PKC412 stellt sich im Blutplasma nach ca. ein bis drei Stunden nach der Einnahme ein (Dutreix, Munarini et al. 2013).

Einsatz findet PKC412 heutzutage in der AML- und MDS-Therapie. Andere potenzielle Anwendungsbereiche sind Gegenstand vieler aktuellen Studien, auf die im Folgenden weiter eingegangen wird.

### **1.6.2 Wirkungsweise und bisherige Erkenntnisse**

Als Tyrosin-Kinase-Inhibitor (TKI) ist PKC412 dafür einsetzbar, die FLT3-Autophosphorylierung in AML-Zellen zu hemmen und eine Apoptose hervorzurufen. FLT3 ist ein transmembran lokalisierter Tyrosin-Kinase-Rezeptor, der durch die Regulation der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von hämatopoetischen Stammzellen eine bedeutende Rolle in der Hämatopoese und dadurch auch in der Entwicklung von bösartigen Erkrankungen wie AML und MDS übernimmt.

Frühere Studien haben gezeigt, dass FLT3-Mutationen in manchen AML-Patienten vorliegen, die eine Relevanz für die Überlebenswahrscheinlichkeit dieser Patienten besitzen (Fathi and Chabner 2011). Ca. 20-30 % der AML-Patienten weisen eine solche FLT3-Mutation auf, die mit einer konstanten Aktivierung des Rezeptors und dadurch einer unkontrollierten Blastenproliferation einhergehen. Diese Patientengruppe ist klinisch durch eine schlechtere Prognose und eine erhöhte Rückfallquote gekennzeichnet (Frohling, Scholl et al. 2007, Hassanein, Almahayni et al. 2016).

Mutationen im FLT3-Rezeptor gehören zu den ersten genetischen Aberrationen, die im Zusammenhang von AML und Prognose beschrieben worden sind (Williams, Kambhampati et al. 2013). Insgesamt sind bisher zwei FLT3-Mutationen bekannt, die in AML-Patienten vorkommen: FLT3-ITD- und FLT3-TKD-Mutationen, wobei die zweite Gruppe eher selten ist.

FLT3-ITD-Mutationen sind häufiger vorzufinden und sind in der Modulation von Proliferation, in der Differenzierung und im Überleben von AML-Zellen bedeutsam. Diese Mutationen präsentieren sich als sehr aggressiv und sind mit einer deutlichen Leukozytose verbunden. FLT3-Mutationen kommen nach der FAB-Klassifikation in Patienten mit AML Subtyp M3 oder M5 vor (Hassanein, Almahayni et al. 2016).

Verschiedene Studien haben PKC412 als potenten Tyrosin-Kinase-Inhibitor identifiziert, der in der Lage dazu ist, die Kinaseaktivität von sowohl WT-FLT3- als auch FLT3-ITD- sowie FLT3-TKD-Rezeptoren in AML-Patienten zu beeinträchtigen. Durch FLT3-Inhibition ist es PKC412 möglich, die Signaltransduktion zu hemmen und Apoptose durch Zellarrest zu induzieren (Williams, Kambhampati et al. 2013).

Eine Kombinationstherapie aus Chemotherapeutika und Midostaurin ist Gegenstand diverser Forschungen gewesen. Die Kombination von PKC412 und Ponatinib hat z.B. eine Blockade diverser anti-apoptotischer Kinasen wie p-KIT, p-Lyn und p-STAT5 zur Folge, was in einer Wachstumsinhibition und Apoptose in HMC-1 Zellen (human mast cell leukemia cells) resultiert (Gleixner, Peter et al. 2013).

Cooper et al. sowie Strati et al. haben sich ebenfalls mit den synergetischen Effekten von PKC412 und Zytostatika befasst: In zwei Studien aus dem Jahre 2015 wurde die Kombination aus PKC412 und Azacitidin im Rahmen der Induktionstherapie von unbehandelten älteren AML-Patienten und AML-Patienten mit einem Relaps angewandt. Es zeigte sich, dass die Kombination dieser beiden Medikamente von den Patienten gut vertragen wurde und als Ergebnis eine zytotoxisch bedingte Blastenreduktion festgestellt werden konnte. Allerdings ist diese Kombination nur für jene Patienten vorteilhaft, welche bisher noch nie mit FLT3-Inhibitoren behandelt wurden, außerdem für solche Patienten, die von der Standard-Induktionstherapie nicht profitieren (Cooper, Kindwall-Keller et al. 2015, Strati, Kantarjian et al. 2015).

## **1.7 Fenretinide**

### **1.7.1 Herstellung, Eigenschaften und Anwendung**

Seit einiger Zeit ist in der Fachwissenschaft bekannt, dass Retinoide regulatorisch auf Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose wirken und einhergehend damit über tumorpräventive Eigenschaften verfügen (Hursting, Shen et al. 2002). Bei Fenretiniden (auch bekannt als N-(4-hydroxyphenyl) retinamide oder 4-HPR) handelt es sich um synthetisch hergestellte Vitamin A Derivate, die als weniger toxische Analoga der all-trans Retinsäure interagieren (Veronesi, De Palo et al. 1999).

Frühere Studien konnten aufzeigen, dass 4-HPR in der Lage ist, das Zellwachstum in Tumorzellen zu hemmen und durch mehrere verschiedene Mechanismen Apoptose in solchen Zellen zu induzieren (Tiberio, Cavadini et al. 2010).

Eine breite Anwendung findet 4-HPR heute vor allem in der Therapie maligner Erkrankungen, allerdings kommt es ebenso im Rahmen der Behandlung von Mukoviszidose, rheumatologischen Erkrankungen oder Psoriasis zum Einsatz.

### 1.7.2 Wirkungsweise

Die genaue Wirkungsweise von 4-HPR insbesondere in Bezug auf Krebserkrankungen wurde in diversen Studien erforscht. Sie haben den Beleg dafür erbringen können, dass 4-HPR auf verschiedenen Wegen Apoptose in malignen Zellen induzieren kann. Dazu gehören die Aktivierung von nukleären Retinoidrezeptoren, Akkumulation von ROS, Ceramid-induzierte Apoptose, der Verlust von mitochondrialem Transmembranpotential sowie die Triggerung von mitochondrialen Caspase-Kaskaden (Jiang, Pan et al. 2011). Ferner ist bereits dokumentiert, dass 4-HPR einige Stammzell-assoziierten Signalwege hemmen kann, die für das Überleben von malignen Stammzellstellen essentiell sind. Hierzu zählen unter anderem NF- $\kappa$ B, c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und extrazellulär regulierte Kinase (ERK) (Wu, DiPietrantonio et al. 2001, Shimada, Nakamura et al. 2002, Zhang, Mi et al. 2013).

Angesichts des Umstandes, dass Fenretinide als potente Vitamin A Derivate fähig sind, LSCs zu zerstören und dabei die physiologischen hämatopoetischen Zellen zu schonen, wurde in einer Studie von Zhang et al. die Interaktion zwischen 4-HPR und CD34<sup>+</sup> AML Zellen in den Fokus gerückt. Die Ergebnisse dieser Studie stützen die Aussage, dass 4-HPR einen zytotoxischen Effekt auf CD34<sup>+</sup> AML Zellen besitzt, insbesondere betroffen war in der Studie die LSC-reiche CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> Zellpopulation, wobei die gesunden HSCs nicht signifikant beeinträchtigt wurden. Infolgedessen wurden Fenretinide als potente Mittel identifiziert, die dazu genutzt werden können, LSCs selektiv zu attackieren, wodurch sie einen hohen Stellenwert in der Therapie von AML erlangen konnten (Zhang, Mi et al. 2013).

Allerdings wurde im Laufe der Jahre klar, dass 4-HPR je nach Zelltyp unterschiedliche Apoptosemechanismen aktivieren kann. Selbst innerhalb der einzelnen AML Zelllinien wird die Apoptose auf unterschiedliche Art und Weise getriggert (Jiang, Pan et al. 2011). Ozpolat et al. zeigten hierzu bereits im Jahre 2003, dass 4-HPR die Proliferation in HL-60 AML-Zellen durch die Aktivierung von nukleären Retinoidrezeptoren unterdrücken kann. Der exakte

Mechanismus des supprimierten Zellwachstums bleibt jedoch bis dato unklar (Ozpolat, Tari et al. 2004).

Morad et al. haben sich ebenfalls mit den 4-HPR-induzierten Apoptosemechanismen in AML Zelllinien befasst, darunter auch KG-1, HL-60 und HL-60/ VCR Zelllinien. Sie haben den Beweis dafür erbringen können, dass in diesen Zelllinien eine Apoptose auch durch die Ceramidproduktion und Akkumulation von ROS induziert werden konnte. Der grundlegende Gedanke lautet diesbezüglich, dass Fenretinide Ceramide bilden können, indem sie ihre de novo Synthese aktivieren oder aber eine SMase aktivieren, die in ihrer Funktion als DNase für den Abbau von Sphingolipid in Phosphocholin und Ceramide zuständig ist. Auf diesem Wege wurde eine zytotoxische Reaktion in den malignen Zelllinien erzielt (Morad, Davis et al. 2015).

## 1.8 Zielsetzung und Fragestellung

Akute Leukämien repräsentieren eine sehr häufige maligne Erkrankung sowohl im Kindes- als auch Erwachsenenalter. In diese Kategorie fällt auch die AML, die durch einen ausgesprochen aggressiven Verlauf, hohe Rezidivraten und schlechte Prognose gekennzeichnet ist. Ungeachtet der Tatsache, dass während der vergangenen Jahre große Fortschritte in der Therapie der AML realisiert werden konnten, kommt es bei vielen Patienten doch weiterhin zu einem Rückfall. Forscher gehen davon aus, dass der Ausgangspunkt für einen solchen Relaps nach erfolgter zytostatischen Chemotherapie leukämische Stammzellen sind, die durch die Behandlung nicht vollständig eradiziert werden konnten. Daher wird nach wie vor nach potenten Mitteln geforscht, die leukämische Zellen mit Stammzeleigenschaften selektiv sowie effizient angreifen können.

KG-1a stellt eine humane promyeloide leukämische Zelllinie aus der Reihe der AML dar, deren Zellen nicht mehr in der Lage sind, zu reifen Granulozyten und Makrophagen zu differenzieren. Ziel der vorliegenden Ausarbeitung ist es vor diesem Hintergrund, den Anteil an unreifen KG-1a Zellen mit Stammzeleigenschaften durchflusszytometrisch zu bestimmen. Diese werden als SP Zellen bezeichnet und gehören dadurch zu den LICs. Insbesondere gilt es ihr Ansprechen auf Medikamentensubstanzen zu untersuchen, die als potenzielle AML-Therapeutika fungieren. Genauer wurden die Auswirkungen von vier Substanzen (Curcumin, Salinomycin, Midostaurin und Fenretinide) auf die Stammzellpopulation der Zelllinie KG-1a in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (24, 48 und 72 Stunden) und Konzentrationsmenge der jeweiligen Substanz untersucht.

Hauptziel der Untersuchungen war die Beantwortung der Frage, ob es eine Korrelation zwischen der Frequenz der SP Zellen der Zelllinie KG-1a und der Behandlungskonzentration sowie Behandlungsdauer der vier Substanzen gibt und wie die potenzielle therapeutische Konsequenz aussieht, die daraus resultiert.

## 2 Material und Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden Zellen der Zelllinie KG-1a kultiviert und im Anschluss daran mit vier potenziellen therapeutischen Medikamentensubstanzen behandelt: Curcumin, Salinomycin, Midostaurin und Fenretinide. Folgend wurde der Anteil an unreifen SP-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Materialien und Methoden, die zu diesem Zweck benutzt wurden, werden im Nachstehenden ausgeführt.

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und allgemeine Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Geräte und Verbrauchsmaterialien \*

Material	Hersteller
Beheizbares Wasserbad	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Dtl.
Blutanalysegerät ABX Micros CRP	Axonlab AG, Reichenbach an der Fils, Dtl
Durchflusszytometer BD LSR II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Dtl.
FACS-Röhrchen 5 ml, Rundboden Inkl. Röhrchenabdeckungen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Dtl.
Falcon-Röhrchen Cellstar Tubes 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Dtl.
Filter-tip Pipettenspitzen FT 10, FT 20, FT 100, FT 1000	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Dtl.

Feinwaage Typ AC 210 S-001	Sartorius AG, Göttingen, Dtl.
Gefrierschrank (-23 °C)	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Dtl.
Gefrierschrank (-80 °C) -86 °C Freezer	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Dtl.
Inkubator HERAcell	Heraeus GmbH, Hanau, Dtl.
Kanülen BD Microlance 3 18Gx1,5''	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Dtl.
Kryoröhrchen CRYO S 2,0 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Dtl.
Mikroskop CX 40	Olympus AG, Shinjuku, Tokio, Japan
Milli-Q Biocel Wasseraufbereitungssystem	Millipore GmbH, Schwalbach, Dtl.
Neubauerkammer Improved	Karl Hecht GmbH + Co. KG „Assistent“, Sondheim, Dtl.
Pipetten verstellbar 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Glison International, Limburg, Dtl.
Pipettenspitzen 10 µl, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Dtl.
Pipettenspitzen 20 µl, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Dtl.

---

Pipettenspitzen 100 µl, gelb	Sarstedt AG + Co., Nümbrecht, Dtl.
Pipettenspitzen 200 µl, gelb	Sarstedt AG + Co., Nümbrecht, Dtl.
Pipettenspitzen 1000 µl, blau	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Dtl.
Pepettiergerät Pipetboy acu	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Dtl.
Pipetiergerät Pipetboy Plus	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Dtl.
Safe-Lock-Tubes 0,5 ml, 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Dtl.
Spitzen, steril 2 ml, 5 ml, 10 ml	Braun GmbH, Kronberg/Taunus, Dtl.
Sterile Plastikpipetten 1 ml, 2 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning Costar GmbH, Bodenheim, Dtl.
Sterile Werkbank HERAsafe	Heraeus GmbH, Hanau, Dtl.
Umluftgewerbekühlschrank (4 °C)	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Dtl.
Vortexer MS1 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Dtl.
Zellkulturflaschen CellStar 50 ml, 250 ml, 550 ml, roter Filterverschluss	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Dtl.

---

Zentrifuge Rotixa RP	Andreas Hettich GmbH + Co. KG, Tuttlingen, Dtl.
Zentrifuge Rotixa 50 RS	Andreas Hettich GmbH + Co. KG, Tuttlingen, Dtl.
6-well Tissue Culture Plate	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Dtl.

\*Modifiziert nach (Mattes 2016)

Tabelle 3: Allgemeine Chemikalien\*

Chemikalie	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Dtl.
Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
FACS Flow	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Dtl.
FACS Clean	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Dtl.
FACS Rinse	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Dtl.
Fötales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert (30 Minuten bei 50 °C)	Biochrom AG, Berlin, Dtl.
(4-(3-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Biochrom AG, Berlin, Dtl.

L-Glutamin 200 mM	Biochrom AG, Berlin, Dtl.	
Penicillin/Streptomycin 10000 U / ml	Biochrom AG, Berlin, Dtl.	
Phosphatpuffersatzlösung (PBS)	Lonza Group AG, Basel, Schweiz	
RPMI 1640 (Rosewell Park Memorial Institute)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze, Dtl.	Laborchemikalien
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze, Dtl.	Laborchemikalien

\*Modifiziert nach (Mattes 2016)

Tabelle 4: Potenzielle Therapeutika

<b>Therapeutikum</b>	<b>Hersteller</b>	
Curcumin (mit sterilem DMSO auf 1,0 µM, 2,5 µM, 5,0 µM, 10,0 µM, 15,0 µM verdünnt)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze, Dtl.	Laborchemikalien
Salinomycin (mit sterilem DMSO auf 1,0 µM, 2,0 µM, 5,0 µM, 10,0 µM verdünnt)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze, Dtl.	Laborchemikalien
Midostaurin (mit sterilem DMSO auf 100 nM, 150 nM, 200 nM, 300 nM, 500 nM verdünnt)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze, Dtl.	Laborchemikalien
Fenretinide (mit sterilem DMSO auf	Sigma-Aldrich	Laborchemikalien

1,0 µM, 2,5 µM, 5,0 µM, 10,0 µM GmbH,  
verdünnt) Seelze, Dtl.

---

### 2.1.2 Stammlösungen

- Zellkulturmedium:  
500 ml RPMI 1640  
+ 100 ml 20 % FCS (inaktiviert bei 56 °C für 30 Minuten)  
+ 5 ml 1 % L-Glutamin 200 mM  
+ 5 ml 1 % Penicillin/Streptomycin
- DMEM-Stammlösung:  
500 ml DMEM  
+ 10 ml 5 % HEPES  
+ 50 ml 10 % FCS  
+ 5 ml 1 % L-Glutamin 200 mM  
+ 5 ml 1 % Penicillin/Streptomycin

### 2.1.3 Stammzellreagenzien

Tabelle 5: Reagenzien zur Bestimmung von SP\*

Reagenz	Hersteller	
Hoechst 33342 (mit sterilem Wasser auf 1 mg/ml verdünnt)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze, Dtl.	Laborchemikalien
Verapamil (mit Alkohol auf 10,0 mM)	Sigma-Aldrich	Laborchemikalien

---

---

verdünnt) GmbH,  
Seelze, Dtl.

---

\*Modifiziert nach (Mattes 2016)

Tabelle 6: Lebend-Tot-Marker\*

---

<b>Marker</b>	<b>Hersteller</b>
Propidium Iodid (PI, mit PBS (1x) auf 200 µg/ml verdünnt)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Dtl.

---

\*Modifiziert nach (Mattes 2016)

#### 2.1.4 Software zur Auswertung

Tabelle 7: EDV-Software

---

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
FACS Diva Software Version 6.1.3	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Dtl.
SPSS	IBM Company GmbH, Armonk, North Castle, New York, Vereinigte Staaten

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Unter einer Zellkultur wird die Kultivierung von Zellen verstanden, die unabhängig vom ursprünglichen Zellverband unter In-vitro-Bedingungen in einem entsprechenden Nährmedium außerhalb des Organismus` gezüchtet werden. Zwei wichtige Punkte sind hierbei zu beachten: Zum einen müssen aus wenigen Zellen viele Populationen entstehen, zum anderen müssen diese Populationen von Zellen über mehrere Generationen hinweg am Leben erhalten werden (Gstraunthaler and Lindl 2013).

In diesem Zusammenhang ist zwischen Primärkultur und Sekundärkultur zu differenzieren. Unter einer Primärkultur versteht man die In-vitro-Heranzüchtung von Zellen, die direkt aus dem Organismus entstammen. Erst dann, wenn aus dieser Primärkultur eine Subkultur entnommen wird, die weiter am Leben erhalten wird, spricht man von einer Sekundärkultur (Gstraunthaler and Lindl 2013). Eine weitere Subkultivierung von Zellstämmen, die aus der ursprünglichen Primärkultur entstammen, wird folgend als Zelllinie bezeichnet (Schmitz 2007).

Anhand einer Reihe verschiedener Eigenschaften lassen sich Zellkulturen weiter in einerseits permanente Kulturen, die unbegrenzt weiter kultiviert werden können, und andererseits in finite Kulturen unterschieden, die nur zeitlich begrenzt herangezüchtet werden können. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit werden ausschließlich permanente Zellkulturen der Zelllinie KG-1a verwendet, die aus dem Knochenmark eines 59-jährigen AML Patienten (FAB M0) isoliert wurden. Diese Zellen haben wir bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) erworben. Aufgrund der Tatsache, dass hämatopoetische Zellen vorzugsweise in Suspension wachsen, sich nicht an ein Substrat oder einer Oberfläche anheften, ferner keine Kontaktinhibition zeigen sowie vorzugsweise frei zirkulieren (Schmitz 2007), haben wir für unsere Zwecke ausschließlich Suspensionskulturen eingesetzt.

Zur Versorgung der herangezuchteten leukämischen Zellen mit ausreichend Nährstoffen, die für das unmittelbare Überleben und verlängerte Weiterleben der Zellen essenziell sind, haben wir uns für das Medium RPMI 1640 entschieden. Dieses Medium wurde erstmalig von Moore und seinen Mitarbeitern für das Wachstum von Leukämiezellen in einer Suspensionskultur entwickelt (Schmitz 2007). Bestandteile des Mediums sind D-Glukose und Bikarbonat. Wir haben das Medium zusätzlich mit FCS, L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin supplementiert. FCS wird aus ungeborenen Rinderfeten gewonnen und enthält Wachstumsfaktoren, Hormone, Cytokine, Aminösauren sowie Vitamine, wodurch es als optimale Nährstoffquelle für In-vitro-Heranzüchtung von Zellen fungiert (Schmitz 2007). Um im Serum eventuell enthaltene Komplementfaktoren zu inaktivieren, wurde das FCS 30 Minuten lang in 56 °C inkubiert. Ob dieser Vorgang tatsächlich unerlässlich ist, gilt allerdings als umstritten (Schmitz 2007).

Abgesehen von Nährstoffen braucht eine Zellkultur zusätzlich eine Energiequelle, da Zellen mit einer hohen Zellteilungsrate einen dementsprechend hohen Energiebedarf aufweisen. Bedingt dadurch haben wir dem RPMI Medium zusätzlich L-Glutamin zugefügt. Glutamin zählt zu den für den Menschen nicht essenziellen Aminosäuren und fungiert im Organismus als universeller Stickstoff-Donor. Jedoch geht mit Glutamin ein Nachteil einher: Es bleibt bei 37 °C nicht lange in der Kultur stabil und wird abgebaut. Folglich hat sich die Zugabe von 1 % L-Glutamin (200 mM) bewährt. In dieser Form ist Glutamin bei einer Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4 °C bis zu vier Wochen haltbar und kann bedenkenlos dem Nährmedium zugefügt werden (Schmitz 2007).

Zu guter Letzt haben wir dem RPMI Medium 1 % Penicillin/Streptomycin zugefügt. Ziel dieser prophylaktischen Maßnahme ist vor allem die Reduktion von bakteriellen Kontaminationen. Penicillin ist ein bakterizid wirkendes  $\beta$ -Laktam Antibiotikum, das die bakterielle Zellwandsynthese hemmt. Streptomycin gehört dagegen zu den Aminoglykosid-Antibiotika und verhindert das Bakterienzellwachstum mittels Inhibition der bakteriellen Translation.

Aufgrund der Kombination aus Penicillin und auch Streptomycin werden sowohl gram-positive als auch gram-negative Erreger abgedeckt.

Die Kultivierung und Aufbewahrung der für unsere Fragestellung verwendeten KG-1a Zellen erfolgte entsprechend der Herstellerangaben in 50 ml bis 250 ml Zellkulturflaschen bei 37,0 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem dazu geeigneten Inkubator.

Zur Gewährleistung optimaler Bedingungen für das Zellwachstum ist ein regelmäßiges Passagieren notwendig. Das Passagieren einer Zellkultur meint die Subkultivierung von Zellen, indem ein Teil des Kulturbestands entfernt und ein entsprechendes Volumen an frischem Medium zugefügt wird. Auf diese Art und Weise werden auf der einen Seite die von den Zellen metabolisierten Abfallstoffe entfernt und auf der anderen wird die Zellkultur auf diejenige Zelldichte reduziert, welche für das weitere Wachstum der Zellen förderlich ist. Dies entspricht einer Zelldichte von  $0,5 \times 10^6$ /ml für Zellen der Zelllinie KG-1a. Außerdem gilt zu beachten, dass einige Medium-Zusatzstoffe wie z.B. L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin bei 37,0 °C lediglich begrenzt stabil sind und in regelmäßigen Abständen ausgewechselt werden sollten (Schmitz 2007). Daher haben wir alle zwei bis drei Tage die Kultur passagiert. Vor jeder Passage wurde die jeweilige Zellzahl der Zellkultur entweder elektronisch mittels Blutanalysegerät ABX Micros CRP oder manuell anhand der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Ziel dieses Vorgangs war es, für das Zellwachstum der Zelllinie KG-1a eine exakte Zelldichte zu erreichen.

### **2.2.2 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie – oder spezifischer die eigenschaftsbezogene Sortierung von ausgewählten Zellen, auch als FACS bekannt (Fluorescence-activated cell sorting) – ist ein Messverfahren, das eine präzise quantitative Analyse sowie molekulare Charakterisierung von Zellen zulässt (Sack, Tarnok et al. 2007). Dabei handelt es sich um eine synchrone Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenzsignalen von Zellen, die senkrecht an einer Lichtquelle vorbeigeführt werden (Sack, Tarnok et al. 2007). Beim Durchtritt

durch den fokussierten Laserstrahl werden das Streu- und Fluoreszenzlicht abhängig von den jeweiligen Zellmerkmalen separat detektiert.

Solange der Laserstrahl ohne jegliche Behinderung durch die Zelle dringen kann, entsteht kein Streulicht. Sobald aber eine Zelle den Laserstrahl durchquert, wird das Licht in verschiedene Richtungen gestreut und kann gemessen werden. Messgrößen, die dabei eine wichtige Rolle spielen, sind das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht. Als Vorwärtsstreulicht (FCS, forward scatter, Streulicht in Richtung des ursprünglichen Strahls) wird der Anteil an Streulicht bezogen auf einen flachen Winkel zum Laserlicht bezeichnet. Dieser ist abhängig von der Form und Größe der einzelnen Zellen der Suspension. Hieraus ist zu folgern, dass kleine Zellen ein geringeres FCS-Signal erzeugen und große Zellen ein größeres. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, side scatter, Streulicht senkrecht zum ursprünglichen Strahl) meint dagegen den Anteil an Streulicht rechtwinklig zum Laserlicht und ist abhängig von der Granularität sowie Binnenstruktur der zu analysierenden Zellen (Sack, Tarnok et al. 2007). Weist die Zelle viele Binnenstrukturen und ein hohes Maß an Komplexität auf, entsteht bei der Messung ein großes SSC-Signal – und umgekehrt, wenn sich in der Zelle nur wenige Binnenstrukturen finden. Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass je größer eine Zelle ist und je mehr Binnenstrukturen vorhanden sind, desto größer ist auch das bei der Messung entstehende Streulicht.

Die Fluoreszenzsignale, die von den Zellen in sämtliche Richtungen ausgestrahlt werden, werden ebenfalls senkrecht zum Laserstrahl detektiert. Zu diesem Zweck werden die zu analysierenden Zellen vorab mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen behandelt, die spektral unterschiedliche Lichtsignale ausstrahlen. Sie werden mittels Photomultiplier (PMT) detektiert (Sack, Tarnok et al. 2007). Photomultiplier sind Elektronenröhren, die in der Lage sind, das detektierte Licht durch Verstärkung in elektrische Signale umzufraktionieren. Die elektrischen Signale werden zusammen mit allen Messwerten der einzelnen gemessenen Zellen dementsprechend digitalisiert in einen Datenspeicher eingegeben und können zu einem späteren Zeitpunkt ausgewertet werden

(Sack, Tarnok et al. 2007). Auf diese Art und Weise kann die Analyse der Messergebnisse unter verschiedenen Fragestellungen vorgenommen werden.

Bedingt durch den Sachverhalt, dass mit diesem Verfahren eine synchrone Bestimmung mehrerer Merkmale umgesetzt werden kann (Kentrou, Tsagarakis et al. 2011) und dadurch pro Sekunde Tausende von Zellen analysiert werden können, ist eine statistische Auswertung der Messergebnisse ebenfalls durchführbar (Sack, Tarnok et al. 2007).

### **2.2.2.1 Aufbau des FACS-Gerätes und Messung**

Grundsätzlich besteht jedes FACS-Gerät aus einem Flüssigkeitssystem, das die in der Flusskammer platzierten Messproben an einem Laserstrahl vorbeiführt (Abb. 2). In der Flusskammer trifft der Laserstrahl auf die zu analysierenden Zellen, wodurch wiederum Streu- und Fluoreszenzlicht entstehen. Mit dem Einsatz von integrierten Spiegeln und Filtern kommt es zu einer Trennung nach der Wellenlänge. Dabei ist die richtige Filterkombination besonders entscheidend: Wird aufgrund einer falschen Filterauswahl das Emissionsspektrum der fluoreszierenden Substanzen (auch Fluorochrome genannt) eingegrenzt, so ist das entstehende Signal zu schwach. Im umgekehrten Fall eines zu breiten Messbereichs wird das entstehende Signal durch die Streustrahlung anderer Fluorochrome verfälscht.

Die nachfolgenden Abb. 3 und 4 illustrieren die Filterkombination, die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendet wurde.

Nachdem Streu- und Fluoreszenzlicht das Filtersystem passiert haben, werden beide Lichter den unterschiedlichen Detektoren zugeführt. Diese Detektoren erfüllen die Aufgabe, die Signale von Fluorochromen aufzufangen, die vom Laser angeregt werden. Die Antwort auf die Frage, welche Fluorochrome verwendet werden können, ist abhängig von der Ausstattung des Durchflusszytometers, der zum Einsatz kommt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ausschließlich der Durchflusszytometer LSR II verwendet, der mit den folgend genannten Lasern ausgestattet ist:

- UV Laser mit 355 nm Wellenlänge

- Blauer Laser mit 488 nm Wellenlänge
- Roter Laser mit 633 nm Wellenlänge
- Violetter Laser mit 405 nm Wellenlänge

Durch diese umfangreiche Laserausstattung wird ein breites Analysespektrum gewährleistet.

Zum Schluss werden die von den Detektoren aufgefangenen Signale in elektrische Signale umgewandelt und können zu einem späteren Zeitpunkt ausgewertet werden.

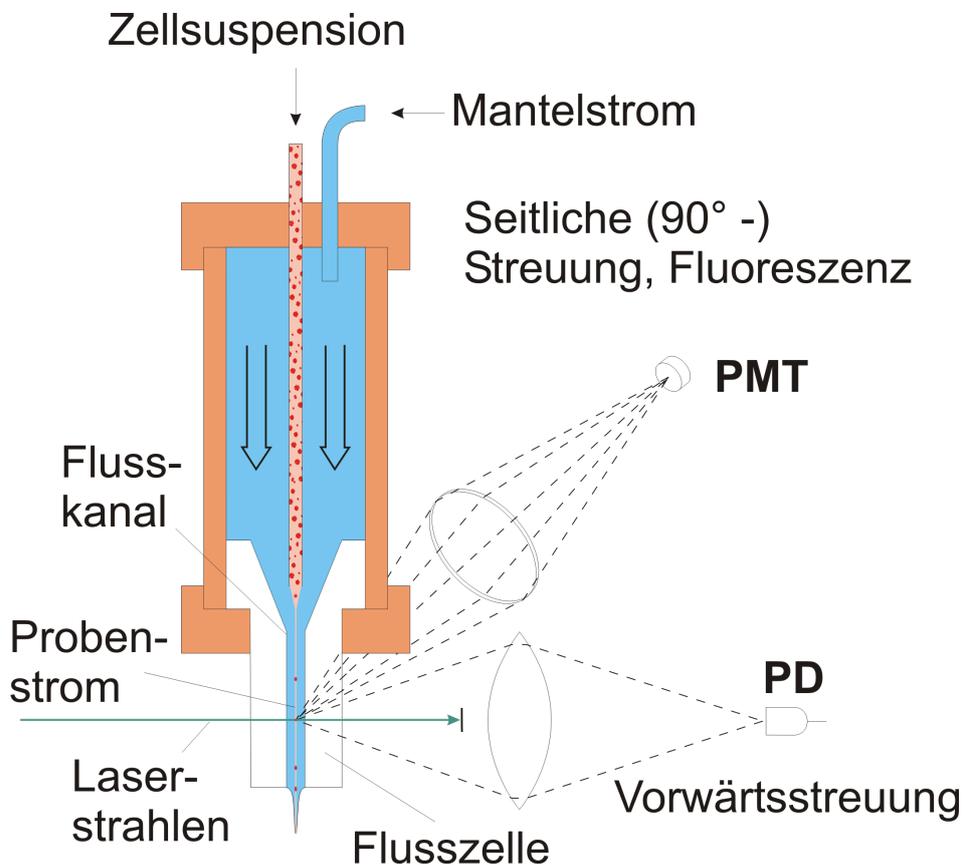


Abb. 2: Aufbau eines Durchflusszytometers

Über das Flüssigkeitssystem wird die Zellsuspension in die Flusszelle transportiert und dort hydrodynamisch fokussiert. Hiermit treffen die Laserstrahlen stets auf exakt eine einzelne Zelle. Das beim Durchtritt durch die fokussierten Laserstrahlen entstehende Streu- und Fluoreszenzlicht wird zu verschiedenen Detektoren (PMT, PD) geleitet, wo es wiederum in elektrische Signale umgewandelt wird. Abkürzungen: PMT: Photomultiplier tube, PD: Photo diode.

Quelle: (Kammel, Kummrow et al. 2012)

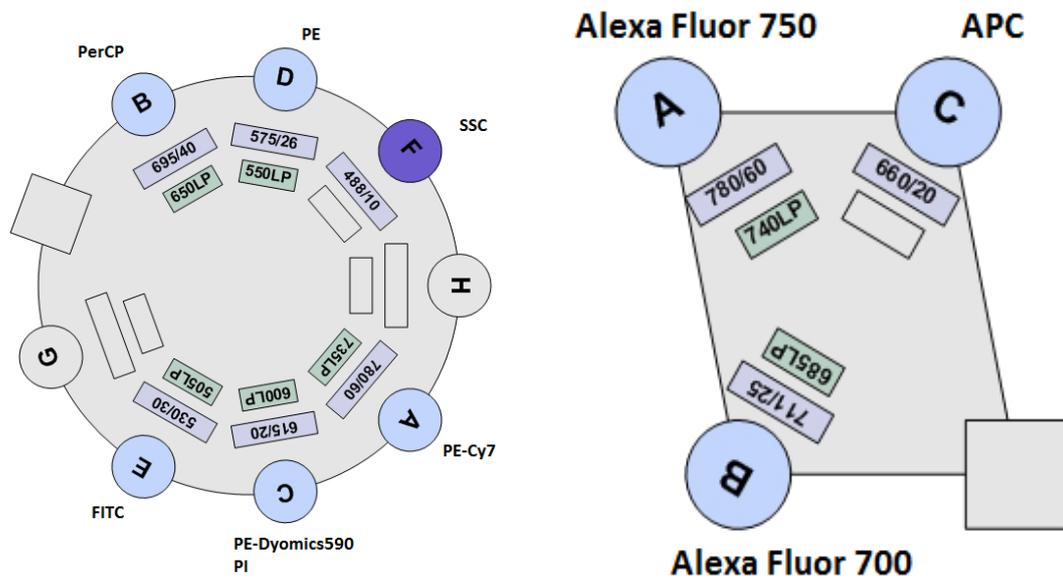


Abb. 3: Konfiguration des blauen (links) und roten Lasers (rechts)

Das gestreute Licht passiert zunächst das Filtersystem und wird daraufhin den entsprechenden Detektoren zugeführt (in der Reihenfolge A bis H bzw. A bis C). Abkürzungen PerCP: Peridin Chlorophyll, PE: Phycoerythrin, SSC: side scatter, PI: Propium Iodid, FITC: Fluoreszeinisothiozyanat, LP: Langpassfilter

Quelle: BD FACSDiva Software Reference Manual

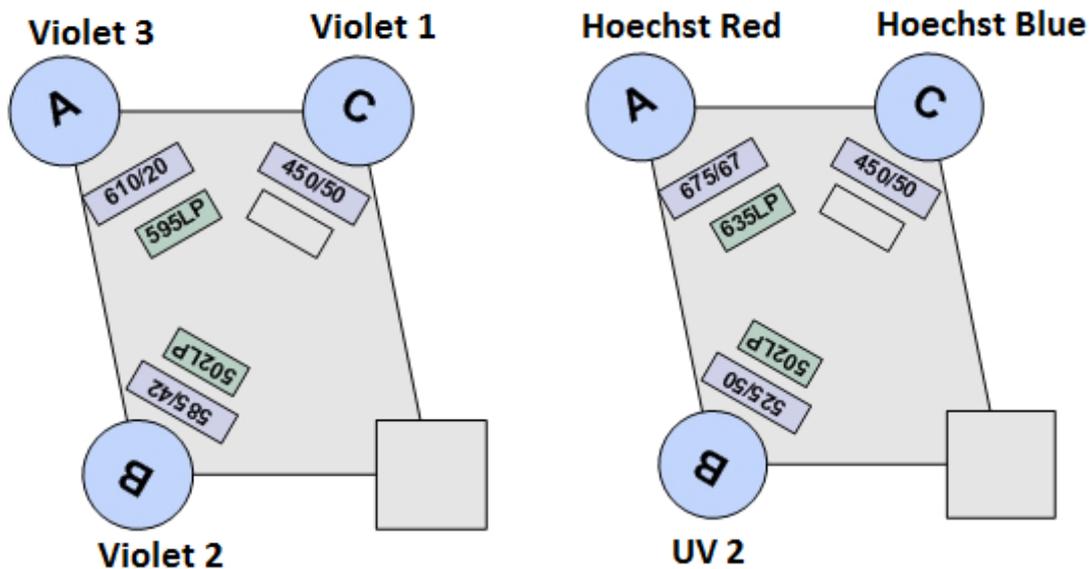


Abb.4: Konfiguration des violetten (links) und UV-Lasers (rechts)

Das gestreute Licht passiert zuerst das Filtersystem und wird anschließend den entsprechenden Detektoren zugeführt (in der Reihenfolge A bis H bzw. A bis C). Abkürzungen PerCP: Peridin Chlorophyll, PE: Phycoerythrin, SSC: side scatter, PI: Propium Iodid, FITC: Fluoreszeinisothiozyanat, LP: Langpassfilter

Quelle: BD FACSDiva Software Reference Manual

### **2.2.2.2 Kompensation und Kalibrierung**

Die zur Färbung der Zellen eingesetzten Farbstoffe weisen spektrale Überschneidungen auf. So können beispielweise Fluoreszenzsignale an mehreren Detektoren aufgefangen werden, obgleich es sich bei der Messung um eine Zelle handelt, die allein mit einem Farbstoff markiert wurde (Sack, Tarnok et al. 2007). Dieser Umstand legt nahe, dass aufgrund der Tatsache, dass die eingesetzten Filter nicht alle spektrale Überlappungen von Farbstoffen beseitigen können, eine Korrektur der Messergebnisse durch Kompensation erforderlich ist.

Es existieren dabei zwei Möglichkeiten, wie eine Kompensation realisiert werden kann. Zum einen kann vor der Digitalisierung und Speicherung der Messergebnisse eine prozentuale Korrektur stattfinden. Damit ist aber die Gefahr verbunden, dass eine fehlerhaft durchgeführte Kompensation zu nicht mehr korrigierbaren verfälschten Messergebnissen führen kann. Zum anderen ist es möglich, die erworbenen Messwerte hochauflösend zu digitalisieren und unkompensiert zu speichern. Hierbei erfolgt die Kompensation mittels einer Software während der Re-Analyse der Messergebnisse und sie können jederzeit korrigiert werden (Sack, Tarnok et al. 2007).

Um vergleichbare Messergebnisse zu erhalten, haben wir in regelmäßigen Abständen ebenfalls eine Kalibrierung des LSR-Geräts durchgeführt. Diese erfolgte nach Anleitung der FACS Diva Software. Die dabei verwendeten Compensation Beads sind das Produkt der Becton Dickinson GmbH. Unter Beads fasst man kleine Kunststoffpartikel, die mit fluoreszierenden Farbstoffen gefärbt werden können. Im Gegensatz zu anderen Zellen verfügen diese Beads über konstante Eigenschaften wie eine hohe Intensität der Fluoreszenz, zeitliche Stabilität und Gleichmäßigkeit des Labelings, womit sie sich optimal für die Kalibrierung eignen (Sack, Tarnok et al. 2007).

### **2.2.2.3 Prinzip der Datenanalyse**

Bedingt durch den geschlossenen Probenstrom und die gleichzeitige Detektion mehrerer Signale entsteht während der Messung ein „Hintergrundrauschen“.

Um die Signale, die aus einer Zelle stammen, herausfiltern zu können, wird während der Datenaufnahme ein sog. „threshold“ oder Schwellenwert definiert. Erst bei Überschreiten eben dieses Schwellenwertes werden die aufgenommene Daten gespeichert. Wenn zum Beispiel der Parameter FCS als führender Parameter bestimmt wird, werden Zellen erst ab einer gewissen Größe detektiert und folglich abgespeichert (Sack, Tarnok et al. 2007).

Die Speicherung der verschiedenen Parameter ist für jede einzelne Zelle in einem passenden Dateiformat umsetzbar. Die darauffolgend durchzuführende Analyse der gewonnenen Messergebnisse erfolgt grundsätzlich unabhängig von der Messung. Ziel der Analyse ist es, Zellpopulationen voneinander zu differenzieren, die im Hinblick auf bestimmte definierte Merkmale ähnliche Eigenschaften aufweisen. Die identifizierten Zellpopulationen können dann eindimensional als Histogramme oder zweidimensional als Dot-Plots (Punktwolkendarstellungen) oder auch Contour-Plots (Höhenliniendarstellungen) dargestellt werden (Sack, Tarnok et al. 2007). Wir haben uns im vorliegenden Fall für die zweidimensionale Darstellung entschieden: Bei dieser zweidimensionalen Darstellung werden Intensitäten von zwei Messparametern einander gegenübergestellt. In einem Dot-Plot erscheinen die einzelnen Zellen dementsprechend als einzelne Punkte an der entsprechenden Position auf der x- und y-Achse. Dies erlaubt es, Schlüsse in Bezug auf die Korrelation der gemessenen Parameter in ihrer Expression zu ziehen. In einem Contour-Plot werden dagegen die gemessenen Parameter je nach Intensität in Form von Höhenlinien aufgetragen. Resultierend daraus eignet sich diese Art von Plots besonders gut für die Darstellung der Heterogenität großer Populationen (Sack, Tarnok et al. 2007).

Schlussendlich ist für die hierarchische Abbildung der Zellen verschiedener Populationen, bei der mehrere Merkmale simultan berücksichtigt werden, eine verschaltete Verknüpfung in Gates notwendig. Einhergehend damit wird eine Eingrenzung von Populationen vorgenommen, die über verschiedene Parameter definiert sind. Um am Ende der Auswertung aller

Behandlungsversuche vergleichbare Ergebnisse vorliegen zu haben, wurden in dieser Doktorarbeit Gates in abgespeicherten Auswertevorlagen verwendet.

### **2.2.3 Hoechstfärbung**

Der Farbstoff Bisbenzimid Hoechst 33342 ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, der Anwendung in der durchflusszytometrische DNA-Analyse findet. Die Hoechst-Färbung ermöglicht durch eine selektive Bindung an AT-reiche DNA-Sequenzen eine quantitative Bestimmung des Anteils an SP-Zellen. Wie schon unter Kapitel 1.2.2 beschrieben wurde, sind einige HSC und SP-Zellen in der Lage, den Hoechst-Farbstoff schneller auszuscheiden als andere. Dies ist ein aktiver biologischer Prozess und beruht auf der Fähigkeit bestimmter Transmembranproteinen, den Farbstoff schneller aus der Zelle herauszupumpen (Goodell, Brose et al. 1996).

In der Folge davon weisen diese Zellen einen niedrigeren Fluoreszenz-Farbstoffgehalt auf und können dadurch durchflusszytometrisch von den restlichen Zellen differenziert werden (siehe Kapitel 1.2.2). Um die verminderte Farbstoffanreicherung auf die Existenz eines solchen Transmembranproteins zu überprüfen, haben wir neben jeder Hoechst-Probe jeweils eine Verapamil-Kontrollprobe untersucht, die zusätzlich zum Hoechst-Farbstoff mit Verapamil behandelt wurde. Verapamil ist ein potenter Inhibitor von P-Glykoprotein, einem Transmembranprotein. Durch eine durch Verapamil hervorgerufene Blockade des Effluxes sind die betroffenen Zellen hierauf nicht mehr dazu fähig, den Hoechst-Farbstoff auszuscheiden (Goodell, Brose et al. 1996) und sie können dadurch eingegrenzt werden. Zu beachten ist allerdings, dass eine exakte Eingrenzung der SP-Zellen unmöglich ist, da die Emissionsintensität von Hoechst durch die Zugabe von Verapamil leicht verändert wird (Mattes 2016).

Die Hoechst-Färbung haben wir gemäß Protokoll nach Goodell et al. in folgender Weise vorgenommen:

1. Vor jeder Hoechst-Färbung wurde die Zellzahl am Blutanalysegerät ABX Micros CRP bestimmt und die benötigte Menge (ca. 8 Millionen) an Zellen geerntet.

2. Die Zellen wurden folgend bei 450 G (1390 Umdrehungen pro Minute) und Raumtemperatur für fünf Minuten zentrifugiert.
3. In einem dritten Schritt wurde der Überstand nach dem Zentrifugieren vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und die Zellen wurden in 2 ml vorgewärmtem DMEM (+ 2 mM Glutamin + 20 mM HEPES + Pen/Strep + 10 % FCS) resuspendiert. Dadurch ergibt sich eine Zellzahl von > 1 Mio. Zellen/ ml.
4. Es wurde nun die Zellzahl der Suspension bestimmt.
5. Jeweils 2 Mio. Zellen in 2 ml DMEM wurden in FACS-Röhrchen überführt.
6. Der aufgetaute Hoechst-Farbstoff wurde in einem Verhältnis von 1:200 auf eine Konzentration von jeweils 5 µl verdünnt und den FACS-Röhrchen zugegeben. Anschließend wurden die Röhrchen gut gemischt.
7. Im siebten Schritt wurden 500 µl der Suspension entnommen und in einem frischen Röhrchen pipettiert (Kontrollprobe). Der Kontrollprobe wurden 2,5 µl Verapamil zugegeben und diese wurde gut gemischt.
8. Daraufhin wurden alle Röhrchen (Hoechst-Proben und Verapamilkontrollen, insgesamt zehn bis zwölf Röhrchen je nach Behandlungsversuch) für 120 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.
9. In regelmäßigen Abständen (15 bis 20 Minuten) wurden die Röhrchen durch Invertieren gemischt, so dass sich der Hoechst-Farbstoff gleichmäßig verteilen konnte.
10. Ca. 15 Minuten vor Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zentrifuge auf 2 °C heruntergekühlt und eine ausreichende Menge an Eis vorbereitet.
11. Nach Ende der Inkubation wurden sämtliche Röhrchen auf Eis gelegt und dort für kurze Zeit zum Abkühlen liegen gelassen.
12. Im Weiteren wurden die Zellen in der vorab abgekühlten Zentrifuge bei 450 G (1390 Umdrehungen pro Minute) und 2 °C für fünf Minuten zentrifugiert.
13. Nach dem Zentrifugieren und der Abnahme des Überstands wurden die Zellen in 2 ml abgekühltem DMEM (+ 2 mM Glutamin + 20 mM HEPES + Pen/Strep + 10 % FCS) resuspendiert.

14. Die Schritte 12 und 13 wurden insgesamt zweimal wiederholt.
15. Nach dem letzten Zentrifugiervorgang wurde der Überstand gut abgekippt und jedem Röhrchen wurde zu den Zellpellets jeweils 1  $\mu$ l PI (200  $\mu$ g/ml) zugegeben.
16. Schlussendlich wurden die Proberöhrchen am LSR II Durchflusszytometer gemessen.

Anmerkung: Soweit nicht anders erwähnt, wurde die Hoechst-Färbung in den oben genannten 16 Schritten durchgeführt. Kam es zu zusätzlichen Vorgängen, so sind diese bei den jeweiligen Behandlungsversuchen ausführlich beschrieben.

#### **2.2.4 Behandlungsversuche mit Curcumin**

Zunächst haben wir die KG-1a-Zellen mit sechs verschiedenen Konzentrationen Curcumin (0,0  $\mu$ M = nur DMSO-Zusatz, 1,0  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 5,0  $\mu$ M, 10,0  $\mu$ M und 15,0  $\mu$ M) behandelt. Die entsprechenden Platten mit behandelten Zellen haben wir jeweils für 24 h, 48 h und 72 h im Brutschrank inkubiert und danach gemäß Protokoll eine Hoechst-Färbung durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.3). Ferner wurden die Zellen anschließend am LSR II Durchflusszytometer beurteilt.

Im Einzelnen haben wir uns bei jedem Behandlungsversuch mit Curcumin an das nachstehende Protokoll gehalten:

- Tag 0 (0 h Behandlungsdauer):
  1. Die Zellzahl der für den Behandlungsversuch vorbereiteten KG-1a-Zellkultur wurde am Blutanalysegerät ABX Micros CRP bestimmt und die benötigte Menge (ca. 8 Millionen Zellen in je sechs 50 ml-Falcon-Röhrchen) an Zellen geerntet.
  2. Die Zellen wurden bei 450 G (1390 Umdrehungen pro Minute) und Raumtemperatur für sieben Minuten zentrifugiert.
  3. Nach dem Zentrifugieren wurde unter sterilen Bedingungen der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Die Zellen wurden in jeweils 16 ml vorgewärmtem Medium (RPMI 1640 + 20 % FCS + Glutamin + Pen/Strep) resuspendiert.

4. Curcumin und DMSO wurden unter sterilen Bedingungen in den entsprechenden Konzentrationen in die einzelnen Falcon-Röhrchen gegeben (Tab. 8).
5. Alle Röhrchen wurden gut invertiert, so dass sich Curcumin und DMSO innerhalb der einzelnen Röhrchen gut gleichmäßig verteilen können.
6. Im Anschluss daran wurden die Platten angesetzt (3 x 6-Well-Platten) und beschriftet.
7. Alle drei 6-Well-Platten wurden für die entsprechende Behandlungsdauer von 24 h, 48 h und 72 h bei 37 °C in den Brutschrank inkubiert.
8. Abschließend wurde ein Hoechst-Ansatz nach Protokoll (siehe Kapitel 2.2.3) für Tag 0 angefertigt und am LSR II Durchflusszytometer beurteilt.

Tabelle 8: Curcumin-Ansätze

<b>CUR-Konzentration</b>	<b>Vol. CUR-Stock (20 mM)</b>	<b>Vol. DMSO (steril)</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>0,0 µM CUR</b> (DMSO-Kontrolle)	-	12 µl DMSO	-
<b>1,0 µM CUR</b>	0,8 µl CUR	11,2 µl DMSO	1:20000
<b>2,5 µM CUR</b>	2 µl CUR	10 µl DMSO	1:8000
<b>5,0 µM CUR</b>	4 µl CUR	8 µl DMSO	1:4000
<b>10,0 µM CUR</b>	8 µl CUR	4 µl DMSO	1:2000
<b>15,0 µM CUR</b>	12 µl CUR	-	1:1333

Auflistung der entsprechenden CUR-Stock- und DMSO-Volumina, die bei einem Suspensionsvolumen von 16 ml benutzt wurden. Abkürzungen: CUR: Curcumin, DMSO: Dimethylsulfoxid

- Tag 1 (24 h Behandlungsdauer), Tag 2 (48 h Behandlungsdauer) und Tag 3 (72 h Behandlungsdauer):

1. Die jeweilige 6-Well-Platte wurde aus dem Inkubator entnommen und die jeweiligen Volumina (ca. 5 ml) wurden in je ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt.
2. Es wurden jeweils 10 µl der jeweiligen Zellsuspensionen entnommen und mit je 10 µl Trypanblau vermischt.
3. Daraufhin wurde eine Zelldichtebestimmung in der Neubauer-Zählkammer realisiert. Ziel dieses Vorgangs ist die genauere Bestimmung von lebenden und toten Zellen in der Suspension.
4. Für die Berechnung der Zelldichte wurde folgende Formel angewendet:

$$\text{Zelldichte} \frac{[1}{\text{ml}]} = \frac{\text{Anzahl der ausgezählten Zellen in allen vier Quadranten} \times \text{Verdünnung} \times 10^4}{4}$$

5. Die restliche Menge an Zellen wurde bei 450 G (1390 Umdrehungen pro Minute) und Raumtemperatur für sieben Minuten zentrifugiert.
6. Danach wurde für alle sechs Röhrchen mit verschiedenen Behandlungskonzentrationen jeweils einen Hoechst-Ansatz gemäß Protokoll nach Goodell et al. (Schritte 3 bis 16, siehe Kapitel 2.2.3) angefertigt.

### 2.2.5 Behandlungsversuche mit Salinomycin

In einem nächsten Schritt haben wir die KG-1a-Zellen mit fünf verschiedenen Konzentrationen Salinomycin (0,0 µM = nur DMSO-Zusatz, 1,0 µM, 2,0 µM, 5,0 µM und 10,0 µM) behandelt. Die entsprechenden Platten mit den behandelten Zellen haben wir jeweils für 24 h, 48 h und 72 h im Brutschrank inkubiert und danach wurde gemäß Protokoll eine Hoechst-Färbung vorgenommen (siehe Kapitel 2.2.3). Im Anschluss daran wurden die Zellen am LSR II Durchflusszytometer beurteilt.

Im Einzelnen haben wir uns bei jedem Behandlungsversuch mit Salinomycin an das nachstehende Protokoll gehalten:

- Tag 0 (0 h Behandlungsdauer):
  1. Die Zellzahl der für den Behandlungsversuch vorbereiteten KG-1a-Zellkultur wurde am Blutanalysegerät ABX Micros CRP bestimmt und die

- benötigte Menge (ca. 8 Millionen Zellen in je sechs 50 ml-Falcon-Röhrchen) an Zellen geerntet.
2. Die Zellen wurden bei 450 G (1390 Umdrehungen pro Minute) und Raumtemperatur für sieben Minuten zentrifugiert.
  3. Nach dem Zentrifugieren wurde unter sterilen Bedingungen der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und die Zellen wurden in jeweils 16 ml vorgewärmtem Medium (RPMI 1640 + 20 % FCS + Glutamin + Pen/Strep) resuspendiert.
  4. Salinomycin und DMSO wurden unter sterilen Bedingungen in den entsprechenden Konzentrationen in die einzelnen Falcon-Röhrchen gegeben (Tab. 9)
  5. Sämtliche Röhrchen wurden gut invertiert, so dass sich Salinomycin und DMSO innerhalb der einzelnen Röhrchen wie gewünscht gleichmäßig verteilen konnten.
  6. Im Anschluss daran wurden die Platten angesetzt (3 x 6-Well-Platten) und beschriftet.
  7. Alle drei 6-Well-Platten wurden für die entsprechende Behandlungsdauer von 24 h, 48 h und 72 h bei 37 °C in den Brutschrank inkubiert.
  8. Anschließend wurde ein Hoechst-Ansatz nach Protokoll (siehe Kapitel 2.2.3) für Tag 0 angefertigt und in bekannter Weise am LSR II Durchflusszytometer beurteilt.

Tabelle 9: Salinomycin-Ansätze

<b>SAL-Konzentration</b>	<b>Vol. SAL-Stock (5 mM)</b>	<b>Vol. DMSO (steril)</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>0,0 µM SAL</b> (DMSO-Kontrolle)	-	32 µl DMSO	-
<b>1,0 µM SAL</b>	3,2 µl SAL	28,8 µl DMSO	1:5000
<b>2,0 µM SAL</b>	6,4 µl SAL	25,6 µl DMSO	1:2500
<b>5,0 µM SAL</b>	16 µl SAL	16 µl DMSO	1:1000

10,0 $\mu$ M SAL	32 $\mu$ l SAL	-	1:500
------------------	----------------	---	-------

Auflistung der entsprechenden SAL-Stock- und DMSO-Volumina, die bei einem Suspensionsvolumen von 16 ml benutzt wurden. Abkürzungen: SAL: Salinomycin, DMSO: Dimethylsulfoxid

- Tag 1 (24 h Behandlungsdauer), Tag 2 (48 h Behandlungsdauer) und Tag 3 (72 h Behandlungsdauer):
  1. Die jeweilige 6-Well-Platte wurde dem Inkubator entnommen und die Volumina (ca. 5 ml) wurden in jeweils ein 15-ml-Falvon-Röhrchen überführt.
  2. Es wurden 10  $\mu$ l der jeweiligen Zellsuspensionen entnommen und mit jeweils 10  $\mu$ l Trypanblau vermischt.
  3. Folgend wurde eine Zelldichtebestimmung in der Neubauer-Zählkammer durchgeführt.
  4. Die restliche Menge an Zellen wurde bei 450 G (1390 Umdrehungen pro Minute) und Raumtemperatur für sieben Minuten zentrifugiert.

Im Weiteren wurde für alle fünf Röhrchen mit verschiedenen Behandlungskonzentrationen je einen Hoechst-Ansatz gemäß Protokoll nach Goodell et al. (Schritte 3-16, siehe Kapitel 2.2.3) angefertigt.

### **2.2.6 Behandlungsversuche mit Midostaurin**

Die Forschung wurde damit fortgeführt, dass wir die KG-1a-Zellen mit sechs verschiedenen Konzentrationen Midostaurin (0,0 nM = nur DMSO-Zusatz, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 300 nM und 500 nM) behandelt haben. Die entsprechenden Platten mit den behandelten Zellen haben wir in analoger Art und Weise für je 24 h, 48 h und 72 h im Brutschrank inkubiert, bevor gemäß Protokoll eine Hoechst-Färbung vorgenommen wurde (siehe Kapitel 2.2.3) und die Zellen anschließend am LSR II Durchflusszytometer beurteilt wurden.

Im Einzelnen haben wir uns bei jedem der Behandlungsversuche mit Midostaurin an folgendes Protokoll gehalten:

- Tag 0 (0 h Behandlungsdauer):

1. Die Zellzahl der für den Behandlungsversuch vorbereiteten KG-1a-Zellkultur wurde am Blutanalysegerät ABX Micros CRP bestimmt und die benötigte Menge (ca. 8 Millionen Zellen in je sechs 50-ml-Falcon-Röhrchen) an Zellen geerntet.
2. Die Zellen wurden im nächsten Schritt bei 450 G (1390 Umdrehungen pro Minute) und Raumtemperatur für sieben Minuten zentrifugiert.
3. Nach dem Zentrifugieren wurde unter sterilen Bedingungen der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und die Zellen wurden in jeweils 17,5 ml vorgewärmtem Medium (RPMI 1640 + 20 % FCS + Glutamin + Pen/Strep) resuspendiert.
4. Midostaurin (PKC412) und DMSO wurden unter sterilen Bedingungen in den entsprechenden Konzentrationen in den einzelnen Falcon-Röhrchen hinzugegeben (Tab. 10)
5. Alle Röhrchen wurden so invertiert, dass sich Midostaurin und DMSO innerhalb der einzelnen Röhrchen gut gleichmäßig verteilen konnten.
6. Im weiteren Schritt wurden die Platten angesetzt (3 x 6-Well-Platten) und beschriftet.
7. Alle drei 6-Well-Platten wurden für die entsprechende Behandlungsdauer von 24 h, 48 h und 72 h bei 37 °C in den Brutschrank inkubiert.
8. Zum Abschluss wurde ein Hoechst-Ansatz nach Protokoll (siehe Kapitel 2.2.3) für Tag 0 realisiert und am LSR II Durchflusszytometer beurteilt.

Tabelle 10: Midostaurin-Ansätze

<b>PKC412-Konzentration</b>	<b>Vol. PKC412-Stock (175 µM)</b>	<b>Vol. DMSO (steril)</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>0,0 nM</b> PKC412 (DMSO-Kontrolle)	-	50,0 µl DMSO	-
<b>100 nM</b> PKC412	10,0 µl PKC412	40,0 µl DMSO	1:1750
<b>150 nM</b> PKC412	15,0 µl PKC412	35,0 µl DMSO	1:1166
<b>200 nM</b> PKC412	20,0 µl PKC412	30,0 µl DMSO	1:875

<b>300 nM</b> PKC412	30 µl PKC412	20,0 µl DMSO	1:583
<b>500 nM</b> PKC412	50 µl PKC412	-	1:350

Auflistung der entsprechenden PKC412-Stock- und DMSO-Volumina, die bei einem Suspensionsvolumen von 17,5 ml benutzt wurden. Abkürzungen: DMSO: Dimethylsulfoxid

- Tag 1 (24 h Behandlungsdauer), Tag 2 (48 h Behandlungsdauer) und Tag 3 (72 h Behandlungsdauer):
  1. Die jeweilige 6-Well-Platte wurde aus dem Inkubator genommen und die jeweiligen Volumina (ca. 5 ml) wurden in je ein 15-ml-Falcon-Röhrchen überführt.
  2. Es wurden jeweils 10 µl der Zellsuspensionen entnommen und mit den schon bekannten 10 µl Trypanblau vermischt.
  3. Im Anschluss wurde eine Zelldichtebestimmung in der Neubauer-Zählkammer durchgeführt.
  4. Die restliche Menge an Zellen wurde bei 450 G (1390 Umdrehungen pro Minute) und Raumtemperatur für sieben Minuten zentrifugiert.
  5. Folgend wurde für sämtliche der sechs Röhrchen mit verschiedenen Behandlungskonzentrationen jeweils ein Hoechst-Ansatz gemäß Protokoll nach Goodell et al. (Schritte 3-16, siehe Kapitel 2.2.3) geschaffen.

### **2.2.7 Behandlungsversuche mit Fenretinide**

Zuletzt haben wir die KG-1a-Zellen mit fünf verschiedenen Konzentrationen Fenretinide (0,0 µM = nur DMSO-Zusatz, 1,0 µM, 2,5 µM, 5,0 µM, 10,0 µM und 15,0 µM) behandelt. Die entsprechenden Platten mit behandelten Zellen haben wir jeweils für 24 h, 48 h und 72 h im Brutschrank inkubiert und danach gemäß Protokoll eine Hoechst-Färbung durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.3) sowie die Zellen am LSR II Durchflusszytometer beurteilt.

Im Einzelnen haben wir bei jedem Behandlungsversuch mit Fenretinide das folgende Protokoll zugrunde gelegt:

- Tag 0 (0 h Behandlungsdauer):

1. Die Zellzahl der für den Behandlungsversuch vorbereiteten KG-1a-Zellkultur wurde am Blutanalysegerät ABX Micros CRP bestimmt und die benötigte Menge (ca. 8 Millionen Zellen in je sechs 50-ml-Falcon-Röhrchen) an Zellen geerntet.
2. Die Zellen wurden weiter bei 450 G (1390 Umdrehungen pro Minute) und Raumtemperatur für sieben Minuten zentrifugiert.
3. Nach dem Zentrifugieren wurde unter sterilen Bedingungen der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und die Zellen wurden in jeweils 17,5 ml vorgewärmtem Medium (RPMI 1640 + 20 % FCS + Glutamin + Pen/Strep) resuspendiert.
4. Fenretinide (4-HPR) und DMSO wurden unter sterilen Bedingungen in den entsprechenden Konzentrationen in die einzelnen Falcon-Röhrchen gegeben (Tab. 11)
5. Alle Röhrchen wurden gut invertiert, so dass sich Fenretinide und DMSO innerhalb der einzelnen Röhrchen gleichmäßig verteilen konnten.
6. Im Anschluss wurden die Platten angesetzt (dreimal 6-Well-Platten) und beschriftet.
7. Alle drei 6-Well-Platten wurden für die entsprechende Behandlungsdauer von 24 h, 48 h und 72 h bei 37 °C in den Brutschrank inkubiert.
8. Den Abschluss bildeten die Anfertigung eines Hoechst-Ansatzes nach Protokoll (siehe Kapitel 2.2.3) für Tag 0 und die Beurteilung am LSR II Durchflusszytometer.

Tabelle 11: Fenretinide-Ansätze

<b>4-HPR-Konzentration</b>	<b>Vol. 4-HPR-Stock (5 mM)</b>	<b>Vol. DMSO (steril)</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>0,0 µM 4-HPR</b> (DMSO-Kontrolle)	-	35 µl DMSO	-
<b>1,0 µM 4-HPR</b>	3,5 µl 4-HPR	31,5 µl DMSO	1:5000
<b>2,5 µM 4-HPR</b>	7 µl 4-HPR	28 µl DMSO	1:2500

<b>5,0 <math>\mu</math>M 4-HPR</b>	17,5 $\mu$ l 4-HPR	17,5 $\mu$ l DMSO	1:1000
<b>10,0 <math>\mu</math>M 4-HPR</b>	35 $\mu$ l 4-HPR	-	1:500

Auflistung der entsprechenden RA-Stock- und DMSO-Volumina, die bei einem Suspensionsvolumen von 17,5 ml benutzt wurden. Abkürzungen: 4-HPR: 4-Hydroxyphenyl retinamide, DMSO: Dimethylsulfoxid

- Tag 1 (24 h Behandlungsdauer), Tag 2 (48 h Behandlungsdauer) und Tag 3 (72 h Behandlungsdauer):
  1. Die jeweilige 6-Well-Platte wurde aus dem Inkubator genommen und die Volumina (ca. 5 ml) wurden in jeweils ein 15-ml-Falcon-Röhrchen überführt.
  2. Es wurden im nächsten Schritt je 10  $\mu$ l der jeweiligen Zellsuspensionen entnommen und mit 10  $\mu$ l Trypanblau vermischt.
  3. Im Folgenden wurde eine Zelldichtebestimmung in der Neubauer-Zählkammer vorgenommen.
  4. Die restliche Menge an Zellen wurde bei 450 G (1390 Umdrehungen pro Minute) und Raumtemperatur für sieben Minuten zentrifugiert.
  5. Abschließend wurde für alle fünf Röhrchen mit verschiedenen Behandlungskonzentrationen jeweils ein Hoechst-Ansatz in Übereinstimmung mit dem Protokoll nach Goodell et al. (Schritte 3-16, siehe Kapitel 2.2.3) angefertigt.

### **2.2.8 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde ausschließlich mit der Software IBM SPSS Statistics 24 (IBM Company, Armonk, North Castle, New York, Vereinigte Staaten) durchgeführt.

### **3 Ergebnisse**

Gemäß der Fragestellung der vorliegenden Abhandlung wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit vier verschiedene Testsubstanzen (Curcumin, Salinomycin, Misostaurin und Fenretinide) in jeweils fünf bis sechs unterschiedlichen Behandlungskonzentrationen in Bezug auf ihre Effekte auf die SP der AML-Zelllinie KG-1a einander gegenübergestellt. Einhergehend damit wurde bei jeder der Testsubstanzen zwischen einer Behandlungsdauer von 24, 48 und 72 Stunden differenziert.

Die dargestellten Messergebnisse haben wir bei jeweils mindestens vier gemäß Protokoll unabhängig voneinander durchgeführten Messungen an unterschiedlichen Tagen ermittelt. Bei der statistischen Auswertung der gewonnenen Messdaten kamen das arithmetische Mittel und die Standardabweichung als Streuungsmaß zum Einsatz. Ferner wurde für die jeweilige Testsubstanz ausgehend vom Mittelwert aller gemessenen Ergebnisse die Standardabweichung als Fehlerbalken herangezogen. Grundlegend für die Wahl der Darstellungsart war die Vergleichbarkeit der Messdaten mit den Angaben anderer Arbeitsgruppen, die sich ebenfalls mit den von uns verwendeten Testsubstanzen und deren Auswirkungen auf AML-Zellen befasst haben.

#### **3.1 Bestimmung, Eingrenzung und Differenzierung der Zellpopulationen**

Zum Erlangen einer differenzierten Auswertung separater Zellpopulationen wurden für jede gemessene Messprobe im Voraus definierte Gate-Einstellungen verwendet. Beim Gating-Prozess handelt es sich um eine Begrenzung von positiven und negativen Populationen, deren Richtwert sich an einer Negativkontrolle (in unserem Falle an einer Verapamilprobe) orientiert. Auf diese Art und Weise konnten wir Zellpopulationen mit ähnlichen

Eigenschaften präzise eingrenzen, außerdem auch unterschiedliche Entwicklungsstufen innerhalb einer Population konnten differenziert werden.

Jedes Gate fungierte als eine definierte Region. Durch eine Verknüpfung mehrerer Gates miteinander und mittels eines aufeinanderfolgenden Gatings entstand die in Abb. 5 dargestellte Gating-Hierarchie.

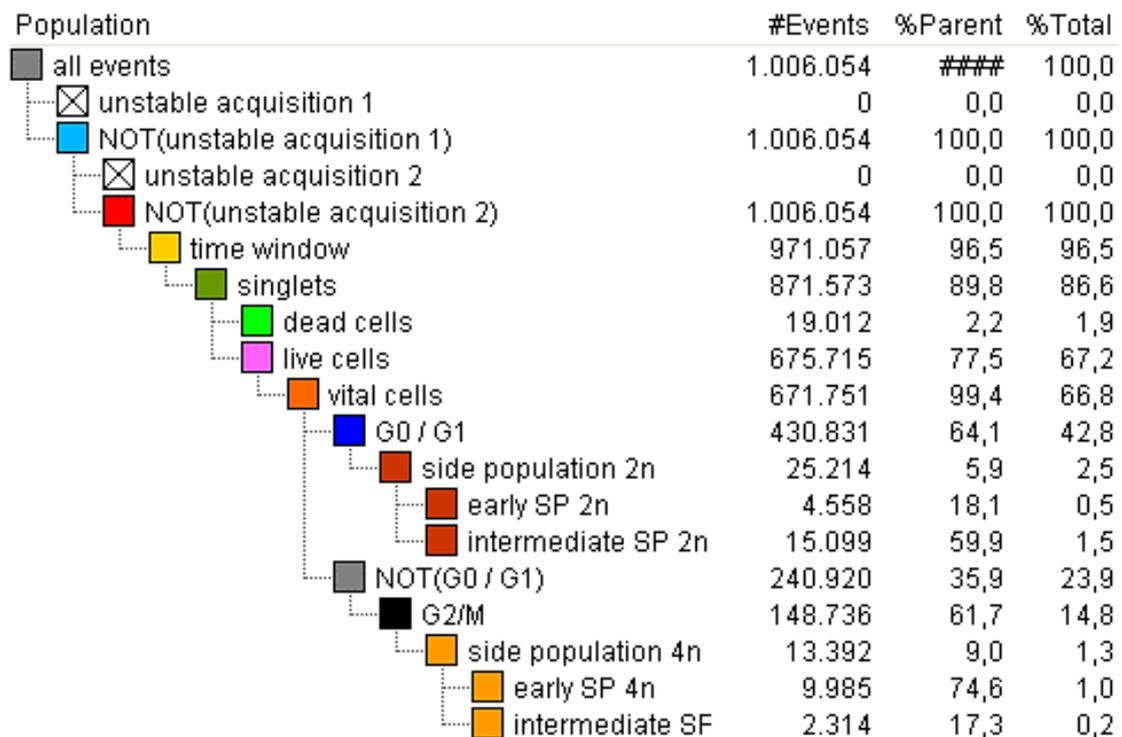


Abb.5: Gating Hierarchie

Abgebildet sind sämtliche Haupt- und Subpopulationen, die für die Fragestellung dieser Doktorarbeit von Relevanz sind. Abkürzungen: G: Gap, M: Mitose, SP: Side Population, 2n: einfacher Chromosomensatz, 4n: doppelter Chromosomensatz

In einem ersten Schritt des Gating-Prozesses fand eine Aufreinigung der gemessenen Zellen statt. Während des Messvorgangs kann es prinzipiell vielfach zu einer Verfälschung des endgültigen Ergebnisses aufgrund von bestimmten Störvariablen kommen. Zwei der wichtigsten Störvariablen sind ungenau gemessene Zellen, was v.a. einmal am Anfang und einmal am Ende der Akquirierung und Aufzeichnung von aneinander haftenden Zellen, sog. Dublets, auftreten kann. Um diese Störfaktoren zu beseitigen, haben wir uns

die zwei Gates „Time window“ und „Singlets“ zu Nutze gemacht (Abb. 6 und Abb. 7). Auf diese Art und Weise blieben lediglich die Einzelzellen für die weitere Auswertung übrig.

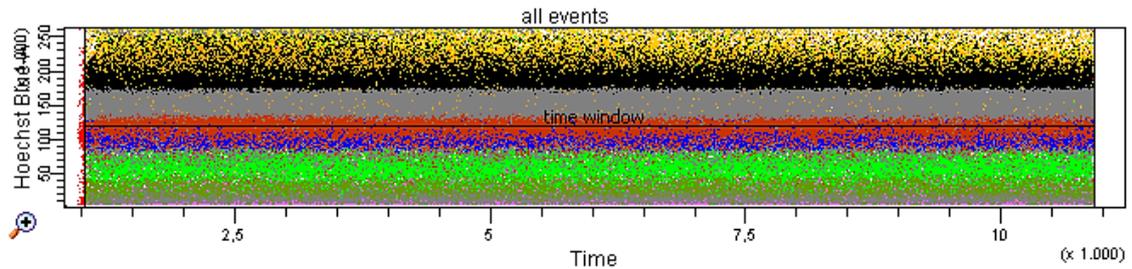


Abb. 6: All events mit "Time window" – Gate

Abgebildet sind alle während der Messung registrierten Zellen. Die ungenau gemessenen Zellen am Anfang und Ende der Akquirierung sind mit der Hilfe des „Time window“-Gates herausgefiltert worden.

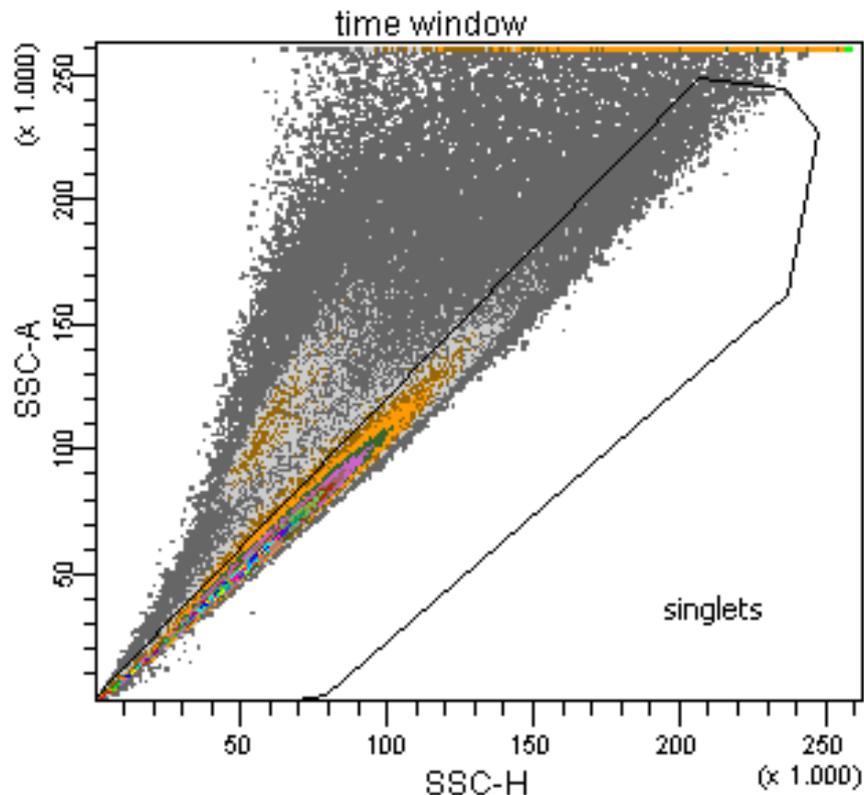


Abb. 7: Time window mit Singlets-Gate

Ziel dieses Gates ist die Eliminierung von Dubletten, die das endgültige Messergebnis verfälschen können. Abkürzungen: SSC-A: Side scatter area, SSC-H: Side scatter height

In einem weiteren Schritt wurden die toten und apoptotischen Zellen herausgefiltert. Ziel dieses Vorgangs war einerseits die Bestimmung der toten Zellen zwecks Beurteilung der Toxizität der Testsubstanzen in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und -konzentration. Andererseits wurde auf diesem Wege eine Eingrenzung der vitalen Zellen realisiert (Abb. 8). Die vitalen Zellen konnten im weiteren Verlauf in einem separaten Hoechst-Blue-Hoechst-Red-Fenster abgebildet werden, in dem die einzelnen Haupt- und Subpopulationen voneinander abgegrenzt wurden (Abb. 9).

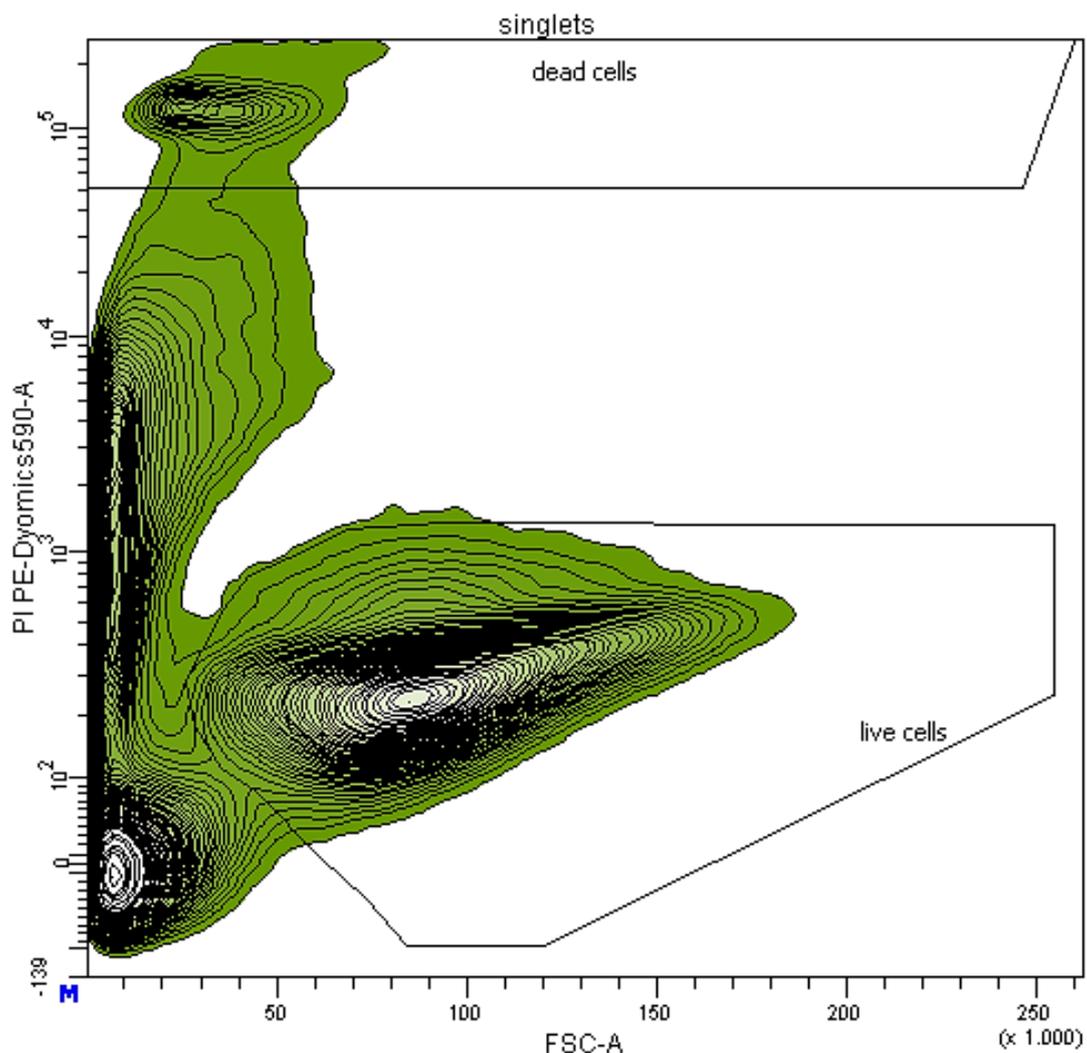


Abb. 8: Singlets Plot mit "Dead cells"-Gate und "Live cells"-Gate

In der oberen Hälfte der Abbildung sind die toten Zellen abgebildet. Apoptotische Zellen und Zelltrümmer befinden sich in der Mitte des Bildes und in der unteren Hälfte sind die Live cells gegatet. Abkürzungen: FSC-A: Forward scatter area

Die stärksten Hauptpopulationen finden sich in der diploiden Zellpopulation, die Zellen der G0- und G1-Phase des Zellzyklus` enthält, und die tetraploide Zellpopulation, in der Zellen der G2- und M-Phase des Zellzyklus` darstellt sind. Zwischen diesen beiden Populationen befindet sich noch eine dritte Zellpopulation, die Zellen in der S-Phase des Zellzyklus` beinhaltet (siehe Abb. 9). Diese Zellen haben wir bewusst aus der weiteren Auswertung herausgehalten, da sie sich im Prozess der DNA-Synthese befinden und weder diploid noch tetraploid sind (Petritz 2007).

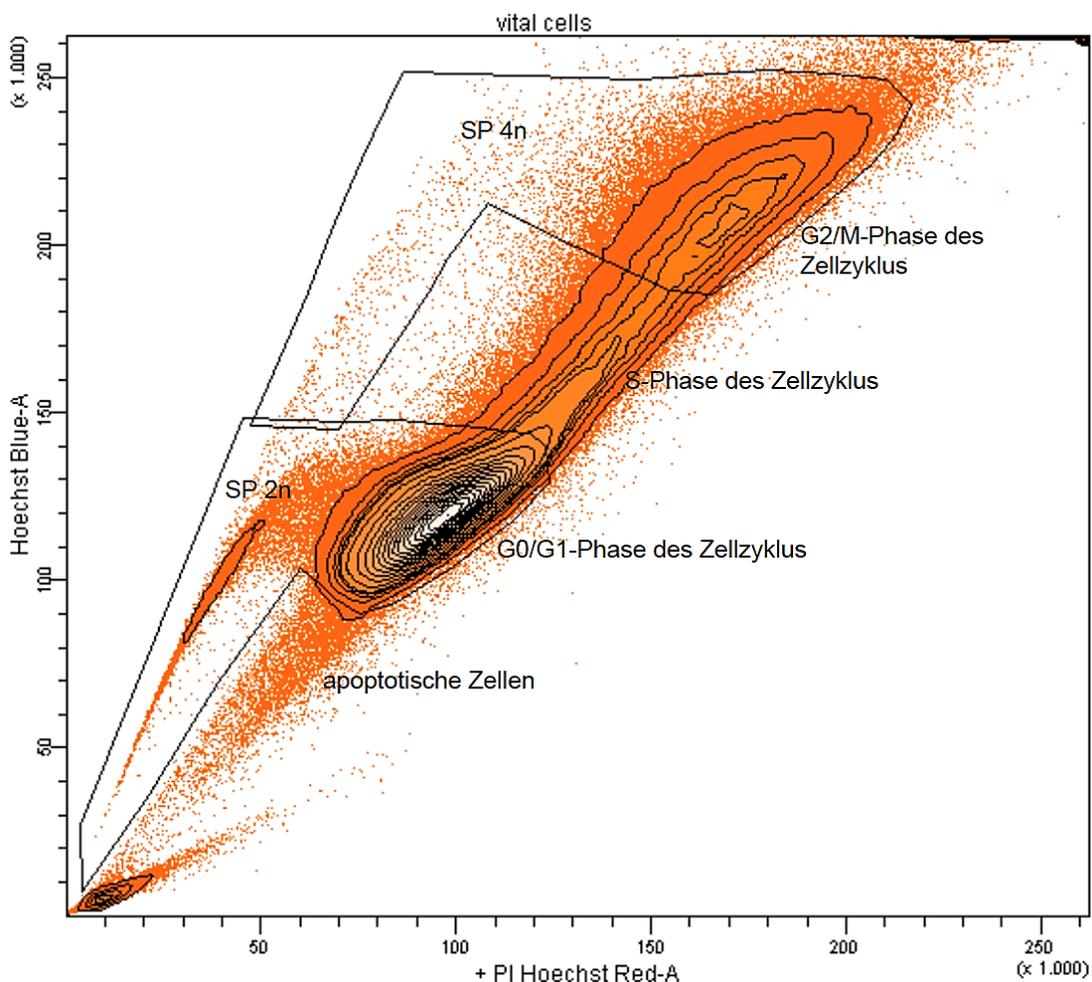


Abb. 9: Vital cells und Subpopulationen im Hoechst-Blue- und Hoechst-Red-Fenster

Abgebildet sind oben die diploide G0/G1-Population und die tetraploide G2/M-Population als Hauptpopulationen. Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus` befinden, sind in der Mitte zwischen den beiden stärksten Populationen zu erkennen. Aus den beiden Hauptpopulationen entspringen dementsprechend die diploide Side Population und die tetraploide Side Population. Im unteren Abschnitt des Bildes sind

apoptotische Zellen sowie Zelltrümmer sichtbar. Abkürzungen: SP: Side Population, 2n: einfacher Chromosomensatz, 4n: doppelter Chromosomensatz, G: Gap, M: Mitose, S: Synthese

Die sogenannte Side Population stellt eine Ausläuferpopulation der Hauptpopulation dar und enthält exakt jene Zellen, welche in der Lage sind, den Hoechst-Farbstoff schneller auszuscheiden. Das entsprechende SP-Gate für die diploide bzw. tetraploide Population wird ausgehend von einem Richtwert der Negativkontrolle am Übergang der Haupt- zur Ausläuferpopulation gesetzt (Abb. 10).

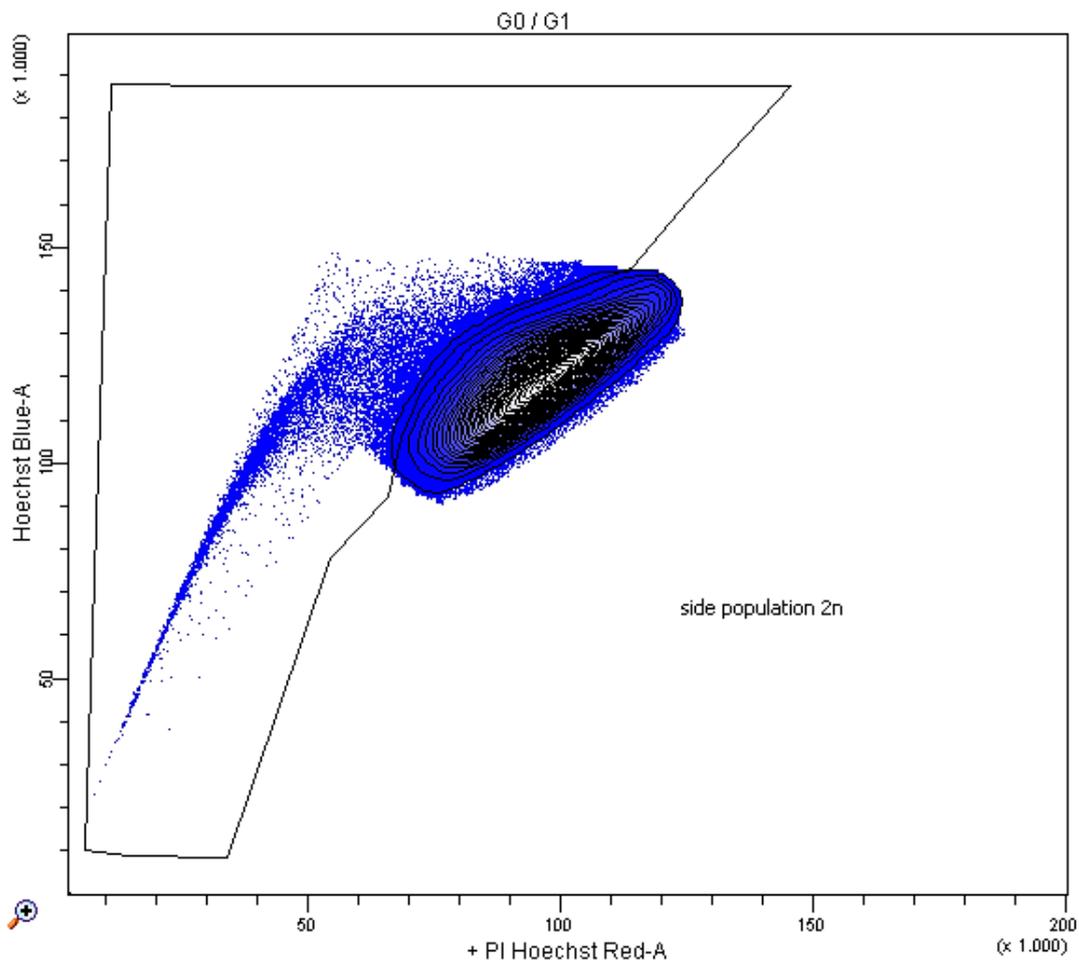


Abb. 10: G0/G1 Plot mit SP 2n-Gate

Die diploide SP startet vom linken Rand der G0/G1-Hauptpopulation und verläuft in Richtung Achsenursprung. Zellen, die den Hoechst-Farbstoff besonders schnell herauspumpen, befinden sich am nächsten zum Achsenursprung. Abkürzungen: G: Gap, 2n: einfacher Chromosomensatz

Abschließend haben wir die Zellen der diploiden SP und tetraploiden SP in zwei weitere Subpopulationen unterteilt, nämlich in Early SP und Intermediate SP (Abb. 11). Die Zellen der Early SP liegen am nächsten zum Achsenursprung und repräsentieren jene Subpopulation, welche in der Lage dazu ist, den Hoechst-Farbstoff am schnellsten auszuschleusen. Aufgrund des geringen Anteils an der Hauptpopulation ist eine isolierte Betrachtung dieser Zellen aber eher problematisch und störanfällig. Bedingt dadurch haben wir die Zellen der Early SP und Intermediate SP zur Zellpopulation mit frühen Stammzellkriterien zusammengefasst. Auf die Darstellung der Subpopulation Late SP wurde dabei bewusst verzichtet, weil v.a. der Übergang von der Hauptpopulation zur SP fließend ausfällt und die Late SP zum großen Teil Zellen der Hauptpopulation mit einschließt.

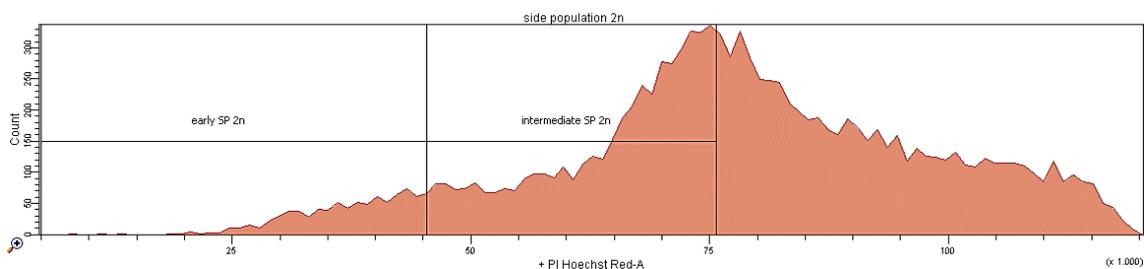


Abb. 11: Diploide SP mit Early- und Intermediate-SP-Gate

Die Berechnungen für die jeweiligen Gates wurden mit der Hilfe folgender Formel vorgenommen:  $\text{Gate - Grenze} = \frac{\text{Medianwert der Hauptpopulation} - \text{definierte Minimalfluoreszenz}}{3}$ .

Die Grenze für die Minimalfluoreszenz haben wir bei 15000 gesetzt. Abkürzungen: SP: Side Population, 2n: einfacher Chromosomensatz, 4n: doppelter Chromosomensatz, PI: Propidiumiodid

### 3.2 Behandlungsspezifische Effekte von Curcumin auf die Stammzellpopulation der Zelllinie KG-1a

Wir haben die KG-1a Zellen in vier zeitlich voneinander unabhängigen Versuchsreihen mit sechs verschiedenen CUR-Konzentrationen (0,0  $\mu\text{M}$ , 1,0  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 5,0  $\mu\text{M}$ , 10,0  $\mu\text{M}$  und 15,0  $\mu\text{M}$ ) für die Dauer von 24, 48 und 72 Stunden behandelt. Bei der Auswertung der daraus gewonnenen

Messergebnisse haben wir uns auf drei Schwerpunkte konzentriert: Toxizität der Testsubstanz in Abhängigkeit von Behandlungsdauer sowie -konzentration und differenzielle Effekte von CUR auf den Anteil der diploiden SP bzw. Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien sowie differenzielle Effekte von CUR auf den Anteil der tetraploiden SP bzw. Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien ebenfalls in Abhängigkeit von der Dauer der Behandlung und angewandten Menge an CUR.

### **3.2.1 Differenzielle zytotoxische Effekte von CUR auf KG-1a-Zellen in Abhängigkeit von Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration**

Angaben diverser Veröffentlichungen bezüglich der Toxizität von CUR auf Zellen verschiedener Zelllinien, darunter auch KG-1a, sprechen dafür, dass sowohl eine höhere Konzentration der Testsubstanz als auch eine längere Behandlungsdauer mit einer Zunahme des prozentualen Anteils toter Zellen einhergeht (Pesakhov, Khanin et al. 2010, Rao, Xu et al. 2011, Weng, Zeng et al. 2015, Zeng, Weng et al. 2016).

Die vorliegende CUR-Versuchsreihe zeigt erst bei Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  CUR und höher einen Anstieg der Zytotoxizität. Nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden war kaum ein Unterschied im prozentualen Anteil toter Zellen bei den Zellen zu beobachten, die mit einer Konzentration von 0,0  $\mu\text{M}$ , 1,0  $\mu\text{M}$  und 2,5  $\mu\text{M}$  (die entsprechenden Mittelwerte des prozentualen Anteils toter Zellen lagen bei je 1,7 %, 1,8 % und 1,9 %) behandelt wurden. Jedoch zeigte sich bei der Behandlung mit 15,0  $\mu\text{M}$  CUR ein Anteil toter Zellen von 3,1 % und damit ein ähnlicher Effekt vergleichbar mit dem in den zitierten Publikationen. Die folgende Abb. 12 liefert eine Übersicht der Toxizität von CUR nach einer 24-stündigen Behandlungsdauer dar.

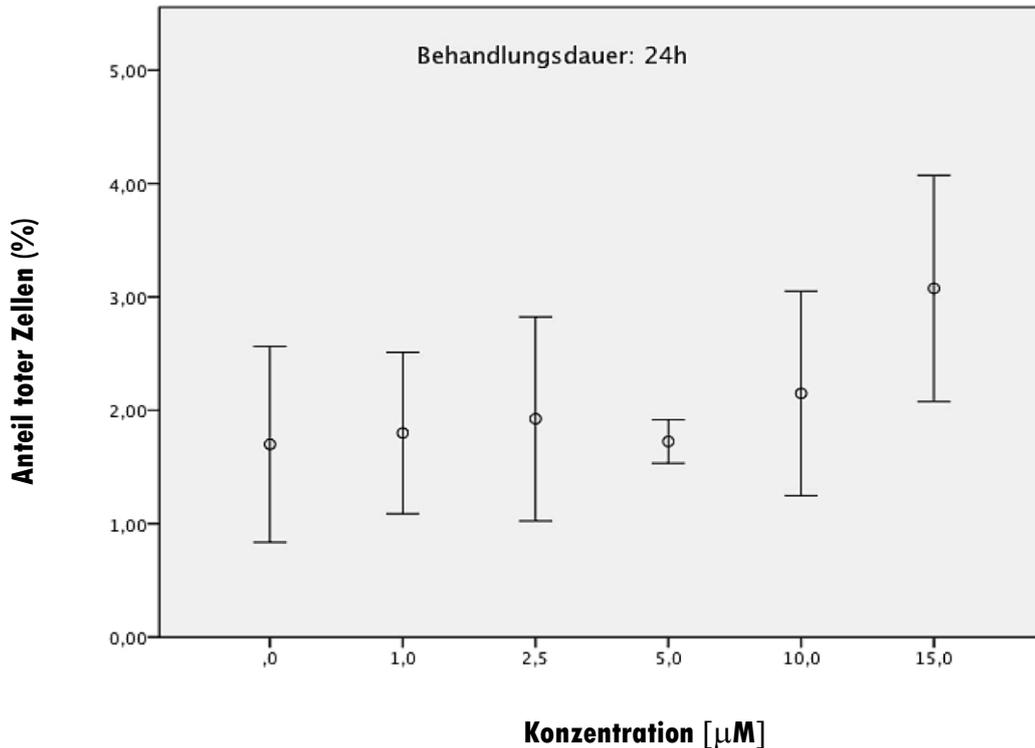


Abb. 12: Anteil toter Zellen nach einer CUR-Behandlungsdauer von 24 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile toter Zellen (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse).

Wiederum nach einer längeren Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden haben wir einen eher geringer ausfallenden Effekt von CUR auf die Vitalität der behandelten Zellen registriert. Mit Mittelwerten von 1,8 %, 1,7 %, 1,8 %, 1,7 %, 2,4 % und 3,3 % (aufsteigend je nach Behandlungskonzentration) nach 48 Stunden und Mittelwerten von 1,9 %, 1,7 %, 1,9 %, 2,1 %, 2,2 % und 4,6 % (ebenfalls aufsteigend geordnet nach der Behandlungskonzentration) nach 72 Stunden Behandlungsdauer (Abb. 13) kann die Schlussfolgerung aufgestellt werden, dass ein deutlicher zytotoxischer Effekt erst bei höheren CUR-Konzentrationen (10,0  $\mu\text{M}$  und v.a. 15,0  $\mu\text{M}$ ) zu beobachten ist.

Eine genaue Übersicht über die Toxizität aller durchgeführten CUR-Versuche in Form eines Punktdiagramms findet sich im Anhang.

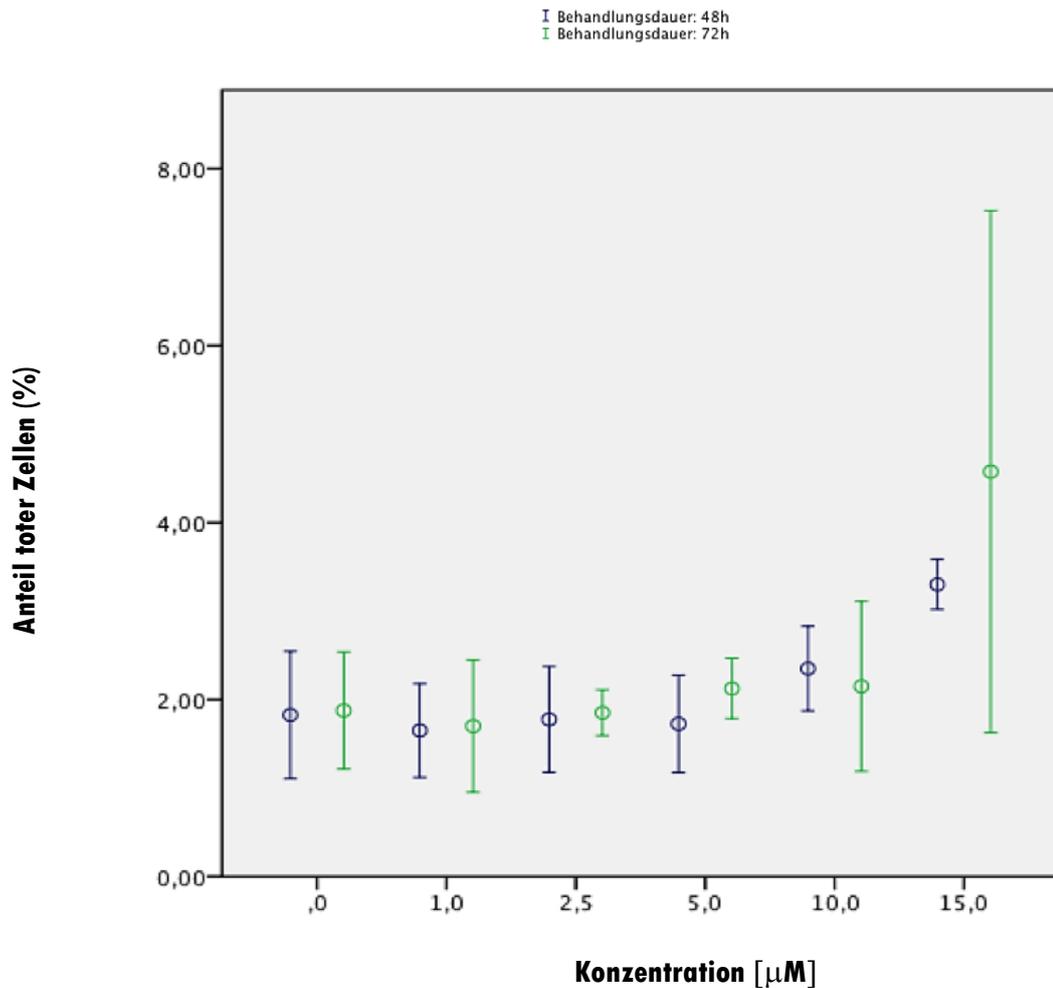


Abb. 13: Anteil toter Zellen nach einer CUR-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden. Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile toter Zellen (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse).

### 3.2.2 Differenzielle Effekte von CUR auf den Anteil der diploiden SP in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration

Für die Beurteilung von differenziellen Effekte von CUR auf den Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation haben wir die erhaltenen Mittelwerte für die entsprechenden Behandlungskonzentrationen untereinander und je nach Inkubationsdauer miteinander verglichen. Im Unterschied zu den ermittelten Werten für die Toxizität der Substanz konnte eine deutliche Tendenz beobachtet werden. Sowohl mit ansteigender Behandlungskonzentration als

auch mit zunehmender Behandlungsdauer hat sich eine deutliche Zunahme des prozentualen Anteils der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation eingestellt (Abb. 14 und 15). Wir haben für den Anteil der diploiden SP für die unbehandelten Zellen (0,0  $\mu\text{M}$  CUR) einen Mittelwert in Höhe von 2,7 % feststellen können. Bereits nach 24 Stunden Inkubationszeit ist dieser Wert bei einer Behandlungskonzentration von 15  $\mu\text{M}$  auf 4,3 % gestiegen, nach 72 Stunden konnten wir fast eine Verdreifachung des Ursprungwertes auf 6,7 % für die Konzentration von 15  $\mu\text{M}$  erkennen.

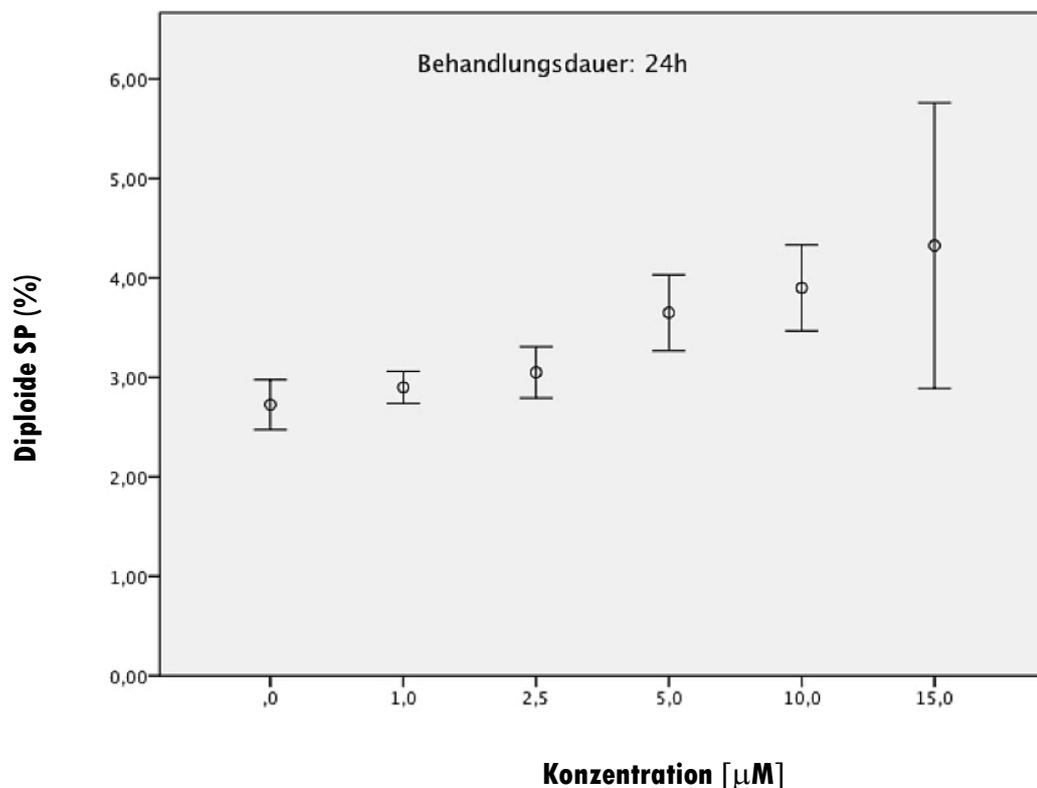


Abb. 14: Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 24 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile diploider SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

Eine detaillierte Übersicht der ermittelten Werte für den Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation sämtlicher realisierter CUR-Versuche in Form eines Punktdiagramms findet sich im Anhang.

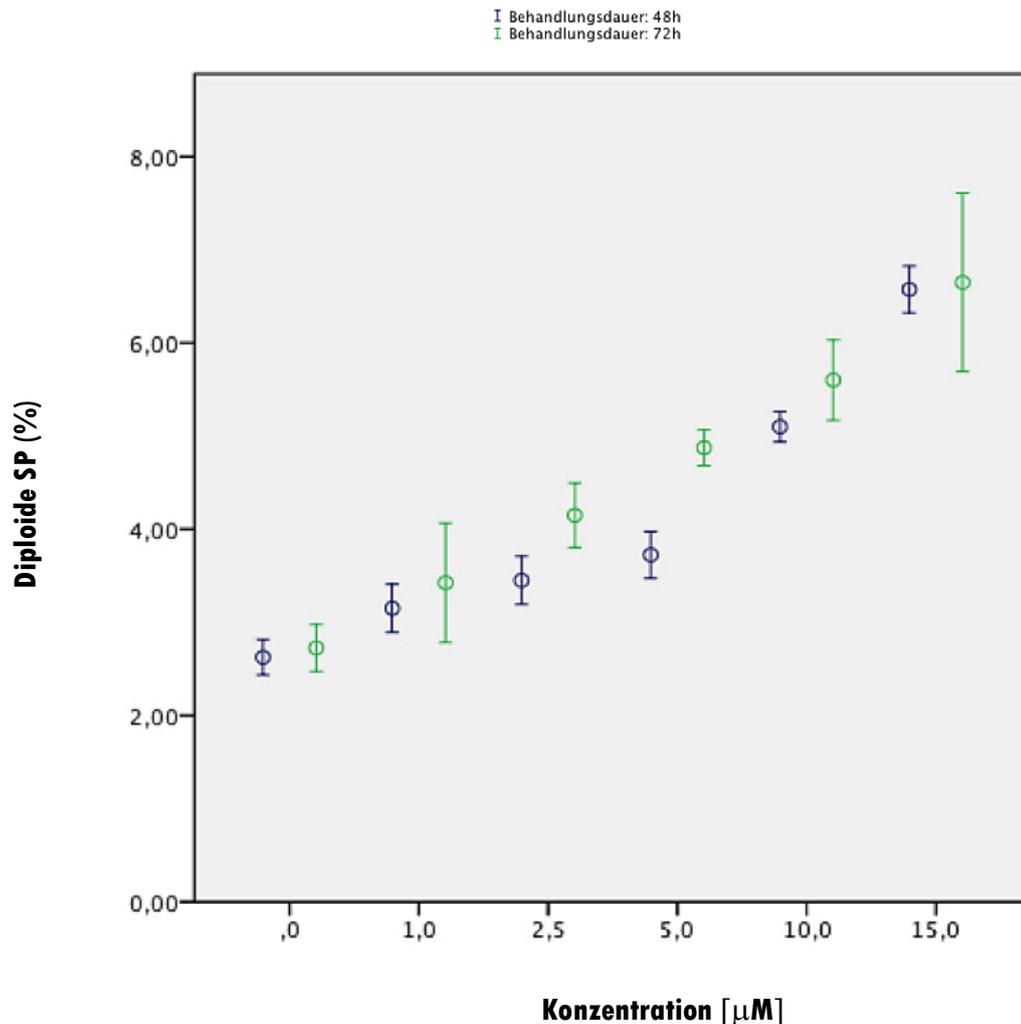


Abb. 15: Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile diploider SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

### 3.2.3 Differenzielle Effekte von CUR auf den Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration

Des Weiteren haben wir die differenziellen Effekte von CUR auf die Early und Intermediate SP  $2n$  untersucht. Intention dieser Analyse war es, den Anteil der diploiden SP zu erheben, der einerseits am schnellsten den Hoechst Farbstoff metabolisieren kann und andererseits keine Zellen der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Hauptpopulation einschließt. Somit ergaben unsere Messungen für die diploide SP mit frühen

Stammzellkriterien für unbehandelte Zellen einen Mittelwert von 0,9 % nach einer Behandlungsdauer von 24, 48 und 72 Stunden.

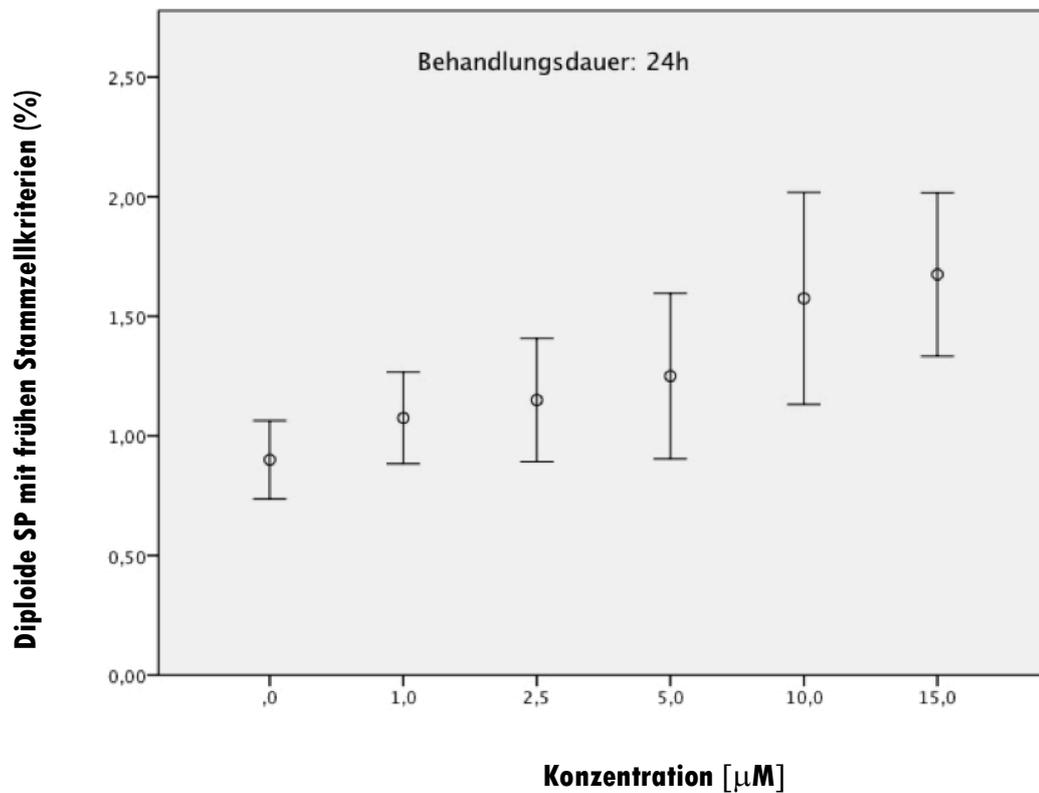


Abb. 16: Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 24 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile der Early und Intermediate diploiden SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

Mit zunehmender Inkubationszeit ist der ursprüngliche Wert von 0,9 % konzentrationsabhängig kontinuierlich angestiegen, was den Abbildungen 16 und 17 zu entnehmen ist. Für jene Zellen, welche mit der höchsten CUR-Konzentration von 15  $\mu$  behandelt wurden, haben wir Werte von 2,1 % (nach 48 Stunden) und 2,2 % (nach 72 Stunden) feststellen können. Demnach ergibt sich eine Verdopplung der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien bei einer Behandlungskonzentration von 15  $\mu\text{M}$  CUR nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden.

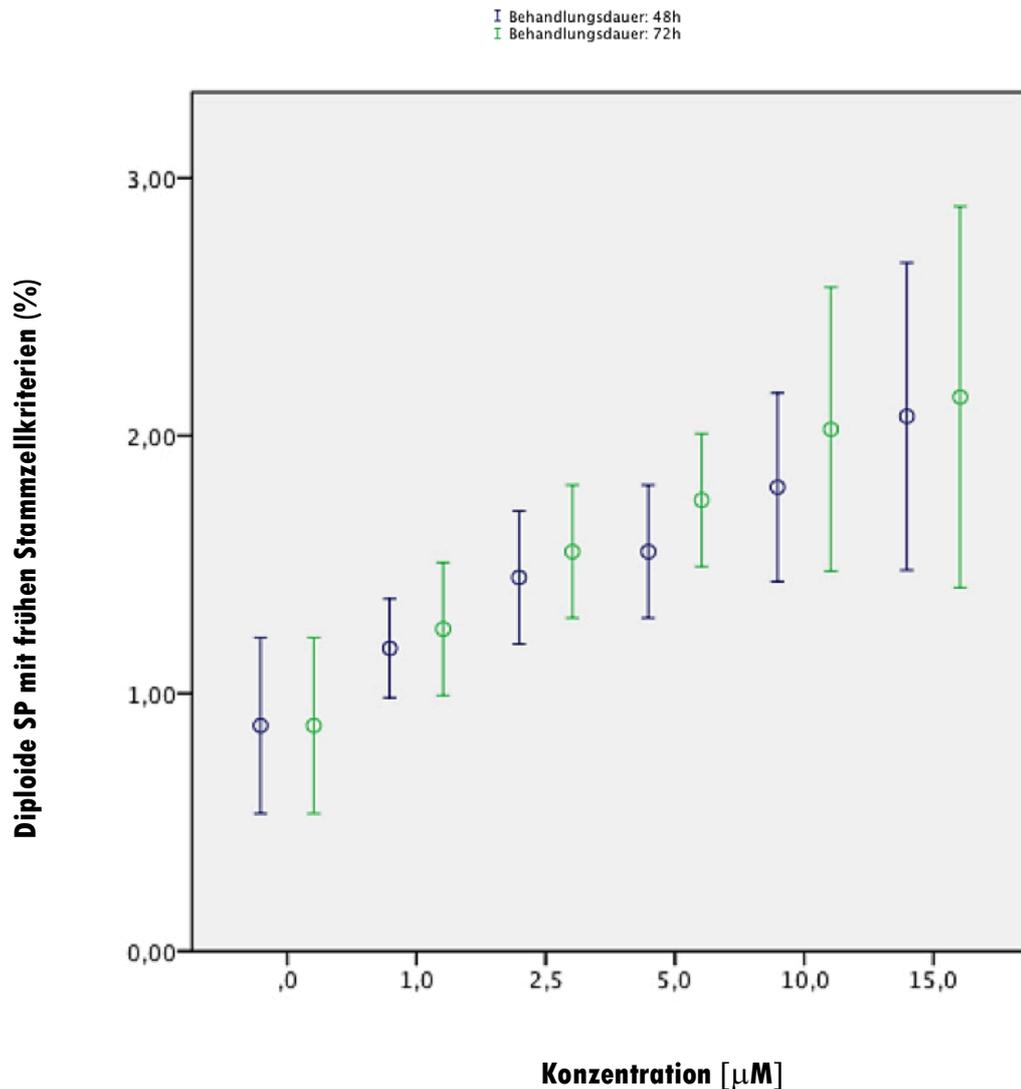


Abb. 17: Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile der Early und Intermediate diploiden SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side population

Die genaue Übersicht über die ermittelten Werte für den Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation aller durchgeführten CUR-Versuche in Form eines Punktdiagramms kann – wie bekannt – dem Anhang entnommen werden.

### 3.2.4 Differenzielle Effekte von CUR auf den Anteil der tetraploiden SP in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration

Bei der Auswertung der Werte für den Anteil der tetraploiden SP an der G2/M-Hauptpopulation war ebenfalls eine klare Tendenz auszumachen. Bei einem Mittelwert von 5,1 % im Falle einer Behandlungskonzentration von 0,0  $\mu\text{M}$  CUR haben wir einen Wert von 7,8 % nach 48 und 72 Stunden Behandlungsdauer bei 15  $\mu\text{M}$  CUR ermitteln können.

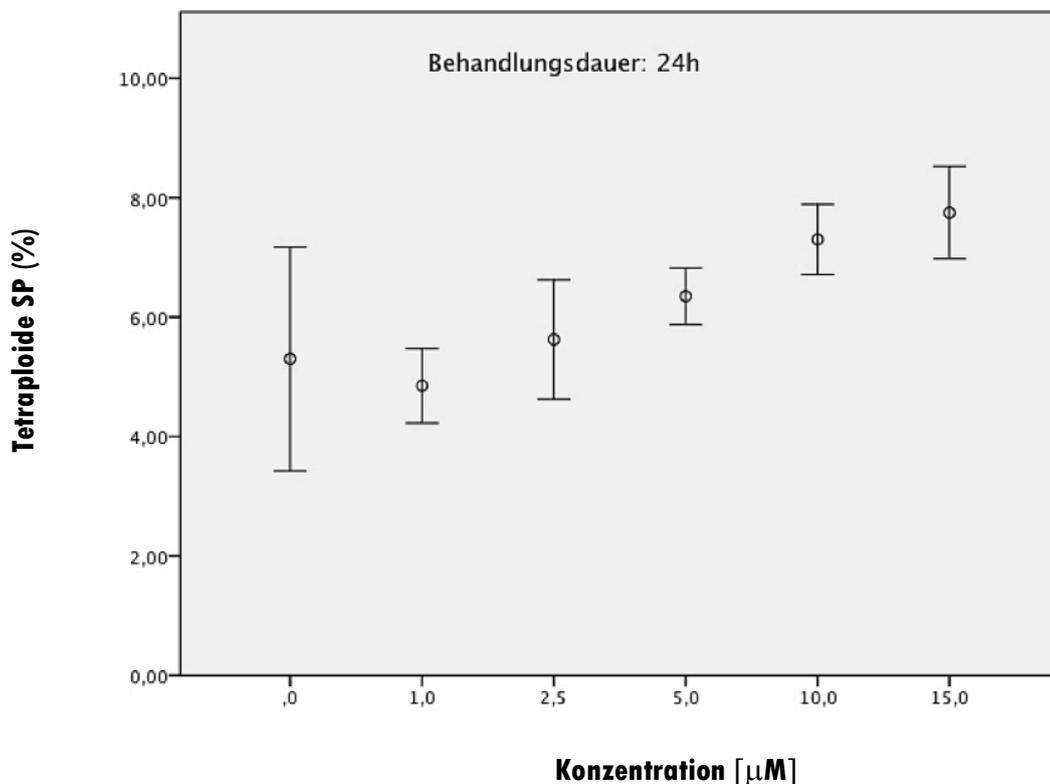


Abb. 18: Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 24 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile der tetraploiden SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

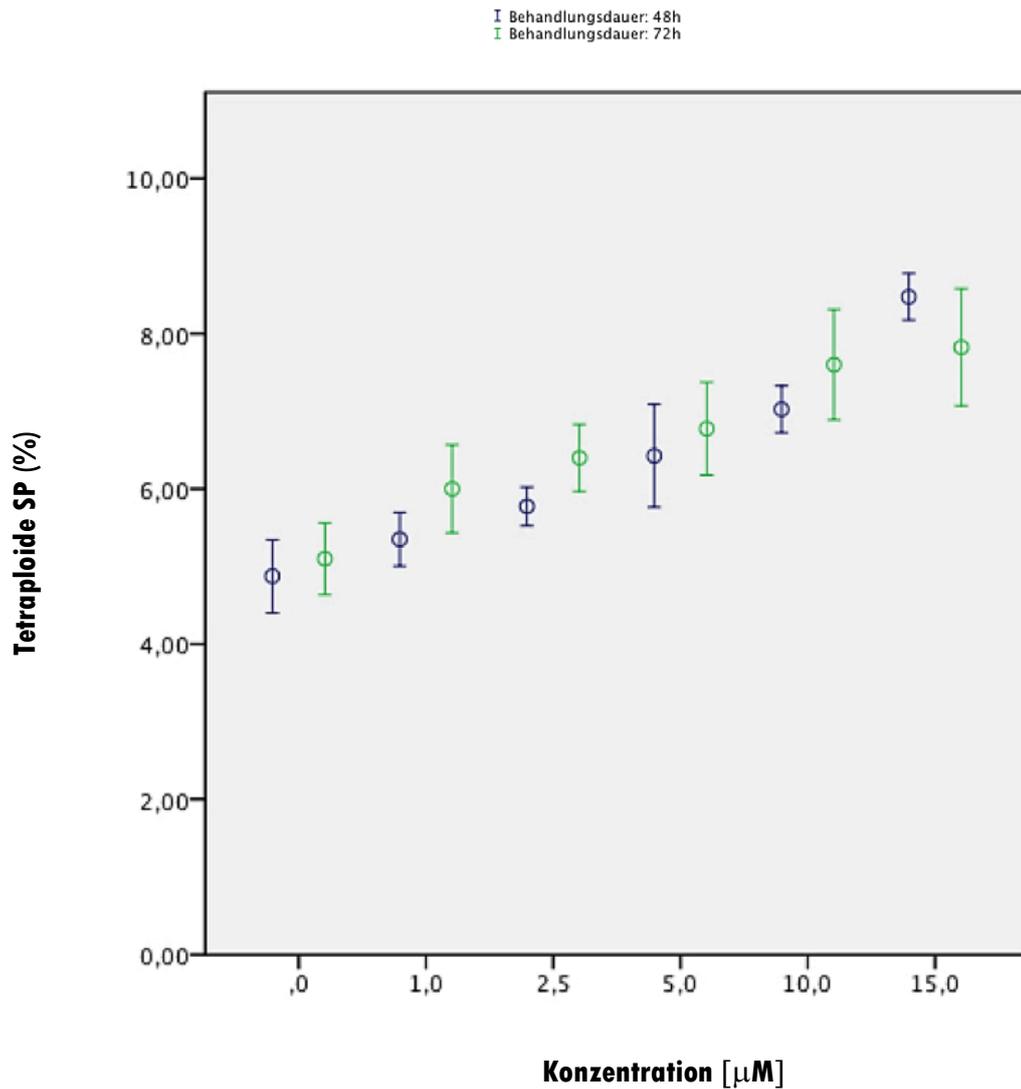


Abb. 19: Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile der tetraploiden SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

Die Zellen der tetraploiden Hauptpopulation, die die doppelte DNA-Menge enthalten und sich kurz vor der Zellteilung befinden, zeigen eine eher geringere Sensitivität für die untersuchte Substanz verglichen mit den Zellen der diploiden Hauptpopulation. Ungeachtet dessen ist ein mäßiger Anstieg der tetraploiden SP sowohl konzentrationsabhängig als auch in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer zu registrieren. Eine Übersicht der ermittelten Mittelwerte bieten die Abbildungen 18 und 19.

Die exakte Übersicht über die ermittelten Werte findet sich im Anhang.

### 3.2.5 Differenzielle Effekte von CUR auf den Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration

Ähnlich wie beim Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation zeigte sich beim Anteil der Early und Intermediate SP an der G2/M-Hauptpopulation ebenfalls eine signifikante Progredienz. Der erhobene Mittelwert von 1,5 % (Abb. 20) bei unbehandelten Zellen stieg konzentrationsabhängig und mit Zunahme der Inkubationszeit auf 3,0 % bei einer Behandlungskonzentration von 15  $\mu\text{M}$  CUR und einer Behandlungsdauer von 48 und ebenfalls bei 72 Stunden, wie es aus der Abb. 21 zu entnehmen ist.

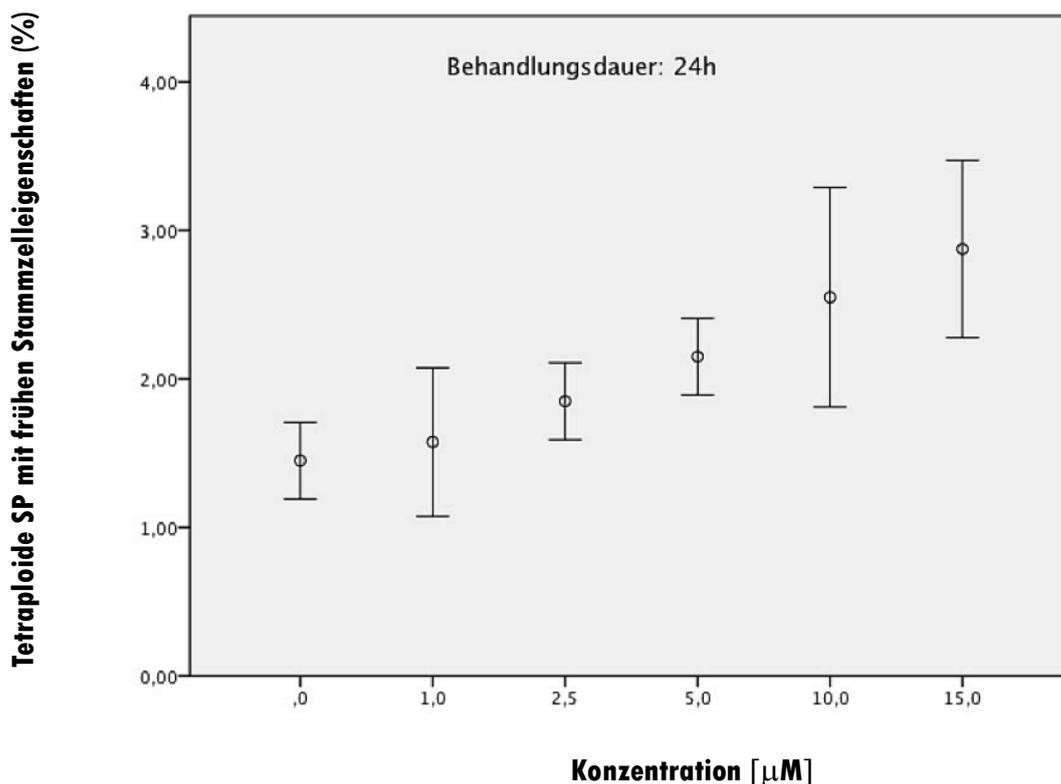


Abb. 20: Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 24 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile der Early und Intermediate tetraploiden SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

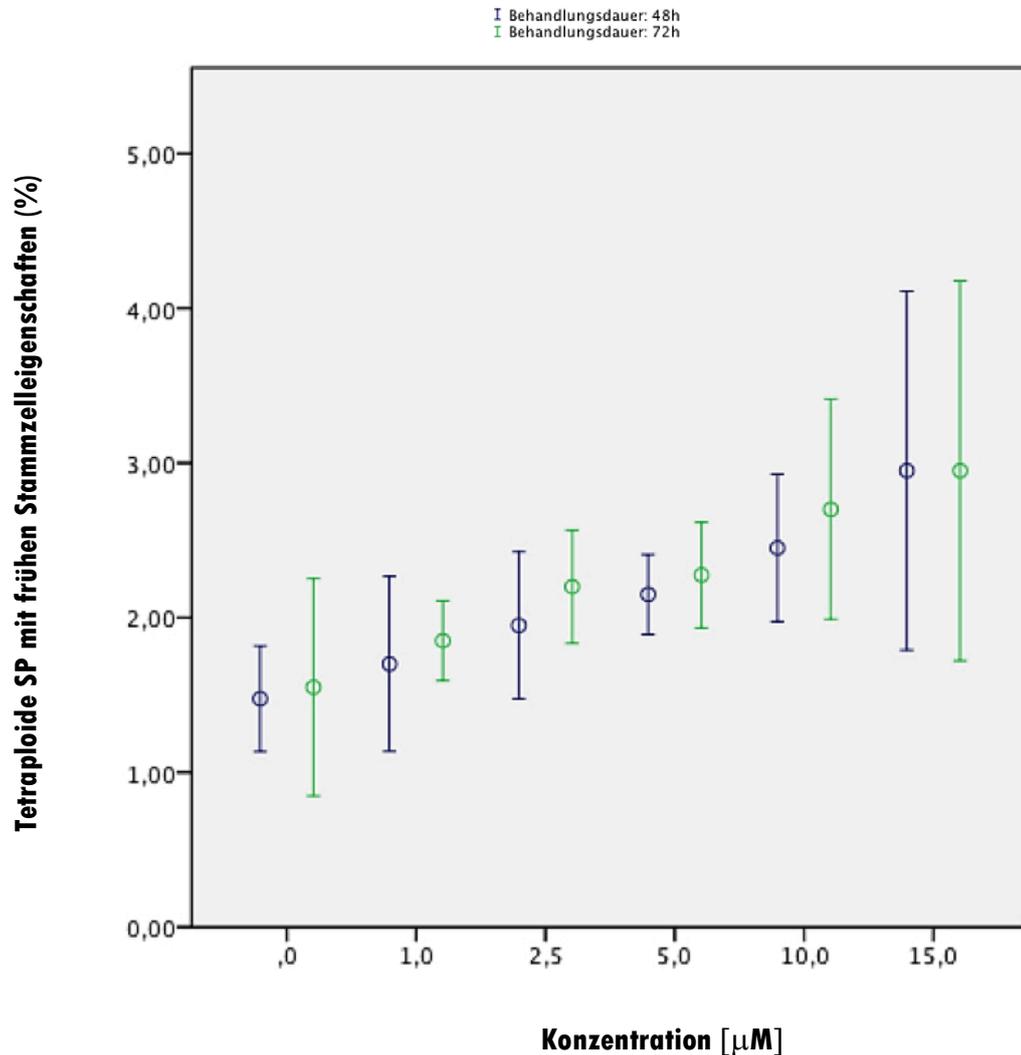


Abb. 21: Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden

Abgebildet sind oben die jeweiligen prozentualen Anteile der Early und Intermediate tetraploiden SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

Die genauere Übersicht für die ermittelten Werte des Anteils der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation aller durchgeführten CUR-Versuche in Form eines Punktdiagramms ist im Anhang einsehbar.

### **3.3 Behandlungsspezifische Effekte von Salinomycin auf die Stammzellpopulation der Zelllinie KG-1a**

In der Fachliteratur wurde SAL als therapeutische Substanz beschrieben, die in der Lage ist, Krebsstammzellen zu depletieren und sogar Apoptose in diesen Zellen zu induzieren, indem SAL ihre Resistenzmechanismen umhergeht (Fuchs, Heinold et al. 2009, Gupta, Onder et al. 2009). Aus diesem Grund haben wir beschlossen, SAL als zweite Testsubstanz auf ihre Auswirkungen auf KG-1a Zellen hin zu untersuchen. Wir haben insgesamt vier zeitlich voneinander unabhängige Versuchsreihen mit SAL durchgeführt. Dabei haben wir die KG-1a Zellen mit fünf verschiedenen SAL-Konzentrationen (0,0  $\mu\text{M}$ , 1,0  $\mu\text{M}$ , 2,0  $\mu\text{M}$ , 5,0  $\mu\text{M}$  und 10,0  $\mu\text{M}$ ) für die Dauer von 24, 48 und 72 Stunden behandelt. Bei einem ersten Testversuch war auch die Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  SAL in die Testreihe eingeschlossen. Da es aber kaum Unterschiede zwischen der Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  und 1,0  $\mu\text{M}$  SAL zu beobachten gab, haben wir in den weiteren Versuchen davon abgesehen.

Entsprechend der Auswertungen von CUR haben wir uns wiederum auf drei Schwerpunkte konzentriert: Toxizität der Testsubstanz in Abhängigkeit von Behandlungsdauer sowie -konzentration und differenzielle Effekte von SAL auf den Anteil der diploiden SP bzw. Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien sowie differenzielle Effekte von SAL auf den Anteil der tetraploiden SP bzw. Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien, und zwar ebenfalls konzentrationsabhängig und je nach Inkubationsdauer.

#### **3.3.1 Differenzielle zytotoxische Effekte von SAL auf KG-1a-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration**

Frühere Veröffentlichungen haben gezeigt, dass die Erhöhung der SAL-Konzentration und Inkubationszeit bei Behandlungsversuchen mit Krebsstammzellen, darunter auch AML-Zellen, mit einem erheblichen Anstieg der Toxizität der Substanz einhergeht (Riccioni, Dupuis et al. 2010, Pellegrini, Dyczynski et al. 2016, Roulston, Burt et al. 2016). Unsere Messergebnisse

bezüglich der zytotoxischen Effekte von SAL auf KG-1a-Zellen gehen konform mit den Ergebnissen dieser Forschungsbeiträge. Wir haben bei unbehandelten Zellen (0,0  $\mu\text{M}$  SAL) einen prozentualen Anteil von toten Zellen in Höhe von 2,6 % nach 24 Stunden Inkubationszeit ermittelt.

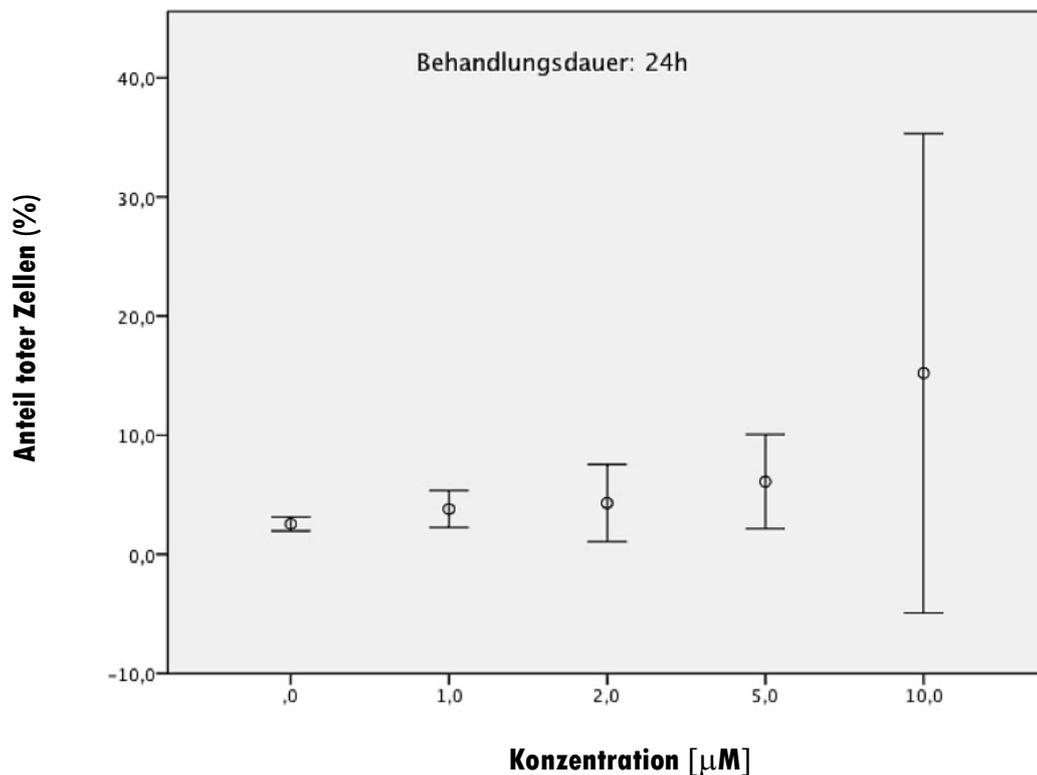


Abb. 22: Anteil toter Zellen nach einer SAL-Behandlungsdauer von 24 Stunden  
Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile toter Zellen (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse).

Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  SAL ist dieser Anteil auf 6,1 % und bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  SAL auf 15,2 % bei einer Behandlungsdauer von ebenfalls 24 Stunden angestiegen (Abb. 22). Nach 72 Stunden lagen die Anteile toter Zellen für die oben genannten Konzentrationen bei 11,7 % bzw. 17,1 %, was auch aus der Abbildung 23 zu entnehmen ist.

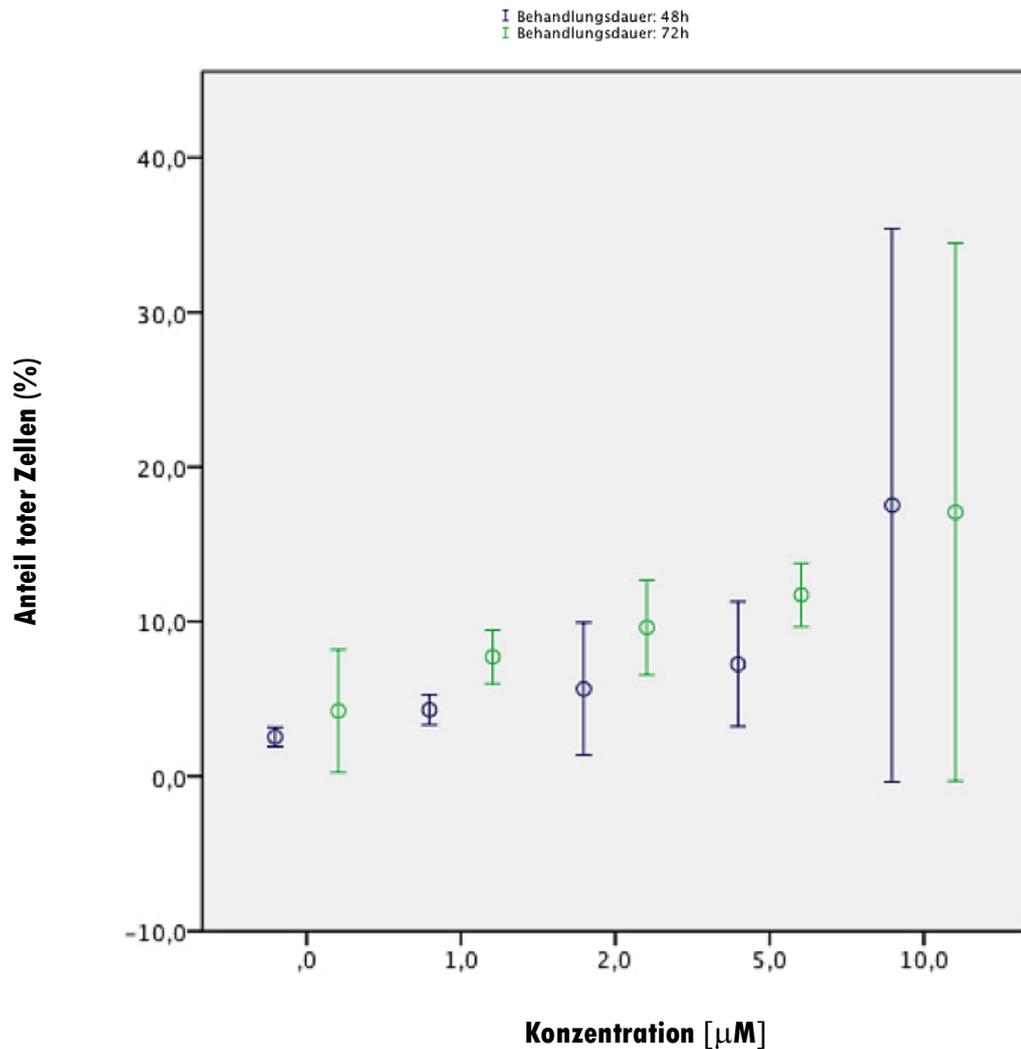


Abb. 23: Anteil toter Zellen nach einer SAL-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden. Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile toter Zellen (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse).

Eine genaue Übersicht der ermittelten Werte für den Anteil toter Zellen aller durchgeführten SAL-Versuche liegt in der bekannten Form des Punktdiagramms im Anhang vor.

### 3.3.2 Differenzielle Effekte von SAL auf den Anteil der diploiden SP in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration

Das erklärte Hauptziel unserer Untersuchungen war es, u.a. die differenziellen Effekte von SAL auf den Anteil der diploiden SP in Abhängigkeit von der

Behandlungsdauer sowie -konzentration zu ermitteln. Die Analyse der gewonnenen Messdaten ergab eine gering ausgeprägte, aber dennoch klare Tendenz. Sowohl mit der Erhöhung der Behandlungskonzentration als auch mit der Zunahme der Inkubationszeit kam es zu einer Verringerung des Anteils der diploiden SP an der G0/G1-Hauptpopulation.

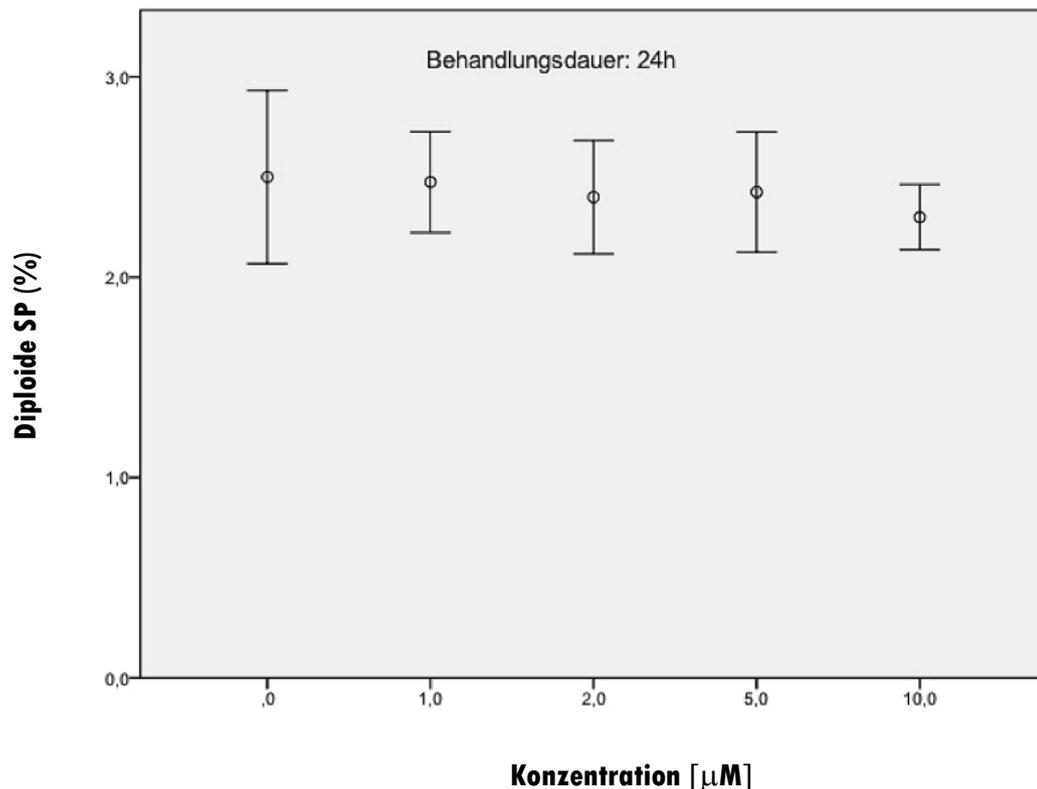


Abb. 24: Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 24 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile der diploiden SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

Im Anschluss an die Auswertung aller für den Versuch relevanten Daten zeigte sich für unbehandelte Zellen ( $0,0 \mu\text{M}$  SAL) unabhängig von der jeweiligen Behandlungsdauer ein durchschnittlicher Anteil der SP  $2n$  von  $2,5 \%$ . Dieser Anteil lag bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  SAL nach 24 Stunden bei  $2,3 \%$ , nach 48 Stunden bei  $2,0 \%$  und nach 72 Stunden wurde ein Wert von  $1,2 \%$  erreicht. Ausgehend davon ist annäherungsweise eine Halbierung der diploiden

SP bei der höchsten Behandlungskonzentration nach 72 Stunden Inkubationszeit festzustellen.

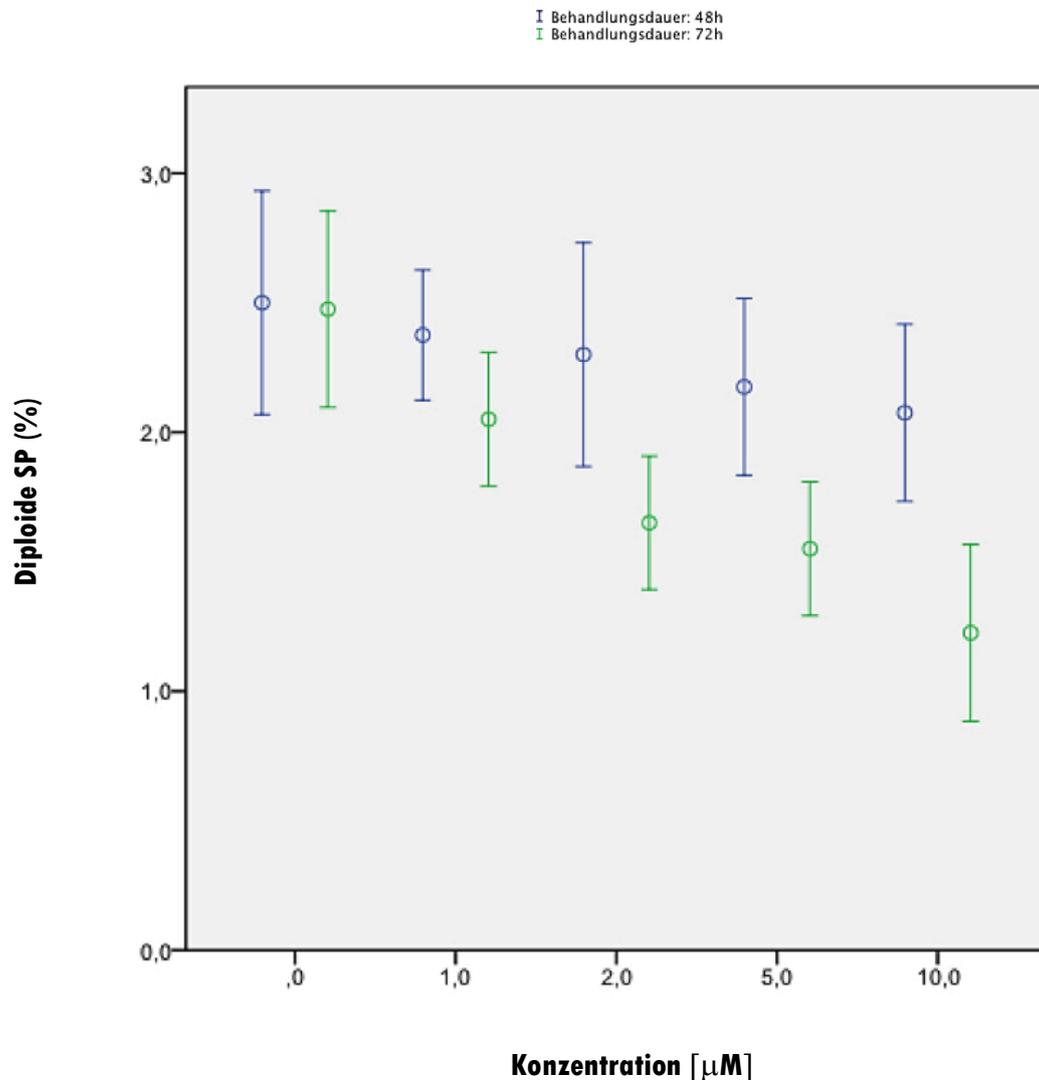


Abb. 25: Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile der diploiden SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

Für eine detailliertere Übersicht über die erhobenen Werte für den Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation sämtlicher durchgeführten SAL-Versuche in Form eines Punktdiagramms ist auf den Anhang zu verweisen.

### **3.3.3 Differenzielle Effekte von SAL auf den Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration**

Ähnlich der Analyse des Anteils der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation zeigte sich bei der Auswertung des Anteils der Early und Intermediate SP an der G0/G1-Hauptpopulation bereits nach 24 Stunden eine leichte konzentrationsabhängige Minimierung der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien in Relation zum Ursprungswert unbehandelter Zellen (0,9 % bei einer Konzentration von 0,0  $\mu\text{M}$  SAL bis auf 0,7 % bei einer SAL-Konzentration von 10,0  $\mu\text{M}$ ). Die Veranschaulichung der Ergebnisse für die Behandlungsdauer von 24 Stunden findet sich in der nachstehenden Abbildung 26.

Im Falle der Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden fielen die Ergebnisse weitaus eindeutiger aus. Wir haben ermitteln können, dass der Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien konzentrationsabhängig und in Abhängigkeit von der Inkubationszeit geringer wurde. Der Anteil der Early und Intermediate SP an der diploiden Hauptpopulation lag bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  SAL nach 48 Stunden bei 0,5 % und nach 72 Stunden bei 0,4 %. Diese Werte lassen auf eine Halbierung des Ursprungswertes schließen (Abb. 27).

Die bekannte Übersicht der ermittelten Werte für den Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation aller durchgeführten SAL-Versuche in Form des Punktdiagramms ist im Anhang hinterlegt.

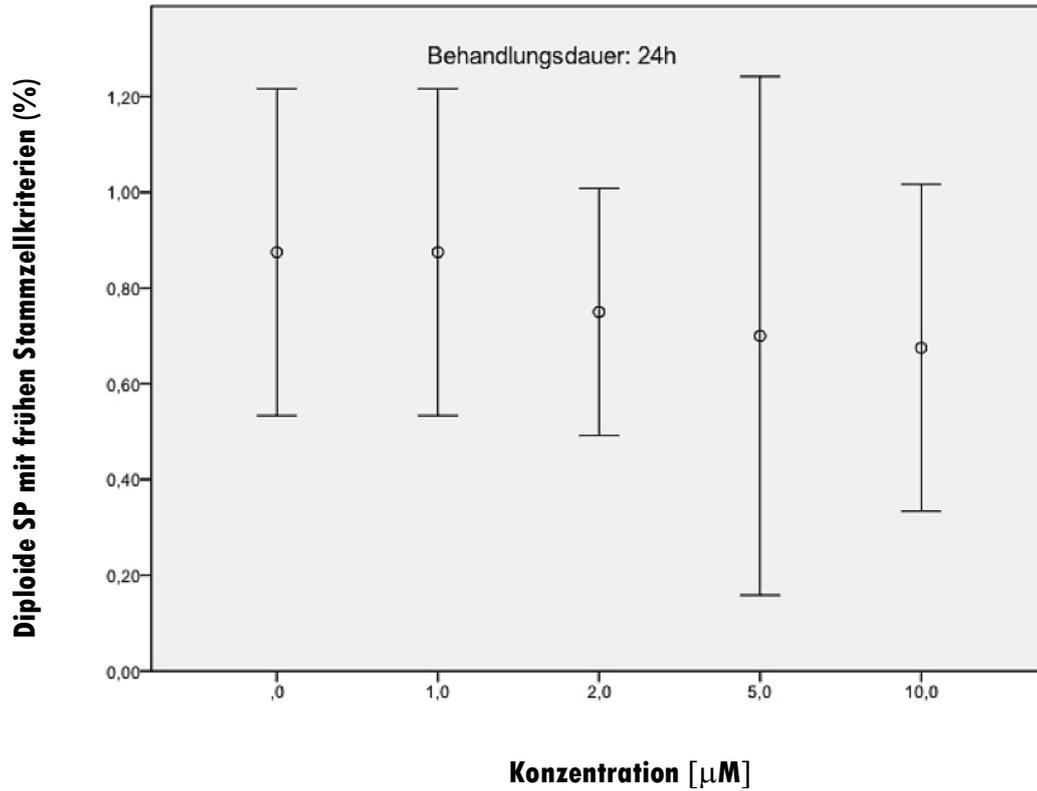


Abb. 26: Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 24 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile der Early und Intermediate diploiden SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

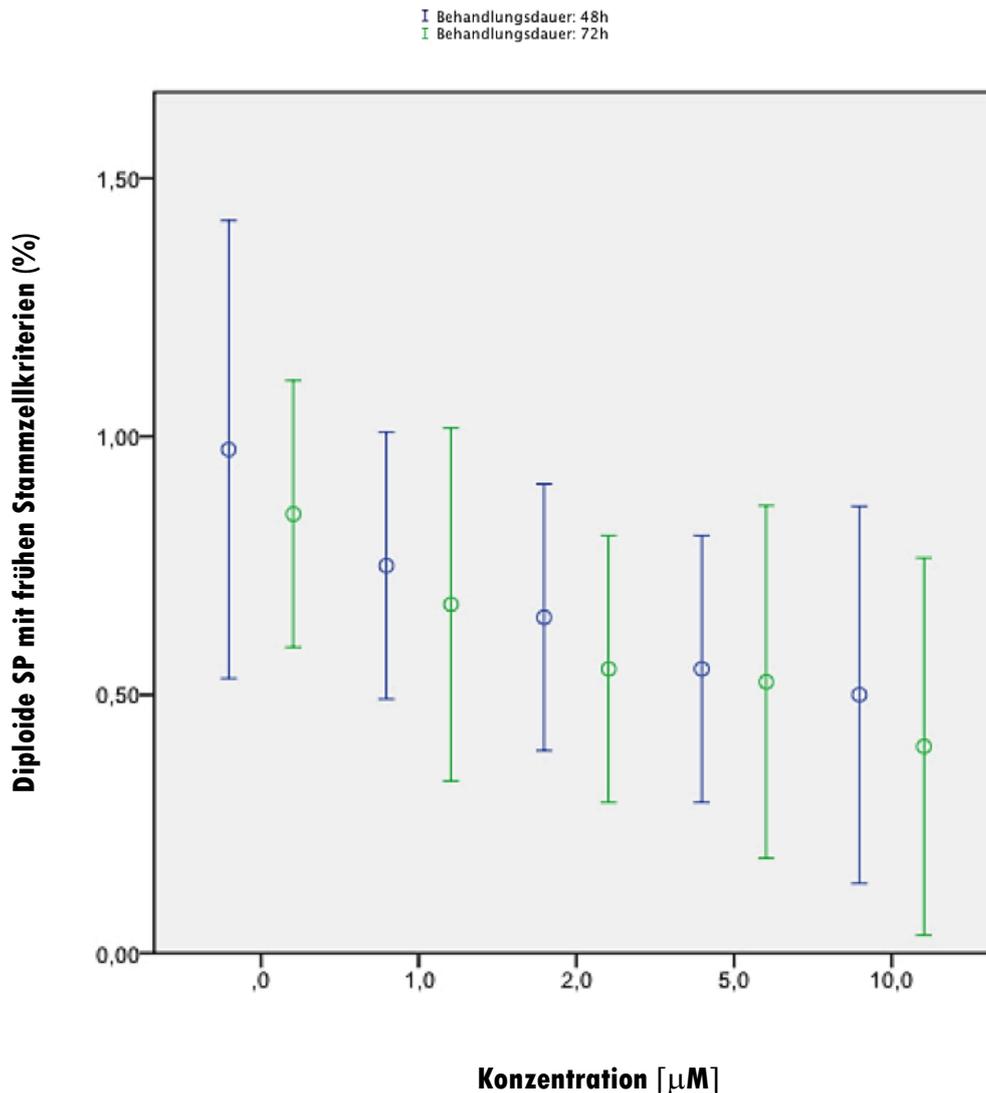


Abb. 27: Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile der Early und Intermediate diploiden SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in μM (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

### 3.3.4 Differenzielle Effekte von SAL auf den Anteil der tetraploiden SP in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration

Die ausgewerteten Messdaten bezüglich der differenziellen Effekte von SAL auf den Anteil der tetraploiden SP in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer sowie -konzentration waren nicht derart eindeutig wie die Ergebnisse bezüglich

des Anteils der diploiden SP. Es ist uns nicht gelungen, eine klare Tendenz aufzuzeigen: Während bei der Analyse der Werte für die tetraploide SP nach 24-stündiger Behandlung bei allen verwendeten Konzentrationen von SAL sehr geringe Unterschiede aufgefallen sind (Abb. 28), ergab die weitere Auswertung der Messdaten für die Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden sehr sprunghafte Ergebnisse. Wir haben nach 48 Stunden Inkubationszeit einen klaren Anstieg der tetraploiden SP verzeichnen können, insbesondere bei jenen Zellen, welche mit 2,0  $\mu\text{M}$  (SP 4n Anteil von 5,4 %) und mit 10,0  $\mu\text{M}$  (SP 4n Anteil von 5,5 %) behandelt worden waren. Nach 72 Stunden war demgegenüber eine konzentrationsabhängige Verringerung der tetraploiden SP zu sehen. Die Übersicht für die ermittelten Ergebnisse im Rahmen der Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden bietet die nachfolgende Abbildung 29.

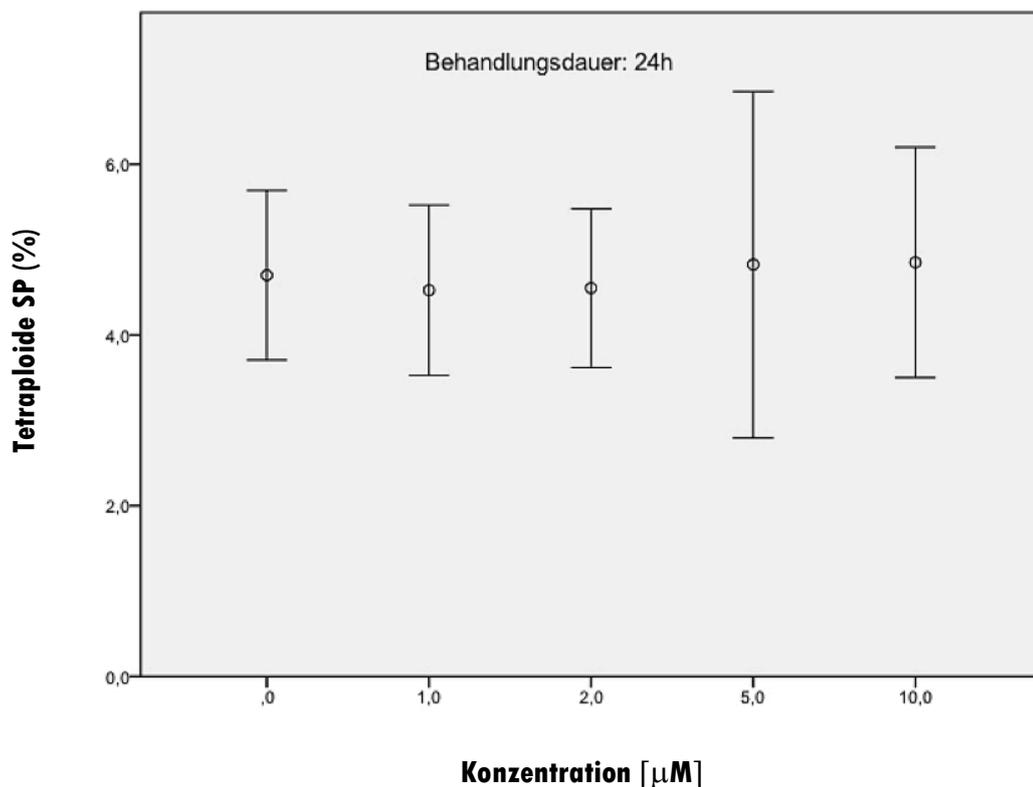


Abb. 28: Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 24 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile tetraploider SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

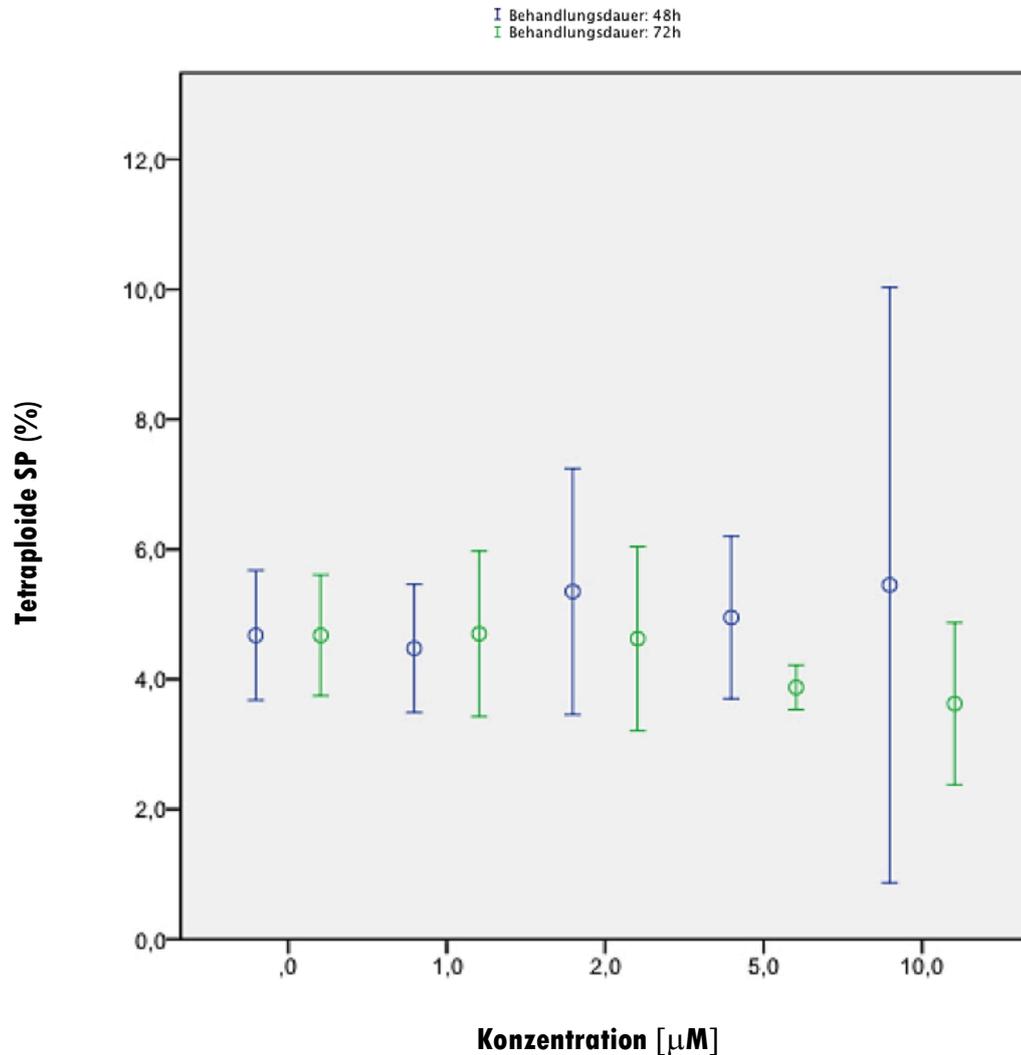


Abb. 29: Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile tetraploider SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

Die genauere Übersicht über die erhobenen Werte für den Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation aller durchgeführten SAL-Versuche liegt in Form des Punktdiagramms im Anhang vor.

### 3.3.5 Differenzielle Effekte von SAL auf den Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration

Analog zu den im Vorangegangenen beschriebenen Ergebnissen bezüglich des Anteils der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation hat sich eine ähnliche Entwicklung beim Anteil der Early und Intermediate SP an der G2/M-Hauptpopulation offenbart. Nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden war kaum ein relevanter Unterschied abhängig von der Behandlungskonzentration für den Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien festzustellen. Die Werte der entsprechenden Konzentrationen schwanken zwischen 1,4 % und 1,7 %, was der nachstehenden Abbildung 30 zu entnehmen ist.

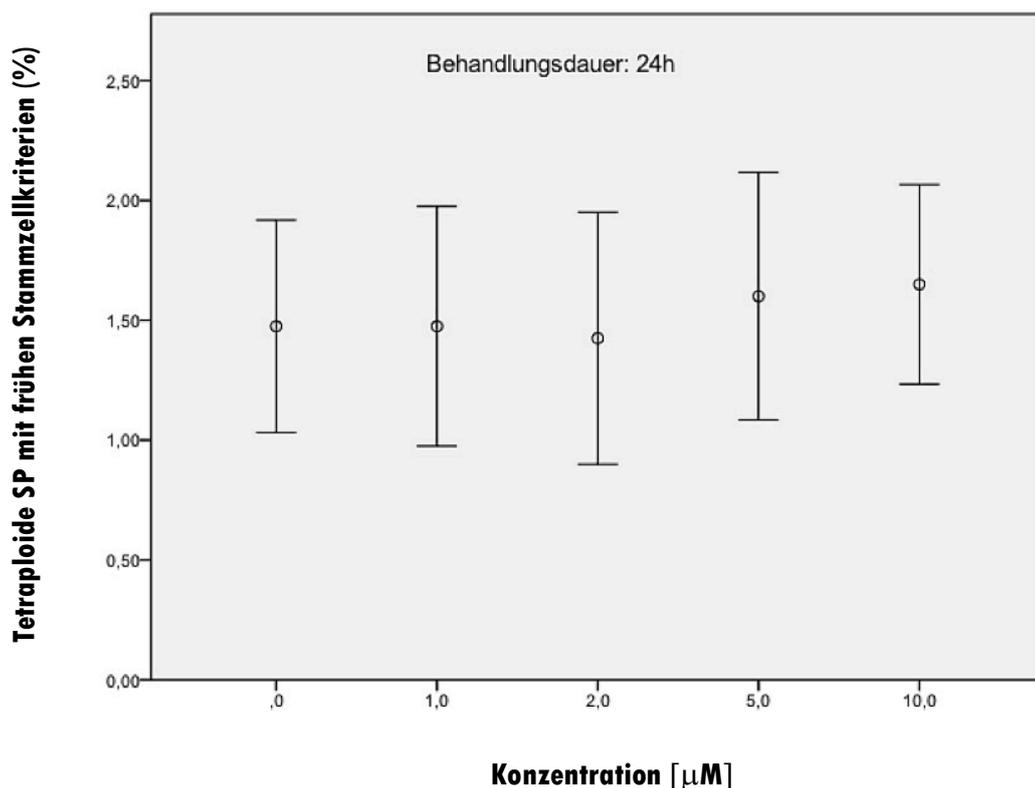


Abb. 30: Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 24 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile der Early und Intermediate tetraploiden SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

Es fanden sich weiterhin zwischen den ermittelten Werten der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration nach einer Inkubationszeit von 48 und 72 Stunden zum einen und den präsentierten Ergebnissen im Kapitel 3.3.4 zum anderen deutliche Parallelen. Im Anschluss an eine Behandlungsdauer von 48 Stunden war ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Early und Intermediate SP zu beobachten. Für jene Zellen, welche mit 0,0  $\mu\text{M}$  SAL behandelt wurden, ergab sich ein Mittelwert der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien in Höhe von 1,6 %. Dagegen ermittelten wir einen Mittelwert für die mit 10  $\mu\text{M}$  SAL behandelten Zellen, der bei 2,0 % lag.

Nach 72 Stunden war dagegen eine konzentrationsabhängige Abnahme der SP 4n mit frühen Stammzellkriterien zu sehen. Somit lag der Wert für jene Zellen, welche mit der höchsten SAL-Konzentration behandelt wurden, bei 1,2 %. Im Gegensatz dazu lag der Ursprungswert bei 1,5 % bei den mit 0,0  $\mu\text{M}$  SAL behandelten Zellen (Abb. 31).

Die umfassende Übersicht der ermittelten Werte für den Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation aller realisierten SAL-Versuchen ist in Form eines Punktdiagramms im Anhang einzusehen.

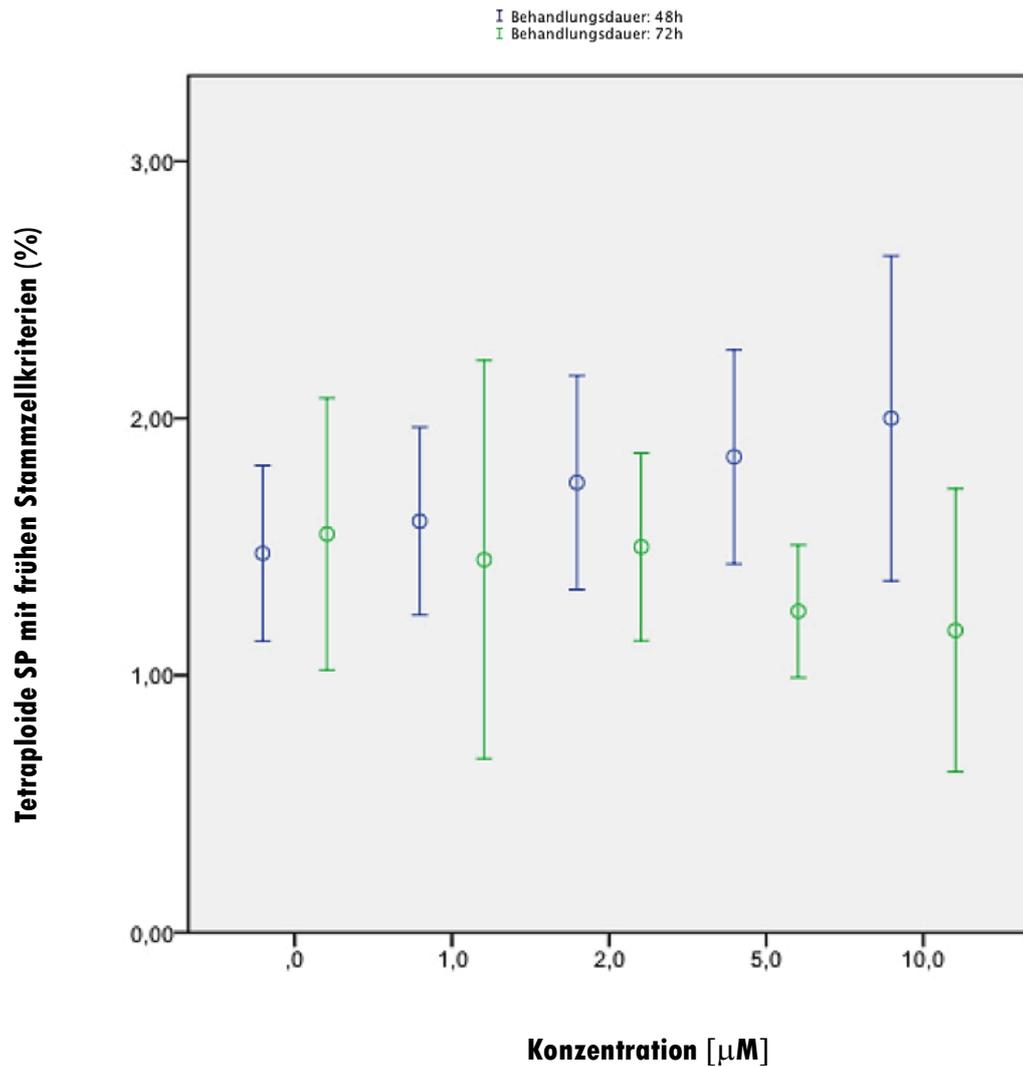


Abb. 31: Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile der Early und Intermediate tetraploiden SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in µM (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

### 3.4 Behandlungsspezifische Effekte von Midostaurin auf die Stammzellpopulation der Zelllinie KG-1a

Als Tyrosinkinaseinhibitor ist PKC412 (Midostaurin) eine vielversprechende Substanz zur Therapie von AML. Aus diesem Grund haben wir entsprechend den Behandlungsversuchen mit CUR und SAL die AML-Zellen der Zelllinie KG-1a mit sechs verschiedenen Konzentrationen (0,0 nM, 100 nM, 150 nM, 200

nM, 300 nM und 500 nM) über die Inkubationsdauer von 24, 48 und 72 Stunden hinweg behandelt.

Ähnlich wie bei den zwei zuvor untersuchten Substanzen haben wir bei der Auswertung der Testergebnisse erneut drei Schwerpunkte gesetzt. Im Einzelnen handelt es sich um die Toxizität der Testsubstanz in Abhängigkeit von Behandlungsdauer sowie -konzentration und differenzielle Effekte von PKC412 auf den Anteil der diploiden SP bzw. Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien sowie differenzielle Effekte von PKC412 auf den Anteil der tetraploiden SP bzw. Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien, die ebenfalls konzentrationsabhängig und je nach Inkubationsdauer in Betracht genommen wurden.

#### **3.4.1 Differenzielle zytotoxische Effekte von PKC412 auf KG-1a-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration**

Ziel der Analyse war die Bestimmung der konzentrationsabhängigen PKC412-Toxizität, darüber hinaus sollte die Beurteilung der substanzspezifischen Auswirkungen auf den Anteil toter Zellen je nach Behandlungsdauer vorgenommen werden.

Die Auswertung unserer Messergebnisse hat ergeben, dass die Toxizität von PKC412 auf AML-Zellen der Zelllinie KG-1a sowohl mit der Zunahme der Konzentration als auch der Inkubationszeit ansteigt. Somit haben wir für unbehandelte Zellen (0,0 nM PKC412) nach 24 Stunden Behandlungsdauer einen Mittelwert von 2,9 % und nach 72 Stunden einen Mittelwert von 3,7 % ermitteln können. Dieser Wert wächst bei einer PKC412-Konzentration von 300 nM auf 6,0 % (nach 24 Stunden), 7,6 % (nach 48 Stunden) und 9,0 % (nach 72 Stunden) an. Im Falle einer Konzentration von 500 nM PKC412 haben wir sogar Mittelwerte für den prozentualen Anteil toter Zellen an den Singlets von 8 % (nach 24 Stunden), 8,2 % (nach 48 Stunden) und 15 % nach 72 Stunden Inkubationszeit feststellen können (Abb. 32 und Abb. 33).

Eine genauere Übersicht der ermittelten Werte für den Anteil toter Zellen aller durchgeführten PKC412-Versuche in Form eines Punktdiagramms findet sich im Anhang.

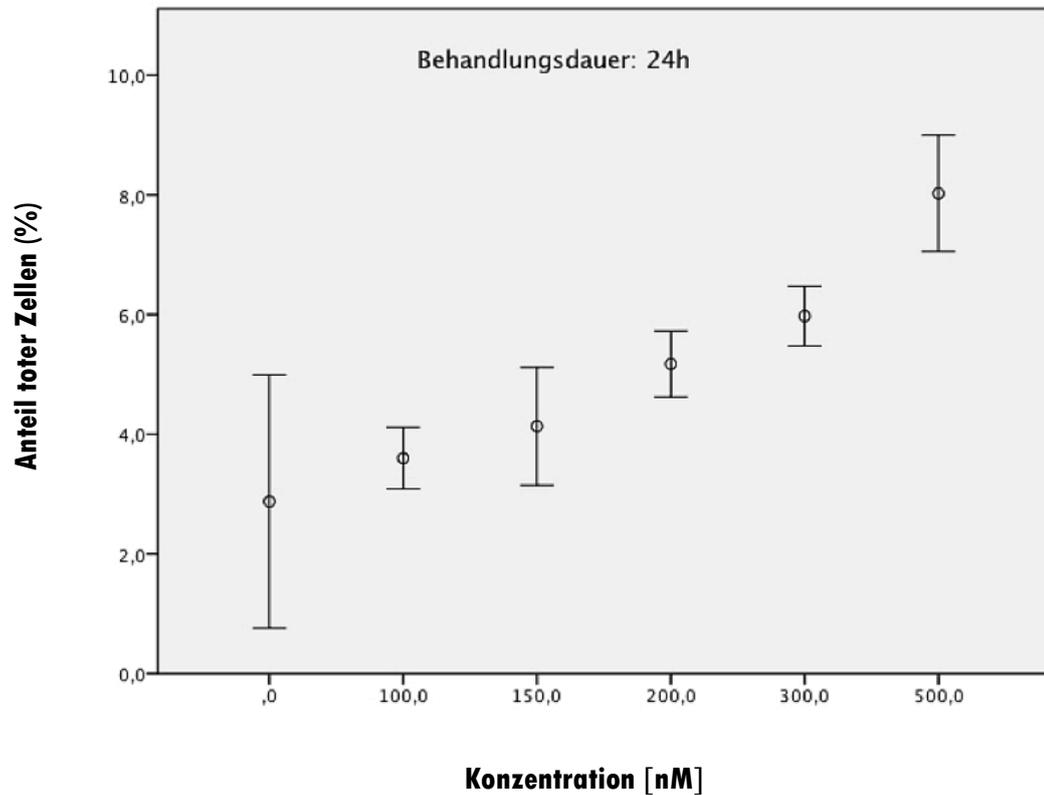


Abb. 32: Anteil toter Zellen nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 24 Stunden  
Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile toter Zellen (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in nM (X-Achse).

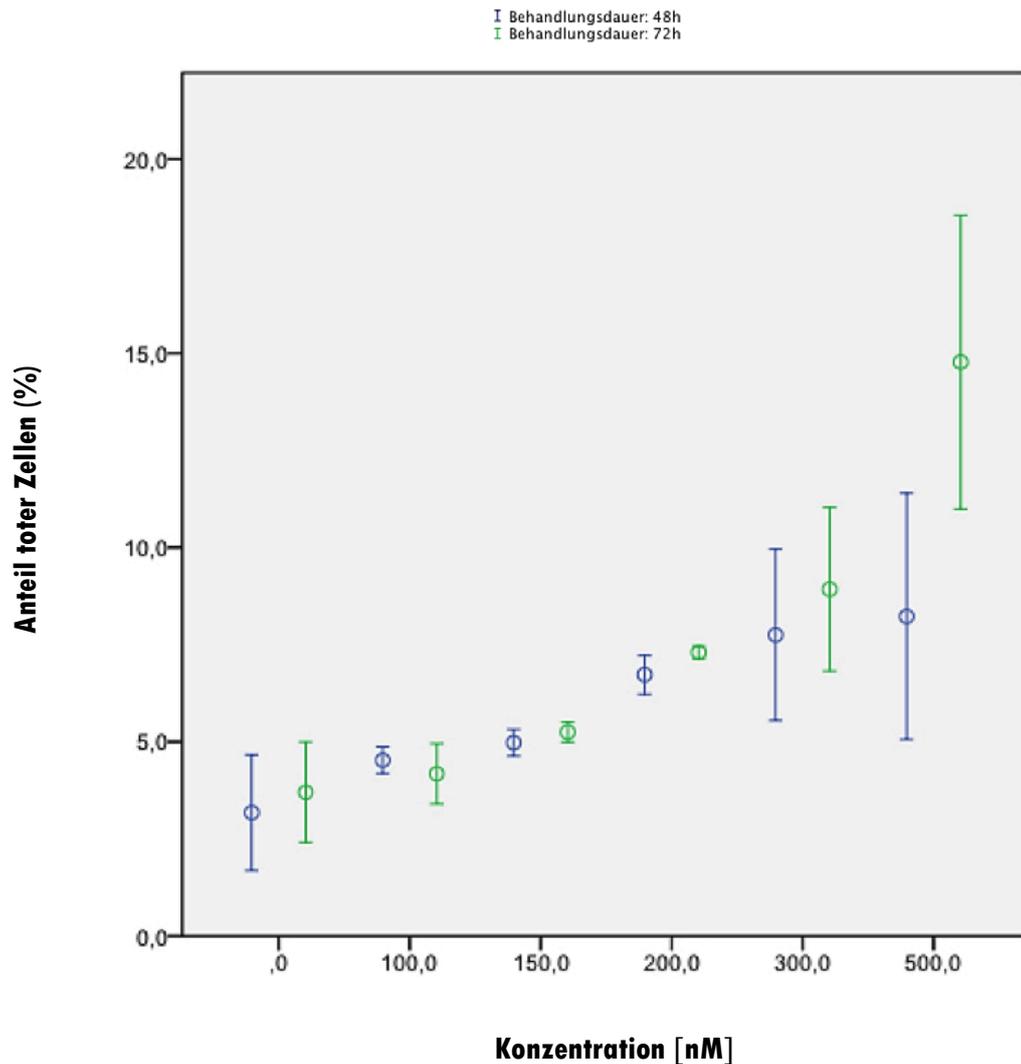


Abb. 33: Anteil toter Zellen nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile toter Zellen (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in nM (X-Achse).

### 3.4.2 Differenzielle Effekte von PKC412 auf den Anteil der diploiden SP in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration

Das primäre Analyseziel war Untersuchung der differenziellen Effekte von PKC412 auf den Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation. Die erarbeiteten Ergebnisse haben eine deutliche Tendenz aufzeigen können. Aus den Abbildungen 34 und 35 geht hervor, dass sowohl eine höhere PKC412-

Konzentration wie auch eine längere Behandlungsdauer zu einer Abnahme der diploiden SP führen.

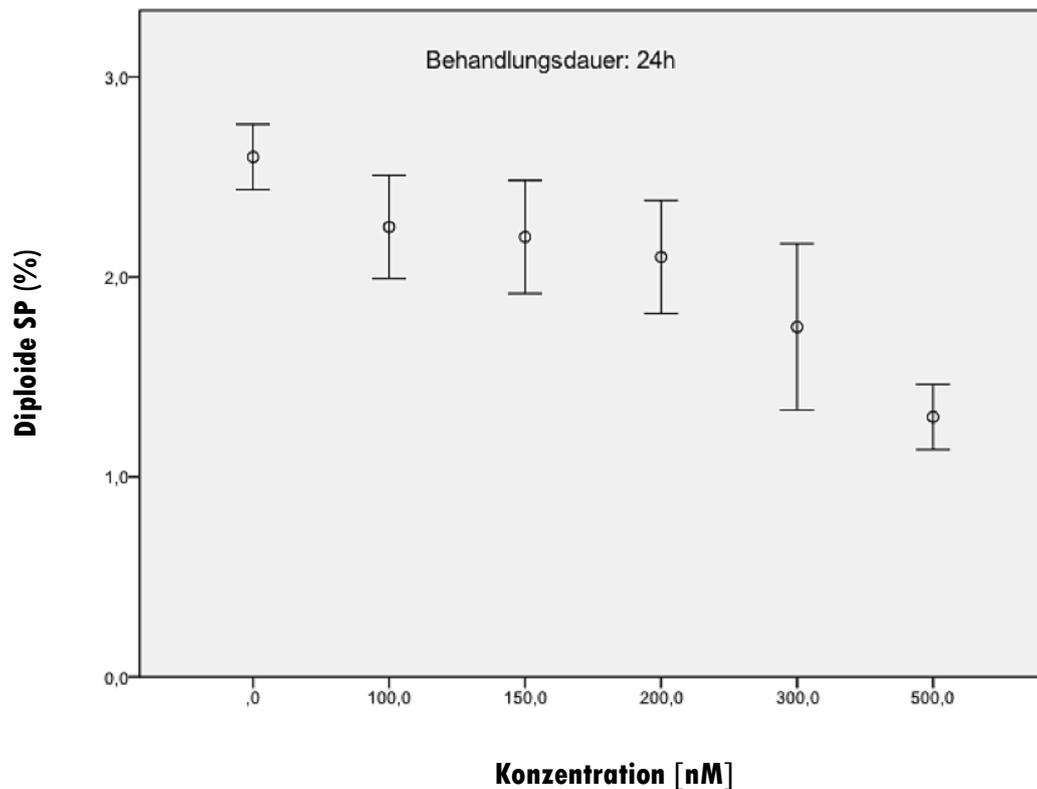


Abb. 34: Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 24 Stunden

Abgebildet sind oben die jeweiligen prozentualen Anteile diploider SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in nM (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

Der von uns erfasste mittlere Anteil der diploiden SP an der G0/G1-Hauptpopulation unbehandelter Zellen (0,0 nM PKC412) lag bei 2,6 %. Im Anschluss an eine Inkubationszeit von 24 Stunden erreichte der SP-Anteil 1,3 % bei den mit 500 nM PKC412 behandelten Zellen. Demnach liegt schon nach einer Behandlungsdauer von gerade einmal 24 Stunden eine Halbierung des SP 2n-Anteils an der diploiden Hauptpopulation vor. Nach 48 Stunden haben die mit 500 nM PKC412 inkubierten Zellen einen Anteil der diploiden SP von 0,9 % aufgewiesen, nach 72 Stunden war dieser Anteil noch weiter auf 0,5 % gesunken (Abb. 35).

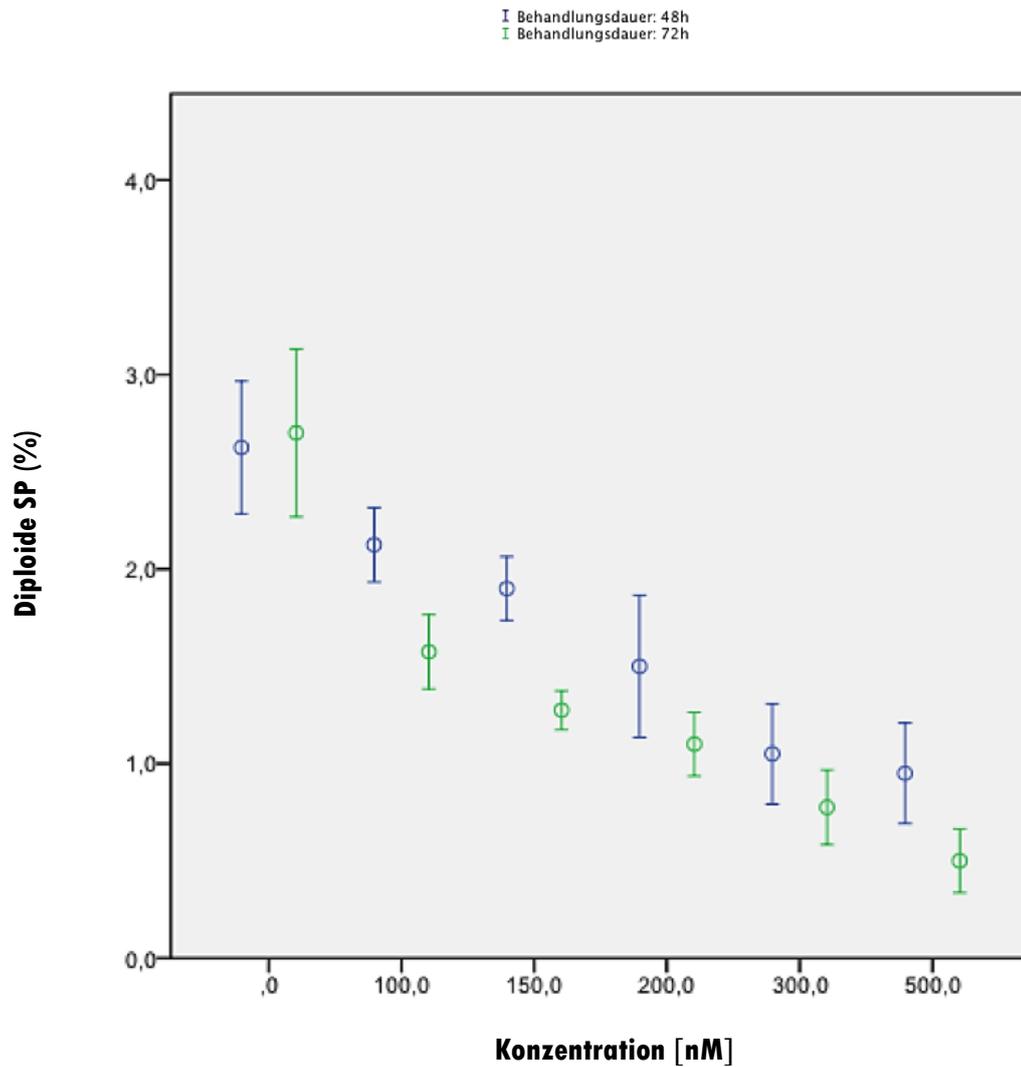


Abb. 35: Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile diploider SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in nM (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

Die präzisere Übersicht der ermittelten Werte für den Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation sämtlicher umgesetzter PKC412-Versuche ist in Form eines Punktdiagramms im Anhang vorhanden.

### 3.4.3 Differenzielle Effekte von PKC412 auf den Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration

Vergleichbar mit den eben beschriebenen Ergebnissen bezüglich des Anteils der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation hat sich bei dem Anteil der Early und Intermediate SP an der G0/G1-Hauptpopulation eine ähnliche Entwicklung gezeigt. Bereits nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden haben wir einen Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien von 0,9 % für unbehandelten Zellen ermitteln können, was der Abbildung 36 zu entnehmen ist. Dieser Wert ist nach 48 Stunden und bei einer Konzentration von 500 nM PKC412 auf 0,4 % abgesunken, nach 72 Stunden Inkubationszeit lag der Wert bei den mit 500 nM PKC412 behandelten Zellen nur noch bei 0,3 % (Abb. 37).

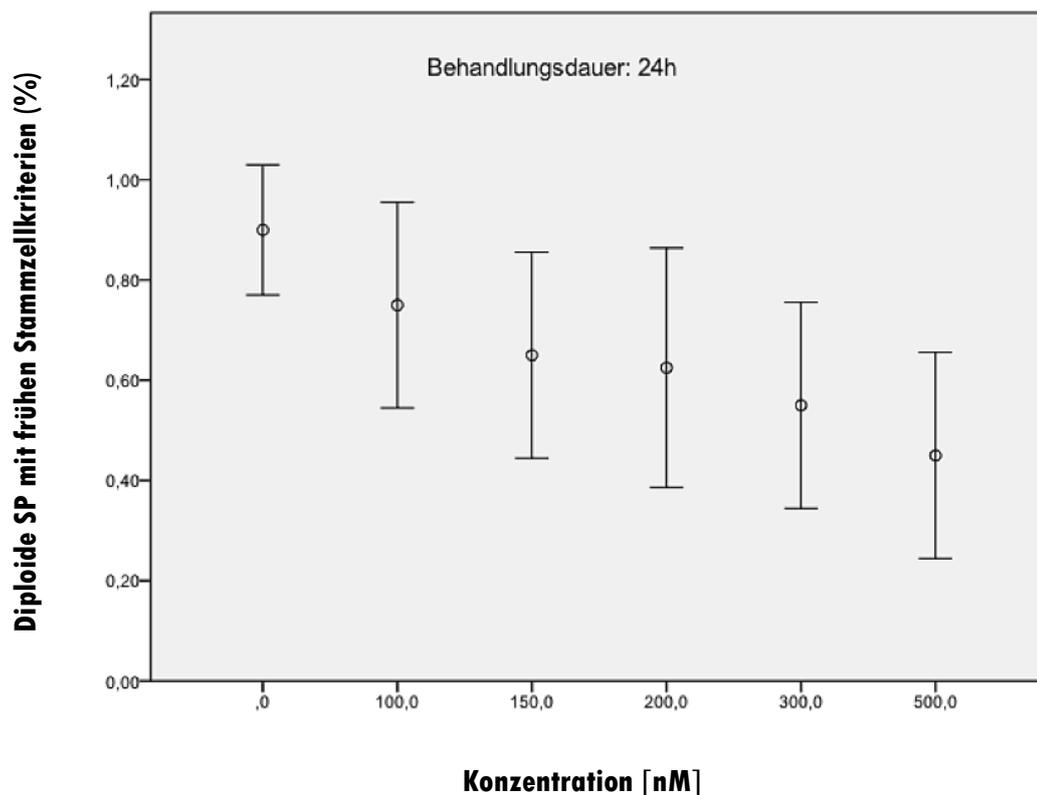


Abb. 36: Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 24 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile der Early und Intermediate diploiden SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in nM (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

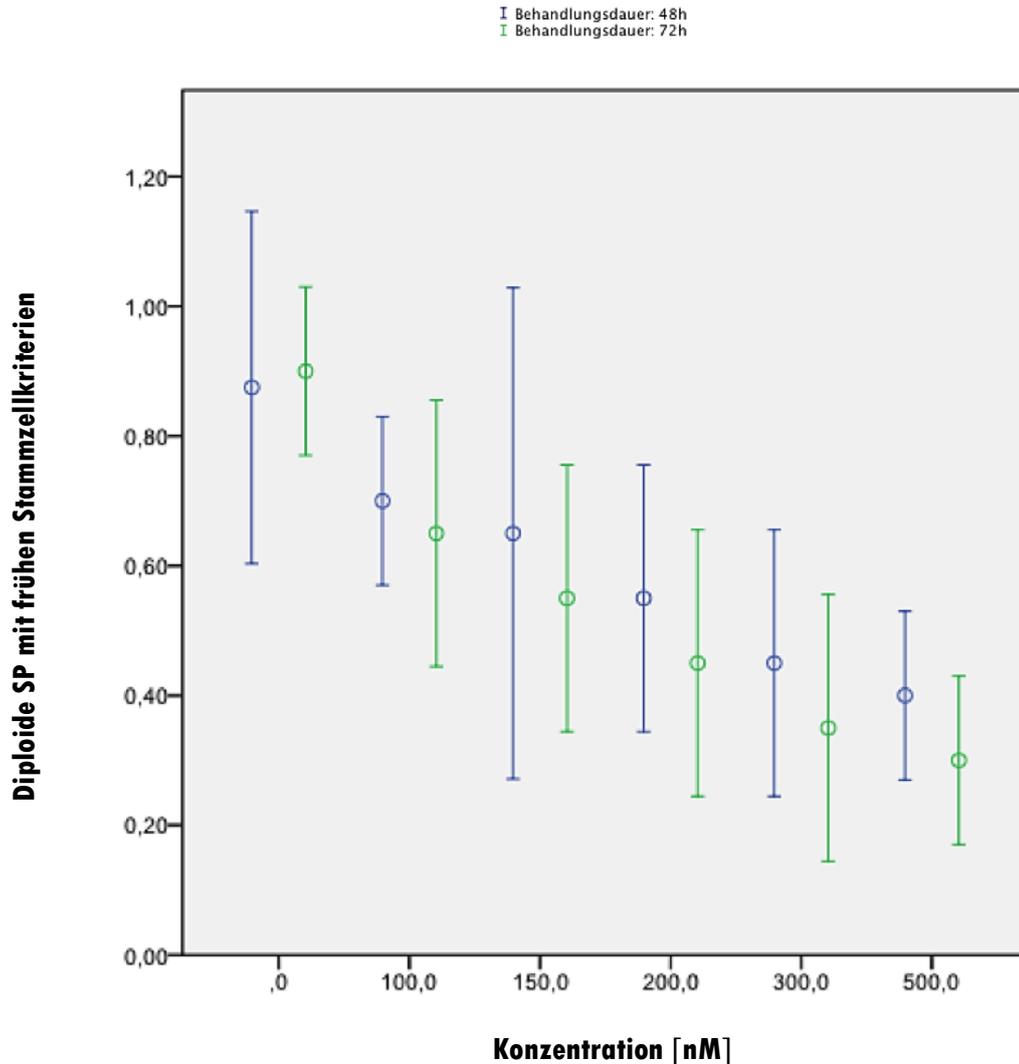


Abb. 37: Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile diploider SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in nM (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

Vergleicht man Abb. 36 und 37, so wird ersichtlich, dass der Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien nach einer Behandlung mit PKC412 einen starken konzentrationsabhängigen Effekt zeigt. Zwar besteht eine Korrelation zwischen der PKC412-Behandlungsdauer und dem Anteil der diploiden SP mit

frühen Stammzellkriterien. Dieser ist aber im Vergleich zu dem konzentrationsabhängigen Effekt weniger stark ausgeprägt.

Eine genauere Übersicht über die Werte für den Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation aller durchgeführten PKC412-Versuche liegt als Punktdiagramm im Anhang vor.

#### **3.4.4 Differenzielle Effekte von PKC412 auf den Anteil der tetraploiden SP in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration**

Die ausgewerteten Messdaten bezüglich der differenziellen Effekte von PKC412 auf den Anteil der tetraploiden SP in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer sowie -konzentration haben analog zu den Ergebnissen bezüglich des Anteils der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation gezeigt, dass sowohl eine längere Behandlungsdauer als auch eine Zunahme der Behandlungskonzentration mit einer Verringerung des Anteils der tetraploiden SP an der G2/M-Population einhergeht. Vor diesem Hintergrund haben wir einen mittleren Ausgangswert für den Anteil der tetraploiden SP un behandelter Zellen von 4,4 % bei einer 24-stündigen Inkubationszeit (Abb. 38) ermitteln können. Abbildung 39 visualisiert hierzu, dass dieser Wert nach 24 Stunden bei den mit 500 nM PKC412 behandelten Zellen auf 2,1 % sinkt. Anschließend fällt er weiter auf 1,5 % nach 72 Stunden Behandlungsdauer und ebenfalls bei den Zellen, die mit 500 nM behandelt wurden.

Die genauere Übersicht der ermittelten Werte für den Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation sämtlicher im Rahmen dieser Abhandlung realisierten PKC412-Versuche ist als Punktdiagramm im Anhang vorhanden.

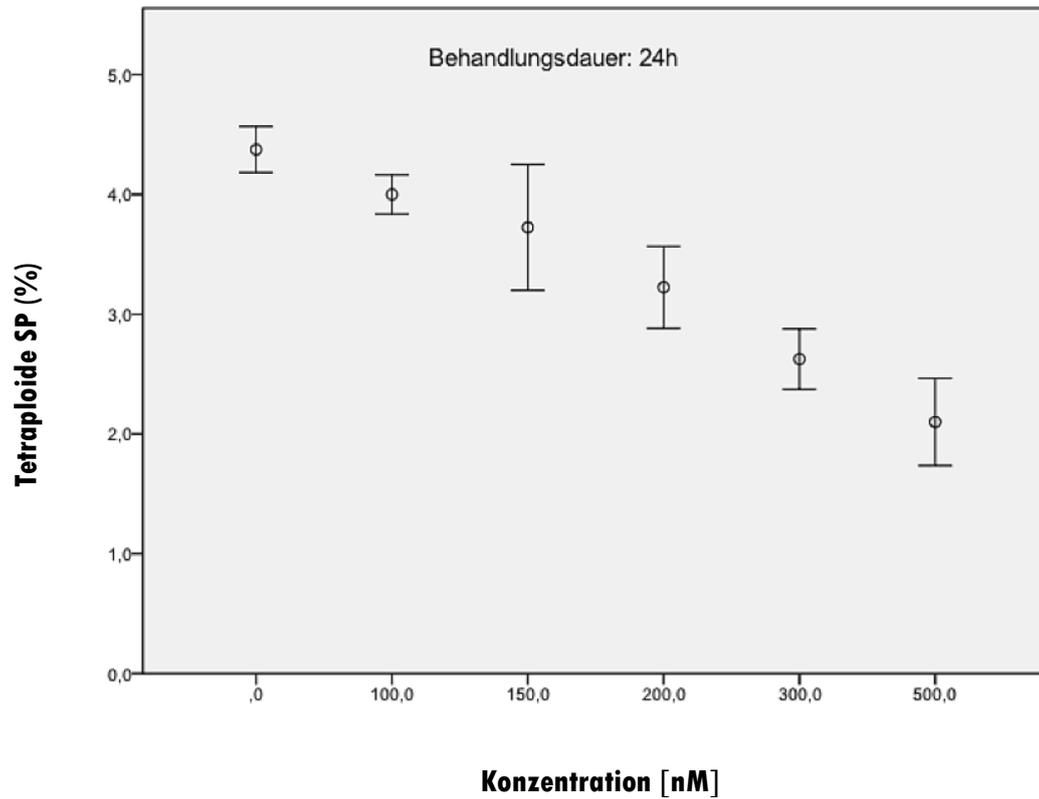


Abb. 38: Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 24 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile tetraploider SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in nM (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

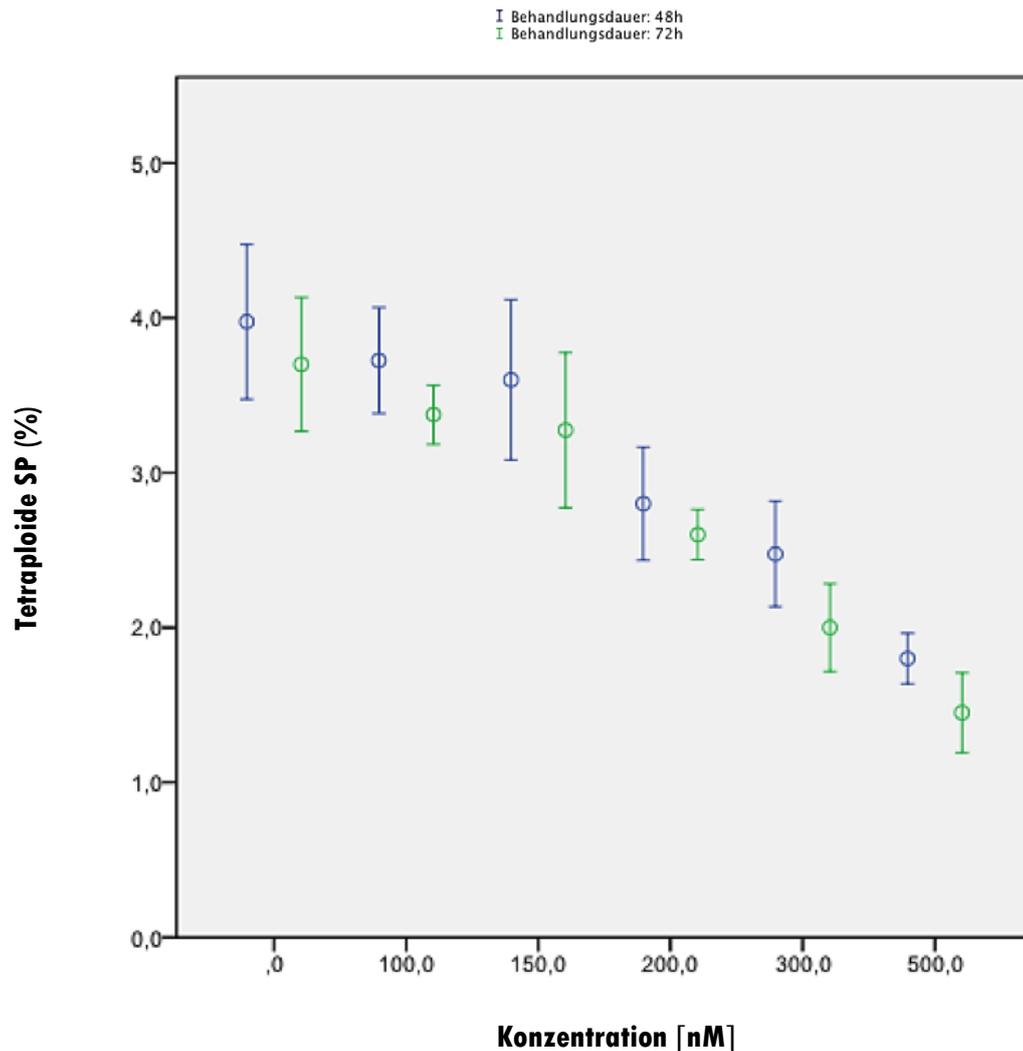


Abb. 39: Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile tetraploider SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in nM (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

### 3.4.5 Differenzielle Effekte von PKC412 auf den Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration

Die ausgewerteten Messdaten bezüglich der differentiellen Effekte von PKC412 auf den Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der G2/M-Hauptpopulation in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer sowie -konzentration haben ebenfalls eine klare Tendenz aufgezeigt. Bei einem

Ausgangswert von 1,5 % bei den unbehandelten Zellen ergab sich für die mit 500 nM PKC412 behandelten nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden ein mittlerer Wert von 0,9 %. Diese Entwicklung ist in Abbildung 40 zu sehen.

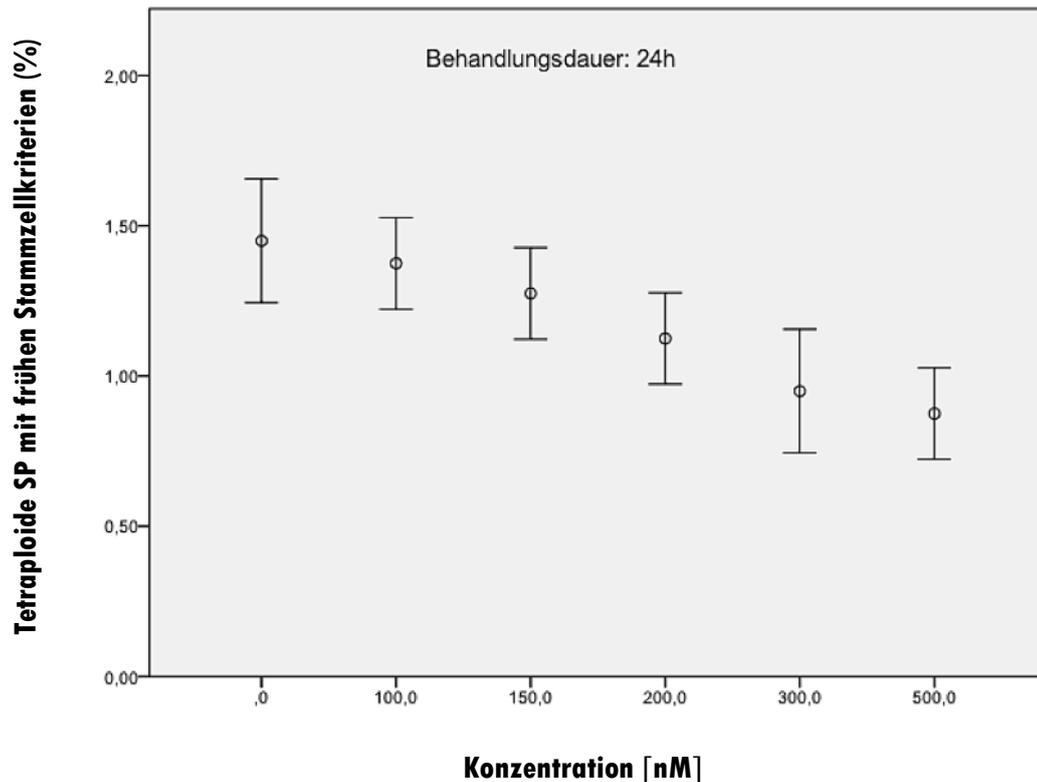


Abb. 40: Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 24 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile der Early und Intermediate tetraploiden SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in nM (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

Im Anschluss an die 48 Stunden Behandlungsdauer haben wir einen weiteren konzentrationsabhängigen Abfall der Werte für die Early und Intermediate SP 4n beobachten können. Aus der nachstehenden Abbildung 41 offenbart sich für die mit 500 nM PKC412 behandelten Zellen ein Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation in Höhe von 0,8 %. Dieser Wert sinkt nach 72 Stunden Inkubationszeit weiter auf 0,7 %, und zwar ebenfalls bei 500 nM PKC412 Konzentration.

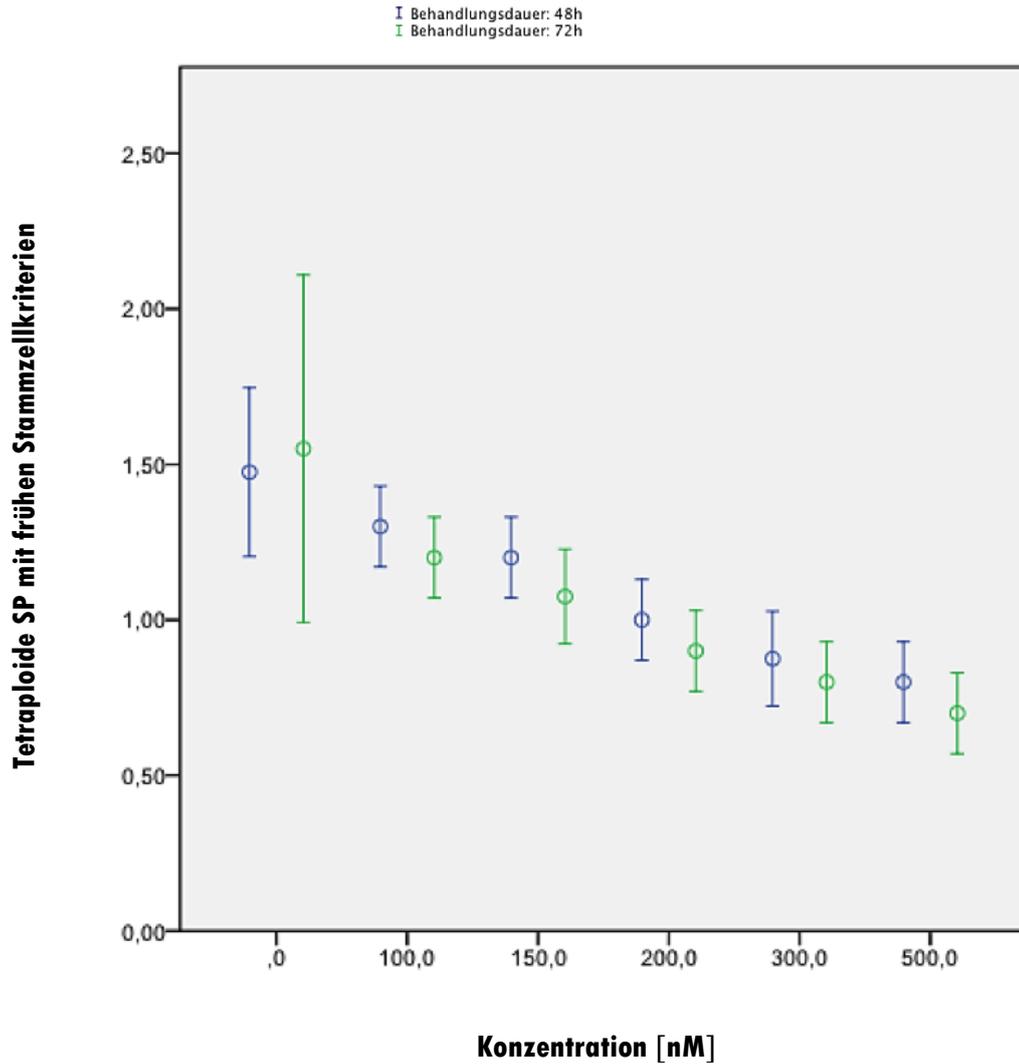


Abb. 41: Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile der Early und Intermediate tetraploiden SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in nM (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

Die detaillierte Übersicht der beobachteten Werte für den Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation aller PKC412-Versuche liegt als Punktdiagramm im Anhang vor.

### **3.5 Behandlungsspezifische Effekte von Fenretinide auf die Stammzellpopulation der Zelllinie KG-1a**

Als letzte Testsubstanz haben wir 4-HPR (Fenretinide) und dessen Auswirkung auf AML-Zellen der Zelllinie KG-1a einer Untersuchung unterzogen. Wir haben insgesamt vier zeitlich voneinander unabhängige Versuchsreihen mit Fenretinide durchgeführt. Dabei haben wir fünf verschiedenen 4-HPR-Konzentrationen (0,0  $\mu\text{M}$ , 1,0  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 5,0  $\mu\text{M}$  und 10,0  $\mu\text{M}$ ) für die Dauer von 24, 48 und 72 Stunden behandelt. Bei einem ersten Testversuch hatten wir auch die Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  4-HPR in unsere Testreihe mit eingeschlossen. Da es aber kaum Unterschiede zwischen der Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  und 1,0  $\mu\text{M}$  4-HPR zu beobachten gab, haben wir in unseren weiteren Versuchen davon abgesehen.

Entsprechend der Auswertungen der anderen drei untersuchten Testsubstanzen haben wir uns auch hier auf die drei folgenden Schwerpunkte konzentriert: Toxizität der Testsubstanz in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer sowie -konzentration und differenzielle Effekte von 4-HPR auf den Anteil der diploiden SP bzw. Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien sowie differenzielle Effekte von 4-HPR auf den Anteil der tetraploiden SP bzw. Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien, die ebenfalls konzentrationsabhängig und je nach Inkubationsdauer unterschiedlich sind.

#### **3.5.1 Differenzielle zytotoxische Effekte von 4-HPR auf KG-1a-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration**

Unsere Messergebnisse zu den differenziellen zytotoxischen Effekten von 4-HPR auf AML-Zellen der Zelllinie KG-1a in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und -konzentration haben nicht immer eine eindeutige Tendenz identifizieren können. Für die Interpretation unserer Messergebnisse haben wir die gemessenen Werte für den Anteil toter Zellen an den Singlets zwischen behandelten und unbehandelten Zellen miteinander verglichen. Es

ergab sich für unbehandelte Zellen und eine Inkubationszeit von 24 Stunden ein Mittelwert von 2,1 %. Überraschenderweise lag dieser Wert nach 48 und 72 Stunden Behandlungsdauer bei 3,7 %. Bei mit 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  4-HPR behandelten Zellen zeigte sich nach 24 Stunden ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Toxizität, was aus der folgenden Abbildung 43 zu entnehmen ist. Somit haben wir einen Mittelwert in Höhe von 5,7 % für jene Zellen ermitteln können, welche mit 10  $\mu\text{M}$  4-HPR behandelt wurden.

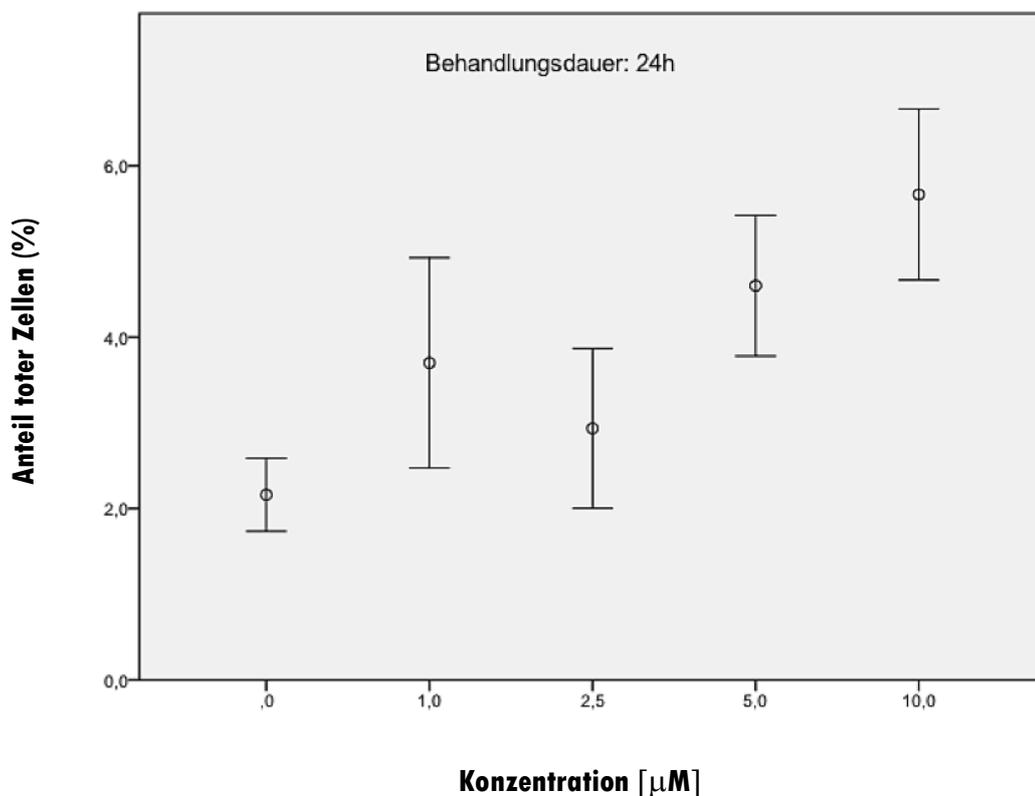


Abb. 42: Anteil toter Zellen nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 24 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile toter Zellen (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse).

Nach einer Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden ist dagegen auf Basis unserer Auswertungen trotz stark voneinander abweichender versuchsbezogener Messwerte eine klare Tendenz zu erkennen: Sowohl mit steigender Behandlungsdauer als auch einer Erhöhung der Behandlungskonzentration offenbart sich eine Zunahme des Anteils toter Zellen

an den Singlets. Demzufolge haben wir für die mit 1  $\mu\text{M}$  4-HPR behandelten Zellen nach 48 Stunden einen Wert von 3,7 % und nach 72 Stunden in Höhe von 5 % ermitteln können. Die entsprechenden Werte liegen bei einer Behandlungskonzentration von 10  $\mu\text{M}$  4-HPR bei 13,3 % (nach 48 Stunden Inkubationszeit) und 16,7 % (nach 72 Stunden Behandlungsdauer). Abbildung 44 bietet eine Übersicht über die Mittelwerte für den Anteil toter Zellen nach jeweils 48 und 72 Stunden Inkubationszeit.

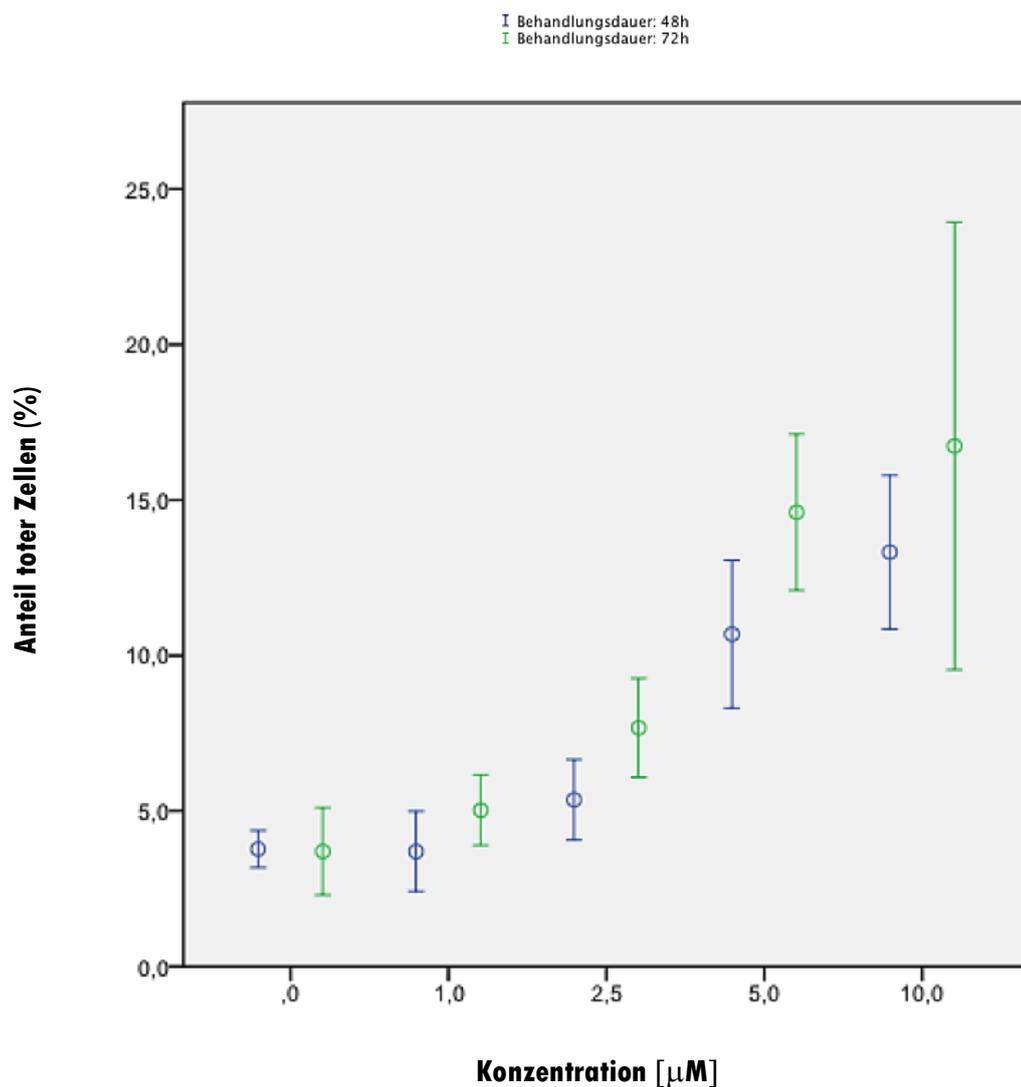


Abb. 43: Anteil toter Zellen nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile toter Zellen (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse).

Eine genauere Übersicht über die ermittelten Werte für den Anteil toter Zellen aller durchgeführten 4-HPR-Versuche in Form eines Punktdiagramms findet sich im Anhang.

### **3.5.2 Differenzielle Effekte von 4-HPR auf den Anteil der diploiden SP in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration**

Ein wichtiger Punkt bei der Auswertung der Messergebnisse manifestierte sich darin, die differenziellen Effekte von 4-HPR auf den Anteil der diploiden SP in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer sowie -konzentration zu ermitteln. Einhergehend damit ist uns aufgefallen, dass die Testergebnisse der vier Versuchsreihen einigermaßen abweichende Werte aufgewiesen haben. Wie aus Abbildung 44 zu entnehmen ist, haben eine Behandlungsdauer von 24 Stunden und eine Erhöhung der Behandlungskonzentration zu einem Anstieg der diploiden SP beigetragen. Somit haben wir für unbehandelte Zellen einen Mittelwert von 2,6 % feststellen können. Bei einer Behandlungskonzentration von 10  $\mu\text{M}$  4-HPR ergab sich dagegen ein Mittelwert von 5,4 %.

Bei einer Behandlungsdauer von 48 Stunden zeigte sich ebenfalls ein konzentrationsabhängiger Anstieg des Anteils der diploiden SP an der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Hauptpopulation, wie es aus Abbildung 45 ersichtlich wird. Unsere Messergebnisse verhielten sich diesbezüglich nach 72 Stunden sehr sprunghaft. Nach einem initialen Anstieg der diploiden SP mit steigender Behandlungskonzentration ist uns aufgefallen, dass die mit 10  $\mu\text{M}$  4-HPR behandelten Zellen einen geringeren Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation aufweisen. Dies gilt sowohl im Vergleich zu den mit anderen Behandlungskonzentrationen behandelten Zellen nach 72 Stunden Inkubationszeit als auch verglichen mit den Werten der mit 10  $\mu\text{M}$  4-HPR behandelten Zellen sowie einer kürzeren Behandlungsdauer (24 und 48 Stunden). Allerdings ist an dieser Stelle anzumerken, dass die bei allen vier Versuchsreihen gewonnenen Messdaten nach genauer und präziser Auswertung nach identischer Vorlage sehr abweichende Werte hervorgebracht

haben. Daher gehen wir an dieser Stelle aufgrund starker Streuung am ehesten von zufälligen Schwankungen aus. Die nachfolgende Abbildung 45 liefert eine Übersicht über die gewonnenen Messergebnisse im Anschluss an 48 und 72 Stunden Behandlungsdauer.

Wie zuvor findet sich die detaillierte Übersicht der ermittelten Werte für den Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation sämtlicher durchgeführten 4-HPR-Versuche als Punktdiagramm im Anhang.

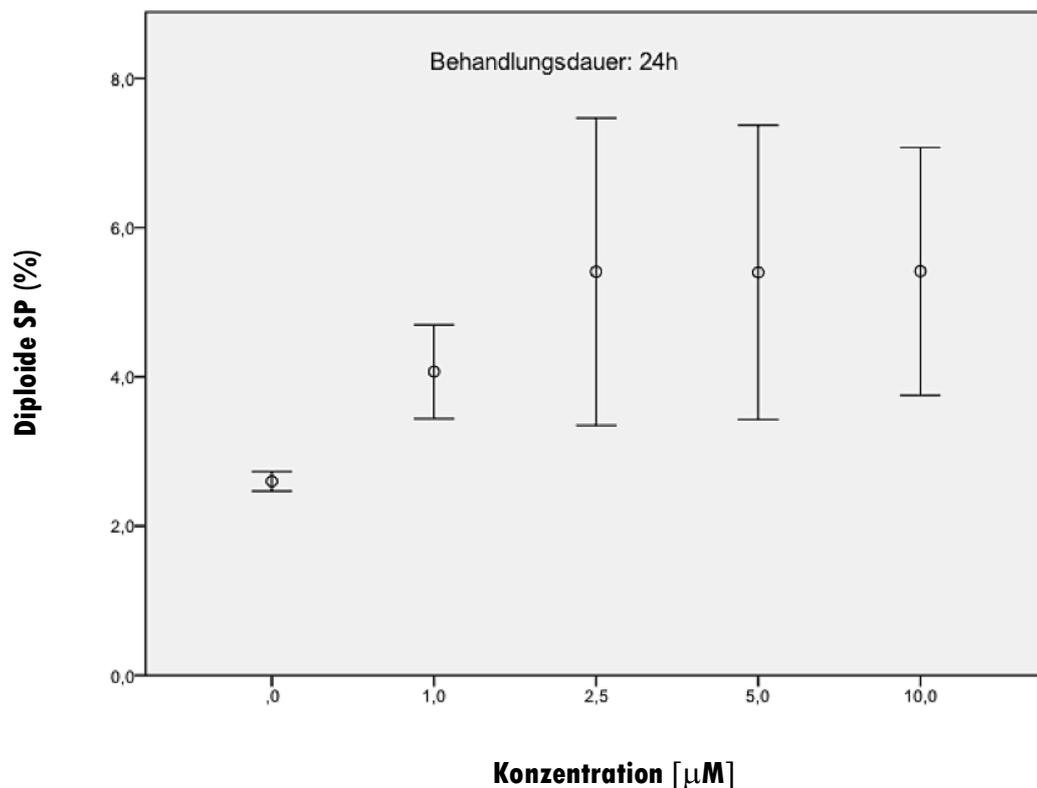


Abb. 44: Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 24 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile diploider SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

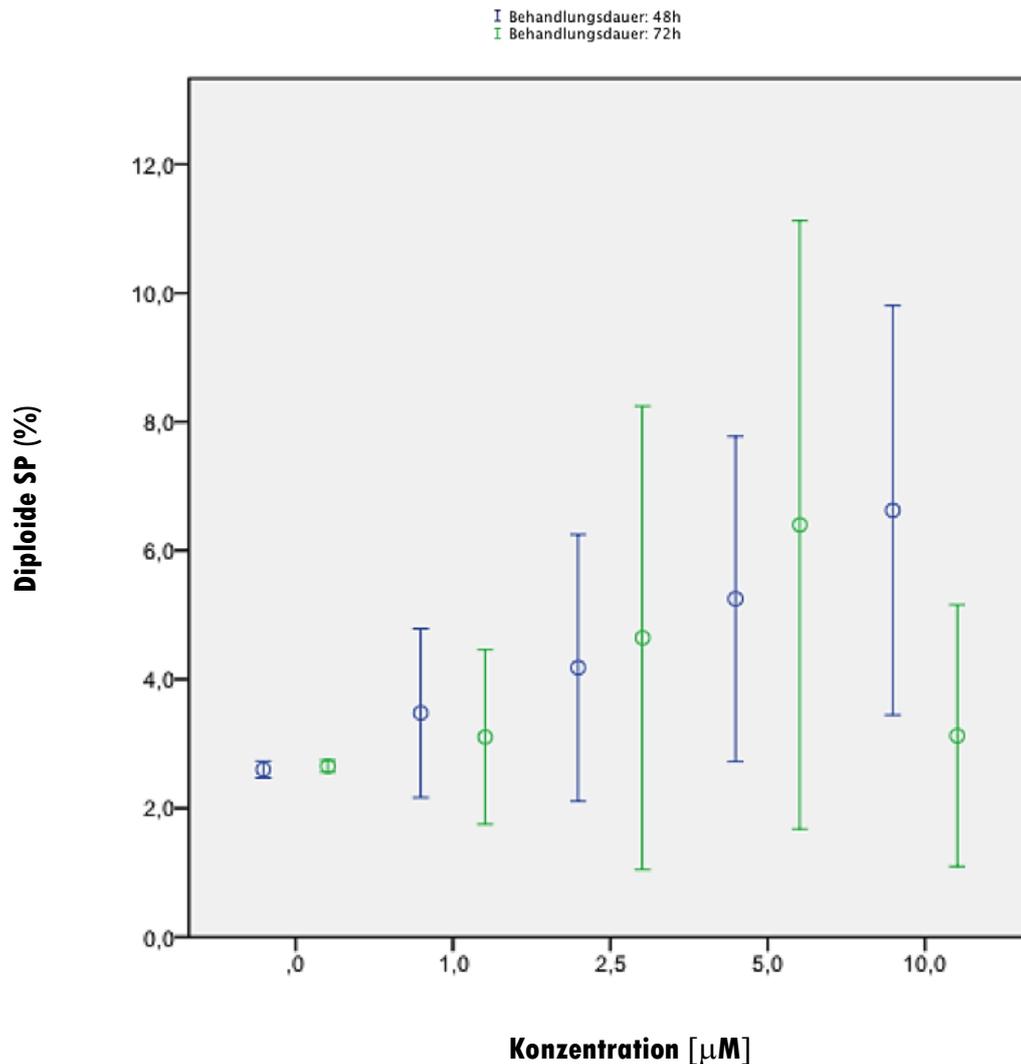


Abb. 45: Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile diploider SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

### 3.5.3 Differenzielle Effekte von 4-HPR auf den Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration

Ähnlich der Analyse des Anteils der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation zeigten sich im Rahmen der Auswertung des Anteils der Early und Intermediate SP an der G0/G1-Hauptpopulation sehr abweichende Messergebnisse. Nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden war ein

leichter konzentrationsabhängiger Anstieg der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien in Relation zum Ursprungswert unbehandelter Zellen festzustellen (0,9 % bei einer Konzentration von 0,0  $\mu\text{M}$  4-HPR bis auf 1,8 % bei einer 4-HPR-Konzentration von 10,0  $\mu\text{M}$ ). Die Veranschaulichung der Ergebnisse für die Behandlungsdauer von 24 Stunden findet sich in der nachstehenden Abbildung 46.

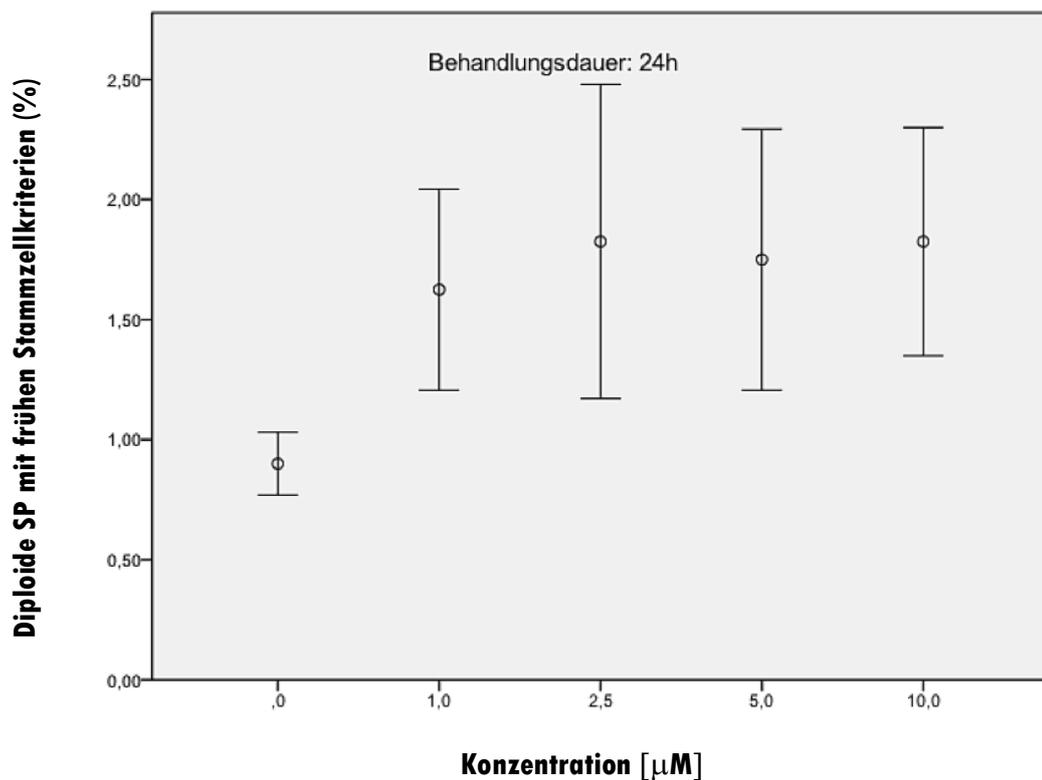


Abb. 46: Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 24 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile der Early und Intermediate diploiden SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

Im Falle der Behandlungsdauer von 48 Stunden fielen die Ergebnisse etwas eindeutiger aus: Wir haben ermitteln können, dass der Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien konzentrationsabhängig und zudem in Abhängigkeit von der jeweiligen Inkubationszeit anstieg. Der Anteil der Early und Intermediate SP an der diploiden Hauptpopulation lag nach 48 Stunden bei

einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  4-HPR bei 1,7 % und bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  4-HPR bei 2,2 %. Diese Werte lassen auf eine Verdopplung des Ursprungswertes schließen (Abb. 47).

Die Messergebnisse nach 72 Stunden Inkubationsdauer waren dagegen sehr sprunghaft. Nach einem initialen Anstieg der gemessenen Werte für die diploide SP mit frühen Stammzellkriterien ist ein Abfall des Anteils der diploiden Early und Intermediate SP für die mit 10  $\mu\text{M}$  4-HPR behandelten Zellen eingetreten, was der nachfolgenden Abbildung 47 grafisch zu entnehmen ist.

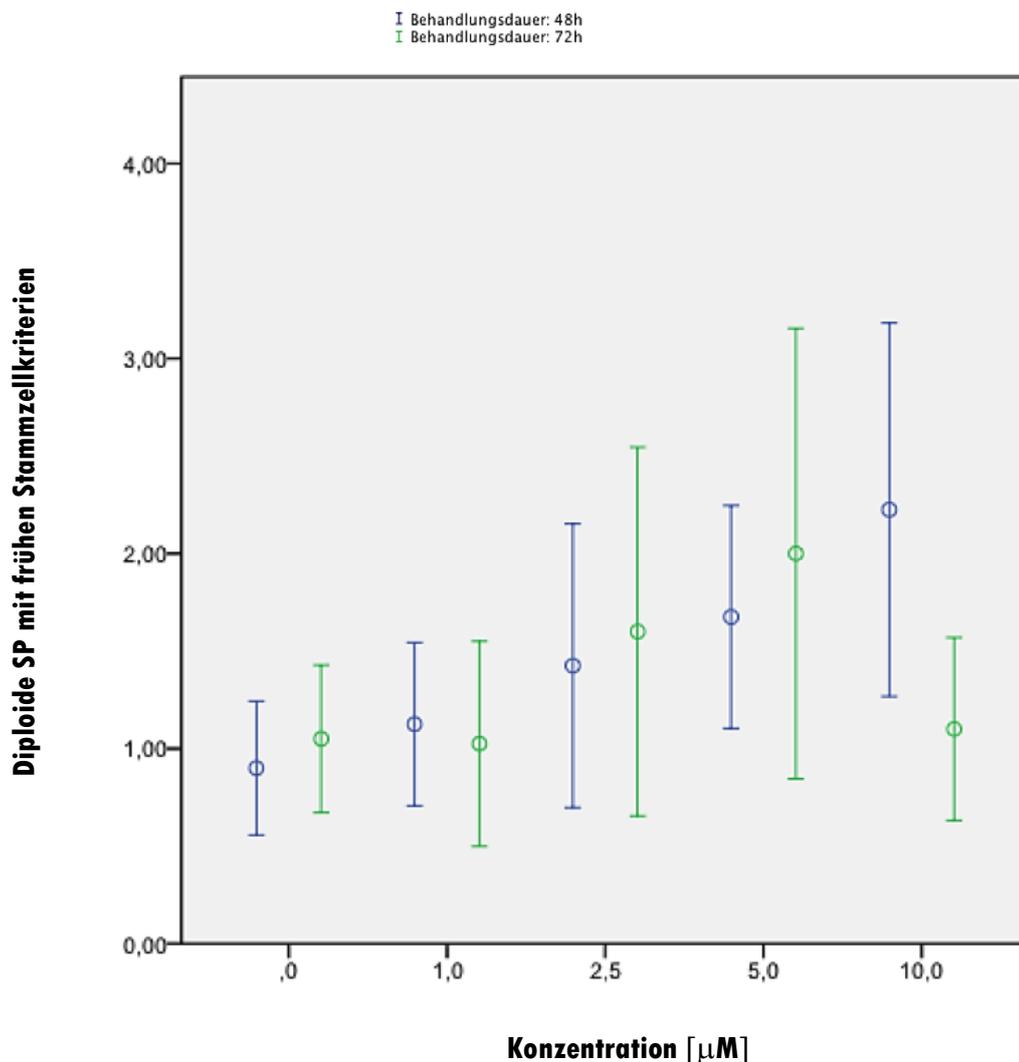


Abb. 47: Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile der Early und Intermediate diploiden SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

Die bekannte Übersicht der ermittelten Werte für den Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation aller in diesem Promotionsprojekt durchgeführten 4-HPR-Versuche ist in Form des Punktdiagramms im Anhang hinterlegt.

#### **3.5.4 Differenzielle Effekte von 4-HPR auf den Anteil der tetraploiden SP in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration**

Mit Ähnlichkeit zu den ermittelten Messwerten bezüglich des Anteils der diploiden SP zeigte sich eine vergleichbare Entwicklung bei der Auswertung der Messdaten hinsichtlich der tetraploiden SP. Alle aus den vier Versuchsreihen 4-HPR gewonnenen Messwerte haben wir präzise nach Vorlage ausgewertet. Dennoch ist uns eine Inkohärenz der Messergebnisse zwischen den einzelnen Versuchen aufgefallen.

Für die Werte der tetraploiden SP bei einer Behandlungsdauer von 24 Stunden ergab sich folglich keine eindeutige Tendenz. Wir haben für unbehandelte Zellen einen Mittelwert von 4,7 % feststellen können. Bei den mit 1  $\mu\text{M}$  4-HPR behandelten Zellen ergab sich ein Mittelwert von 6,3 %, bei den mit 2,5  $\mu\text{M}$  behandelten Zellen lag dieser Wert zunächst bei 5,0 %, bevor er bei einer Behandlungskonzentration von 5  $\mu\text{M}$  4-HPR auf 8,4 % angestiegen und bei einer Behandlungskonzentration von 10  $\mu\text{M}$  4-HPR wiederum auf 5,8 % gesunken ist (Abb. 48).

Die für die Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden ermittelten Messwerte bestätigen eine ähnliche Entwicklung. Nach einem initialen Anstieg der tetraploiden SP wurde sowohl nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden als auch einer Inkubationsdauer von 72 Stunden wiederum ein Abfall des Anteils der tetraploiden SP an der G2/M-Hauptpopulation sichtbar, was aus Abbildung 49 zu erkennen ist.

Eine exaktere Übersicht zu den erhobenen Werten für den Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation aller realisierten 4-HPR-Versuche in Gestalt eines Punktdiagramms findet sich im Anhang.

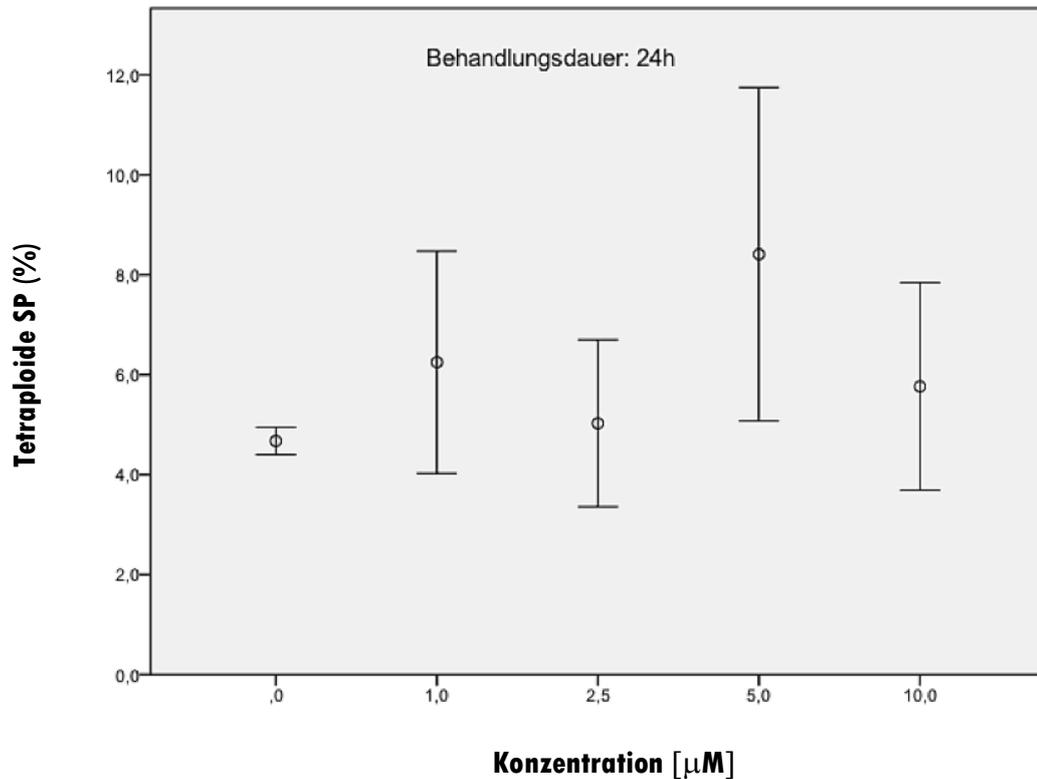


Abb. 48: Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 24 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile der tetraploiden SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

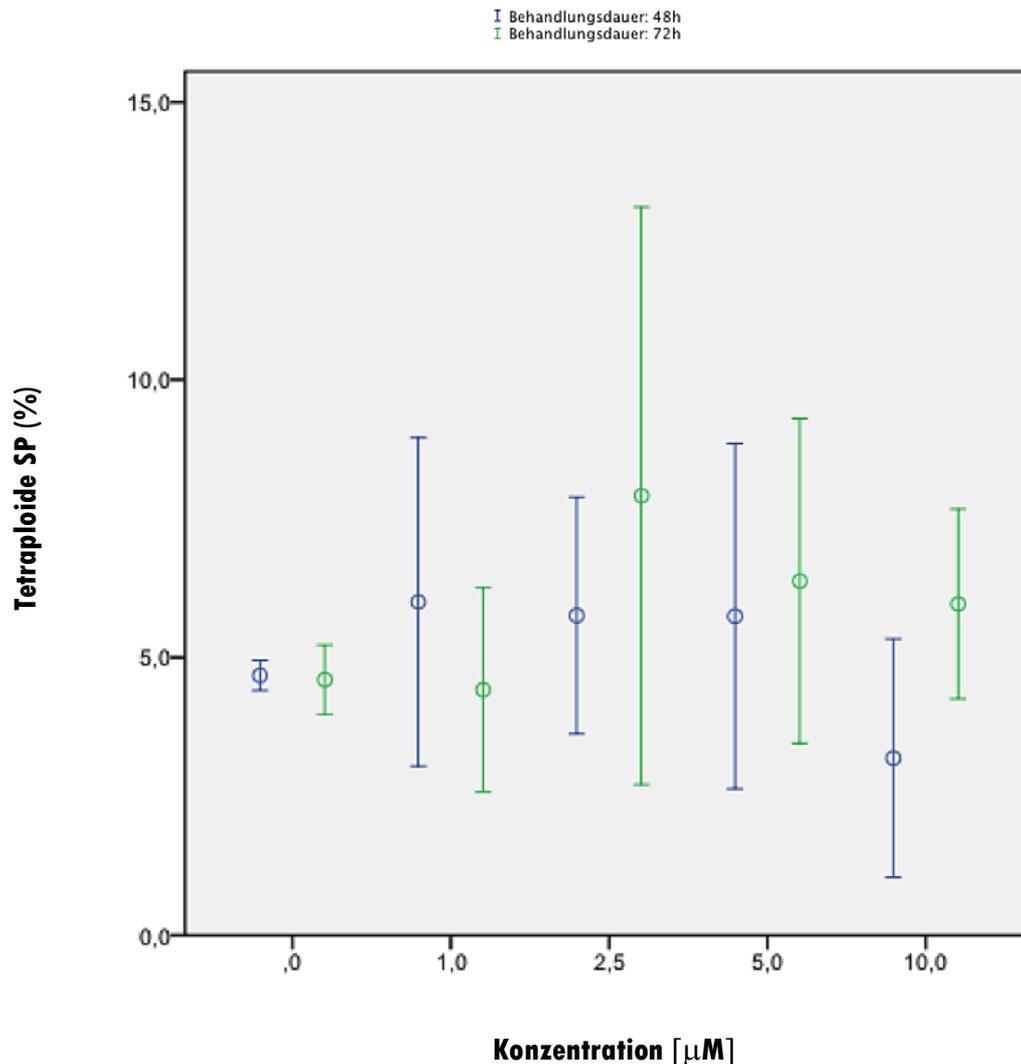


Abb. 49: Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile der tetraploiden SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

### 3.5.5 Differenzielle Effekte von 4-HPR auf den Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und Behandlungskonzentration

Vergleichbar mit den ermittelten Ergebnissen für den Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation haben unsere Auswertungen der differenziellen Effekte von 4-HPR auf den Anteil der sowohl Early als auch der Intermediate SP an der G2/M-Hauptpopulation konzentrationsabhängig wie

auch in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer keine eindeutige Tendenz offenbart. Resultierend daraus haben wir nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden folgende Mittelwerte ermitteln können: 1,5 % für unbehandelte Zellen, 2,0 % für die mit 1,0  $\mu\text{M}$  4-HPR behandelten Zellen, 1,8 % für die mit 2,5  $\mu\text{M}$  4-HPR behandelten Zellen, 2,8 % für jene Zellen, welche mit 5,0  $\mu\text{M}$  4-HPR behandelt wurden, sowie 1,9 % für die Zellen, die mit der höchsten Konzentration von 10,0  $\mu\text{M}$  4-HPR behandelt wurden (Abb. 50).

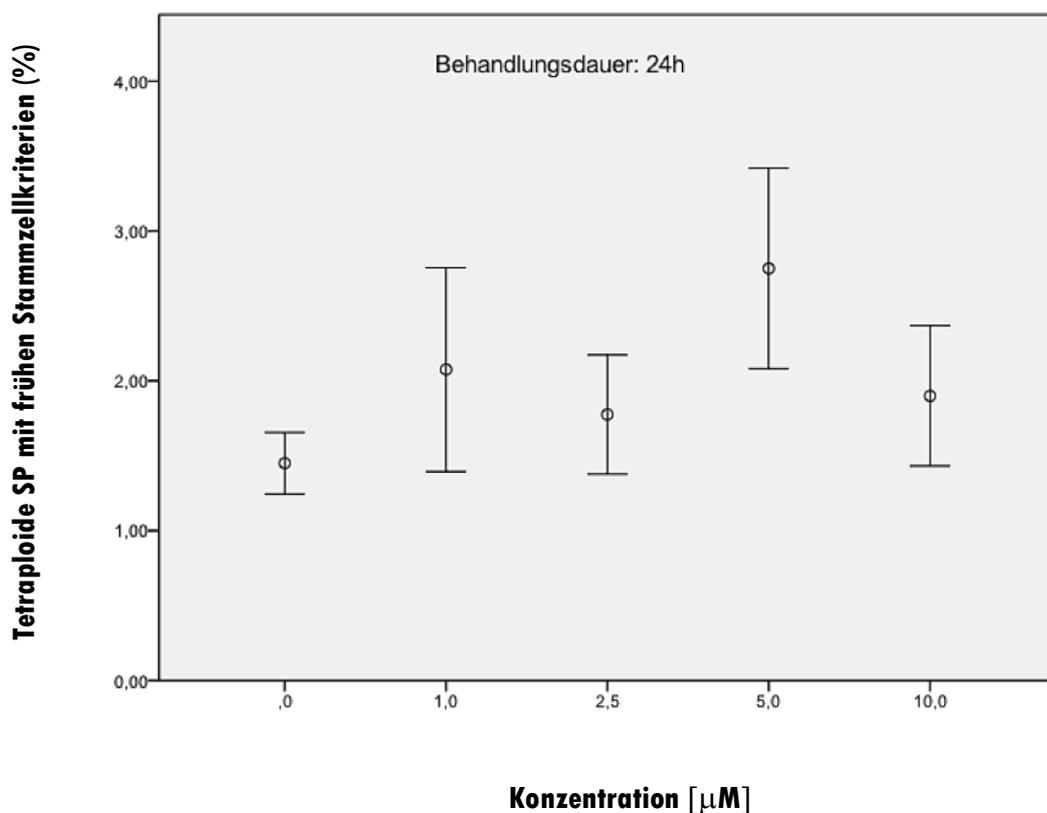


Abb. 50: Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 24 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile der Early und Intermediate tetraploiden SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in  $\mu\text{M}$  (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

Eine längere Inkubationsdauer von 48 bzw. 72 Stunden hat ebenfalls ähnlich sprunghafte Messergebnisse für den Anteil der tetraploiden SP mit frühen

Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation an den Tag gelegt, wie es aus der nachstehenden Abbildung 51 zu entnehmen ist.

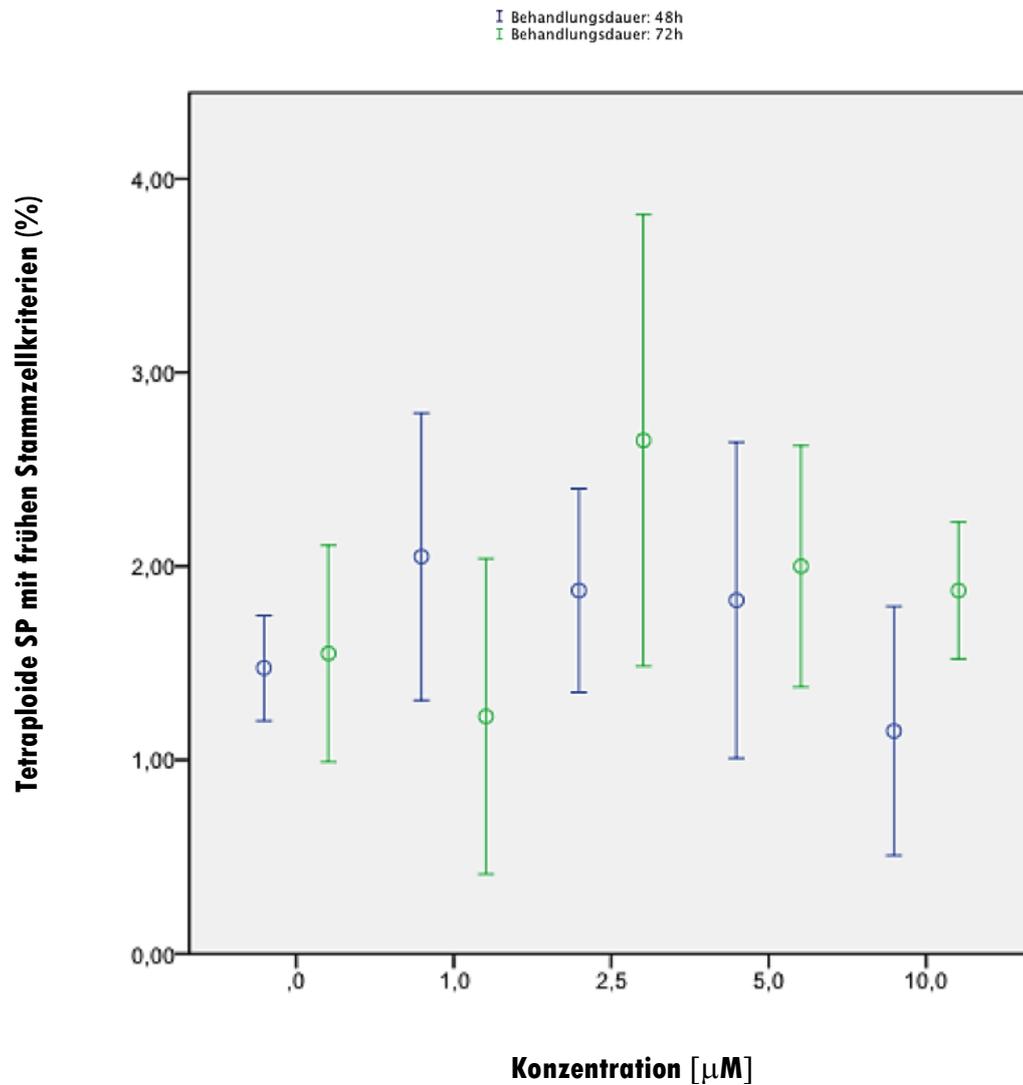


Abb. 51: Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden

Abgebildet sind die jeweiligen prozentualen Anteile der Early und Intermediate tetraploiden SP (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration in µM (X-Achse). Abkürzungen: SP: Side Population

Eine exaktere Übersicht zu den erhobenen Werten für den Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden

Hauptpopulation sämtlicher realisierter 4-HPR-Versuche ist in Form eines Punktdiagramms im Anhang vorzufinden.

### **3.6. Zusammenfassende Gesamtbetrachtung der erhobenen Ergebnisse**

Die in den Kapiteln 3.2 bis 3.5 präsentierten Ergebnissen zeigen die differenziellen zytotoxischen Effekte und Auswirkungen vier verschiedener Substanzen auf die putativen LSCs der AML-Zelllinie namens KG-1a. Dieses Kapitel soll eine zusammenfassende Gesamtbetrachtung der erhobenen Daten bieten.

An erster Stelle soll hier die Dosis- und Behandlungsdauer-abhängige zellspezifische Toxizität je nach Substanz betrachtet werden: Unsere Ergebnisse sprechen eindeutig dafür, dass alle vier Substanzen in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration und Inkubationsdauer die Vitalität der KG-1a-Zellen beeinträchtigt haben. Es konnte bestätigt werden, dass bei der Behandlung der KG-1a-Zellen mit jeder einzelnen dieser Substanzen die zellspezifische Toxizität angestiegen ist. Den größten Anteil an toten Zellen konnten wir bei unseren Versuchsreihen mit SAL registrieren. Die Behandlung der KG-1a-Zellen mit SAL hat bereits nach 24 Stunden Inkubationsdauer einen Dosis-abhängigen Anstieg der Zellzytotoxizität hervorgebracht. Vor diesem Hintergrund konnte für die höchste Behandlungskonzentration mit 10,0 µM SAL bereits nach 24 Stunden ein fünffach höherer Wert für die Zellzytotoxizität gemessen werden.

Auch nach weiterer Behandlung mit der Substanz ist dieser Wert gestiegen und nach 72 Stunden Behandlungsdauer konnte ein sechsfach höherer Anteil toter Zellen verglichen mit unbehandelten Zellen gemessen werden. Für PKC412 lagen die Werte für die Zellzytotoxizität in einem vergleichbaren Rahmen gegenüber den Befunden von den mit SAL behandelten Zellen. Unsere Versuchsreihen mit 4-HPR ergaben zwar in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und -konzentration sehr sprunghafte Ergebnisse zwischen

den einzeln durchgeführten Versuchen, dennoch zeigten sich auch hier eine Verdreifachung des Anteils toter Zellen nach einer Behandlung mit der höchsten 4-HPR-Konzentration nach 24 Stunden und eine um das Vierfache angestiegene Zellzytotoxizität nach 72 Stunden Behandlungsdauer.

Bezüglich der Auswirkungen der vier Substanzen auf die diploide und tetraploide SP ergaben unsere Messdaten weniger übereinstimmende Resultate. Es konnte für die Behandlung der KG-1a-Zellen mit CUR ein Dosis- und Behandlungsdauer-abhängiger Anstieg sowohl der SP 2n als auch der SP 4n gemessen werden. Somit lag der Anteil von SP 2n bei den mit 15,0  $\mu\text{M}$  CUR behandelten Zellen nach einer Behandlungsdauer von 72 Stunden bei 6,7 % gegenüber einem Wert von 2,7 % bei unbehandelten Zellen. Folglich zeigte sich fast eine Verdreifachung des SP 2n-Anteils. Auch bei der tetraploiden SP konnte ein deutlicher Anstieg in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und -konzentration beobachtet werden: 7,8 % bei mit 15  $\mu\text{M}$  CUR behandelten Zellen nach 72 Stunden verglichen mit 5,1 % bei unbehandelten.

Die Versuchsreihen mit PKC412 ergaben dagegen eine deutlich behandlungsspezifische Reduktion der SP 2n und 4n in Abhängigkeit von der Konzentration der Substanz und Inkubationszeit. Bereits nach einer Behandlungsdauer von nur 24 Stunden konnte ein prozentualer Anteil der diploiden SP von 1,3 % bei einer Behandlungskonzentration von 500 nM PKC412 gegenüber 2,6 % bei unbehandelten Zellen ermittelt werden. Nach 72 Stunden war dieser Wert weiter auf 0,5 % gesunken. Auch die Auswirkungen der Behandlung mit PKC412 auf den Anteil der SP 4n hat eine deutliche Tendenz gezeigt: Der Anteil tetraploider SP nach 72 Stunden mit der höchsten PKC412-Konzentration ist auf 1,5 % verglichen mit 4,4 % bei unbehandelten Zellen gesunken.

Unsere Versuchsreihen mit SAL haben zudem eine Reduktion der diploiden und tetraploiden SP in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration und -dauer betont. Allerdings war dieser Effekt weniger deutlich ausgeprägt als in den Versuchsreihen mit PKC412.

4-HPR hat als einzige Substanz keine eindeutige Tendenz bezüglich des diploiden und tetraploiden Anteils der SP aufzeigen können. Unsere Ergebnisse offenbaren sehr schwankende Werte sowohl zwischen den einzelnen Konzentrationen als auch den einzelnen Versuchsreihen. So konnte nach 24 Stunden Behandlungsdauer ein Anstieg der SP 2n registriert werden. Nach 72 Stunden war dagegen nach einem initialen Anstieg der SP 2n unter der Behandlung mit 1,0  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  4-HPR ein starkes Abfallen des Anteils der SP 2n bei einer Behandlungskonzentration von 10  $\mu\text{M}$  4-HPR festzustellen. Ein ähnlicher Verlauf zeigte auch bezüglich des Anteils der SP 4n unter der Behandlung mit 4-HPR.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einführung

Nach wie vor ist die Behandlung akuter Leukämien, insbesondere die Behandlung der AML im Kindes- und Erwachsenenalter, eine therapeutische Herausforderung. Trotz der voranschreitenden Forschungsbemühungen gab es während der letzten vier Dekaden kaum eine Änderung in den Standards für die AML-Therapie (Naqvi, Konopleva et al. 2017). Neben Zytostatika kommen weitere Medikamente aus der Klasse der Kinaseinhibitoren und Antikörper zum Einsatz, die zum Teil auch in aktuell laufenden klinischen Studien untersucht werden. Es werden einhergehend damit gleich mehrere vielversprechende Therapieansätze verfolgt. Einige davon setzen sich das Ziel, bestimmte Adhäsionsmoleküle (wie z.B. das JAM-C Molekül) zu identifizieren, die von blutbildenden Zellen exprimiert werden und eine Untergruppe von Leukämiezellen definieren, welche mit Leukämie-initiiertes Zellaktivität (LIC) ausgestattet sind (De Grandis, Bardin et al. 2017).

Andere Studien befassen sich mit der Biologie von Stammzellen, um ein besseres Verständnis für deren wichtigste Charakteristika, nämlich die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung, zu erlangen und dadurch eine Grundlage für das Verstehen der Biologie leukämischer Stammzellen zu entwickeln. In diesen Studien werden u.a. die verschiedenen Signalwege zur Wachstums- und Apoptoseregulation insbesondere von LSCs näher betrachtet, da diese Mechanismen für die Langlebigkeit von Stammzellen verantwortlich sind und dadurch eine Basis für Mutationen jeglicher Art kreieren (Reya, Morrison et al. 2001).

In dem Fall, dass solche Mutationen bestimmten Zellen einen Wachstumsvorteil verleihen und einen Entwicklungsstillstand auf einer unreifen Stufe der Differenzierung verursachen, können sich daraus leukämische Stammzellen entwickeln und klinisch eine Leukämieform verursachen. Wichtig ist diesbezüglich, dass die neu entstandenen leukämischen Stammzellen, ebenso

wie die hämatopoetischen Stammzellen, die Fähigkeiten zur Selbsterneuerung und Proliferation beherrschen, aber keine Differenzierungseigenschaften besitzen, so dass sie unfähig sind, reife und funktionierende Blutzellen zu bilden. Darüber hinaus unterliegen die LSCs nicht der gewohnten Wachstums- und Apoptoseregulation wie die HSCs, so dass es im Endeffekt zu einer unkontrollierten Proliferation und zu einem Wachstum von unreifen, funktionsuntüchtigen leukämischen Zellen kommt. In Anbetracht der kritischen Rolle von LSCs für die Entwicklung und das Fortschreiten von Leukämien ist das Verstehen der einzigartigen Merkmale und Wachstumsmechanismen von solchen Zellen essenziell, um sie mit potenziellen therapeutischen Substanzen gezielt anzugreifen und dadurch wiederum die Apoptose solcher Zellen zu induzieren.

Dies ist Ziel der vorliegenden Ausarbeitung. Wir haben uns mit den differenzierenden Effekten vier potenzieller Leukämie-Therapeutika (Curcumin, Salinomycin, Midostaurin und Fenretinide) auf den Anteil von Stammzellen der AML Zelllinie KG-1a befasst. Hierbei differenzieren wir zwischen den Effekten auf den einfachen Chromosomensatz (SP 2n, diploider Chromosomensatz) und den doppelten Chromosomensatz (SP 4n, tetraploider Chromosomensatz). In diesem Teil der Arbeit wird speziell auf die Korrelation zwischen der Größe des Anteils der SP Zellen der Zelllinie KG-1a in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration und Behandlungsdauer der vier untersuchten Substanzen eingegangen. Ferner wird die potenziell daraus resultierende therapeutische Konsequenz diskutiert.

## **4.2 Bestimmung, Eingrenzung und Differenzierung der SP**

Für unsere Versuche haben wir mit permanenten Zellkulturen der AML-Zelllinie KG-1a gearbeitet. Speziell für unsere Fragestellung und Zielsetzung, nämlich die Untersuchung verschiedener potenzieller therapeutischer Substanzen, war die In-vitro-Heranzüchtung von leukämischen Stammzellen sehr gut geeignet. Tiermodelle bieten durch ihre entwicklungsbiologische Ähnlichkeit mit dem menschlichen Organismus zwar deutlich zuverlässigere Daten, sie sind aber

aus ethischer Sicht zur Untersuchung von potenziell wirksamer, jedoch auch potenziell unwirksamer Substanzen eher als ungeeignet zu bewerten.

In-vitro-Modelle haben für die langfristigen Effekten von therapeutischen Substanzen keinen besonders großen Aussagewert und eignen sich eher für die kurzfristige Untersuchung der Wirkung von eben solchen Substanzen auf die Zellen einer bestimmten Zelllinie. Ziel unserer Versuche mit Curcumin, Salinomycin, Midostaurin und Fenretinide war es, eben diese kurzfristigen Auswirkungen der Substanzen auf die SP Zellen der AML-Zelllinie KG-1a zu untersuchen und daraus jene Substanz/-en zu finden, welche vielversprechende Ergebnisse geliefert haben und sich dadurch für die Versuche im Tiermodell anbieten.

Um unsere Zellen mit ausreichenden Nährstoffen zu versorgen sowie ihnen optimale Wachstumsbedingungen zu verschaffen und somit ihr Überleben sichern zu können, haben wir sie in einem entsprechenden Medium (RPMI 1640) gezüchtet und dazu zusätzlich FCS, L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin supplementiert. Diese Zusammensetzung der serumhaltigen Zellkultur ist angesichts der Tatsache besonders kritisch zu betrachten, dass Seren wie das FCS neben wachstumsfördernden Stoffen unerwünschte Komponente wie gewisse Mikroorganismen oder Kontaminationen mit Endotoxinen, Viren etc. enthalten können. Daher ist der Einsatz von FCS als Supplement in Zellkultursystemen sehr umstritten. Üblicherweise verwendet man für In-vitro-Heranzüchtung FCS, das vor der Anwendung 30 Minuten lang bei 56 ° C im Wasserbad hitzeinaktiviert wurde. Auf diese Weise werden schädliche Komponente wie thermolabile Viren oder Mycoplasmen inaktiviert. Zu diesem Vorgang der Hitzeinaktivierung von FCS finden sich aber in der Literatur wiederum durchaus kontroverse Ansichten: Einerseits werden durch den Prozess der Hitzeinaktivierung hitzeinstabile unerwünschte Komponente beseitigt, andererseits können dadurch auch für das Zellwachstum wichtige Wachstumsfaktoren und Vitaminen zerstört werden. Ein anderer bedeutsamer Punkt, der zu Diskussionen bezüglich der Anwendbarkeit von FCS in Zellkulturen führt, ist darin zu sehen, dass das Serum geschätzt aus 1000 verschiedenen Inhaltsstoffen besteht, die zum Teil

auch nicht identifiziert sind und deren Konzentration von Charge zu Charge signifikant schwanken kann (Lindl 2002, Schrödel 2007). Resultierend daraus ist der Einsatz von FCS in Zellkulturen eher kritisch zu bewerten.

Für unsere Versuchszwecke haben wir uns trotz kritischer Betrachtung der Zusammensetzung von FCS für die Supplementierung von eben diesem Serum bewusst entschieden, weil die KG-1a-Zelllinie damit etabliert ist.

Ein weiterer ausschlaggebender Faktor ist die Färbung der Zellen. Für unsere Zwecke haben wir ein Bis-Benzimidazol, nämlich Hoechst 33342, benutzt. Wie schon im Rahmen von Kapitel 2.2.3 erläutert wurde, handelt es sich hierbei um einen Fluoreszenz-Farbstoff, der die Fähigkeit besitzt, durch die Zellmembran zu dringen und an Nukleinsäuren zu binden, weshalb er breite Anwendung bei der durchflusszytometrischen DNA-Analyse findet. Eine besonders wichtige Rolle spielt der Hoechst-Farbstoff für die Bestimmung von SP-Zellen (Durand 1982) (siehe Kapitel 2.2.3). Goodell et al. haben schon in den frühen 1990er Jahren aufgezeigt, dass die SP-Zellen ähnlich wie die HSCs bestimmte Membranproteine besitzen, die es ihnen erlauben, einen schnelleren, gerichteten und aktiven Efflux von fluoreszierenden DNA-Hoechst 33342-Farbstoff zu bewerkstelligen. Hoechst 33342 besitzt die Fähigkeit, an die AT-reiche Region der DNA zu binden. Mittels dieser Bindung wird der Effekt erreicht, dass die DNA-Moleküle einen spektralen Shift in ihrer Fluoreszenz durchlaufen, der durchflusszytometrisch detektiert und für die Bestimmung von der Menge zellulärer DNA verwendet werden kann. Das Ergebnis dieser Bindung ist eine Verlagerung des Emissionsspektrums des Farbstoffs in Abhängigkeit von der jeweiligen Affinität und Bindungsenergie bzw. Bindungsstelle von der Farbe Violett nach Rot (Bertoncello and Williams 2004). Auf diese Art und Weise kann Hoechst 33342 in einer Gegenüberstellung von zwei Wellenlängen, nämlich 450 nm (Hoechst blue) und >675 nm (Hoechst red), durchflusszytometrisch detektiert werden (Lin and Goodell 2006).

In diesem Kontext fällt ein Schweif an Zellen auf, der eine viel stärkere Fluoreszenz aufweist und als Side Population definiert wird. Die Zellen der SP besitzen, wie oben beschrieben, intramembranäre Transportproteine, die zu der

Familie der ATP-binding cassette Transporter gehören und ihnen einen aktiven Efflux von Hoechst-Farbstoff ermöglichen. Es wird in der Forschung postuliert, dass diejenigen Zellen, welche den ABC-Transporter überexprimieren, einen niedrigeren Gehalt an intranukleären Farbstoff besitzen. Diese Fähigkeit der SP-Zellen, mittels bestimmter Transporter den DNA-Farbstoff herauszupumpen, wird durch ihre Reife determiniert. Genauer ist zu konstatieren: Je unreifer und primitiver die Zellen sind, desto mehr Hoechst 33342 schleusen sie aus (Challen and Little 2006). Diejenigen Zellen, welche den ABC-Transporter überexprimieren, offenbaren somit einen niedrigeren Gehalt an intranukleären Farbstoff.

Bedeutsam hinsichtlich der Interpretation der gewonnenen Ergebnisse ist die Berücksichtigung des Umstandes, dass unterschiedlich lange Bearbeitungszeiten bei der Färbung mit dem Hoechst-Farbstoff sowie die Konzentration an Hoechst-Farbstoff und die Inkubationsdauer einen Einfluss auf die Größe der SP haben. Folglich haben wir uns bei der Durchführung unserer Versuchsreihen darum bemüht, die Bearbeitungszeit möglichst kurz zu halten. Wir haben versucht, die Fehlerrate durch schwankende oder ungenaue Hoechst-Konzentrationen dadurch zu minimieren, dass wir uns bei der Durchführung der Versuchsreihen strikt an das unter Kapitel 2.2.3 dargestellte Protokoll zur Hoechst-Färbung nach Goodell et al. gehalten haben und die Versuche nur durch eine Person durchführen lassen, damit auch die personenbezogenen subjektiven Differenzen eliminiert werden.

An dieser Stelle sollen die durchflusszytometrische Eingrenzung und Differenzierung von SP-Zellen kritisch näher betrachtet werden. Ein großes Problem entsteht durch den fließenden Übergang zwischen G0/G1-Hauptpopulation und SP 2n, außerdem zwischen G2/M-Hauptpopulation und SP 4n. Da die SP 2n direkt aus der Hauptpopulation G0/G1 und die SP 4n dementsprechend direkt aus der Hauptpopulation G2/M hervorgeht, stellt sich an dieser Stelle die Frage, wie denn das SP-Gate am besten gelegt werden soll.

Wird das Gate zu weit Richtung Hauptpopulation gesetzt, werden der SP auch Zellen der Hauptpopulation zugeordnet und der SP-Anteil erscheint dadurch größer, als er tatsächlich ist. Wird dagegen das SP-Gate zu weit links gesetzt, erscheint der SP-Anteil geringer (siehe Kapitel 3.1). Wir haben darauf abgezielt, diese Problematik des subjektiven Gating-Prozesses dadurch zu minimieren, dass die Ergebnisse der durchgeführten durchflusszytometrischen Messungen nur durch eine Person ausgewertet wurden. Somit konnten interpersonell bedingte Schwankungen im Auswertungsprozess eliminiert werden. Um zudem eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen, wurde das gleiche Auswertungsblatt als Vorlage bei der Auswertung sämtlicher Messungen herangezogen.

### **4.3 Effekte von Curcumin auf die Stammzellpopulation der Zelllinie KG-1a**

#### **4.3.1 Wirkungsweise von Curcumin und seine Bedeutung für die Krebsforschung**

Wie schon im Verlauf von Kapitel 1.4 beschrieben wurde, handelt es sich bei Curcumin um einen sekundären pflanzlichen Farbstoff. CUR ist ein niedermolekulares Polyphenol mit lipophilen Eigenschaften (Menon and Sudheer 2007). Wenn man sich die chemische Zusammensetzung der Substanz näher anschaut, stellt man fest, dass CUR freie Hydroxylgruppen enthält. Suzuki et al. stellten 2005 die Hypothese auf, dass diese freien Hydroxylgruppen eine entscheidende Rolle für die anti-oxidativen Eigenschaften von CUR spielen (Suzuki, Nakamura et al. 2005). Neben anti-oxidativen Eigenschaften konnten bei CUR auch anti-inflammatorische, antikanzerogene, immunomodulatorische und anti-metastatische Eigenschaften im Laufe der Jahre nachgewiesen werden (Maheshwari, Singh et al. 2006).

Einige Studien haben sich mit der signifikanten chemoprotektiven Rolle von CUR in der Krebstherapie befasst (Dinkova-Kostova and Talalay 1999), andere konnten herausfinden, dass CUR eine gezielte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen impliziert, wobei normale gesunde Zellen davon weniger

beeinträchtigt sind (Zhou, Wang et al. 2011). Notarbartolo et al. haben ferner 2005 die Hypothese postuliert, dass CUR eine Inhibition der antiapoptotischen Gene bewirken kann, die in leukämischen Stammzellen überexprimiert und als Ursache für die Resistenz gegenüber vielen Chemotherapeutika angesehen werden (Notarbartolo, Poma et al. 2005).

All diese Studien verdeutlichen, dass die biologische Aktivität von CUR durch mehr als einen biochemischen Mechanismus determiniert ist. Bevor wir uns mit der Interpretation der Ergebnisse unserer Arbeit befassen, sollten wir einige dieser Mechanismen erläutern, um die Wirkung von CUR auf die von uns untersuchten Zellen der AML-Zelllinie KG-1a nachvollziehbar präsentieren zu können.

1995 konnten Singh et al. darlegen, dass CUR ein potenter Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B ist, der eine essenzielle Rolle in der Aktivierung der Zellproliferation und des Tumorwachstums durch bestimmte inflammatorische Mechanismen spielt und dadurch ein entscheidender Faktor für die Resistenz gegen die Radio- und Chemotherapie in der Tumorbehandlung ist (Singh and Aggarwal 1995). In den meisten Zellen befindet sich NF- $\kappa$ B in seiner inaktiven Form gebunden an inhibitorischen Proteine wie das I $\kappa$ B (Inhibitor of kappa B). Durch die Phosphorylierung von I $\kappa$ B durch die IKK (Inhibitor of kappa B Kinase) wird NF- $\kappa$ B von der Bindung an das I $\kappa$ B befreit und kann in den Zellkern wandern und dort die Expression mehrerer Gene initiieren, die wiederum eine proliferative, anti-apoptotische und pro-inflammatorische Wirkung aufweisen. Eine weitere Eigenschaft von NF- $\kappa$ B manifestiert sich in der Induktion von Expression und der anschließenden Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen (MMP), die bei manchen Tumoren ein invasives Wachstum durch die Degradation der Tumor umgebenden Matrix bewirken (Stetler-Stevenson and Yu 2001, Bachmeier, Nerlich et al. 2007). Somit spielt die konstante Aktivierung von NF- $\kappa$ B eine entscheidende Rolle in der Tumorproliferation, -progression, Angiogenese, Inflammation, Invasion wie auch Metastasierung (Garg and Aggarwal 2002, Bachmeier, Nerlich et al. 2007).

CUR kann eine Hemmung von NF- $\kappa$ B bewirken, und zwar entweder auf direktem Wege durch die direkte Inhibition von IKK oder dementsprechend indirekt durch seine Interaktion mit Upstream-Aktivatoren der IKK. Auf diese Weise kann die I $\kappa$ B nicht phosphoryliert werden und NF- $\kappa$ B bleibt inaktiv.

Außerdem wird durch CUR eine Downregulation von COX-2 realisiert, die als NF- $\kappa$ B-abhängiger Mediator ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Inflammation übernimmt (Killian, Kronski et al. 2012). Laut Killian et al. ist CUR in der Lage, den positiven Feedback-Mechanismus zwischen Zytokinen und NF- $\kappa$ B zu unterbrechen und somit die Metastasierung bei einigen Tumoren zu hindern. Da die Inflammation als einer der entscheidenden Faktoren in der Tumorprogression angesehen wird, wird zudem vermutet, dass durch die Hemmung der Inflammation auch die Tumorproliferation gehemmt werden kann (Balkwill and Mantovani 2001).

Yu et al. haben sich mit der Wirkung von Curcumin auf AML-Zellen auseinandergesetzt. Sie konnten den Nachweis dafür bringen, dass CUR zu einer DNA-Hypomethylierung in AML-Zellen der Zelllinien K562, ML-1 und HL-60 durch eine selektive Downregulation der DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) sowie einer Blockade der enzymatischen Aktivität von DNMT1 führt, ohne dabei gesunde Zellen zu beeinträchtigen (Yu, Peng et al. 2013). Die DNMT1-Expression wird durch Sp1 und p53 reguliert, die zum NF- $\kappa$ B Signalweg gehören. Ihre in vitro und in vivo durchgeführten Studien zeigten, dass eine CUR-Behandlung zu einer Reduktion der Sp1- und p53-Expression führt (Yu, Peng et al. 2013). Somit wurde eine Apoptose in AML-Zellen initiiert und es erfolgte ein Zellarrest in der G1-Phase des Zellzyklus` (Yu, Peng et al. 2013).

Allerdings konnten Yu et al. ebenfalls herausarbeiten, dass durch CUR keine komplette Suppression des Tumorwachstums verwirklicht werden konnte und es nach Beendigung der CUR-Therapie zu einem Relaps in vitro sowie in vivo kam (Yu, Peng et al. 2013).

Andere Studien konnten die pro-apoptotische Wirkung von CUR auf Tumorzellen bestätigen. Es konnte einerseits gezeigt werden, dass CUR durch

die Aktivierung von Caspase, Freisetzung von Cytochrom C und Downregulation von Bcl-2 eine Apoptose in CD34<sup>+</sup>-AML Zelllinien, darunter auch KG-1a, induzieren kann. Andererseits konnte CUR die Proliferation eben dieser Zellen durch die Interaktion auf mehreren Signalweg-Ebenen evozieren, darunter NF-κB Signalweg, Wnt-Signalweg, Phosphoinositide-3-Kinase, Notch-mediated-Signalwege etc. (Rao, Xu et al. 2011).

Rao et al. konnten insbesondere in ihrer Studie deutlich zeigen, dass CUR in der Lage ist, zum einen allein in Monobehandlung der entsprechenden Zellen, aber zum anderen auch in Kombination mit DNR einerseits eine signifikante Behandlungsdauer- und Behandlungskonzentration-abhängige Zellzytotoxizität und andererseits eine Inhibition der Proliferation eben dieser Zellen zu bewirken. Schon nach 24 Stunden Behandlungsdauer konnten Rao et al. einen Anstieg der Zellzytotoxizität von ca. 10 % (unbehandelte Zellen) auf 40 % (mit 80 μM CUR behandelte Zellen) registrieren. Die selektiv induzierte Apoptose und Hemmung der Proliferation von CD34<sup>+</sup>-AML Zellen wurde mit einer Downregulation von der Expression von Bcl-2 in Verbindung gebracht. Dieser Effekt war noch viel deutlicher in einer Kombinationsbehandlung derselben Zellen mit CUR und DNR. Rao et al. haben die Hypothese aufgestellt, dass eine Downregulation von Bcl-2 durch CUR ein entscheidender Apoptosemechanismus in CD34<sup>+</sup>-AML Zellen ist und daher stellt CUR eine potenzielle Substanz für die Behandlung von einer therapierefraktären CD34<sup>+</sup>-AML dar.

#### **4.3.2 Differenzielle zytotoxische Effekte von CUR auf KG-1a-Zellen**

Wie schon in Kapitel 3.2.1 erwähnt, so finden sich in der Literatur diverse Studien, die den zytotoxischen Effekt von CUR auf Tumorzellen verschiedener Zelllinien bereits bewiesen haben (Pesakhov, Khanin et al. 2010, Rao, Xu et al. 2011, Weng, Zeng et al. 2015, Zeng, Weng et al. 2016). So konnten z.B. Pesakhov et al. den Nachweis dafür erbringen, dass eine signifikante Erhöhung des prozentuellen Anteils toter Zellen speziell bei höheren CUR-Konzentrationen (10,0 μM CUR, 15,0 μM CUR und 20,0 μM CUR) zu beobachten ist.

Bei unseren Versuchen konnten wir nach einer 24-stündigen Inkubationsdauer kaum einen Unterschied im prozentualen Anteil apoptotischer Zellen bei den niedrigeren Konzentrationen von CUR (1,0  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  und 5,0  $\mu\text{M}$  CUR) feststellen, dafür war allerdings bei 15  $\mu\text{M}$  CUR fast eine Verdopplung der Zellzytotoxizität im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu beobachten (1,7 % bei 0,0  $\mu\text{M}$  CUR und 3,1 % bei 15  $\mu\text{M}$  CUR). Die Mittelwerte für die Zytotoxizität nach 48 und 72 Stunden Behandlungsdauer ergaben bei unseren Untersuchungen für die niedrigeren CUR-Konzentrationen kaum veränderte Werte im Vergleich zu den nur 24 Stunden lang behandelten Zellen. Folglich konnten wir lediglich bei den höheren Konzentrationen von CUR (10  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$ ) einen signifikanten zytotoxischen Effekt registrieren. Diese Beobachtung deckt sich insoweit mit den Ergebnissen von Pesakhov et al., dass die Arbeitsgruppe von Pesakhov ebenfalls deutlich erhöhte Zellzytotoxizität erst ab Behandlungskonzentrationen von  $\geq 10 \mu\text{M}$  CUR registrieren konnte. Allerdings wurden von Pesakhov et al. erheblich höhere Toxizitätswerte in Höhe von  $> 15$  % bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  CUR dokumentiert. Dieser Unterschied könnte aus unserer Sicht dadurch erklärt werden, dass Pesakhov et al. neben erhöhter Zellzytotoxizität unter CUR-Behandlung von KG-1a Zellen eine deutliche Hemmung der Proliferation eben dieser Zellen feststellen konnten, was bei uns nicht der Fall war. Im Gegenteil: Wir konnten eine verglichen mit diesen Ergebnissen nur leicht erhöhte Zytotoxizität bei den höheren CUR-Konzentrationen in Verbindung mit einem klaren Anstieg des Zellwachstums sowohl bei den diploiden als auch tetraploiden SP dokumentieren (siehe 3.2.2 bis 3.3.5).

#### **4.3.3 Differenzielle Effekte von CUR auf den Anteil diploider und tetraploider SP**

Diverse Studien, die während der letzten Jahre realisiert wurden, haben gezeigt, dass CUR und auch seine Analoga in der Lage sind, eine Wachstumssuppression in diversen leukämischen Zelllinien wie U937 (Kwon, Jun et al. 2005, Sanchez, Simon et al. 2010), K562 (Sanchez, Simon et al. 2010), HL-60 (Wu, Lai et al. 2011, Derochette, Franck et al. 2013) und KG-1a

(Pesakhov, Khanin et al. 2010, Rao, Xu et al. 2011, Weng, Zeng et al. 2015, Zeng, Weng et al. 2016) zu induzieren. Wenig et al. konnten 2015 in ihrer Studie erfolgreich aufzeigen, dass CUR in Monobehandlung, aber ebenso in Kombination mit BUS durchaus in der Lage ist, die Zellproliferation zu hemmen und einen Zellarrest in der S-Phase des Zellzyklus` hervorzurufen, indem CUR mehrere zellspezifische Mechanismen beeinträchtigt, unter anderem Autophagie, Apoptoseinduktion, reduzierte Expression von bestimmten Stammzellmarkern u.a.. In eben dieser Studie, wie auch in vielen anderen davor, konnte CUR seine antikanzerogenen Eigenschaften offensichtlich entfalten, indem CUR die Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren (NF- $\kappa$ B, STAT3, AP-1), Rezeptoren (HER-2, IL-8), Kinasen (EGFR, ERK, JAK) und Zytokinen (TNF, IL) beeinflusst hat (Anand, Sundaram et al. 2008, Jiao, Wilkinson et al. 2009, Weng, Zeng et al. 2015).

Um die differenziellen Effekten von CUR auf den Anteil der diploiden und tetraploiden SP an der jeweiligen Hauptpopulation zu untersuchen, haben wir die von uns registrierten Mittelwerte für die entsprechenden Behandlungskonzentrationen untereinander und je nach Inkubationsdauer zueinander in Relation gesetzt. In diesem Zusammenhang war ein signifikanter Anstieg des Zellwachstums und Anteils der SP an der Hauptpopulation zu beobachten. Im Gegensatz zu den in der Literatur zu findenden Ergebnissen der Behandlung von KG-1a Zellen mit CUR konnten wir feststellen, dass eine ansteigende CUR-Behandlungskonzentration und eine zunehmende Behandlungsdauer zu einer deutlichen Zunahme des Anteils sowohl der diploiden als auch der tetraploiden SP an der jeweiligen Hauptpopulation führt (siehe Kapitel 3.2.2 bis 3.2.5).

Eine Erklärung für diesen Anstieg der diploiden und tetraploiden SP könnte ein Zellarrest in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- und der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus` sein. Eine solche Wirkung von CUR auf Tumorzellen, darunter auch leukämische Zellen, wurde schon von Weng et al. (Weng, Zeng et al. 2015), Yu et al. (Yu, Peng et al. 2013), Zhou et al. (Zhou, Ye et al. 2014) und anderen Forschern beschrieben.

Eine Übersicht der CUR-spezifischen Mechanismen, die einen Zellarrest hervorrufen können, bietet Kapitel 4.3.1.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen und publizierter Studien zu diesem Thema, die sich mit der Wirkung von CUR auf die Gesamtheit der Zellen bestimmter malignen Zelllinien (darunter auch KG-1a) befassen, bestätigen unsere Untersuchungsergebnisse die explizite Wirkung von CUR auf die frühen Vorläuferzellen der AML-Zelllinie KG-1a mit Stammzeleigenschaften.

Bei unseren Untersuchungen konnten wir u.a. zwei differenzielle Effekte auf die frühen Vorläuferzellen der diploiden und tetraploiden SP beobachten: Aus der Übersicht des Kapitels 3.2.4 und Kapitels 3.2.5 ist zu entnehmen, dass die Zellen der tetraploiden Hauptpopulation, die eine doppelte DNA-Menge enthalten und sich kurz vor der Teilung befinden, eine geringere Sensitivität für CUR offenbaren als die Zellen der SP 2n. Aus Kapitel 3.2.4 wird ersichtlich, dass wir für die tetraploide SP bei unbehandelten Zellen ein Mittelwert von 5,1 % ermitteln konnten. Bei einer CUR-Konzentration von 15  $\mu$ M CUR ist dieser Wert nach einer Behandlungsdauer von 72 Stunden auf 7,8 % angestiegen.

Ausgehend von diesen Ergebnissen liegt die Vermutung nahe, dass CUR bei diesen Zellen einen Arrest unmittelbar vor der Zellteilung, nämlich in der G2-Phase des Zellzyklus, hervorgerufen hat. Aufgrund des Zellarrestes erfolgt dementsprechend keine Teilung der tetraploiden Zellen, die aber Wachstums- und Teilungssignale an die übrigen SP-Zellen übermitteln, so dass es zu einer Anreicherung von SP-Zellen in der S-Phase des Zellzyklus kommt (Mattes 2016). Diese Annahme steht in keinem Gegensatz zu den bisher publizierten Ergebnissen von anderen Arbeitsgruppen, die sich mit der Wirkung von CUR auf KG-1a Zellen befasst haben (Weng, Zeng et al. 2015, Zeng, Weng et al. 2016).

Viel deutlicher wird durch unsere Messergebnisse der mitogene Effekt von CUR auf die Vorläuferzellen der SP 2n. Diesbezüglich konnten wir nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden bei den mit 15  $\mu$ M CUR behandelten Zellen

eine Verdopplung der SP 2n im Vergleich zu unbehandelten Zellen dokumentieren. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass diese starke Zunahme diploider Zellen durch eine proliferationsfördernde Wirkung von CUR innerhalb der frühen Vorläuferzellen zu erklären ist. Diese Zellen befinden sich kurz vor der Phase der Zellteilung und die Überlegung scheint legitim zu sein, dass CUR zu einem proliferationsfördernden Effekt und damit zu einer Anreicherung der Zellen mit einfachem Chromosomensatz führt, der einem Zellarrest in der G0/G1-Phase des Zellzyklus unterliegt.

Unsere Behandlungsversuche mit CUR haben zwar zu keiner deutlichen Apoptose und Reduktion der frühen Vorläuferzellen im Sinne einer Proliferationsinhibition geführt, aber es konnte dessen ungeachtet eine klare Tendenz bezüglich der Wirkung von CUR insbesondere auf die SP 2n der Zelllinie KG-1a beobachtet werden. Der registrierte mitogene Effekt von CUR auf die Zellen der SP 2n dient damit als ein Ansatzpunkt, der therapeutisch genutzt werden könnte. Frühere Studien haben hierzu herausgearbeitet, dass CUR eine besonders gute synergistische Wirkung in Kombination mit anderen Medikamenten wie DNR (Rao, Xu et al. 2011) oder BUS (Weng, Zeng et al. 2015) aufweist. Demnach liegt die Vermutung nahe, dass CUR ein potenziell starker Sensibilisator für die Chemotherapie in Kombinationsbehandlung mit gängigen Chemotherapeutika wie Bortezomib, Cisplatin und FOLFOX sein könnte.

## **4.4 Effekte von Salinomycin auf die Stammzellpopulation der Zelllinie KG-1a**

### **4.4.1 Wirkungsweise von Salinomycin**

SAL ist ein Polyether-Antibiotikum aus der Gruppe der Ionophore, das derzeit eine breite Anwendung in der Veterinärmedizin findet. 2009 haben Gupta et al. einen Artikel über die extrem gute antikanzerogene Wirkung von SAL auf Stammzellen des Mamma-Karzinoms veröffentlicht. In diesem Beitrag konnte erfolgreich gezeigt werden, dass SAL in der Lage ist, eine

Wachstumssuppression und Apoptoseinduktion bei epithelialen Krebsstammzellen des Mamma-Karzinoms 100-fach effektiver als Paclitaxel hervorzurufen (Gupta, Onder et al. 2009).

Die genaue Wirkweise von SAL auf Tumorzellen ist bis dato allerdings noch unklar. Es gab während der vergangenen Jahre immer mehr Studien, die die Interaktionen von SAL und verschiedenen Tumorzellen auf molekularbiologische Ebene untersucht haben. Hierbei konnten z.B. Lu et al. im Jahr 2011 aufzeigen, dass SAL dazu fähig ist, den Wnt-Signalweg selektiv zu hemmen und Apoptose in CLL-Zellen zu induzieren (Lu, Choi et al. 2011). Laut Lu et al. stellt SAL einen potenten Inhibitor des proximalen Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalwegs dar, indem die Phosphorylierung von dem Wnt-Korezeptor LRP6 durch Casein Kinase  $1\gamma$ , Glykogen Synthase Kinase- $3\gamma$  und auch andere Kinasen blockiert und somit die Aktivierung der Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalkaskade verhindert wird, die eine entscheidende Rolle für die Fähigkeit zur Selbsterneuerung übernimmt, die HSCs und auch LSCs besitzen. Des Weiteren hat die Studie gezeigt, dass durch SAL die LRP6-Expression in malignen Lymphozyten reduziert werden konnte (Lu, Choi et al. 2011).

Ferner konnte der Nachweis erbracht werden, dass SAL den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch durch den NCX ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger) stören und zu einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytosol führen kann. Ein intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg kann wiederum eine Antagonisierung des kanonischen Wnt-Signalwegs hervorrufen, wie es von einer früheren Studie derselben Arbeitsgruppe offengelegt wurde (Lu and Carson 2009).

Der Anstieg von  $\text{Ca}^{2+}$  im Zytosol hat außerdem zur Folge, dass Calpain aktiviert wird. Dies führt wiederum zu einer Aktivierung von Caspase 12, Caspase 9 und schließlich Caspase 3, wodurch Apoptose in den betroffenen Zellen eingeleitet wird (Boehmerle and Endres 2011, Lu, Choi et al. 2011). Angesichts dieser Entwicklung wird deutlich, dass SAL durch die Interaktion auf Elektrolytebene die Vitalität von Zellen beeinflussen kann.

All diese Mechanismen und auch einige andere (siehe Kapitel 1.5.1) spielen in LSCs eine entscheidende Rolle für die Zytostatika- und Apoptoseresistenz und

stellen eine therapeutische Herausforderung dar. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass SAL eine potenziell wirksame therapeutische Substanz mit einer enormen Bedeutung für die Behandlung von chemoresistenten Leukämien ist.

#### **4.4.2 Differenzielle zytotoxische Effekte von SAL auf KG-1a-Zellen**

Aus den in Kapitel 3.3.1 dokumentierten Messergebnissen ist zu folgern, dass eine gesteigerte Zytotoxizität mit einer Erhöhung der SAL-Behandlungskonzentration und -Behandlungsdauer einhergeht. Unsere Messdaten gehen konform mit den Forschungsergebnissen diverser Studien aus den letzten Jahren. In diesem Sinne zeigen auch die Abbildungen 22 und 23 auf, dass es bei den mit 1,0  $\mu\text{M}$  und 2,0  $\mu\text{M}$  SAL behandelten Zellen initial zu keinem signifikanten Anstieg des prozentualen Anteils toter Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden kam. Bei den höheren SAL-Konzentrationen (5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  SAL) war dagegen aber ein deutlicher zytotoxischer Effekt zu registrieren. Bereits nach 24 Stunden Behandlungsdauer war der Anteil toter Zellen bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  SAL auf 6,1 % angestiegen (verglichen mit 2,6 % bei unbehandelten Zellen) und bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  konnte eine Verdreifachung der Zytotoxizität registriert werden. Nach noch längerer Behandlungsdauer (48 bzw. 72 Stunden) ist die Zytotoxizität weiterhin rasant angestiegen, so dass der Anteil toter Zellen bei den zwei höchsten Behandlungskonzentrationen von SAL nach 72 Stunden Behandlungsdauer bei 11,7 % bzw. 17,1 % lag.

Diese Messergebnisse sprechen klar dafür, dass das  $\text{K}^+$ -Ionophor SAL durchaus fähig ist, die Vitalität von KG-1a Zellen zu beeinträchtigen.

Diversen Arbeitsgruppen ist es in den vergangenen paar Jahren gelungen, eine Interferenz zwischen SAL und ABC-Transportern zu demonstrieren. Es ist bekannt, dass KG-1a Zellen solche ABC-Transporterproteine wie z.B. das P-Glykoprotein überexprimieren und über eine Apoptoseresistenz verfügen, wodurch sie sich erfolgreich den Angriffsmechanismen verschiedener Chemotherapien entziehen können. P-Glykoprotein ist ein primär aktiver Effluxtransporter, der für die Chemoresistenz vieler Krebszellen, darunter auch

AML-Stammzellen der Zelllinie KG-1a, von Relevanz ist. Riccioni et al. konnten in einer ihrer Studie herausarbeiten, dass sich CSCs durch eine Überexpression von P-Glykoprotein oder anderen ABC-Transporterproteinen auszeichnen, die die Zelle vor potenziell schädlichen Substanzen durch einen erhöhten Efflux eben dieser Substanzen schützen. Der ABC-Transporter, insbesondere P-Glykoprotein, ist zuständig für den Transport von wichtigen Chemotherapeutika wie Vinca-Alkaloide, Anthrazykline und Taxane. Zellen, in denen das P-Glykoprotein überexprimiert ist, zeichnen sich durch eine ausgeprägte Chemoresistenz aus. Durch die SAL-vermittelte Blockade des durch den Transporter modulierten Efflux von Chemotherapeutika werden die Zellen für einige Zytostatika wie z.B. Vinblastin wieder sensibilisiert, wie es die Studie von 2010 belegen konnte (Riccioni, Dupuis et al. 2010).

Fuchs et al. haben ebenfalls 2010 eine Studie durchgeführt, die sich mit der Interaktion von ABC-Transportern und KG-1 und KG-1a-Zellen befasst hat. Die Studie zeigt auf, dass mit SAL behandelte KG-1a Zellen durch die Inhibition von P-Glykoprotein, BCRP und MRP8 in der Lage sind, die Apoptoseresistenz-Mechanismen in KG-1a-Zellen zu überwinden (Fuchs, Daniel et al. 2010). In der Studie wurden allerdings deutlich höhere Toxizitätswerte (bis zu 70 %) verglichen mit unseren Ergebnissen registriert.

Eine weitere Erklärung für die erhöhte Zytotoxizität durch SAL stellt der schon in Kapitel 1.5.2 beschriebene, durch SAL induzierte  $K^+$ -Efflux aus Mitochondrien und Zytoplasma dar. Dadurch kommt es zu einer verminderten intrazellulären  $K^+$ -Konzentration, die mit einer Apoptoseinduktion und erhöhten Zellzytotoxizität vergesellschaftet ist (Bortner, Hughes et al. 1997).

Welcher dieser Mechanismen bei unseren Versuchen eine entscheidende Rolle gespielt hat, ist unklar. Um diese Frage beantworten zu können, müssten erweiterte Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene durchgeführt werden, was jedoch kein Teil der vorliegenden Arbeit war.

#### **4.4.3 Differenzielle Effekte von SAL auf den Anteil der diploiden und tetraploiden SP**

Ein besonders wichtiger und essenzieller Teil unserer Untersuchungen war es, die differenziellen Effekte von SAL auf den Anteil der diploiden und tetraploiden SP in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und -konzentration zu ermitteln. Dabei war eine gering ausgeprägte, aber dennoch klare Tendenz zu dokumentieren: Sowohl mit Anstieg der Behandlungskonzentration als auch mit längerer Inkubationsdauer kam es zu einer Verringerung des Anteils der diploiden SP an der G0/G1-Hauptpopulation.

Eine wesentliche Fragestellung, die sich an dieser Stelle ergibt, ist die, ob es sich bei der Reduktion der SP um eine Reduktion der Gesamtzahl der Zellen aufgrund eines stark ausgeprägten pro-apoptischen Effekts von SAL handelt oder die SP-Reduktion auf eine Wachstumssuppression zurückzuführen ist. Um diese Frage zu klären, muss man sich die Zahlen für die SAL-induzierte Zellzytotoxizität nochmals vor Augen führen. Wie schon in Kapitel 3.3.1 dargestellt und in Kapitel 4.3.3 diskutiert wurde, so ist der Prozentsatz toter Zellen verglichen mit der Leerprobe unbehandelter Zellen in Abhängigkeit von der SAL-Konzentration und Inkubationsdauer konstant angestiegen. Besonders stark ausgeprägt ist dieser Effekt für die beiden höchsten Konzentrationen von SAL. Diese durch SAL hervorgerufene erhöhte Zytotoxizität, die besonders bei den hohen Dosen von SAL ersichtlich geworden ist, wurde schon von vielen Autoren in der Literatur beschrieben (Fuchs, Daniel et al. 2010, Riccioni, Dupuis et al. 2010, Lu, Choi et al. 2011) (siehe Kapitel 4.3.3).

Anhand der umfassenden Betrachtung der Messdaten bezüglich der Anteile der diploiden SP an der G0/G1-Hauptpopulation und der tetraploiden SP an der G2/M-Hauptpopulation wird ersichtlich, dass bei der zweiten keine klare Tendenz zu erkennen ist. Während die Analyse der Werte für die tetraploide SP nach 24-stündiger Behandlungsdauer bei allen verwendeten SAL-Konzentrationen sehr geringe Unterschiede aufweist, zeigten sich bei der Auswertung der Messwerte nach 48 und 72 Stunden Behandlungsdauer sehr sprunghafte Ergebnisse. Während eine Konzentration von 1,0  $\mu\text{M}$  SAL zu einer

geringgradigen Reduktion der SP 4n geführt hat, offenbarte sich bei der Behandlung der KG-1a Zellen mit 2,0  $\mu\text{M}$  SAL ein Anstieg der tetraploiden SP. Resultierend daraus erscheint in diesem Zusammenhang die Erklärung einer niedrigeren Sensitivität der tetraploiden Zellen für die Substanz als einzige plausibel zu sein.

Wären beide Populationen (SP 2n und SP 4n) gleichermaßen von der Schwankung der Werte unabhängig von der Behandlungskonzentration und -dauer betroffen, so könnte man dieses Phänomen des Rauschens durch die hohe Sensitivität des Messverfahrens gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen erklären. Dies ist an dieser Stelle aber nicht möglich, da allein die SP 4n von dem Effekt betroffen zu sein scheint.

In früheren Studien wurde nicht nur eine erhöhte Zytotoxizität der Substanz beschrieben, sondern auch eine konzentrationsabhängige Wachstumssuppression in den ALL-Zelllinien CEM-VBL10 und CEM-VBL100, außerdem in der mit Ovarial-CA assoziierten A2780 Zelllinie. Ein inhibitorischer Effekt auf die Zellproliferation konnte dabei schon bei Konzentrationen von 1-5  $\mu\text{M}$  SAL registriert werden (Ricconi, Dupuis et al. 2010). Allerdings konnte mit der Studie nicht aufgezeigt werden, durch welche Mechanismen SAL in der Lage ist, die Zellproliferation zu hemmen.

Unsere Messdaten konnten keinen solchen wachstumshemmenden Effekt von SAL auf die vermeintliche LSC Fraktion der KG-1a Zelllinie darlegen. Es konnte lediglich eine erhöhte konzentrationsabhängige und Behandlungsdauerabhängige Zytotoxizität von SAL auf AML-Zellen der KG-1a Zelllinie beobachtet werden, die mit einer geringgradigen reduktiven Wirkung auf die diploide putative LSC einherging, welche allerdings von keiner Signifikanz war. Folglich eignet sich SAL aus unserer Perspektive heraus eher nicht als Substanz für die Monotherapie der LSCs der AML. Wie es aber in vorherigen Studien (Ricconi, Dupuis et al. 2010) schon gezeigt wurde, verfügt die Substanz durch ihre Fähigkeit, die P-Glykoprotein-vermittelte Multidrug-Resistenz zu überwinden, über ein sehr hohes Potenzial dafür, CSCs und auch LSCs für gängige Chemotherapeutika zu sensibilisieren, wodurch wiederum eine neue

therapeutische Option für resistente Krebsformen und Leukämien genutzt werden könnte.

#### **4.5 Effekte von Midostaurin auf die Stammzellpopulation der Zelllinie KG-1a**

In Kapitel 1.6 wurde beschrieben, dass es sich bei PKC412 um einen potenten FLT3-Inhibitor handelt (siehe Kapitel 1.6). Angesichts des Umstandes, dass in 20 bis 30 % der AML-Patienten eine FLT3-Rezeptortyrosinkinase-Überexpression oder FLT3-Mutation gibt, die mit einer Autophosphorylierung und demnach mit unkontrollierter Zellproliferation einhergeht, eignet sich PKC412 als eine potenzielle therapeutische Substanz bei der Behandlung von AML. Diverse frühere präklinische und klinische Studien haben schon die Effektivität von PKC412 auf die Wachstumssuppression und Apoptoseinduktion in AML-Zellen bzw. bei AML-Patienten mit Erfolg beweisen können (Weisberg, Boulton et al. 2002, Fischer, Stone et al. 2010, Stone, Fischer et al. 2012, Stone, Mandrekar et al. 2017).

Wir haben uns im Rahmen dieser Arbeit einerseits mit den differenziellen zytotoxischen Effekten von PKC412 auf AML-Zellen der Zelllinie KG-1a und andererseits mit den differenziellen Effekten der Substanz auf den Anteil der diploiden und tetraploiden SP an der jeweiligen Hauptpopulation befasst. Die von uns erhobenen Daten gehen konform mit den Daten der bisher publizierten Studien, die jeweils in diesem Zusammenhang erwähnt wurden. Bei unseren Versuchsreihen konnten wir sowohl in Bezug auf die Zytotoxizität der Substanz auf KG-1a Zellen als auch hinsichtlich der Proliferationssuppression eine klare Tendenz erkennen.

Aus den Ergebnissen im Kapitel 3.4.1 wird ersichtlich, dass sowohl mit Zunahme der Behandlungskonzentration als auch der Inkubationszeit ein deutlicher Anstieg des prozentualen Anteils toter Zellen verbunden ist. Die mit der Höchstdosis 500 nM PKC412 behandelten Zellen wiesen bereits nach 24 Stunden Inkubationsdauer fast eine Verdreifachung des prozentualen Anteils

toter Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf (2,9 % bei 0,0 nM PKC412 und 8 % bei 500 nM PKC412). Nach 72 Stunden Inkubationszeit konnten wir sogar einen fünfmal höheren Anteil toter Zellen bei einer Behandlungskonzentration von 500 nM PKC412 verglichen mit den unbehandelten Zellen dokumentieren (siehe Kapitel 3.4.1).

Diese Ergebnisse sprechen zweifellos dafür, dass PKC412 durchaus in der Lage ist, eine gesteigerte Apoptose in KG-1a Zellen hervorzurufen. Auch die nachfolgenden Ergebnisse in Kapiteln 3.4.2 - 3.4.5 offenbaren eindeutige Werte. Im Hinblick auf den Anteil der diploiden und tetraploiden SP an der jeweiligen Hauptpopulation zeigt sich wiederum eine klare Tendenz: Sowohl in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration als auch der Inkubationsdauer konnten wir einen starken Abfall des prozentualen Anteils der diploiden und tetraploiden SP an der jeweiligen Hauptpopulation registrieren. An dieser Stelle taucht die Frage auf, ob es sich bei der Reduktion des Anteils der SPs an der G0/G1- bzw. G2/M-Hauptpopulation um eine apoptoseinduzierte Proliferationssuppression handelt und welche molekulargenetische Mechanismen für diese proapoptotische und antiproliferative Wirkung von PKC412 auf AML-Zellen der Zelllinie KG-1a verantwortlich sind.

Wie schon in Kapitel 1.6 angedeutet wurde, geht es bei PKC412 um einen potenten FLT3-Inhibitor. Die Rezeptortyrosinkinase FLT3 konnte vor allem in frühen myeloischen und lymphatischen Progenitorzellen nachgewiesen werden und übernimmt von daher eine entscheidende Rolle in der Hämatopoese (Gabbianelli, Pelosi et al. 1995, Rosnet, Buhning et al. 1996). Die Aktivierung des FLT3-Rezeptors durch einen entsprechenden Liganden führt zu einer Stimulation der Proliferation und Differenzierung in hämatopoetischen Vorläuferzellen (Gabbianelli, Pelosi et al. 1995, Carow, Levenstein et al. 1996, Ray, Paige et al. 1996). Für gewöhnlich kommt es nach erfolgter Differenzierung der Zellen zu einem Verlust des FLT3-Rezeptors in den normalen hämatopoetischen Zellen (Adolfsson, Mansson et al. 2005, Pemmaraju, Kantarjian et al. 2011).

LSCs weisen zum einen eine übermäßig starke FLT3-Expression und zum anderen diverse Mutationen in FLT3 und KIT auf (Birg, Courcoul et al. 1992, Rosnet, Buhning et al. 1996). Resultierend daraus liegt die Überlegung nahe, dass FLT3 Einfluss auf das Überleben sowie die Proliferation von leukämischen Progenitoren hat und auf diese Art und Weise zur Pathogenese von Leukämien beiträgt (Kiyoi, Towatari et al. 1998, Gilliland and Griffin 2002, Garcia-Montero, Jara-Acevedo et al. 2006).

Ca. 20 bis 30 % der AML-Patienten verfügen über eine FLT3-Mutation, die zu einer konstanten Aktivierung führt und mit einer schlechten Prognose verbunden ist (Carow, Levenstein et al. 1996, Whitman, Archer et al. 2001, Gilliland and Griffin 2002, Thiede, Steudel et al. 2002). Nakao et al. konnten als erste Forscher im Jahr 1996 Ligandenmutationen (internal tandem duplications, ITD) der juxtamembranären Domäne (JGD) von FLT3 in AML-Patienten nachweisen (Nakao, Yokota et al. 1996, Kiyoi, Towatari et al. 1998, Gilliland and Griffin 2002). ITDs entstehen durch eine Nukleotidsequenzverdopplung und verursachen eine Verlängerung der JGD des FLT3-Rezeptors, wodurch wiederum die autoinhibitorische Konformation der JGD beeinträchtigt wird und eine konstitutive Autophosphorylierung des FLT3-Rezeptors bedingt (Nakao, Yokota et al. 1996). Daraus resultiert eine deregulierte permanente Aktivierung verschiedener physiologischer, allerdings auch nicht-physiologischer Signalkaskaden, die zu einer Apoptosesuppression sowie unkontrollierten Zellproliferation führt (Hayakawa, Towatari et al. 2000, Mizuki, Fenski et al. 2000, Levis, Allebach et al. 2002) und im Endeffekt mit der Entwicklung wie auch Aufrechterhaltung einer AML in Verbindung gebracht wird (Hayakawa, Towatari et al. 2000, Mizuki, Fenski et al. 2000).

Des Weiteren konnten Punktmutationen innerhalb der für die FLT3-Aktivierung kodierende Sequenz nachgewiesen werden, die durch den Austausch von relevanten Aminosäuren zu einer Aufhebung der Autoinhibition der Aktivierungsschleife und somit zu einer konstanten Autophosphorylierung des FLT3-Rezeptors führen (Griffith, Black et al. 2004). Eine pharmakologisch induzierte Blockade des FLT3-Rezeptors verursacht eine Hemmung von nachgeordneten Signalwegen, die für die Pathogenese von AML bedeutsam

sind (Barry, Clark et al. 2007, Cooper, Kindwall-Keller et al. 2015). In-vitro-Studien mit FLT3-positiven AML-Zellen haben herausgestellt, dass FLT3-Inhibitoren wie PKC412 durchaus in der Lage dazu sind, die zytotoxischen Effekte der herkömmlichen Chemotherapie zu potenzieren, und sie stellen dadurch eine therapeutische Option für chemoresistente AML-Formen dar (Utz, Spitaler et al. 1998, Levis, Pham et al. 2004, Cooper, Kindwall-Keller et al. 2015).

Das Wirkungsprinzip der meisten Tyrosinkinase-Inhibitoren, darunter auch PKC412, manifestiert sich in einer reversiblen Bindung an der ATP-Bindungstasche der Kinase, wodurch eine Blockade der enzymatischen Wirkung, nämlich die Hemmung der pathologisch verstärkten Signaltransduktion, hervorgerufen wird. Der Einsatz von PKC412 stellt somit eine potenziell sinnvolle therapeutische Option sowohl bei Überexpression als auch deregulierter Kinaseaktivität dar (Brown and Small 2004).

Ein Problem bei der therapeutischen Verwendung selektiver TKIs in der AML-Therapie ist aber die limitierte Aktivität dieser Substanzen in der Monotherapie. Die klinische Wirksamkeit von FLT3-Tyrosinkinaseinhibitoren wurde bereits in vielen präklinischen Studien in vitro wie auch in vivo untersucht. Ihre Effizienz als selektiver Hemmer der FLT3-Autophosphorylierung und die daraus resultierende Proliferationssuppression und Apoptoseinduktion konnten sowohl in primären AML-Zelllinien als auch im Mausmodell erfolgreich dargelegt werden (Levis, Tse et al. 2001, Weisberg, Boulton et al. 2002, Levis, Pham et al. 2004). Die klinische Relevanz der FLT3-Inhibitoren wurde in diversen klinischen Studien bestätigt und führte bei der Behandlung von FLT3-positiven AML-Patienten zu einer Verbesserung deren Überlebenschancen im Sinne einer partiellen oder sogar kompletten Remission nach Behandlung mit PKC412. Allerdings konnte in vielen dieser Studien ebenfalls gezeigt werden, dass die alleinige Therapie mit FLT3-Inhibitoren für die komplette Eradikation der leukämischen Progenitoren nicht ausreichend war. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Tatsache, dass den FLT3-Mutationen zweifellos eine tragende Rolle für die Entstehung und Aufrechterhaltung von AML zuzuweisen ist, aber das FLT3 mit sehr großer Wahrscheinlichkeit nicht das alleinige für die AML-

Induktion verantwortliche Protoonkogen darstellt und eher als eine sekundäre Mutation bei der Entstehung und dem nachfolgenden Verlauf der Erkrankung zu betrachten ist (Ley, Mardis et al. 2008). Diese Einschätzung geht auch mit unseren Ergebnissen konform: Wir konnten im Rahmen unserer Versuchsreihen feststellen, dass PKC412 eine starke pro-apoptotische und wachstumssupprimierende Wirkung auf die putativen LSCs der AML aufweist, aber nicht dazu fähig ist, eine komplette Eradikation der leukämischen Vorläuferzellen hervorzurufen. Von daher scheint die Erklärung zu lauten, dass die FLT3-Mutation bzw. -Überexpression in AML-Zellen nicht als einzige wachstumstriggernde Pathologie vorkommt. Ferner ist an dieser Stelle anzumerken, dass HSCs über verschiedene Resistenzmechanismen verfügen, die es ihnen ermöglichen, dem Einfluss von verschiedenen Medikamenten zu entkommen (Reya, Morrison et al. 2001). Diesbezüglich ist kritisch anzumerken, dass wissenschaftlich noch nicht ganz eindeutig bewiesen werden konnte, ob LSCs und somit KG-1a Zellen, die als putative LSCs der AML gelten, ebenfalls diese Mechanismen in sich tragen.

Eine in vitro durchgeführte Studie von Weisberg et al. zeigte im Jahr 2002, dass PKC412 in der Lage ist, eine selektive Apoptose in den WF-unabhängigen (Wachstumsfaktor-unabhängigen) Ba/F3-FLT3-ITD-Zellen hervorzurufen, ohne dabei die gesunden, WF-abhängigen Ba/F3-Zellen zu beeinträchtigen (Weisberg, Boulton et al. 2002). Dieselbe Studie konnte zeigen, dass PKC412 die Proliferation von Ba/F3-FLT3-ITD-Zellen sogar bei geringen Konzentrationen von 10 nM PKC412 inhibieren und bis zu einer Konzentration von 100nM PKC412 für die gesunden Ba/F3-Zellen keine toxischen Effekte hervorrufen konnte. Laut Weisberg et al. sind die Wachstumssuppression und Apoptoseinduktion bei den Ba/F3-FLT3-ITD-Zellen auf einen Zellzyklusarrest zurückzuführen (Weisberg, Boulton et al. 2002). Einen solchen Effekt von PKC412 auf die AML-Zellen der Zelllinie KG-1a konnten wir in unserer Studie jedoch nicht beobachten. Ein Zellzyklusarrest würde zu einem Anstieg der diploiden und tetraploiden Population führen, was bei unseren Untersuchungen nicht der Fall war.

Stone et al. haben im Jahr 2005 eine Phase I klinische Studie durchgeführt, in der PKC412 bei AML-Patienten mit einem Relaps nach erfolgreicher Chemotherapie und bei Patienten mit einer therapierefraktären AML zum Einsatz kam. In der Studie waren 20 Patienten eingeschlossen, die alle über eine aktivierende FLT3-Mutation verfügten. Die Arbeitsgruppe stellte die Hypothese auf, dass eine Inhibition der FLT3-Rezeptortyrosinkinase, deren Dysregulation zumindest partiell zu einer unkontrollierten Proliferation von leukämischen Blasten führt, eine Apoptoseinduktion in leukämischen Zellen und dadurch eine klinische Verbesserung herbeiführen würde. Bei sieben der 20 Patienten konnte eine Reduktion der peripheren leukämischen Blasten nach Behandlung mit Midostaurin 75 mg p.o. dreimal täglich und bei weiteren fünf Patienten eine Reduktion der leukämischen Blasten im Knochenmark registriert werden (Stone, DeAngelo et al. 2005).

Weitere klinische Studien haben diese Ergebnisse nochmals bestätigt (Fischer, Stone et al. 2010, Stone, Fischer et al. 2012, Stone, Mandrekar et al. 2017). Es stellt sich heraus, dass es bei AML-Patienten mit einer FLT3-Mutation nach einer PKC412-Therapie zu einer signifikanten Reduktion der peripheren leukämischen Blasten und der leukämischen Blasten im Knochenmark kommt. In weiteren klinischen Studien war ein synergistischer Effekt zwischen FLT3-Inhibitoren und gängiger Chemotherapeutika zu erkennen (Levis, Pham et al. 2004). Auch Stone et al. konnten darlegen, dass PKC412 in Kombination mit gängigen Chemotherapeutika zu einem verbesserten Überlebens-Outcome bei neu diagnostizierten Patienten mit AML unter 60 Jahren geführt hat (Stone, Fischer et al. 2012).

In der Zusammenschau unserer Ergebnisse und der Ergebnisse der erwähnten früheren präklinischen und klinischen Studien nimmt PKC412 die Stellung eines geeigneten Medikaments für die Behandlung der LSCs der AML ein, und zwar insbesondere dann, wenn diese FLT3-positiv sind. Die Expression dieser nukleären Rezeptoren ist für KG-1a Zellen in der fachspezifischen Literatur bis dato nicht beschrieben worden. Das Vorhandensein solcher übermäßig starker FLT3-Expression bzw. FLT3-Mutation in KG-1a Zellen, die zu einer dauerhaften

deregulierenden Aktivierung von Signalkaskaden zur Apoptosesuppression und unkontrollierter Zellproliferation in KG-1a Zellen, könnte eine plausible Erklärung für die hohe Sensitivität dieser Zellen gegenüber der Substanz liefern und somit eine Erklärung für die von uns gewonnenen Ergebnisse nach der Behandlung der KG-1a Zellen mit PKC412. Allerdings ist die Expression solcher FLT3-Rezeptoren für KG-1a Zellen in der fachspezifischen Literatur bis dato nicht beschrieben worden.

## **4.6 Effekte von Fenretinide auf die Stammzellpopulation der Zelllinie KG-1a**

### **4.6.1 Wirkungsweise von 4-HPR und Bedeutung für die Zytotoxizität auf AML-Zellen**

Retinoide sind synthetisch hergestellte Vitamin-A-Analoga, die als Proliferationshemmer, Apoptosetrigger und Differenzierungsinduktoren interagieren (Kastner, Mark et al. 1995, Means and Gudas 1995, Lotan 1996, Simoni and Tolomeo 2001, Corazzari, Lovat et al. 2005). Je nach Retinoid-Derivat ist entweder die Differenzierungsinduktion oder, wie es bei 4-HPR der Fall ist, die Apoptoseinduktion stärker ausgeprägt (Meister, Fink et al. 1998, Maurer, Metelitsa et al. 1999).

In Abhängigkeit vom Zelltyp kann aber 4-HPR auf mehreren verschiedenen Wegen einen programmierten Zelltod hervorrufen. Dabei spielen diverse Mechanismen eine Rolle, u.a. bei der Aktivierung von nukleären Retinoidrezeptoren (Supino, Crosti et al. 1996, Sabichi, Hendricks et al. 1998, Asumendi, Morales et al. 2002, Darwiche, Hatoum et al. 2004), ROS-abhängige Signaltransduktion (Oridate, Suzuki et al. 1997, Maurer, Metelitsa et al. 1999, Sun, Li et al. 1999, Sun, Yue et al. 1999), Ceramid-Induktion (DiPietrantonio, Hsieh et al. 1998, Wang, Maurer et al. 2001, Erdreich-Epstein, Tran et al. 2002), beim Verlust von mitochondrialem Transmembranpotential sowie der Triggerung von mitochondrialen Caspase-Kaskaden (Holmes, Soprano et al. 2003, Ulukaya, Pirianov et al. 2003, Cuello, Coats et al. 2004).

Eine Studie von Appierto et al., die sich mit der Wirkung von 4-HPR auf Zellen des Ovarial-Karzinoms befasst hat, zeigte im Jahr 2009 auf, dass die Substanz eine Apoptose in eben diesen Zellen durch die Generierung von ROS und eine damit verbundene ER-Stressreaktion, die zu einer Aktivierung von JNK und einer Überexpression des pro-apoptotischen Proteins PLAB führt, induzieren kann (Appierto, Tiberio et al. 2009). Gerade der ROS-Generierung ist aber eine besondere Bedeutung zuzusprechen: Einerseits sind moderate Mengen an ROS für die Aufrechterhaltung von diversen Erkrankungen, darunter auch für die Aufrechterhaltung von AML, besonders wichtig. Andererseits führen hohe Mengen an ROS zu einem programmierten Zelltod in den betroffenen Zellen (Tothova and Gilliland 2007, Trachootham, Alexandre et al. 2009, Abdel-Wahab and Levine 2010).

Diese zweiseitige Rolle von ROS in CSCs und LSCs zeigt eindeutig, dass diese im Gegensatz zu normalen HSCs anfälliger für die Generierung von ROS und die damit verbundene Stressreaktion in der Zelle sind (Zhang, Mi et al. 2013). Somit stellen ROS ein potenzielles Angriffsziel zur selektiven Attacke von malignen Stammzellen dar. Eine Studie von Zhang et al. aus dem Jahr 2013 unterstützt diese Behauptung. In der Studie konnte die Arbeitsgruppe klar den Nachweis erbringen, dass 4-HPR einen starken zytotoxischen Effekt auf CD34<sup>+</sup> AML-Zellen ausüben kann, und zwar ohne die gesunden Zellen dabei zu beeinträchtigen. Insbesondere war die LSC-reiche CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> Zellpopulation davon betroffen, die damit selektiv angegriffen werden konnte (Zhang, Mi et al. 2013).

Jiang et al. haben sich mit den differenziellen Effekten von 4-HPR auf AML-Zellen der Zelllinien NB4, HL60 und U937 befasst. In ihrer Studie aus dem Jahr 2011 konnten sie darlegen, dass 4-HPR in der Lage ist, eine Behandlungsdauer-abhängige Wachstumssuppression in allen drei AML-Zelllinien zu induzieren (Jiang, Pan et al. 2011). Zudem war aus der Studie zu entnehmen, dass in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration v.a. in NB4-Zellen, aber auch in den anderen zwei AML-Zelllinien, eine Apoptoseinduktion stattgefunden hat. Im Rahmen der Studie wurde zusätzlich durch eine Vitamin-C-Exposition (antagonistische Wirkung im Vergleich zu

Fenretinide) aller drei Zelllinien die Relevanz der ROS-Generierung und Ceramid-Augmentation für die Apoptosetriggerung untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten eindeutig, dass beide Mechanismen eine entscheidende Funktion in der 4-HPR-getriggerten Apoptose übernehmen. Zum einen konnte durch die intrazelluläre Augmentation von Ceramiden, die eine regulatorische Funktion auf die Apoptose und Zytotoxizität ausüben (Maurer, Metelitsa et al. 1999, Lovat, Ranalli et al. 2000, Maurer, Melton et al. 2000, Herr and Debatin 2001), und zum anderen durch die Generierung von ROS sowie die damit verbundene ER-Stressreaktion, ein programmierter Zelltod in AML-Zellen der Zelllinie HL60 initiiert werden (Jiang, Pan et al. 2011). Die Studie konnte aber v.a. zeigen, dass all diese Mechanismen je nach Zelllinie unterschiedlich stark ausgeprägt sind und ihre Sensitivität für 4-HPR sehr stark auch innerhalb der einzelnen AML-Zelllinien variieren kann (Jiang, Pan et al. 2011).

Eine Gegenüberstellung unserer Messdaten zu den Ergebnissen all dieser Studien zeigt eine gewisse Diskrepanz auf. Bei der Auswertung der Messdaten bezüglich der Zytotoxizität von 4-HPR auf der KG-1a Zellen offenbarten sich nach einer Behandlungsdauer von 24 Stunden starke Schwankungen sowohl konzentrationsabhängig als auch zwischen den einzelnen Versuchsreihen. Nach einer Inkubationszeit von 48 und 72 Stunden ist dagegen trotz stark voneinander abweichender versuchsbezogener Messwerte eine klare Tendenz festzustellen: Sowohl mit steigender Behandlungskonzentration als auch einer längeren Behandlungsdauer war eine Zunahme der Zytotoxizität zu erkennen (siehe Kapitel 3.5.1). Selbst dann, wenn diese Zunahme der Zytotoxizität mit der in der Literatur beschriebenen Effekten nach 4-HPR-Exposition von AML-Zellen konform geht, muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass die von uns gemessenen Werte für den Anteil toter Zellen an den Singlets deutlich geringer im Vergleich zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen ausfallen. So konnten Zhang et al. einen Anteil toter Zellen von 73,5 % nach einer 18-stündigen Behandlungsdauer von CD34<sup>+</sup>AML-Zellen mit 4-HPR mit einer Konzentration von 7,5 µM 4-HPR dokumentieren. Wir konnten für die Behandlung von KG-1a Zellen mit der Höchstkonzentration von 10 µM 4-HPR

nach 72 Stunden Inkubationszeit einen verhältnismäßig niedrigen bis moderaten Anteil toter Zellen an den Singletts von lediglich 16,7 % feststellen.

Wie schon beschrieben wurde, spielt bei der zellspezifischen Zytotoxizität von 4-HPR auf AML-Zellen die ROS-Generierung eine entscheidende Rolle, die sich je nach Zelltyp selbst innerhalb der einzelnen AML-Zelllinien differenzieren lässt. Dies könnte die Diskrepanz zwischen unseren und den bisher dokumentierten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen bezüglich der hohen Zytotoxizität (Zhang, Mi et al. 2013) von 4-HPR auf AML-Zellen erklären. Ausgehend davon liegt die Überlegung nahe, dass AML-Zellen der Zelllinie KG-1a weniger sensibel auf 4-HPR reagieren als die Zellen anderer AML-Zelllinien.

#### **4.6.2 Differenzielle Effekte von 4-HPR auf den Anteil der diploiden und tetraploiden SP**

Ein weiterer wichtiger Teil dieser Arbeit bestand darin, neben der Bestimmung und Interpretation der differenziellen zytotoxischen Effekte von 4-HPR auf die Zellen der AML-Zelllinie KG-1a die Wirkung der Substanz auf die Proliferation von leukämischen Zellen mit Stammzeleigenschaften der AML-Zelllinie KG-1a zu beurteilen.

Wenn man sich die erhobenen Messdaten anschaut (siehe Kapitel 3.5.2 - 3.5.5), fällt auf, dass die Werte durch ein starkes Schwanken geprägt sind. Sowohl konzentrationsabhängig als auch in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer lassen sich keine eindeutigen Tendenzen feststellen. Des Weiteren wird schnell ersichtlich, dass die Messdaten der einzelnen Versuchsreihen mit 4-HPR sehr stark voneinander abweichen. Nach einer Behandlung der KG-1a Zellen mit 4-HPR für die Inkubationsdauer von 24 und 42 Stunden war trotz Differenzen zwischen den einzelnen Versuchsreihen mit 4-HPR ein Anstieg der diploiden SP zu beobachten, wobei sich die Ergebnisse nach 72 Stunden Inkubationsdauer als sehr sprunghaft herausgestellt haben. Im Anschluss an einen initialen Anstieg der diploiden SP mit wachsender Behandlungskonzentration war ein starker Abfall der diploiden SP bei den mit 10  $\mu\text{M}$  4-HPR behandelten KG-1a Zellen auffällig.

Dieser Anstieg der SP 2n könnte durch einen Zellarrest der Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus` erklärt werden, der durch die Gabe von 4-HPR induziert wurde. Ähnlich wie bei CUR stellt sich die Frage, ob 4-HPR einen mitogenen Effekt auf die Vorläuferzellen der SP 2n der Zelllinie KG-1a impliziert. Diese Annahme wird durch den Vergleich der erhobenen Messdaten für unbehandelte Zellen (2,6 % nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubationsdauer), für die mit 5  $\mu$ M 4-HPR (5,2 % nach 48 Stunden und 6,1 % nach 72 Stunden Inkubationsdauer) sowie die mit 10  $\mu$ M 4-HPR (6,2 % nach 48 Stunden Inkubationsdauer) behandelten Zellen teilweise verifiziert. Aus diesen Ergebnissen ist zu folgern, dass es sich um eine Verdopplung der SP 2n nach der Behandlung mit 4-HPR verglichen mit unbehandelten Zellen handelt. Aufgrund dieser Beobachtung liegt die Vermutung nahe, dass die starke Zunahme diploider Zellen durch einen proliferationsfördernden Effekt von 4-HPR innerhalb der frühen Vorläuferzellen zu erklären ist. Allerdings bleibt durch diese Erklärung die Frage nach dem plötzlichen Abfall des Anteils der SP 2n an der Hauptpopulation bei der Behandlung der Zellen mit 10  $\mu$ M 4-HPR nach 72 Stunden Inkubationsdauer weiterhin unbeantwortet.

Aus der zum Thema vorliegenden Literatur geht hervor, dass 4-HPR durchaus in der Lage ist, einen Zellarrest zu bewirken, doch in der G2/M-Phase des Zellzyklus`, insbesondere in der Pre-Anaphase, mit einer Aktivierung des mitotischen Spindels einhergeht. Dieser Zellarrest an dieser Stelle des Zellzyklus` ist mit einer aberranten Spindelformation assoziiert, die durch die Fähigkeit von Fenretinide zur Hemmung der Tubulin-Polymerisation durch direkte molekulare Tubulin-Interaktion zu erklären ist (Appierto, Tiberio et al. 2009). Dieser Befund steht in Widerspruch mit unseren Messdaten bezüglich der Proliferation von der SP 4n. Wie aus den Kapiteln 3.5.4 und 3.5.5 zu entnehmen ist, haben wir keinerlei Zusammenhang zwischen der proliferativen Entwicklung der SP 2n der Zelllinie KG-1a, der Behandlungsdauer sowie der Behandlungskonzentration von 4-HPR feststellen können. An dieser Stelle muss nochmals betont werden, dass die pro-apoptotische sowie die antiproliferative Wirkung von 4-HPR innerhalb der einzelnen AML-Zelllinien

unterschiedlich stark ausgeprägt ist, und zwar in Abhängigkeit davon, wie sensibel die jeweilige Zelllinie auf 4-HPR reagiert.

Ozpolat et al. haben im Jahr 2004 eben diese antiproliferative Wirkung von 4-HPR auf AML-Zellen der Zelllinie HL-60 in Abhängigkeit von der Expression bestimmter nukleärer Retinoidrezeptoren untersucht. Die Studie konnte darlegen, dass die wachstumshemmende Wirkung von 4-HPR auf AML-Zellen durch die Expression von bestimmten nukleären Retinoidrezeptoren ( $RAR\alpha$ ,  $RAR\beta$ ,  $RAR\gamma$  und  $RXR\alpha$ ) determiniert ist. In HL-60 Zellen, die über diese Rezeptoren verfügen, konnte somit eine Wachstumssuppression von bis zu 64,5 % realisiert werden (Ozpolat, Tari et al. 2004). Die Expression dieser nukleären Rezeptoren ist für KG-1a Zellen in der fachspezifischen Literatur bis dato nicht beschrieben worden. Die Abwesenheit solcher nukleären Retinoidrezeptoren in KG-1a Zellen, welche die Wirkung von 4-HPR potenzieren können, könnte eine plausible Erklärung für die geringe bis komplett fehlende Sensitivität dieser Zellen gegenüber der Substanz liefern.

Vor diesem Hintergrund nehmen Fenretinide durch die alleinige schwach bis mäßig ausgeprägte pro-apoptotische Wirkung ohne reduktiven Effekt auf die putative LSC der AML-Zelllinie KG-1a und die große Schwankung bezüglich der Sensitivität der einzelnen AML-Zelllinien gegenüber der Substanz unserer Einschätzung zufolge keine Stellung eines geeigneten Medikaments für die Behandlung der LSCs der AML ein.

#### **4.7 Zusammenfassende Gegenüberstellung der Effekte der vier Substanzen auf die AML-Zellen der KG-1a-Zelllinie und Ausblick**

LSCs stellen eine seltene Zellpopulation in Patienten dar, die an Leukämie erkrankt sind. Erstgenannte besitzen zahlreiche Charakteristika, die für HSCs typisch sind, wie etwa die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, selbstinduzierten Proliferation und Anti-Apoptose, darüber hinaus haben sie eine Resistenz gegen Chemotherapie und Immunresistenz (Ruggeri, Mancusi et al. 2007, Zou

2007, Ho, Hogge et al. 2008, Weng, Zeng et al. 2015). Es wird vermutet, dass LSCs eine bedeutende Rolle in der Resistenz mancher Leukämieformen gegenüber Chemotherapeutika spielen und für einen Rückfall nach erfolgter chemotherapeutischer Behandlung verantwortlich sein können. Zellen der Zelllinie KG-1a weisen Eigenschaften leukämischer Stammzellen auf und bieten sich von daher als ideales Zellmodell für die Untersuchung von LSCs und die Ausarbeitung potenzieller Behandlungsmöglichkeiten an. Dieser Ausgangspunkt führte zur Zielsetzung der vorliegenden Doktorarbeit.

Ein wichtiger Teil dieser Arbeit war es, nicht nur die einzelnen Ergebnisse der untersuchten potenziell therapeutischen Substanzen zu präsentieren, sondern diese Ergebnisse miteinander zu vergleichen und eine mögliche therapeutische Konsequenz daraus zu ziehen. In den Kapiteln 4.3 - 4.6 wurden die Effekte der einzelnen Substanzen auf die Zellen der AML-Zelllinie KG-1a in Bezug auf Zytotoxizität und Proliferationssuppression bzw. -stimulation hin ausführlich diskutiert. Im Folgenden sollen eine Gegenüberstellung dieser Ergebnisse und deren Bedeutung für die weitere Forschung erfolgen.

Als Erstes konzentrieren wir uns auf die differenziellen zytotoxischen Effekte der vier untersuchten Substanzen: Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass alle Substanzen in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration und -dauer in einem unterschiedlich ausgeprägten Maß und durch die Aktivierung bzw. Hemmung verschiedener Signalwege den prozentualen Anteil toter Zellen positiv beeinflusst haben. Dies deckt sich mit den bisher publizierten Studien in Bezug auf die Wirkung von CUR, SAL, PKC412 und 4-HPR auf die Zellzytotoxizität (Pesakhov, Khanin et al. 2010, Riccioni, Dupuis et al. 2010, Rao, Xu et al. 2011, Roulston, Burt et al. 2016, Zeng, Weng et al. 2016). Somit konnten wir für CUR bei der Behandlung mit den niedrigeren CUR-Konzentrationen (1,0 µM CUR, 2,5 µM CUR und 5,0 µM CUR) unabhängig von der Behandlungsdauer kaum Unterschiede in der Zellzytotoxizität beobachten. Stattdessen konnte aber bei einer Behandlung der KG-1a Zellen mit 15 µM CUR nahezu eine Verdreifachung des Anteils toter Zellen registriert werden.

Auch bei den anderen drei untersuchten Substanzen zeigte sich ein Dosis-abhängiger Anstieg der Zellzytotoxizität. Die höchsten Apoptose-bedingten Werte konnten wir bei der Behandlung der Zellen mit der Testsubstanz SAL dokumentieren. Bereits nach nur 24 Stunden Inkubationsdauer zeigte sich bei der Versuchsreihe mit SAL für die zwei höchsten SAL-Konzentrationen eine Verdopplung (5,0  $\mu\text{M}$  SAL nach 24 Stunden) bzw. Verfünffachung (10, 0  $\mu\text{M}$  SAL nach 24 Stunden) des prozentualen Anteils toter Zellen. Nach 72 Stunden Inkubationsdauer waren diese Werte noch weiter angestiegen, sodass wir für die mit 5,0  $\mu\text{M}$  SAL behandelten Zellen eine vierfach und für die mit 10,0  $\mu\text{M}$  SAL behandelten Zellen eine sechsfach höhere Zellzytotoxizität aufzeichnen konnten. Für PKC412 lagen die Ergebnisse der Zellzytotoxizität ebenso in einem vergleichbaren Rahmen gegenüber den Ergebnissen der mit SAL behandelten Zellen. Unsere Versuchsreihen mit 4-HPR ergaben zwar in Abhängigkeit mit der Behandlungsdauer und -konzentration sehr sprunghafte Ergebnisse auch zwischen den einzeln durchgeführten Versuchen, nichtdestotrotz zeigte sich aber hier gleichermaßen eine Verdreifachung des Anteils toter Zellen nach einer Behandlung mit der höchsten 4-HPR Konzentration nach 24 Stunden und eine vierfach gesteigerte Zellzytotoxizität nach 72 Stunden Behandlungsdauer.

Diese Resultate erscheinen plausibel angesichts der in der Literatur beschriebenen Funktionsmechanismen der einzelnen Substanzen innerhalb einer Zelle. CUR hat im Laufe der Jahre seine pro-apoptotische Wirkung als potenter NF- $\kappa$ B-Inhibitor (Singh and Aggarwal 1995, Killian, Kronski et al. 2012) unter Beweis stellen können. Auf leukämischer Ebene ist CUR in der Lage, eine DNA-Hypomethylierung in AML-Zellen verschiedener Zelllinien durch selektive Downregulation von DNMT1 und die Blockade der enzymatischen Aktivität von DNMT1 zu verursachen und dabei gesunde Zellen zu schonen (Yu, Peng et al. 2013). SAL ist dagegen fähig, durch Hemmung des Wnt-Signalweges eine Apoptoseinduktion zu verursachen. Außerdem kann SAL durch Interaktionen auf Elektrolytebene die Vitalität von Zellen beeinflussen und durch die Aktivierung von Caspasen eine gezielte Apoptoseinduktion hervorrufen. Die Aktivierung aller drei Wege zur programmierten Zelltod könnte in unserem Fall

die ermittelten hohen Werten für die Zellzytotoxizität in der SAL-Versuchsreihe erklären.

Auch bei den mit PKC412 behandelten Zellen konnten wir eine signifikant erhöhte Zellzytotoxizität feststellen. Als FLT3-Inhibitor fungiert PKC412 als starker Proliferationssuppressor und Apoptoseinduktor. Angesichts des Umstandes, dass LSCs durch eine übermäßig starke FLT3-Expression gekennzeichnet sind (Birg, Courcoul et al. 1992, Rosnet, Buhning et al. 1996) und einen möglichen Angriffspunkt für den Tyrosinkinase-Inhibitor PKC412 darstellen, eignet sich PKC412 als potenzielle therapeutische Substanz für die Behandlung von FLT3-positiven Leukämieformen.

Wie schon im Rahmen von Kapitel 4.5 ausführlich diskutiert wurde, kommt es für gewöhnlich bei normalen hämatopoetischen Zellen nach erfolgter Differenzierung der Zellen zum Verlust des FLT3-Rezeptors (Adolfsson, Mansson et al. 2005, Pemmaraju, Kantarjian et al. 2011). In LSCs ist dies aber nicht der Fall. Aufgrund verschiedener Arten von Mutationen, die bis dato nicht alle erforscht sind, kommt es bei LSCs zum einen zu einer übermäßig starken FLT3-Expression, zum anderen zu einer konstanten Aktivierung des FLT3-Rezeptors. Daraus resultiert eine permanente Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, die mit einer Apoptoseseppression und unkontrollierten Wachstumsstimulation einhergehen (Hayakawa, Towatari et al. 2000, Levis, Allebach et al. 2002). Eine pharmakologisch induzierte Blockade des FLT3-Rezeptors durch PKC412 bedingt eine Inhibition der nachfolgenden Signalkaskaden, die für die Pathogenese der AML von großer Signifikanz sind (Barry, Clark et al. 2007, Cooper, Kindwall-Keller et al. 2015).

Auf diese Weise werden die pathologisch geregelte Apoptoseseppression und Wachstumsinduktion in einer FLT3 positiver AML-Zelle gehemmt. Ferner kommt es durch die pharmakologische Blockade des FLT3-rezeptors zu einer gesteigerten Apoptose und Proliferationshemmung. Dies wurde durch die von uns erhobenen Daten aus unseren Versuchsreihen mit PKC412 zweifellos verifiziert. Es konnte zudem gezeigt werden, dass PKC412 durchaus in der Lage sein kann, eine Apoptoseinduktion in KG-1a Zellen und eine deutliche

Reduktion des SP-Anteils sowohl an der diploiden als auch tetraploiden Hauptpopulation hervorzurufen. Die therapeutische Wirksamkeit der Substanz wurde schon in diversen klinischen und präklinischen Studien *in vitro* wie auch *in vivo* dargelegt (Levis, Tse et al. 2001, Weisberg, Boulton et al. 2002, Stone, DeAngelo et al. 2005, Stone, Fischer et al. 2012). Allerdings konnte in vielen dieser Studien ebenso gezeigt werden, dass die alleinige Therapie mit FLT3-Inhibitoren für die komplette Eradikation der leukämischen Progenitoren nicht ausreicht. Diese Daten gehen mit unseren Ergebnissen konform. Im Rahmen unserer Experimente mit PKC412 und dessen Wirkung auf die KG-1a-Zellen konnte eine starke pro-apoptotische und proliferations-supprimierende Wirkung auf die putativen LSCs der AML dokumentiert werden, jedoch war keine komplette Vernichtung der leukämischen Vorläuferzellen möglich. Dies spricht für eine limitierte Aktivität dieser Substanz in der Monotherapie. In der Konsequenz davon erscheint an dieser Stelle der Versuch einer Kombinationsbehandlung mit PKC412 und einem klassischen Zytostatikum der AML-Therapie sinnvoll. Stone et al. haben die gleiche Hypothese postuliert und im Jahr 2005 eine Phase-I-klinische Studie durchgeführt, in der PKC412 in Kombination mit DNR (Daunorubicin) und anderen klassischen Chemotherapeutika bei AML-Patienten mit einem Relaps nach erfolgter Chemotherapie in der Vergangenheit eingesetzt wurde. Diese Studie hat ans Licht gebracht, dass die experimentelle Kombinationstherapie mit PKC412 zusätzlich zur Induktionstherapie mit Anthrazyklinen oder Cytosin-Arabinoside zu einer Reduktion der peripheren leukämischen Blasten und der leukämischen Blasten im Knochenmark geführt hat (Stone, DeAngelo et al. 2005). Die vielversprechenden Ergebnisse dieser Forschung haben eine weitere internationale randomisierte Doppelblindstudie der Phase III initiiert, die im Sommer 2017 publiziert wurde. In dieser Studie wurden 717 Patienten mit neu diagnostizierter FLT3 positiver AML eingeschlossen, die zusätzlich zur klassischen Zytostatikatherapie (Induktionstherapie mit Daunorubicin und Cytarabin, ferner Konsolidierungstherapie mit Hochdosis Cytarabin) entweder Midostaurin oder Placebos erhalten haben. Die Ergebnisse der Studie sprechen eindeutig für die Effektivität der Kombinationstherapie bestehend aus

klassischer Chemotherapie und Midostaurin. Es konnte herausgefunden werden, dass das Gesamtüberleben von Patienten mit FLT3-positiver AML in der Midostaurin-Gruppe signifikant länger war als in der Placebo-Gruppe (Stone, Mandrekar et al. 2017).

Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass die Behandlung von KG-1a-Zellen mit den untersuchten Substanzen nicht nur zu einer Reduktion der diploiden sowie tetraploiden SP führen kann, wie es bei den Versuchsreihen mit PKC412 der Fall war, sondern auch zu einer Dosis-abhängigen Proliferationsstimulation und dadurch wiederum zu einem prozentualen Anstieg der SP 2n und SP 4n an der jeweiligen Hauptpopulation. Dies war besonders gut bei den Versuchen mit CUR zu illustrieren.

Wie schon in Kapitel 4.3.3 ausführlich dargelegt wurde, gibt es zwei mögliche Erklärungen für den Anstieg des Anteils der SP an der Hauptpopulation: Auf der einen Seite konnten wir eine Zunahme der SP 4n in Abhängigkeit von der Behandlungskonzentration und -dauer beobachten. Auf der anderen Seite war ein noch viel deutlicherer Dosis- und Inkubationszeit-abhängiger Anstieg der SP 2n zu sehen. Somit scheint die Annahme plausibel, dass CUR erstens einen Zellarrest in der G2-Phase des Zellzyklus hervorrufen kann. Aufgrund des Zellarrestes erfolgt dementsprechend keine Teilung der tetraploiden Zellen, die aber Wachstums- und Teilungssignale an die übrigen SP-Zellen übermitteln, womit es zu einer Anreicherung von SP-Zellen in der S-Phase des Zellzyklus` kommt. Zweitens wird durch die von uns erhobenen Messdaten der mitogene Effekt von CUR auf die Vorläuferzellen der SP 2n deutlicher: Nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden kam es bei den mit 15  $\mu$ M CUR behandelten Zellen zu einer Verdopplung der diploiden Zellen mit Stammzeleigenschaften. Diese Zunahme ist durch eine proliferationsfördernde Wirkung von CUR innerhalb der frühen Vorläuferzellen zu erklären. Dieser Ansatz könnte therapeutisch genutzt werden, wie es frühere und auch laufende Studien schon gezeigt haben. Eine besonders gute synergistische Wirkung ist bereits für Kombinationen bestehend aus CUR und DNR (Rao, Xu et al. 2011) oder CUR und BUS (Weng, Zeng et al. 2015) in in-vitro-Modellen beschrieben worden. Interessant wären an dieser Stelle auch die Auswirkungen einer

Kombinationstherapie bestehend aus CUR und gängiger Zytostatika der AML-Induktions- bzw. Konsolidierungstherapie in vitro mit längeren Inkubationszeiten und in einem in-vivo-Modell zu untersuchen. Ebenfalls von Interesse wäre ein Kombinationsversuch mit PKC412. Aufgrund des starken mitogenen Effektes von CUR und des ausgeprägten pro-apoptotischen und wachstumshemmenden Effekt von PKC412 auf FLT3-positive AML-Zelllinien könnte eine gute synergistische Interaktion beider Substanzen daraus resultieren.

Auch eine Versuchsreihe mit der Verknüpfung beider Substanzen CUR und SAL wäre eine denkbare Alternative. Bedingt durch die selektive Hemmung des Wnt-Signalweges ist SAL in der Lage, eine Apoptose und Hemmung der Selbsterneuerung in AML-Zellen hervorzurufen (Lu, Choi et al. 2011). Durch Interaktionen auf Elektrolytebene (Bortner, Hughes et al. 1997, Lu and Carson 2009) wie auch die Aktivierung von Caspase-induzierten Signalwegen zum programmierten Zelltod (Boehmerle and Endres 2011, Lu, Choi et al. 2011) wird die Wirkung von SAL als Apoptoseinduktor noch weiter verstärkt. Diese Behauptung wurde in unseren Versuchen explizit bestätigt. SAL hat zwar zu keinem signifikanten wachstumshemmenden Effekt geführt, dafür war aber ein erheblicher Anstieg des Anteils toter Zellen mit einer geringen reduktiven Wirkung auf die putative LSC zu registrieren. Unter Berücksichtigung des starken mitogenen Effekts von CUR auf die KG-1a-Zellen kann aus der Kombination CUR und SAL eine therapeutische Konsequenz gezogen werden, da LSCs beim Verlassen des Zustandes der Quieszenz für zytotoxische Medikamente angreifbar werden (Mattes 2016) und SAL in unseren Versuchsreihen eine ausgeprägte zytotoxische Wirkung offenbart hat.

In Bezug auf die Wirkung von 4-HPR auf die KG-1a-Zellen konnten starke Schwankungen sowohl Dosis-abhängig und in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer als auch zwischen den einzelnen Versuchsreihen selbst beobachtet werden. Trotz stark voneinander abweichender Werte konnte eine Zunahme der zellspezifischen Zytotoxizität registriert werden, die durch die Generierung von ROS (Oridate, Suzuki et al. 1997, Maurer, Metelitsa et al. 1999) und Aktivierung von mitochondrialen Caspase-Kaskaden (Holmes, Soprano et al. 2003, Ulukaya, Pirianov et al. 2003) erklärt werden könnte.

Allerdings sprechen die bisher publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen dafür, dass sich die 4-HPR-induzierte ROS-abhängige Signaltransduktion je nach Zelltyp und selbst innerhalb der einzelnen AML-Zelllinien sehr stark von anderen unterscheidet. Unsere Ergebnisse sprechen für eine schwach bis mäßig ausgeprägte Zellzytotoxizität. Bezüglich der Wirkung auf die diploide und tetraploide Stammzellpopulation sind die erhobenen Daten nicht einheitlich und zu sehr durch eine Dosis-unabhängige sowie Behandlungsdauer-unabhängige Schwankung geprägt, weshalb 4-HPR keinen Stellenwert einer geeigneten potenziell therapeutischen Substanz für die Behandlung von AML einnehmen kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden in die weitere Forschungsarbeit der AG Ebinger eingehen. Die Auswirkungen der vier untersuchten Substanzen auf die putative LSC in einem in-vitro-Modell schaffen die Basis für weiterführende Untersuchungen. Besonders interessant wäre es, die Effekte von CUR, SAL und MID in einem in-vivo-Modell zu untersuchen; auch in verschiedenen Kombinationen mit gängiger Zytostatika. Die Ergebnisse dieser Ausarbeitung sowie die bisher zum Thema publizierten Studien haben gezeigt, dass es durchaus vielversprechende Substanzen gibt, die zu einer erheblichen Reduktion der leukämischen Vorläuferzellen und einer Verbesserung des Gesamt-Outcome bei Patienten mit AML führen. Dessen ungeachtet bleibt die komplette Vernichtung der putativen LSCs weiterhin eine große Herausforderung in der Behandlung von akuten Leukämien. Um diese Herausforderung zu bewältigen, sollte die Biologie der LSCs zukünftig noch besser erforscht und weitere Resistenzmechanismen dieser Zellen sollten identifiziert werden. Zudem gilt es, weitere potenzielle zellspezifische Angriffspunkte als Therapieansatz zu finden.

---

## Literaturverzeichnis

- Abdel-Wahab, O. and R. L. Levine (2010). "Metabolism and the leukemic stem cell." J Exp Med **207**(4): 677-680.
- Adolfsson, J., R. Mansson, N. Buza-Vidas, A. Hultquist, K. Liuba, C. T. Jensen, D. Bryder, L. Yang, O. J. Borge, L. A. Thoren, K. Anderson, E. Sitnicka, Y. Sasaki, M. Sigvardsson and S. E. Jacobsen (2005). "Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment." Cell **121**(2): 295-306.
- Anand, P., C. Sundaram, S. Jhurani, A. B. Kunnumakkara and B. B. Aggarwal (2008). "Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution." Cancer Lett **267**(1): 133-164.
- Andre, M. C., K. E. Witte, R. A. Hoerrmann, A. Schmitt, R. Handgretinger and M. Ebinger (2015). "Hoechst 33342 Staining Identifies the Progenitor Side Population in NOD.Cg-PrkdcscidIL2rgtmWjl/Sz Mice Harboring Pediatric Leukemias." In Vivo **29**(6): 661-669.
- Appierto, V., P. Tiberio, E. Cavadini, P. Casalini, G. Cappelletti and F. Formelli (2009). "Antimitotic effect of the retinoid 4-oxo-fenretinide through inhibition of tubulin polymerization: a novel mechanism of retinoid growth-inhibitory activity." Mol Cancer Ther **8**(12): 3360-3368.
- Appierto, V., P. Tiberio, M. G. Villani, E. Cavadini and F. Formelli (2009). "PLAB induction in fenretinide-induced apoptosis of ovarian cancer cells occurs via a ROS-dependent mechanism involving ER stress and JNK activation." Carcinogenesis **30**(5): 824-831.
- Asumendi, A., M. C. Morales, A. Alvarez, J. Arechaga and G. Perez-Yarza (2002). "Implication of mitochondria-derived ROS and cardiolipin peroxidation in N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis." Br J Cancer **86**(12): 1951-1956.
- Bachmeier, B., A. G. Nerlich, C. M. Iancu, M. Cilli, E. Schleicher, R. Vene, R. Dell'Eva, M. Jochum, A. Albini and U. Pfeffer (2007). "The chemopreventive polyphenol Curcumin prevents hematogenous breast cancer metastases in immunodeficient mice." Cell Physiol Biochem **19**(1-4): 137-152.
- Balkwill, F. and A. Mantovani (2001). "Inflammation and cancer: back to Virchow?" Lancet **357**(9255): 539-545.
- Barry, E. V., J. J. Clark, J. Cools, J. Roesel and D. G. Gilliland (2007). "Uniform sensitivity of FLT3 activation loop mutants to the tyrosine kinase inhibitor midostaurin." Blood **110**(13): 4476-4479.
- Benderra, Z., A. M. Faussat, L. Sayada, J. Y. Perrot, D. Chaoui, J. P. Marie and O. Legrand (2004). "Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias." Clin Cancer Res **10**(23): 7896-7902.
- Benderra, Z., A. M. Faussat, L. Sayada, J. Y. Perrot, R. Tang, D. Chaoui, H. Morjani, C. Marzac, J. P. Marie and O. Legrand (2005). "MRP3, BCRP, and P-

- 
- glycoprotein activities are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia." Clin Cancer Res **11**(21): 7764-7772.
- Berenson, R. J., R. G. Andrews, W. I. Bensinger, D. Kalamasz, G. Knitter, C. D. Buckner and I. D. Bernstein (1988). "Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons." J Clin Invest **81**(3): 951-955.
- Bertoncello, I. and B. Williams (2004). "Hematopoietic stem cell characterization by Hoechst 33342 and rhodamine 123 staining." Methods Mol Biol **263**: 181-200.
- Beug, H. (2009). "Breast cancer stem cells: eradication by differentiation therapy?" Cell **138**(4): 623-625.
- Birg, F., M. Courcoul, O. Rosnet, F. Bardin, M. J. Pebusque, S. Marchetto, A. Tabilio, P. Mannoni and D. Birnbaum (1992). "Expression of the FMS/KIT-like gene FLT3 in human acute leukemias of the myeloid and lymphoid lineages." Blood **80**(10): 2584-2593.
- Boehmerle, W. and M. Endres (2011). "Salinomycin induces calpain and cytochrome c-mediated neuronal cell death." Cell Death Dis **2**: e168.
- Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nat Med **3**(7): 730-737.
- Bortner, C. D., F. M. Hughes, Jr. and J. A. Cidlowski (1997). "A primary role for K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> efflux in the activation of apoptosis." J Biol Chem **272**(51): 32436-32442.
- Brown, P. and D. Small (2004). "FLT3 inhibitors: a paradigm for the development of targeted therapeutics for paediatric cancer." Eur J Cancer **40**(5): 707-721, discussion 722-704.
- Burchert, A., M. C. Muller, P. Kostrewa, P. Erben, T. Bostel, S. Liebler, R. Hehlmann, A. Neubauer and A. Hochhaus (2010). "Sustained molecular response with interferon alfa maintenance after induction therapy with imatinib plus interferon alfa in patients with chronic myeloid leukemia." J Clin Oncol **28**(8): 1429-1435.
- Carow, C. E., M. Levenstein, S. H. Kaufmann, J. Chen, S. Amin, P. Rockwell, L. Witte, M. J. Borowitz, C. I. Civin and D. Small (1996). "Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias." Blood **87**(3): 1089-1096.
- Challen, G. A. and M. H. Little (2006). "A side order of stem cells: the SP phenotype." Stem Cells **24**(1): 3-12.
- Chen, C. J., J. E. Chin, K. Ueda, D. P. Clark, I. Pastan, M. M. Gottesman and I. B. Roninson (1986). "Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells." Cell **47**(3): 381-389.
- Cheshier, S. H., S. J. Morrison, X. Liao and I. L. Weissman (1999). "In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 3120-3125.

---

Chi, H. T., B. T. Ly, Y. Kano, A. Tojo, T. Watanabe and Y. Sato (2012). "ETV6-NTRK3 as a therapeutic target of small molecule inhibitor PKC412." Biochem Biophys Res Commun **429**(1-2): 87-92.

Christ, O., M. Feuring-Buske, W. Hiddemann and C. Buske (2007). Pathogenese und Biologie der akuten myeloischen Leukämie. Medizinische Klinik. Berlin, Springer: 290-295.

Cooper, B. W., T. L. Kindwall-Keller, M. D. Craig, R. J. Creger, M. Hamadani, W. W. Tse and H. M. Lazarus (2015). "A phase I study of midostaurin and azacitidine in relapsed and elderly AML patients." Clin Lymphoma Myeloma Leuk **15**(7): 428-432 e422.

Corazzari, M., P. E. Lovat, S. Oliverio, F. Di Sano, R. P. Donnorso, C. P. Redfern and M. Piacentini (2005). "Fenretinide: a p53-independent way to kill cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **331**(3): 810-815.

Cuello, M., A. O. Coats, I. Darko, S. A. Ettenberg, G. J. Gardner, M. M. Nau, J. R. Liu, M. J. Birrer and S. Lipkowitz (2004). "N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4HPR) enhances TRAIL-mediated apoptosis through enhancement of a mitochondrial-dependent amplification loop in ovarian cancer cell lines." Cell Death Differ **11**(5): 527-541.

Darwiche, N., A. Hatoum, G. Dbaibo, H. Kadara, R. Nasr, G. Abou-Lteif, R. Bazzi, O. Hermine, H. de The and A. Bazarbachi (2004). "N-(4-hydroxyphenyl)retinamide induces growth arrest and apoptosis in HTLV-I-transformed cells." Leukemia **18**(3): 607-615.

De Grandis, M., F. Bardin, C. Fauriat, C. Zemmour, A. El Kaoutari, A. Serge, S. Granjeaud, L. Pouyet, C. Montersino, A. S. Chretien, M. J. Mozziconacci, R. Castellano, G. Bidaut, J. M. Boher, Y. Collette, S. J. Mancini, N. Vey and M. Aurrand-Lions (2017). "JAM-C identifies Src family kinase-activated leukemia-initiating cells and predicts poor prognosis in acute myeloid leukemia." Cancer Res.

Dean, M., T. Fojo and S. Bates (2005). "Tumour stem cells and drug resistance." Nat Rev Cancer **5**(4): 275-284.

Dempke, W. (2006). Lehrbuch Hämato-Onkologie. Bern, Hans Huber Verlag.

Dempke, W. (2006). Lehrbuch Hämato-Onkologie. Bern, Hans Huber Verlag.

Derochette, S., T. Franck, A. Mouithys-Mickalad, G. Deby-Dupont, P. Neven and D. Serteyn (2013). "Intra- and extracellular antioxidant capacities of the new water-soluble form of curcumin (NDS27) on stimulated neutrophils and HL-60 cells." Chem Biol Interact **201**(1-3): 49-57.

Dinkova-Kostova, A. T. and P. Talalay (1999). "Relation of structure of curcumin analogs to their potencies as inducers of Phase 2 detoxification enzymes." Carcinogenesis **20**(5): 911-914.

DiPietrantonio, A. M., T. C. Hsieh, S. C. Olson and J. M. Wu (1998). "Regulation of G1/S transition and induction of apoptosis in HL-60 leukemia cells by fenretinide (4HPR)." Int J Cancer **78**(1): 53-61.

- 
- Doxani, C., M. Voulgarelis and E. Zintzaras (2013). "MDR1 mRNA expression and MDR1 gene variants as predictors of response to chemotherapy in patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis." Biomarkers **18**(5): 425-435.
- Durand, R. E. (1982). "Use of Hoechst 33342 for cell selection from multicell systems." J Histochem Cytochem **30**(2): 117-122.
- Dutreix, C., F. Munarini, S. Lorenzo, J. Roesel and Y. Wang (2013). "Investigation into CYP3A4-mediated drug-drug interactions on midostaurin in healthy volunteers." Cancer Chemother Pharmacol **72**(6): 1223-1234.
- Erdreich-Epstein, A., L. B. Tran, N. N. Bowman, H. Wang, M. C. Cabot, D. L. Durden, J. Vlckova, C. P. Reynolds, M. F. Stins, S. Groshen and M. Millard (2002). "Ceramide signaling in fenretinide-induced endothelial cell apoptosis." J Biol Chem **277**(51): 49531-49537.
- Fallon, P., T. Gentry, A. E. Balber, D. Boulware, W. E. Janssen, R. Smilee, R. W. Storms and C. Smith (2003). "Mobilized peripheral blood SSCloALDHbr cells have the phenotypic and functional properties of primitive haematopoietic cells and their number correlates with engraftment following autologous transplantation." Br J Haematol **122**(1): 99-108.
- Fathi, A. T. and B. A. Chabner (2011). "FLT3 inhibition as therapy in acute myeloid leukemia: a record of trials and tribulations." Oncologist **16**(8): 1162-1174.
- Fischer, T., R. M. Stone, D. J. Deangelo, I. Galinsky, E. Estey, C. Lanza, E. Fox, G. Ehninger, E. J. Feldman, G. J. Schiller, V. M. Klimek, S. D. Nimer, D. G. Gilliland, C. Dutreix, A. Huntsman-Labed, J. Virkus and F. J. Giles (2010). "Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3." J Clin Oncol **28**(28): 4339-4345.
- Frohling, S., C. Scholl, R. L. Levine, M. Loriaux, T. J. Boggon, O. A. Bernard, R. Berger, H. Dohner, K. Dohner, B. L. Ebert, S. Teckie, T. R. Golub, J. Jiang, M. M. Schittenhelm, B. H. Lee, J. D. Griffin, R. M. Stone, M. C. Heinrich, M. W. Deininger, B. J. Druker and D. G. Gilliland (2007). "Identification of driver and passenger mutations of FLT3 by high-throughput DNA sequence analysis and functional assessment of candidate alleles." Cancer Cell **12**(6): 501-513.
- Fuchs, D., V. Daniel, M. Sadeghi, G. Opelz and C. Naujokat (2010). "Salinomycin overcomes ABC transporter-mediated multidrug and apoptosis resistance in human leukemia stem cell-like KG-1a cells." Biochem Biophys Res Commun **394**(4): 1098-1104.
- Fuchs, D., A. Heinold, G. Opelz, V. Daniel and C. Naujokat (2009). "Salinomycin induces apoptosis and overcomes apoptosis resistance in human cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **390**(3): 743-749.
- Gabbianelli, M., E. Pelosi, E. Montesoro, M. Valtieri, L. Luchetti, P. Samoggia, L. Vitelli, T. Barberi, U. Testa, S. Lyman and et al. (1995). "Multi-level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and

- 
- proliferation of granulomonocytic progenitors/monocytic precursors." Blood **86**(5): 1661-1670.
- Garcia-Montero, A. C., M. Jara-Acevedo, C. Teodosio, M. L. Sanchez, R. Nunez, A. Prados, I. Aldanondo, L. Sanchez, M. Dominguez, L. M. Botana, F. Sanchez-Jimenez, K. Sotlar, J. Almeida, L. Escribano and A. Orfao (2006). "KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients." Blood **108**(7): 2366-2372.
- Garg, A. and B. B. Aggarwal (2002). "Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development." Leukemia **16**(6): 1053-1068.
- Gilliland, D. G. and J. D. Griffin (2002). "Role of FLT3 in leukemia." Curr Opin Hematol **9**(4): 274-281.
- Gleixner, K. V., B. Peter, K. Blatt, V. Suppan, A. Reiter, D. Radia, E. Hadzijusufovic and P. Valent (2013). "Synergistic growth-inhibitory effects of ponatinib and midostaurin (PKC412) on neoplastic mast cells carrying KIT D816V." Haematologica **98**(9): 1450-1457.
- Goodell, M. A., K. Brose, G. Paradis, A. S. Conner and R. C. Mulligan (1996). "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo." J Exp Med **183**(4): 1797-1806.
- Goodell, M. A., M. Rosenzweig, H. Kim, D. F. Marks, M. DeMaria, G. Paradis, S. A. Grupp, C. A. Sieff, R. C. Mulligan and R. P. Johnson (1997). "Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species." Nat Med **3**(12): 1337-1345.
- Griffin, J. D. and B. Lowenberg (1986). "Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia." Blood **68**(6): 1185-1195.
- Griffith, J., J. Black, C. Faerman, L. Swenson, M. Wynn, F. Lu, J. Lippke and K. Saxena (2004). "The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain." Mol Cell **13**(2): 169-178.
- Gstraunthaler, G. and T. Lindl (2013). Zell- und Gewebekultur. Heidelberg, Springer Spektrum.
- Gupta, P. B., T. T. Onder, G. Jiang, K. Tao, C. Kuperwasser, R. A. Weinberg and E. S. Lander (2009). "Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening." Cell **138**(4): 645-659.
- Guzman, M. L. and C. T. Jordan (2004). "Considerations for targeting malignant stem cells in leukemia." Cancer Control **11**(2): 97-104.
- Guzman, M. L., S. J. Neering, D. Upchurch, B. Grimes, D. S. Howard, D. A. Rizzieri, S. M. Luger and C. T. Jordan (2001). "Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells." Blood **98**(8): 2301-2307.
- Hassanein, M., M. H. Almahayni, S. O. Ahmed, S. Gaballa and R. El Fakih (2016). "FLT3 Inhibitors for Treating Acute Myeloid Leukemia." Clin Lymphoma Myeloma Leuk.

---

Hayakawa, F., M. Towatari, H. Kiyoi, M. Tanimoto, T. Kitamura, H. Saito and T. Naoe (2000). "Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines." Oncogene **19**(5): 624-631.

Herold, G. and Mitarbeiter (2016). Innere Medizin. Köln, Gerd Herold.

Herold, G. and u. Mitarbeiter (2016). Innere Medizin. Köln, Gerd Herold.

Herr, I. and K. M. Debatin (2001). "Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy." Blood **98**(9): 2603-2614.

Ho, M. M., D. E. Hogge and V. Ling (2008). "MDR1 and BCRP1 expression in leukemic progenitors correlates with chemotherapy response in acute myeloid leukemia." Exp Hematol **36**(4): 433-442.

Holmes, W. F., D. R. Soprano and K. J. Soprano (2003). "Comparison of the mechanism of induction of apoptosis in ovarian carcinoma cells by the conformationally restricted synthetic retinoids CD437 and 4-HPR." J Cell Biochem **89**(2): 262-278.

Hope, K. J., L. Jin and J. E. Dick (2004). "Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity." Nat Immunol **5**(7): 738-743.

Howells, L., B. Delage, V. J. Drake and J. Higdon. (2016). "Curcumin."

Huber, H. M., M. Heiden and R. Seitz (1999). "Hämatopoetische Stammzellen." Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz **42**: 105-112.

Hursting, S. D., J. C. Shen, X. Y. Sun, T. T. Wang, J. M. Phang and S. N. Perkins (2002). "Modulation of cyclophilin gene expression by N-4-(hydroxyphenyl)retinamide: association with reactive oxygen species generation and apoptosis." Mol Carcinog **33**(1): 16-24.

Inaba, H., M. Greaves and C. G. Mullighan (2013). "Acute lymphoblastic leukaemia." The Lancet **381**(9881): 1943-1955.

Jiang, L., X. Pan, Y. Chen, K. Wang, Y. Du and J. Zhang (2011). "Preferential involvement of both ROS and ceramide in fenretinide-induced apoptosis of HL60 rather than NB4 and U937 cells." Biochem Biophys Res Commun **405**(2): 314-318.

Jiao, Y., J. t. Wilkinson, X. Di, W. Wang, H. Hatcher, N. D. Kock, R. D'Agostino, Jr., M. A. Knovich, F. M. Torti and S. V. Torti (2009). "Curcumin, a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent, is a biologically active iron chelator." Blood **113**(2): 462-469.

Kammel, M., A. Kummrow and J. Neukammer (2012). "Reference measurement procedures for the accurate determination of cell concentrations: present status and future developments." Journal of Laboratory Medicine **36**(1): 25-35.

---

Kastner, P., M. Mark and P. Chambon (1995). "Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life?" Cell **83**(6): 859-869.

Kentrou, N., N. Tsagarakis, K. Tzanetou, M. Damala and K. Papadimitriou (2011). "An improved flow cytometric assay for detection and discrimination between malignant cells and atypical mesothelial cells, in serous cavity effusions." International Clinical Cytometry Society: 324-334.

Killian, P. H., E. Kronski, K. M. Michalik, O. Barbieri, S. Astigiano, C. P. Sommerhoff, U. Pfeffer, A. G. Nerlich and B. E. Bachmeier (2012). "Curcumin inhibits prostate cancer metastasis in vivo by targeting the inflammatory cytokines CXCL1 and -2." Carcinogenesis **33**(12): 2507-2519.

Kim, M., H. Turnquist, J. Jackson, M. Sgagias, Y. Yan, M. Gong, M. Dean, J. G. Sharp and K. Cowan (2002). "The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells." Clin Cancer Res **8**(1): 22-28.

Kiyoi, H., M. Towatari, S. Yokota, M. Hamaguchi, R. Ohno, H. Saito and T. Naoe (1998). "Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product." Leukemia **12**(9): 1333-1337.

Konopleva, M. Y. and C. T. Jordan (2011). "Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting." J Clin Oncol **29**(5): 591-599.

Kwon, Y. K., J. M. Jun, S. W. Shin, J. W. Cho and S. I. Suh (2005). "Curcumin decreases cell proliferation rates through BTG2-mediated cyclin D1 down-regulation in U937 cells." Int J Oncol **26**(6): 1597-1603.

Levis, M., J. Allebach, K. F. Tse, R. Zheng, B. R. Baldwin, B. D. Smith, S. Jones-Bolin, B. Ruggeri, C. Dionne and D. Small (2002). "A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo." Blood **99**(11): 3885-3891.

Levis, M., R. Pham, B. D. Smith and D. Small (2004). "In vitro studies of a FLT3 inhibitor combined with chemotherapy: sequence of administration is important to achieve synergistic cytotoxic effects." Blood **104**(4): 1145-1150.

Levis, M., K. F. Tse, B. D. Smith, E. Garrett and D. Small (2001). "A FLT3 tyrosine kinase inhibitor is selectively cytotoxic to acute myeloid leukemia blasts harboring FLT3 internal tandem duplication mutations." Blood **98**(3): 885-887.

Ley, T. J., E. R. Mardis, L. Ding, B. Fulton, M. D. McLellan, K. Chen, D. Dooling, B. H. Dunford-Shore, S. McGrath, M. Hickenbotham, L. Cook, R. Abbott, D. E. Larson, D. C. Koboldt, C. Pohl, S. Smith, A. Hawkins, S. Abbott, D. Locke, L. W. Hillier, T. Miner, L. Fulton, V. Magrini, T. Wylie, J. Glasscock, J. Conyers, N. Sander, X. Shi, J. R. Osborne, P. Minx, D. Gordon, A. Chinwalla, Y. Zhao, R. E. Ries, J. E. Payton, P. Westervelt, M. H. Tomasson, M. Watson, J. Baty, J. Ivanovich, S. Heath, W. D. Shannon, R. Nagarajan, M. J. Walter, D. C. Link, T. A. Graubert, J. F. DiPersio and R. K. Wilson (2008). "DNA sequencing of a

- 
- cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome." Nature **456**(7218): 66-72.
- Lin, K. K. and M. A. Goodell (2006). "Purification of hematopoietic stem cells using the side population." Methods Enzymol **420**: 255-264.
- Lindl, T. (2002). Zell- und Gewebekultur. Heidelberg, Spektrum.
- Lotan, R. (1996). "Retinoids in cancer chemoprevention." FASEB J **10**(9): 1031-1039.
- Lovat, P. E., M. Ranalli, M. Annichiarico-Petruzzelli, F. Bernassola, M. Piacentini, A. J. Malcolm, A. D. Pearson, G. Melino and C. P. Redfern (2000). "Effector mechanisms of fenretinide-induced apoptosis in neuroblastoma." Exp Cell Res **260**(1): 50-60.
- Lu, D. and D. A. Carson (2009). "Spiperone enhances intracellular calcium level and inhibits the Wnt signaling pathway." BMC Pharmacol **9**: 13.
- Lu, D., M. Y. Choi, J. Yu, J. E. Castro, T. J. Kipps and D. A. Carson (2011). "Salinomycin inhibits Wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(32): 13253-13257.
- Maheshwari, R. K., A. K. Singh, J. Gaddipati and R. C. Srimal (2006). "Multiple biological activities of curcumin: a short review." Life Sci **78**(18): 2081-2087.
- Mattes, M. (2016). Manipulation der Zellpopulation mit differenziellen Stammzellkriterien in definierten Zelllinien akuter Leukämien, Eberhard Karls Universität zu Tübingen.
- Maurer, B. J., L. Melton, C. Billups, M. C. Cabot and C. P. Reynolds (2000). "Synergistic cytotoxicity in solid tumor cell lines between N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and modulators of ceramide metabolism." J Natl Cancer Inst **92**(23): 1897-1909.
- Maurer, B. J., L. S. Metelitsa, R. C. Seeger, M. C. Cabot and C. P. Reynolds (1999). "Increase of ceramide and induction of mixed apoptosis/necrosis by N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide in neuroblastoma cell lines." J Natl Cancer Inst **91**(13): 1138-1146.
- Means, A. L. and L. J. Gudas (1995). "The roles of retinoids in vertebrate development." Annu Rev Biochem **64**: 201-233.
- Meister, B., F. M. Fink, A. Hittmair, C. Marth and M. Widschwendter (1998). "Antiproliferative activity and apoptosis induced by retinoic acid receptor-gamma selectively binding retinoids in neuroblastoma." Anticancer Res **18**(3A): 1777-1786.
- Menon, V. P. and A. R. Sudheer (2007). "Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin." Adv Exp Med Biol **595**: 105-125.
- Minden, M. D., J. E. Till and E. A. McCulloch (1978). "Proliferative state of blast cell progenitors in acute myeloblastic leukemia (AML)." Blood **52**(3): 592-600.
- Mitani, M., T. Yamanishi and Y. Miyazaki (1975). "Salinomycin: a new monovalent cation ionophore." Biochem Biophys Res Commun **66**(4): 1231-1236.

- 
- Mitani, M., T. Yamanishi, Y. Miyazaki and N. Otake (1976). "Salinomycin effects on mitochondrial ion translocation and respiration." Antimicrob Agents Chemother **9**(4): 655-660.
- Mizuki, M., R. Fenski, H. Halfter, I. Matsumura, R. Schmidt, C. Muller, W. Gruning, K. Kratz-Albers, S. Serve, C. Steur, T. Buchner, J. Kienast, Y. Kanakura, W. E. Berdel and H. Serve (2000). "Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways." Blood **96**(12): 3907-3914.
- Morad, S. A., T. S. Davis, M. Kester, T. P. Loughran, Jr. and M. C. Cabot (2015). "Dynamics of ceramide generation and metabolism in response to fenretinide--Diversity within and among leukemia." Leuk Res **39**(10): 1071-1078.
- Nakao, M., S. Yokota, T. Iwai, H. Kaneko, S. Horiike, K. Kashima, Y. Sonoda, T. Fujimoto and S. Misawa (1996). "Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia." Leukemia **10**(12): 1911-1918.
- Naqvi, K., M. Konopleva and F. Ravandi (2017). "Targeted therapies in Acute Myeloid Leukemia: a focus on FLT-3 inhibitors and ABT199." Expert Rev Hematol **10**(10): 863-874.
- Naujokat, C. and R. Steinhart (2012). "Salinomycin as a drug for targeting human cancer stem cells." J Biomed Biotechnol **2012**: 950658.
- Notarbartolo, M., P. Poma, D. Perri, L. Dusonchet, M. Cervello and N. D'Alessandro (2005). "Antitumor effects of curcumin, alone or in combination with cisplatin or doxorubicin, on human hepatic cancer cells. Analysis of their possible relationship to changes in NF-kB activation levels and in IAP gene expression." Cancer Lett **224**(1): 53-65.
- Ogawa, M. (2002). "Changing phenotypes of hematopoietic stem cells." Exp Hematol **30**(1): 3-6.
- Oridate, N., S. Suzuki, M. Higuchi, M. F. Mitchell, W. K. Hong and R. Lotan (1997). "Involvement of reactive oxygen species in N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells." J Natl Cancer Inst **89**(16): 1191-1198.
- Ozpolat, B., A. M. Tari, K. Mehta and G. Lopez-Berestein (2004). "Nuclear retinoid receptors are involved in N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (Fenretinide)-induced gene expression and growth inhibition in HL-60 acute myeloid leukemia cells." Leuk Lymphoma **45**(5): 979-985.
- Passegue, E., C. H. Jamieson, L. E. Ailles and I. L. Weissman (2003). "Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?" Proc Natl Acad Sci U S A **100** Suppl **1**: 11842-11849.
- Pearce, D. J., D. Taussig, C. Simpson, K. Allen, A. Z. Rohatiner, T. A. Lister and D. Bonnet (2005). "Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples." Stem Cells **23**(6): 752-760.

- 
- Pellegrini, P., M. Dyczynski, F. V. Sbrana, M. Karlgren, M. Buoncervello, M. Hagg-Olofsson, R. Ma, J. Hartman, S. Bajalica-Lagercrantz, D. Grandér, P. Kharaziha and A. De Milito (2016). "Tumor acidosis enhances cytotoxic effects and autophagy inhibition by salinomycin on cancer cell lines and cancer stem cells." Oncotarget **7**(24): 35703-35723.
- Pemmaraju, N., H. Kantarjian, F. Ravandi and J. Cortes (2011). "FLT3 inhibitors in the treatment of acute myeloid leukemia: the start of an era?" Cancer **117**(15): 3293-3304.
- Pesakhov, S., M. Khanin, G. P. Studzinski and M. Danilenko (2010). "Distinct combinatorial effects of the plant polyphenols curcumin, carnosic acid, and silibinin on proliferation and apoptosis in acute myeloid leukemia cells." Nutr Cancer **62**(6): 811-824.
- Petriz, J. (2007). "Flow cytometry of the side population (SP)." Curr Protoc Cytom **Chapter 9**: Unit9 23.
- Rao, J., D. R. Xu, F. M. Zheng, Z. J. Long, S. S. Huang, X. Wu, W. H. Zhou, R. W. Huang and Q. Liu (2011). "Curcumin reduces expression of Bcl-2, leading to apoptosis in daunorubicin-insensitive CD34+ acute myeloid leukemia cell lines and primary sorted CD34+ acute myeloid leukemia cells." J Transl Med **9**: 71.
- Ravandi, F. and Z. Estrov (2006). "Eradication of leukemia stem cells as a new goal of therapy in leukemia." Clin Cancer Res **12**(2): 340-344.
- Ray, R. J., C. J. Paige, C. Furlonger, S. D. Lyman and R. Rottapel (1996). "Flt3 ligand supports the differentiation of early B cell progenitors in the presence of interleukin-11 and interleukin-7." Eur J Immunol **26**(7): 1504-1510.
- Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke and I. L. Weissman (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-111.
- Riccioni, R., M. L. Dupuis, M. Bernabei, E. Petrucci, L. Pasquini, G. Mariani, M. Cianfriglia and U. Testa (2010). "The cancer stem cell selective inhibitor salinomycin is a p-glycoprotein inhibitor." Blood Cells Mol Dis **45**(1): 86-92.
- Rieger, M. A. and T. Schroeder (2007). "Hämatopoetische Stammzellen." BIOspectrum.
- Robert-Koch-Institut (2015). Krebs in Deutschland 2011/2012. R. Koch-Institut. Berlin, Robert Koch-Institut **10**: 156.
- Rosnet, O., H. J. Bühring, S. Marchetto, I. Rappold, C. Lavagna, D. Sainty, C. Arnoulet, C. Chabannon, L. Kanz, C. Hannum and D. Birnbaum (1996). "Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells." Leukemia **10**(2): 238-248.
- Roulston, G. D., C. L. Burt, L. M. Kettyle, K. B. Matchett, H. L. Keenan, N. M. Mulgrew, J. M. Ramsey, C. Dougan, J. McKiernan, I. V. Grishagin, K. I. Mills and A. Thompson (2016). "Low-dose salinomycin induces anti-leukemic responses in AML and MLL." Oncotarget **7**(45): 73448-73461.
- Ruggeri, L., A. Mancusi, M. Capanni, E. Urbani, A. Carotti, T. Aloisi, M. Stern, D. Pende, K. Perruccio, E. Burchielli, F. Topini, E. Bianchi, F. Aversa, M. F. Martelli and A. Velardi (2007). "Donor natural killer cell allorecognition of

- 
- missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value." Blood **110**(1): 433-440.
- Sabichi, A. L., D. T. Hendricks, M. A. Bober and M. J. Birrer (1998). "Retinoic acid receptor beta expression and growth inhibition of gynecologic cancer cells by the synthetic retinoid N-(4-hydroxyphenyl) retinamide." J Natl Cancer Inst **90**(8): 597-605.
- Sack, U., A. Tarnok and R. G. (2007). Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Basel, Karger.
- Sanchez, Y., G. P. Simon, E. Calvino, E. de Blas and P. Aller (2010). "Curcumin stimulates reactive oxygen species production and potentiates apoptosis induction by the antitumor drugs arsenic trioxide and lonidamine in human myeloid leukemia cell lines." J Pharmacol Exp Ther **335**(1): 114-123.
- Schmitz, S. (2007). Der Experimentator. München, Elsevier GmbH.
- Schmitz, S. (2007). Der Experimentator Zellkultur. München, Elsevier GmbH.
- Schrödel, A. (2007). "Die Rolle des fetalen Kälberserums in Zellkulturmedien." Biologie in unserer Zeit **37**(5): 289.
- Shimada, K., M. Nakamura, E. Ishida, M. Kishi, S. Yonehara and N. Konishi (2002). "Contributions of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappa B to N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in prostate cancer cells." Mol Carcinog **35**(3): 127-137.
- Siegenthaler, W. and H. E. Blum (2006). Klinische Pathophysiologie. Stuttgart, Thieme.
- Simoni, D. and M. Tolomeo (2001). "Retinoids, apoptosis and cancer." Curr Pharm Des **7**(17): 1823-1837.
- Singh, S. and B. B. Aggarwal (1995). "Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]." J Biol Chem **270**(42): 24995-25000.
- Sokoloski, J. A., K. Shyam and A. C. Sartorelli (1997). "Induction of the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells by curcumin in combination with low levels of vitamin D3." Oncol Res **9**(1): 31-39.
- Steinbach, D. and O. Legrand (2007). "ABC transporters and drug resistance in leukemia: was P-gp nothing but the first head of the Hydra?" Leukemia **21**(6): 1172-1176.
- Steinbach, D., W. Sell, A. Voigt, J. Hermann, F. Zintl and A. Sauerbrey (2002). "BCRP gene expression is associated with a poor response to remission induction therapy in childhood acute myeloid leukemia." Leukemia **16**(8): 1443-1447.
- Stetler-Stevenson, W. G. and A. E. Yu (2001). "Proteases in invasion: matrix metalloproteinases." Semin Cancer Biol **11**(2): 143-152.
- Stone, R. M., D. J. DeAngelo, V. Klimek, I. Galinsky, E. Estey, S. D. Nimer, W. Grandin, D. Lebowitz, Y. Wang, P. Cohen, E. A. Fox, D. Neuberg, J. Clark, D. G. Gilliland and J. D. Griffin (2005). "Patients with acute myeloid leukemia and an

---

activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412." Blood **105**(1): 54-60.

Stone, R. M., T. Fischer, R. Paquette, G. Schiller, C. A. Schiffer, G. Ehninger, J. Cortes, H. M. Kantarjian, D. J. DeAngelo, A. Huntsman-Labed, C. Dutreix, A. del Corral and F. Giles (2012). "Phase IB study of the FLT3 kinase inhibitor midostaurin with chemotherapy in younger newly diagnosed adult patients with acute myeloid leukemia." Leukemia **26**(9): 2061-2068.

Stone, R. M., S. J. Mandrekar, B. L. Sanford, K. Laumann, S. Geyer, C. D. Bloomfield, C. Thiede, T. W. Prior, K. Dohner, G. Marcucci, F. Lo-Coco, R. B. Klisovic, A. Wei, J. Sierra, M. A. Sanz, J. M. Brandwein, T. de Witte, D. Niederwieser, F. R. Appelbaum, B. C. Medeiros, M. S. Tallman, J. Krauter, R. F. Schlenk, A. Ganser, H. Serve, G. Ehninger, S. Amadori, R. A. Larson and H. Dohner (2017). "Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation." N Engl J Med **377**(5): 454-464.

Storms, R. W., P. D. Green, K. M. Safford, D. Niedzwiecki, C. R. Cogle, O. M. Colvin, N. J. Chao, H. E. Rice and C. A. Smith (2005). "Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34." Blood **106**(1): 95-102.

Storms, R. W., A. P. Trujillo, J. B. Springer, L. Shah, O. M. Colvin, S. M. Ludeman and C. Smith (1999). "Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9118-9123.

Strati, P., H. Kantarjian, F. Ravandi, A. Nazha, G. Borthakur, N. Daver, T. Kadia, Z. Estrov, G. Garcia-Manero, M. Konopleva, T. Rajkhowa, M. Durand, M. Andreeff, M. Levis and J. Cortes (2015). "Phase I/II trial of the combination of midostaurin (PKC412) and 5-azacytidine for patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome." Am J Hematol **90**(4): 276-281.

Sun, S. Y., W. Li, P. Yue, S. M. Lippman, W. K. Hong and R. Lotan (1999). "Mediation of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in human cancer cells by different mechanisms." Cancer Res **59**(10): 2493-2498.

Sun, S. Y., P. Yue and R. Lotan (1999). "Induction of apoptosis by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and its association with reactive oxygen species, nuclear retinoic acid receptors, and apoptosis-related genes in human prostate carcinoma cells." Mol Pharmacol **55**(3): 403-410.

Supino, R., M. Crosti, M. Clerici, A. Warlters, L. Cleris, F. Zunino and F. Formelli (1996). "Induction of apoptosis by fenretinide (4HPR) in human ovarian carcinoma cells and its association with retinoic acid receptor expression." Int J Cancer **65**(4): 491-497.

Sutherland, H. J., A. Blair and R. W. Zapf (1996). "Characterization of a hierarchy in human acute myeloid leukemia progenitor cells." Blood **87**(11): 4754-4761.

Suzuki, M., T. Nakamura, S. Iyoki, A. Fujiwara, Y. Watanabe, K. Mohri, K. Isobe, K. Ono and S. Yano (2005). "Elucidation of anti-allergic activities of

- 
- curcumin-related compounds with a special reference to their anti-oxidative activities." Biol Pharm Bull **28**(8): 1438-1443.
- Tajima, F., T. Deguchi, J. H. Laver, H. Zeng and M. Ogawa (2001). "Reciprocal expression of CD38 and CD34 by adult murine hematopoietic stem cells." Blood **97**(9): 2618-2624.
- Terstappen, L. W., S. Huang, M. Safford, P. M. Lansdorp and M. R. Loken (1991). "Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells." Blood **77**(6): 1218-1227.
- Thiede, C., C. Steudel, B. Mohr, M. Schaich, U. Schakel, U. Platzbecker, M. Wermke, M. Bornhauser, M. Ritter, A. Neubauer, G. Ehninger and T. Illmer (2002). "Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis." Blood **99**(12): 4326-4335.
- Tiberio, P., E. Cavadini, G. Abolafio, F. Formelli and V. Appierto (2010). "4-oxo-N-(4-hydroxyphenyl)retinamide: two independent ways to kill cancer cells." PLoS One **5**(10): e13362.
- Till, J. E. and E. A. McCulloch (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." Radiat Res **14**: 213-222.
- Tothova, Z. and D. G. Gilliland (2007). "FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system." Cell Stem Cell **1**(2): 140-152.
- Trachootham, D., J. Alexandre and P. Huang (2009). "Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?" Nat Rev Drug Discov **8**(7): 579-591.
- Tsai, R. (2015). "DNA Purification Using Buffy Coat."
- Uggla, B., E. Stahl, D. Wagsater, C. Paul, M. G. Karlsson, A. Sirsjo and U. Tidefelt (2005). "BCRP mRNA expression v. clinical outcome in 40 adult AML patients." Leuk Res **29**(2): 141-146.
- Ulukaya, E., G. Pirianov, M. A. Kurt, E. J. Wood and H. Mehmet (2003). "Fenretinide induces cytochrome c release, caspase 9 activation and apoptosis in the absence of mitochondrial membrane depolarisation." Cell Death Differ **10**(7): 856-859.
- Utz, I., M. Spitaler, M. Rybczynska, C. Ludescher, W. Hilbe, U. Regenass, H. Grunicke and J. Hofmann (1998). "Reversal of multidrug resistance by the staurosporine derivatives CGP 41251 and CGP 42700." Int J Cancer **77**(1): 64-69.
- Vardiman, J. W., N. Lee Harris and R. D. Brunning (2002). "The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms." Blood Journal: 2292-2302.
- Veronesi, U., G. De Palo, E. Marubini, A. Costa, F. Formelli, L. Mariani, A. Decensi, T. Camerini, M. R. Del Turco, M. G. Di Mauro, M. G. Muraca, M. Del Vecchio, C. Pinto, G. D'Aiuto, C. Boni, T. Campa, A. Magni, R. Miceli, M. Perloff, W. F. Malone and M. B. Sporn (1999). "Randomized trial of fenretinide

---

to prevent second breast malignancy in women with early breast cancer." J Natl Cancer Inst **91**(21): 1847-1856.

Wang, H., B. J. Maurer, C. P. Reynolds and M. C. Cabot (2001). "N-(4-hydroxyphenyl)retinamide elevates ceramide in neuroblastoma cell lines by coordinate activation of serine palmitoyltransferase and ceramide synthase." Cancer Res **61**(13): 5102-5105.

Weisberg, E., C. Boulton, L. M. Kelly, P. Manley, D. Fabbro, T. Meyer, D. G. Gilliland and J. D. Griffin (2002). "Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412." Cancer Cell **1**(5): 433-443.

Weng, G., Y. Zeng, J. Huang, J. Fan and K. Guo (2015). "Curcumin Enhanced Busulfan-Induced Apoptosis through Downregulating the Expression of Survivin in Leukemia Stem-Like KG1a Cells." Biomed Res Int **2015**: 630397.

Whitman, S. P., K. J. Archer, L. Feng, C. Baldus, B. Becknell, B. D. Carlson, A. J. Carroll, K. Mrozek, J. W. Vardiman, S. L. George, J. E. Kolitz, R. A. Larson, C. D. Bloomfield and M. A. Caligiuri (2001). "Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study." Cancer Res **61**(19): 7233-7239.

Williams, C. B., S. Kambhampati, W. Fiskus, J. Wick, C. Dutreix, S. Ganguly, O. Aljitawi, R. Reyes, A. Fleming, S. Abhyankar, K. N. Bhalla and J. P. McGuirk (2013). "Preclinical and phase I results of decitabine in combination with midostaurin (PKC412) for newly diagnosed elderly or relapsed/refractory adult patients with acute myeloid leukemia." Pharmacotherapy **33**(12): 1341-1352.

Wu, J. C., C. S. Lai, V. Badmaev, K. Nagabhushanam, C. T. Ho and M. H. Pan (2011). "Tetrahydrocurcumin, a major metabolite of curcumin, induced autophagic cell death through coordinative modulation of PI3K/Akt-mTOR and MAPK signaling pathways in human leukemia HL-60 cells." Mol Nutr Food Res **55**(11): 1646-1654.

Wu, J. M., A. M. DiPietrantonio and T. C. Hsieh (2001). "Mechanism of fenretinide (4-HPR)-induced cell death." Apoptosis **6**(5): 377-388.

Yu, J., Y. Peng, L. C. Wu, Z. Xie, Y. Deng, T. Hughes, S. He, X. Mo, M. Chiu, Q. E. Wang, X. He, S. Liu, M. R. Grever, K. K. Chan and Z. Liu (2013). "Curcumin down-regulates DNA methyltransferase 1 and plays an anti-leukemic role in acute myeloid leukemia." PLoS One **8**(2): e55934.

Zeng, Y., G. Weng, J. Fan, Z. Li, J. Wu, Y. Li, R. Zheng, P. Xia and K. Guo (2016). "Curcumin reduces the expression of survivin, leading to enhancement of arsenic trioxide-induced apoptosis in myelodysplastic syndrome and leukemia stem-like cells." Oncol Rep **36**(3): 1233-1242.

Zhang, H., J. Q. Mi, H. Fang, Z. Wang, C. Wang, L. Wu, B. Zhang, M. Minden, W. T. Yang, H. W. Wang, J. M. Li, X. D. Xi, S. J. Chen, J. Zhang, Z. Chen and K. K. Wang (2013). "Preferential eradication of acute myelogenous leukemia stem cells by fenretinide." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(14): 5606-5611.

---

Zhou, Q. M., X. F. Wang, X. J. Liu, H. Zhang, Y. Y. Lu, S. Huang and S. B. Su (2011). "Curcumin improves MMC-based chemotherapy by simultaneously sensitising cancer cells to MMC and reducing MMC-associated side-effects." Eur J Cancer **47**(14): 2240-2247.

Zhou, T., L. Ye, Y. Bai, A. Sun, B. Cox, D. Liu, Y. Li, D. Liotta, J. P. Snyder, H. Fu and B. Huang (2014). "Autophagy and apoptosis in hepatocellular carcinoma induced by EF25-(GSH)<sub>2</sub>: a novel curcumin analog." PLoS One **9**(9): e107876.

Zou, G. M. (2007). "Cancer stem cells in leukemia, recent advances." J Cell Physiol **213**(2): 440-444.

---

## **Erklärungen zum Eigenanteil**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe. Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen (Abteilung I Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie / Onkologie) unter Leitung von Prof. Dr. Rupert Handgretinger und Betreuung von PD Dr. Martin Ebinger und Dipl.-Biol. Kai Witte durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. Ebinger und Dipl.-Biol. Kai Witte. Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dipl.-Bio. Kai Witte und Dipl.-Biol. Anja Schmitt von mir mit Unterstützung durch Kai Witte durchgeführt.

Die statistische Darstellung und Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

München, den 11.06.2018

---

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Handgretinger für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas und die Aufnahme als Doktorandin in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen.

Insbesondere möchte ich mich auch bei meinem Doktorvater PD Dr. Martin Ebinger für die außerordentliche Geduld, für die stetige, immer zuverlässige und kompetente Unterstützung, sowie für die intensive und warmherzige Betreuung jeder Phase dieser Arbeit bedanken.

Ihm verdanke ich jede erdenkliche hilfreiche Unterstützung, sowie viele wegweisende und konstruktive Ideen, die das Erstellen dieser Arbeit ermöglicht haben.

Besonders möchte ich mich für die Freiheit bedanken, die mir im Rahmen dieses Projektes gewährt wurde und die es mir ermöglichte ohne Zeitdruck parallel zum Studium das Forschungsprojekt durchzuführen.

Außerdem möchte ich mich bei Dipl.-Bio. Kai Witte für die freundliche und professionelle Einführung in sämtliche durchflusszytometrische Arbeiten bedanken. Hier sei vor allem die sachkundige und erfahrene Unterstützung bei jeglichen durchflusszytometrischen Problemen zu nennen.

Vielen Dank für die zahlreichen und äußerst konstruktiven Gespräche während der gesamten Auswertung des untersuchten Materials.

Zudem möchte ich mich auch bei Dipl.-Bio. Anja Schmidt für die systematische Einarbeitung im Labor und die tatkräftige Unterstützung zu Beginn der Messungen herzlich bedanken. Vielen Dank für die großzügige Hilfsbereitschaft zu Beginn dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ebenso dem Personal des Routinelabors der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen und der guten Zusammenarbeit während der durchgeführten Messungen im Rahmen dieser Arbeit.

Ich möchte mich weiterhin bei allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben: Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir das Studium der

---

Humanmedizin in Deutschland ermöglicht und mich auf meinem gesamten Weg unterstützt hat.

Danke dafür, dass ihr mir in schwierigen Situationen immer zur Seite gestanden habt.

Zudem möchte ich mich bei allen meinen Freunden für die Ruhe, Geduld und Ausdauer bedanken. Danke dafür, dass ihr mir immer Mut gemacht habt und es mir leichter gemacht habt die schwierigen Situationen zu bewältigen.

---

## Anhang

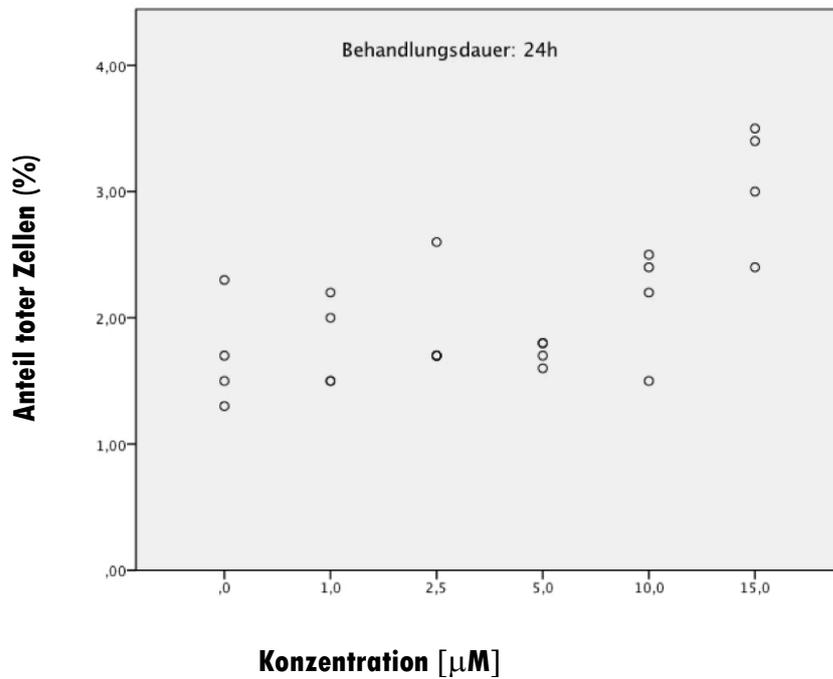


Abb. 12.1 Anteil toter Zellen nach einer CUR-Behandlungsdauer von 24 Stunden

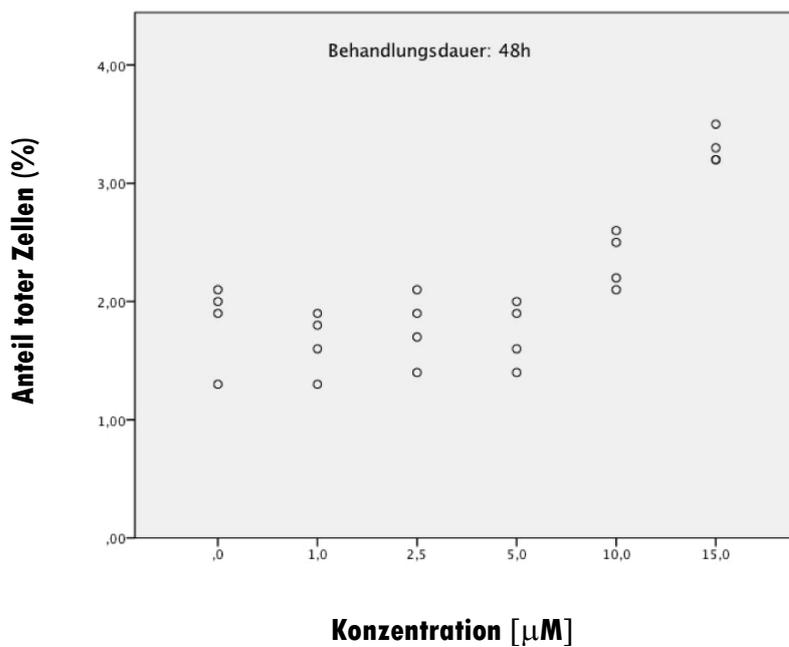


Abb. 13.1 Anteil toter Zellen nach einer CUR-Behandlungsdauer von 48 Stunden

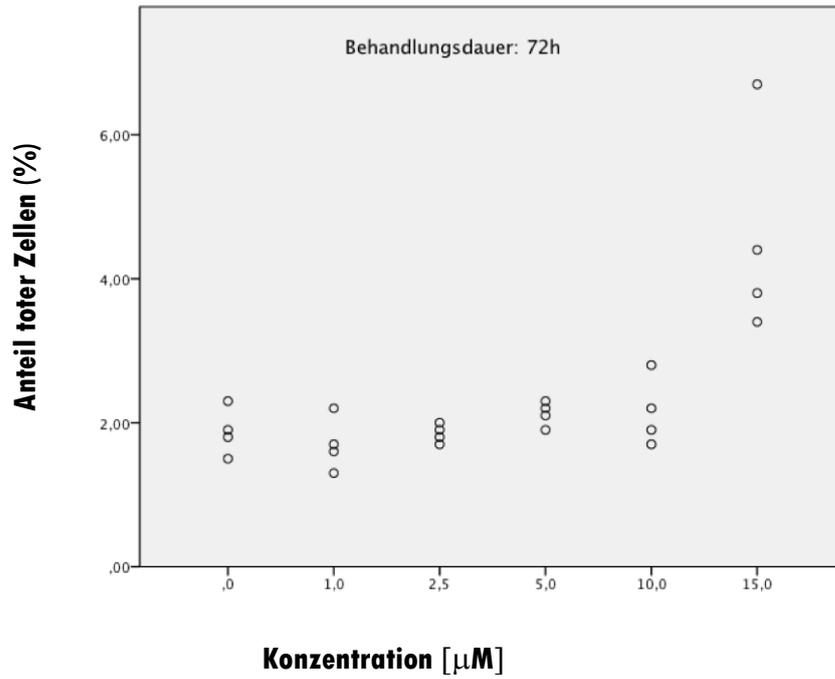


Abb. 13.2 Anteil toter Zellen nach einer CUR-Behandlungsdauer von 72 Stunden

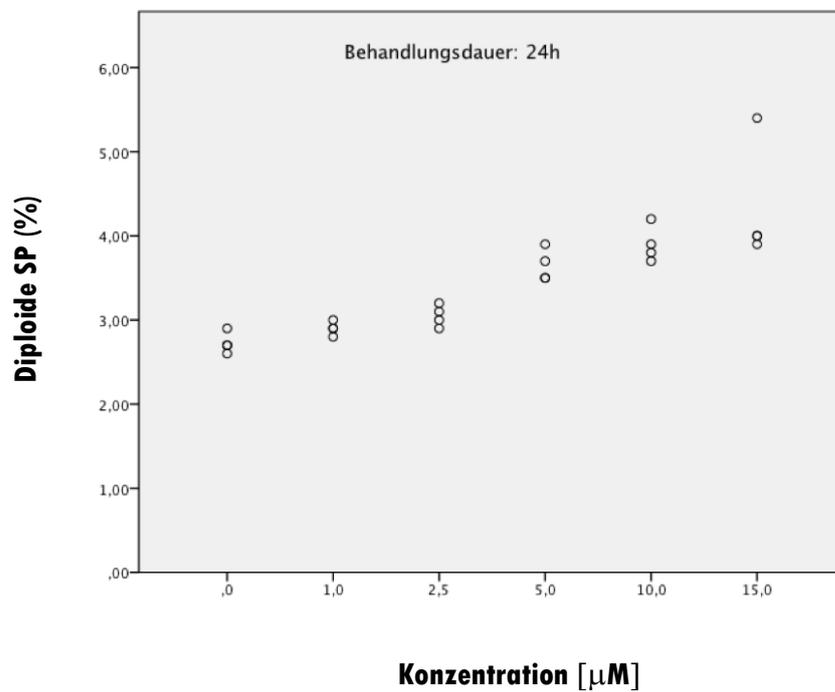


Abb. 14.1 Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 24 Stunden

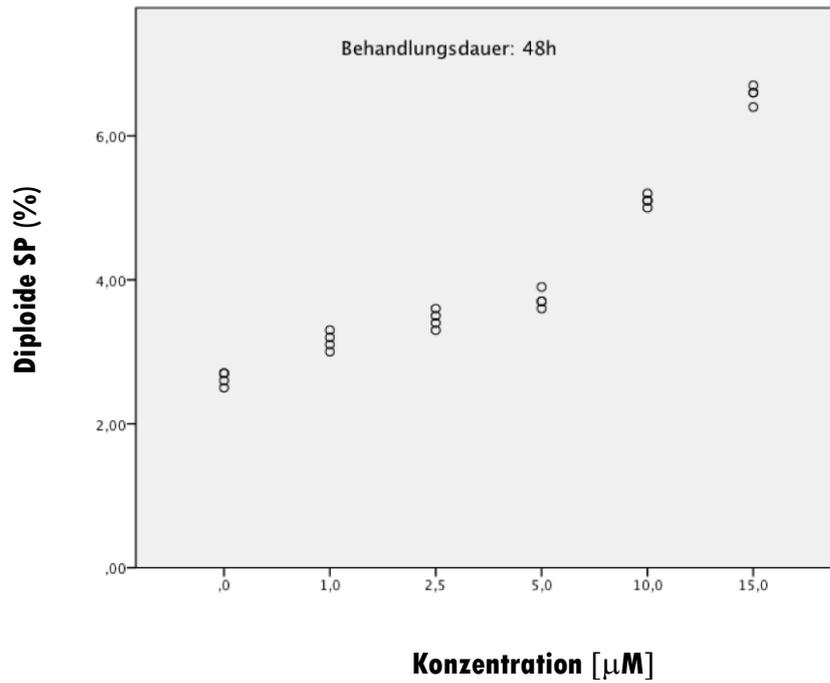


Abb. 15.1 Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 48 Stunden

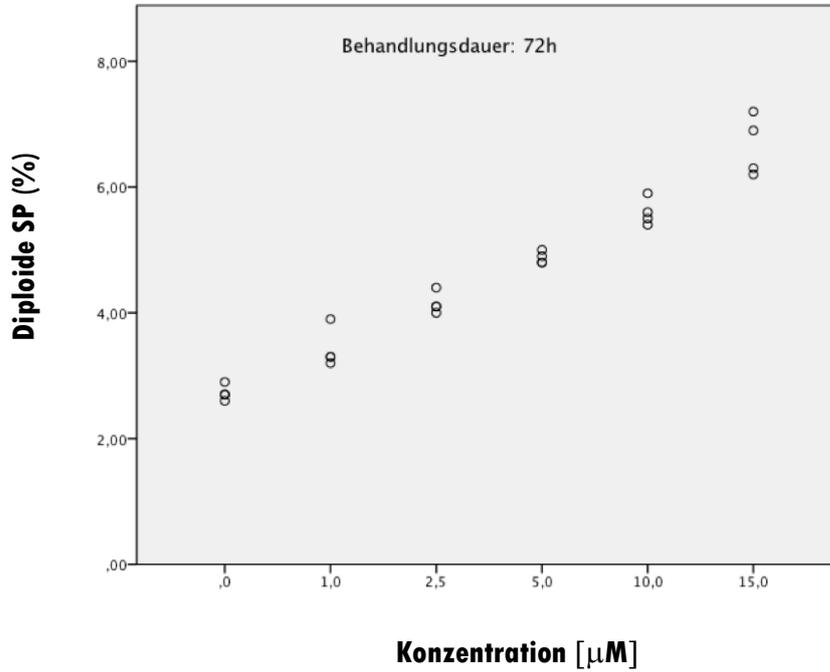


Abb. 15.2 Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 72 Stunden

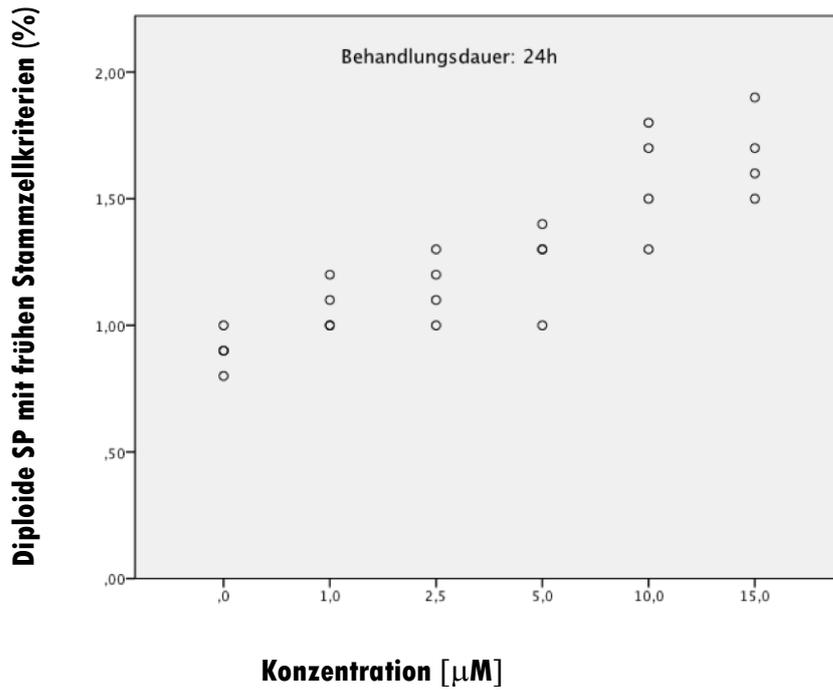


Abb. 16.1 Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 24 Stunden

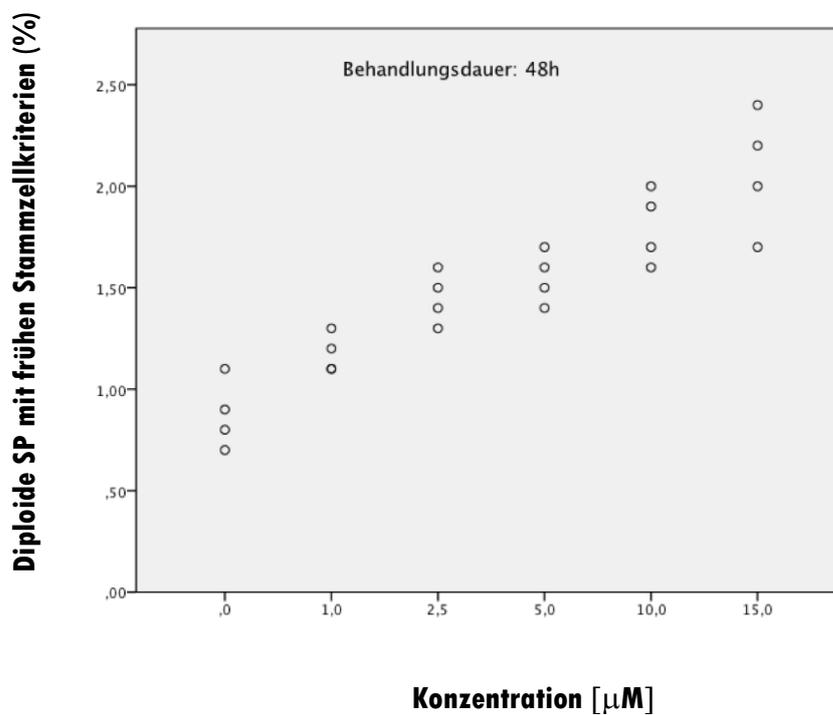


Abb. 17.1 Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 48 Stunden

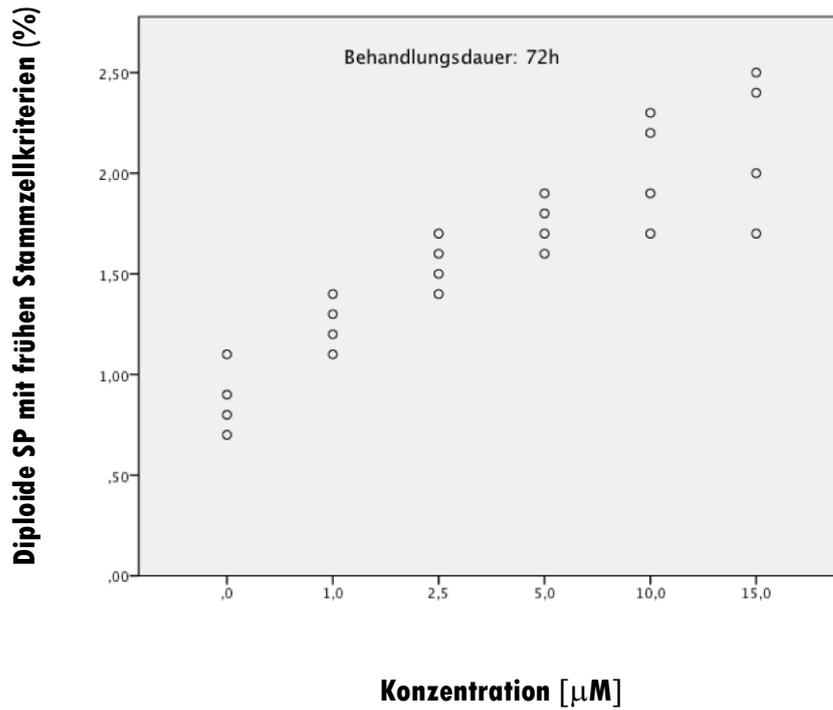


Abb. 17.2 Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 72 Stunden

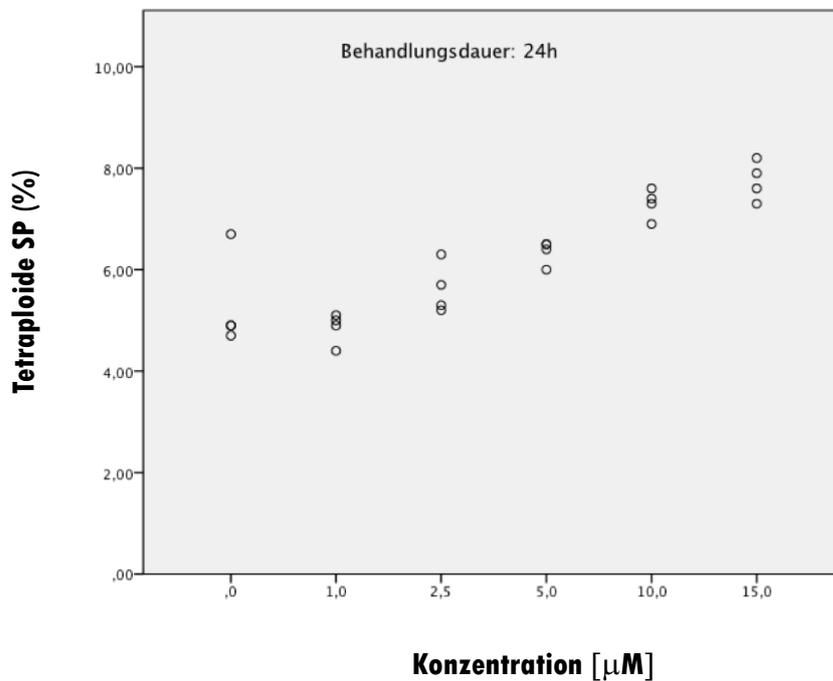


Abb. 18.1 Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 24 Stunden

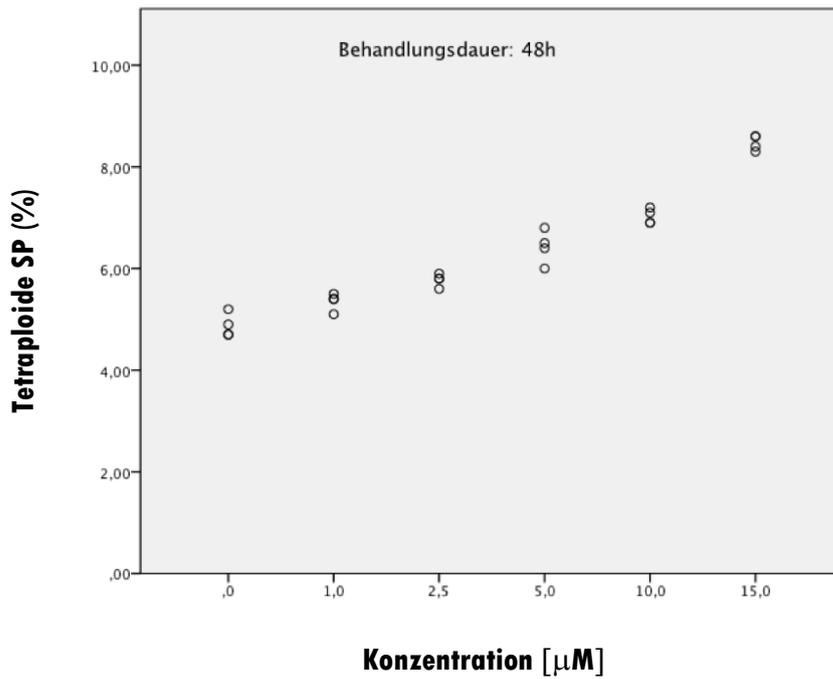


Abb. 19.1 Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 48 Stunden

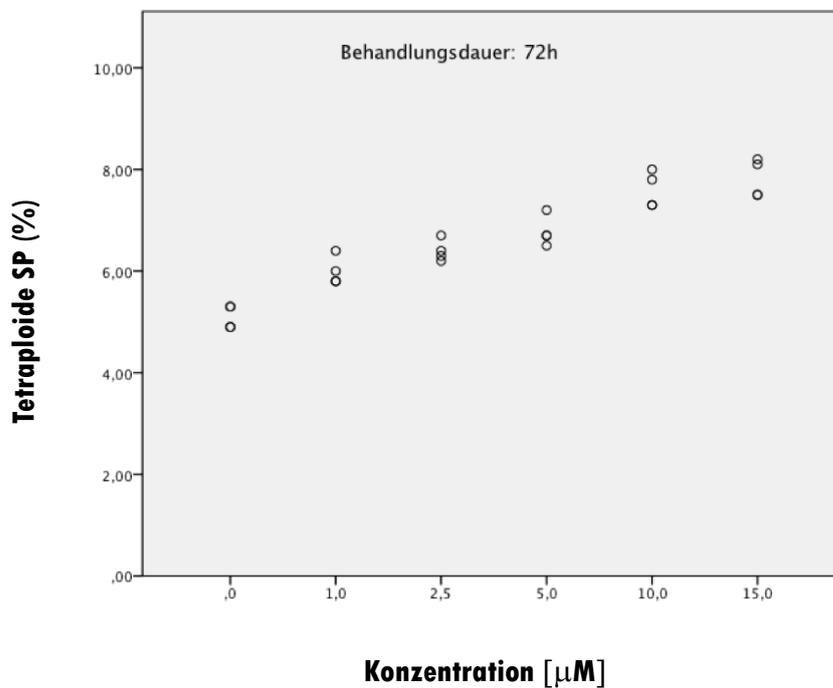


Abb. 19.2 Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 72 Stunden

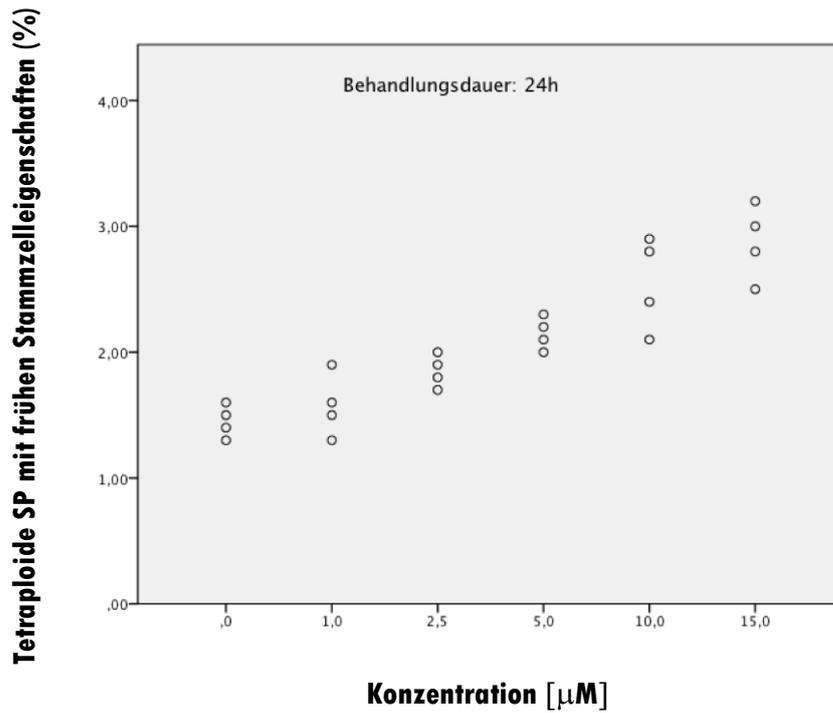


Abb. 20.1 Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 24 Stunden

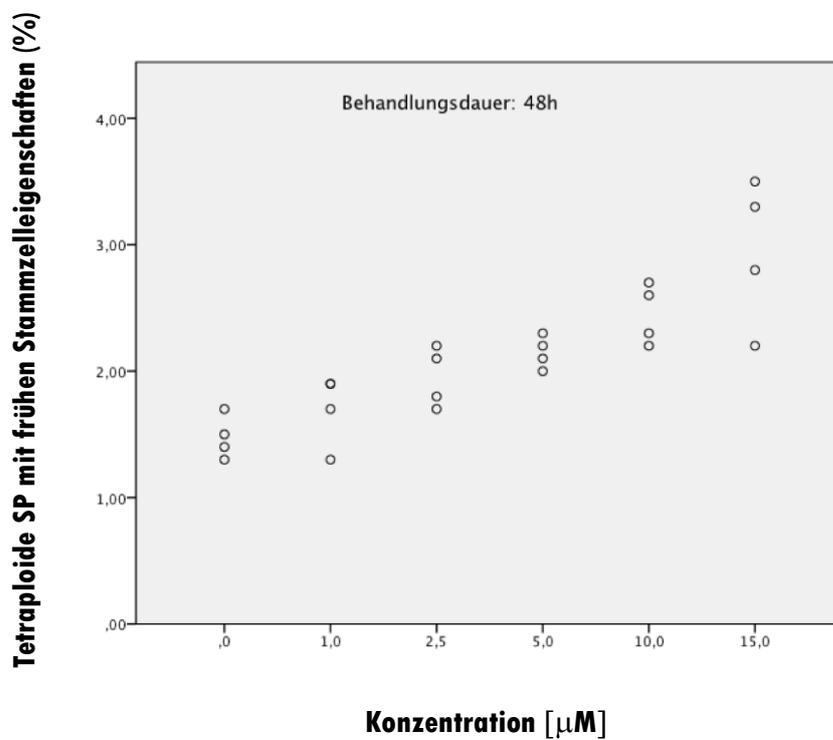


Abb. 21.1 Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 48 Stunden

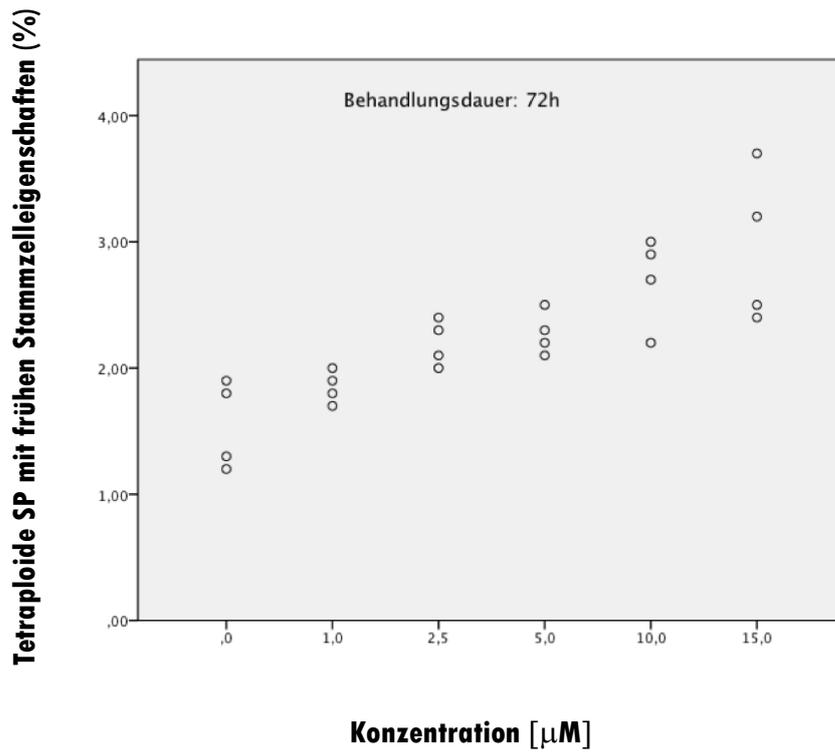


Abb. 21.2 Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 72 Stunden

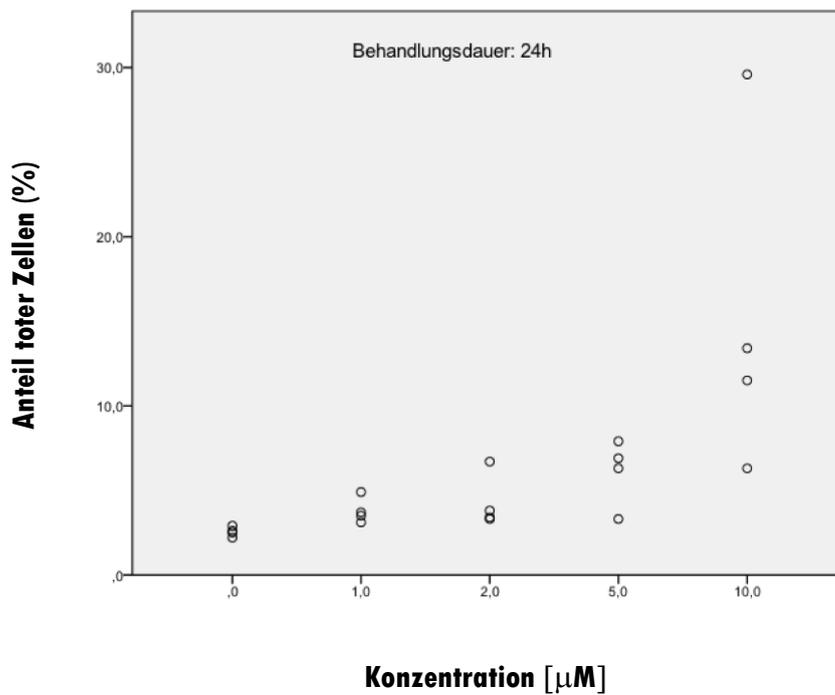


Abb. 22.1 Anteil toter Zellen nach einer SAL-Behandlungsdauer von 24 Stunden

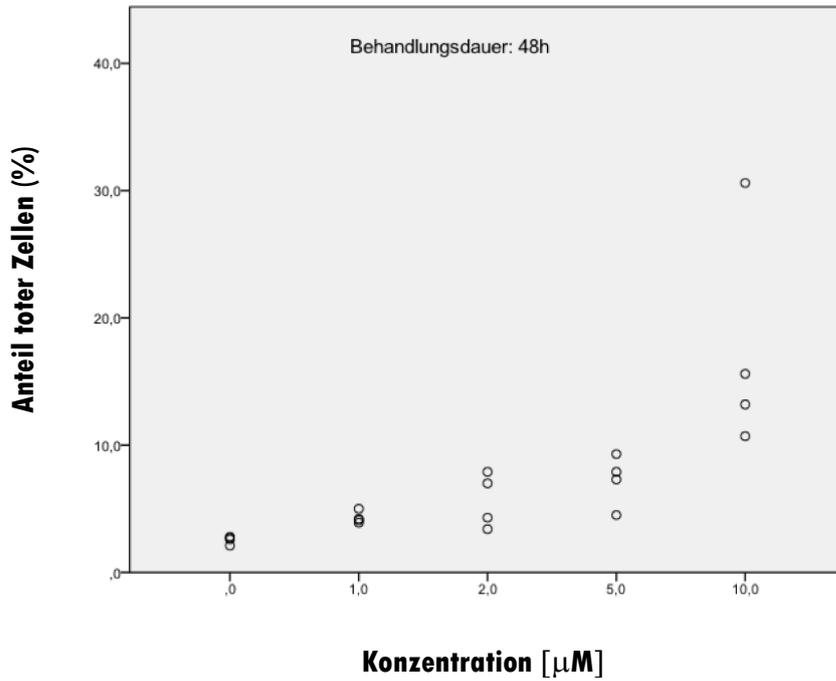


Abb. 23.1 Anteil toter Zellen nach einer SAL-Behandlungsdauer von 48 Stunden

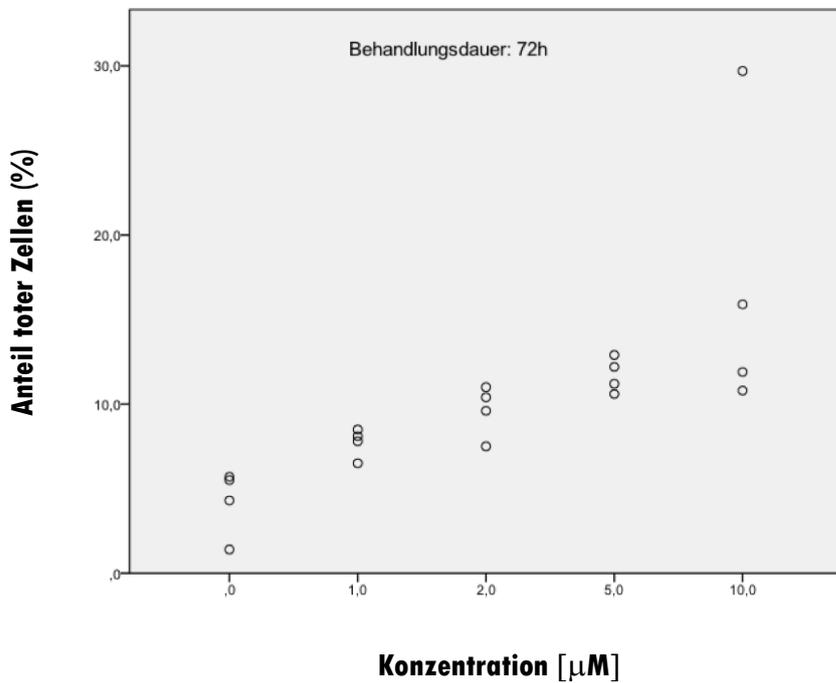


Abb. 23.2 Anteil toter Zellen nach einer SAL-Behandlungsdauer von 72 Stunden

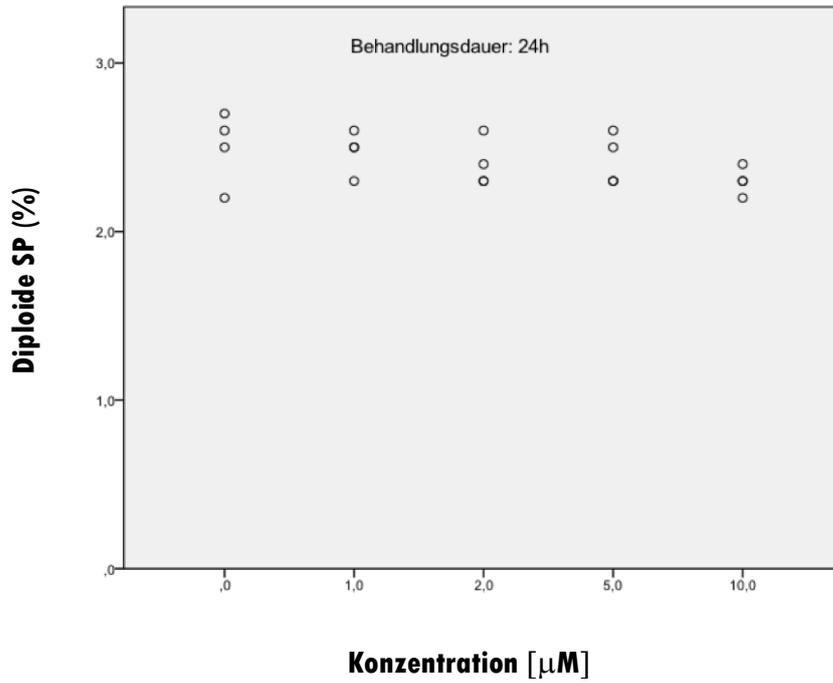


Abb. 24.1 Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 24 Stunden

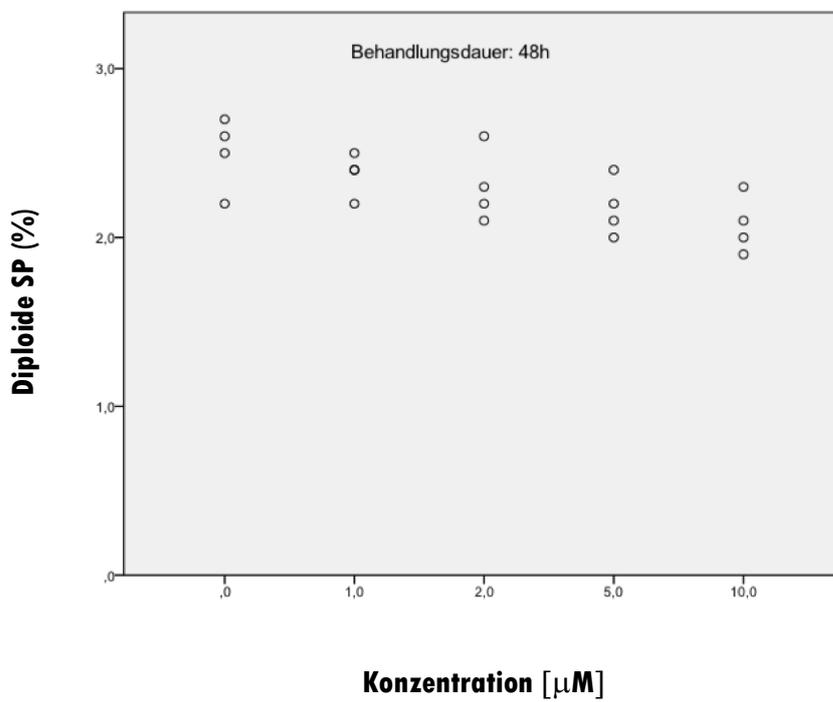


Abb. 25.1 Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 48 Stunden

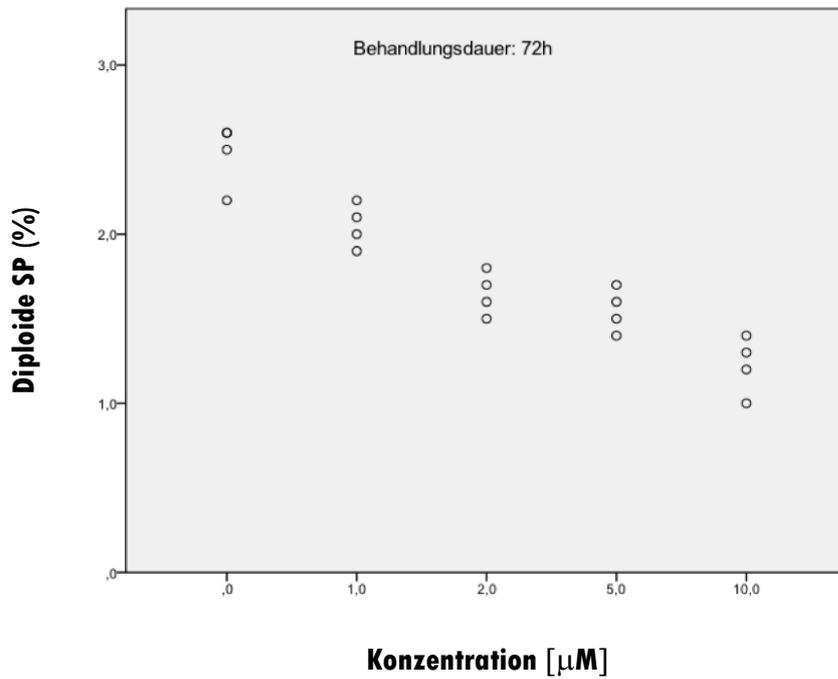


Abb. 25.2 Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 72 Stunden

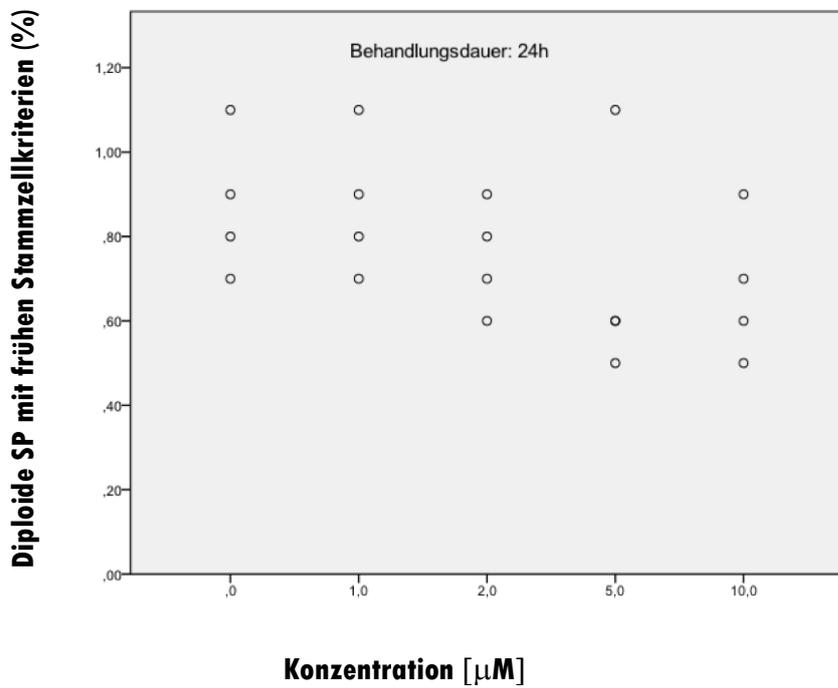


Abb. 26.1 Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 24 Stunden

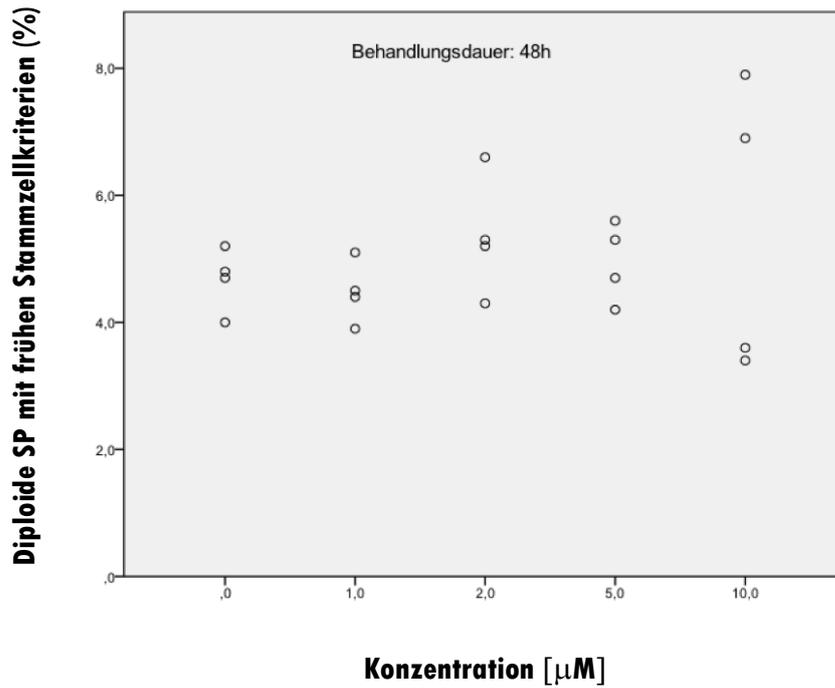


Abb. 27.1 Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 48 Stunden

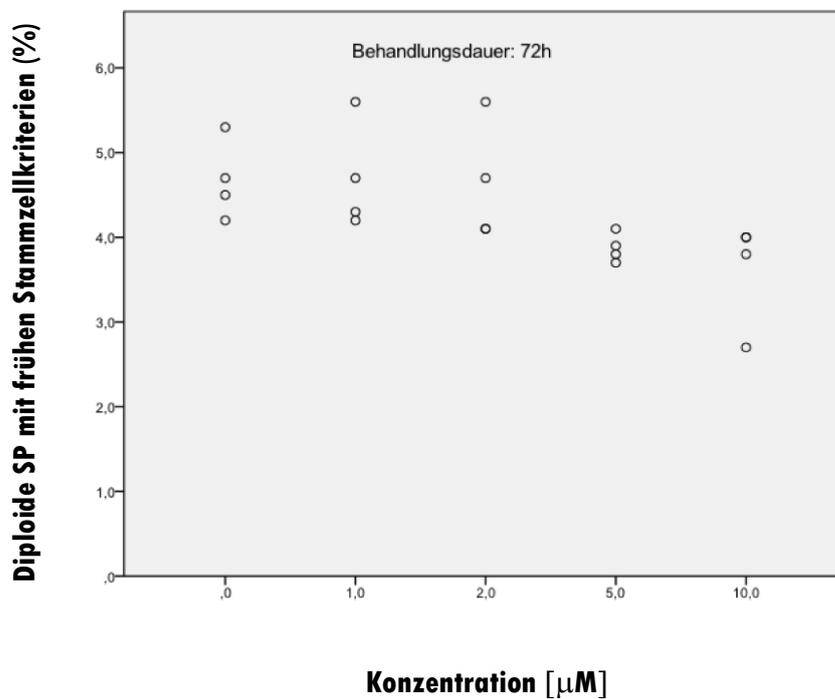


Abb. 27.2 Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 72 Stunden

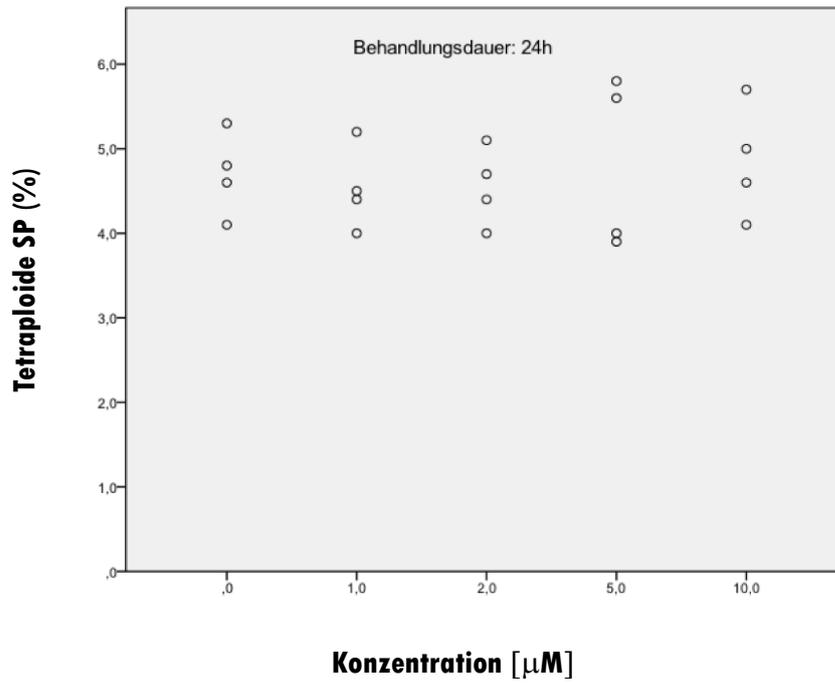


Abb. 28.1 Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 24 Stunden

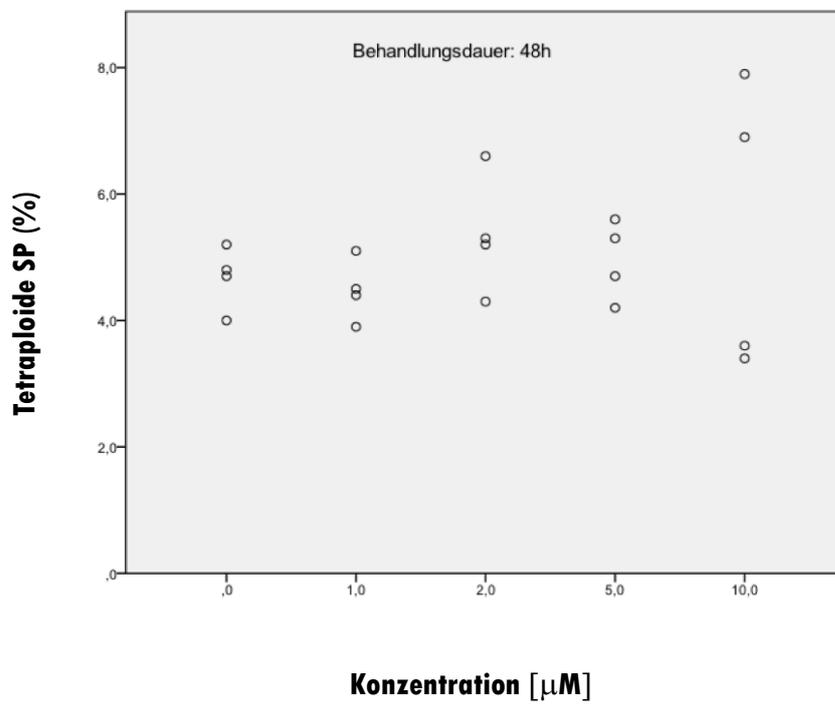


Abb. 29.1 Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer SAL- Behandlungsdauer von 48 Stunden

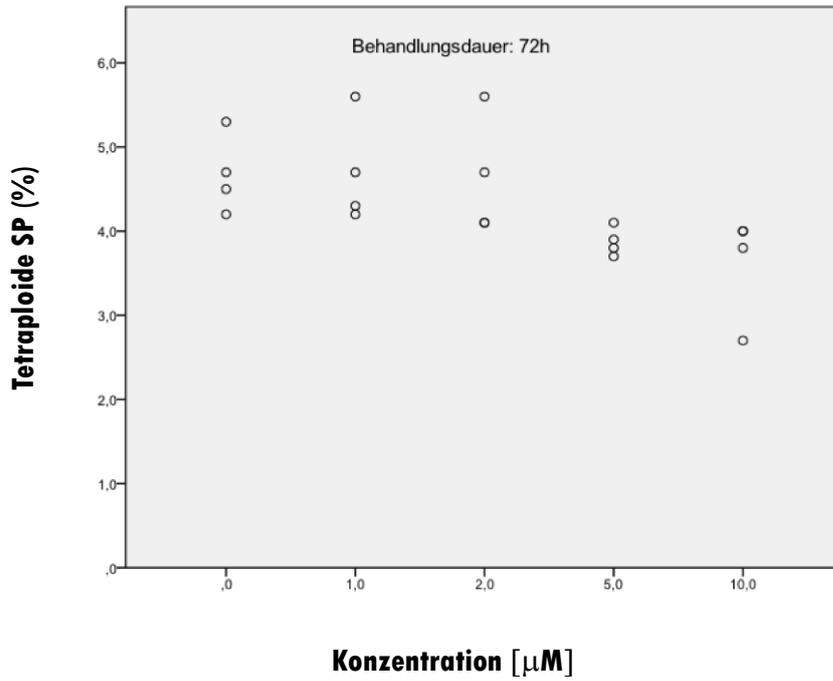


Abb. 29.2 Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 72 Stunden

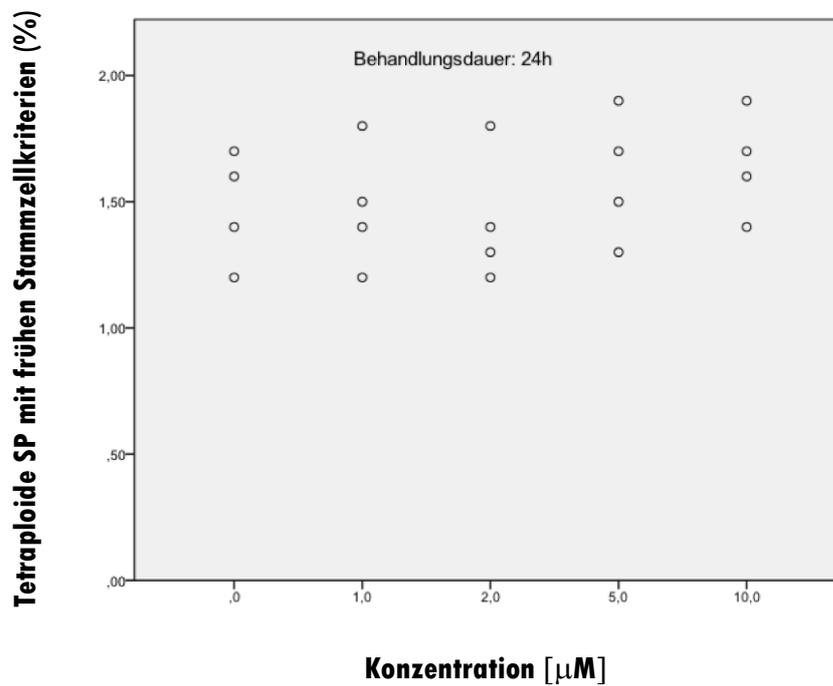


Abb. 30.1 Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 24 Stunden

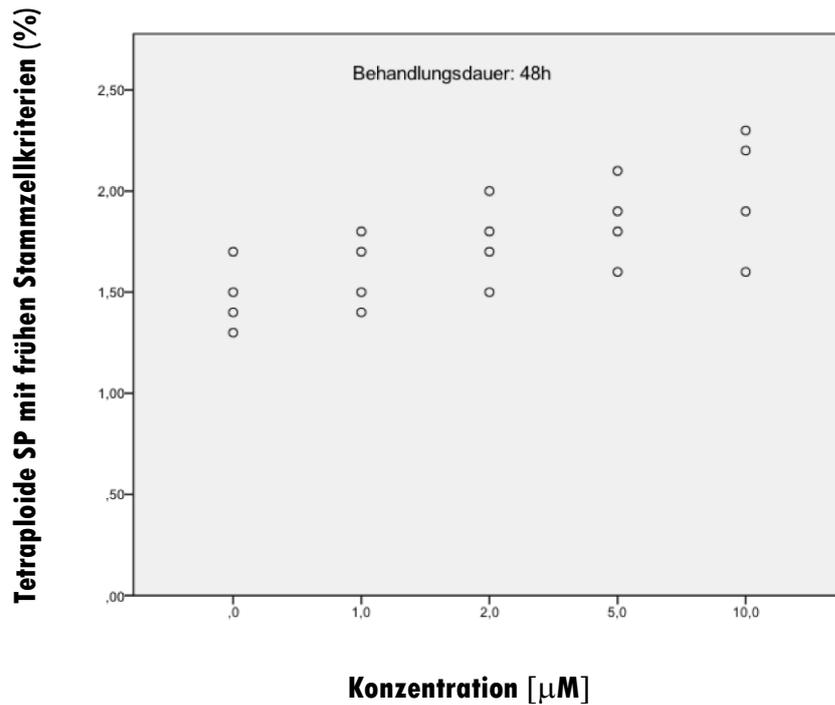


Abb. 31.1 Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 48 Stunden

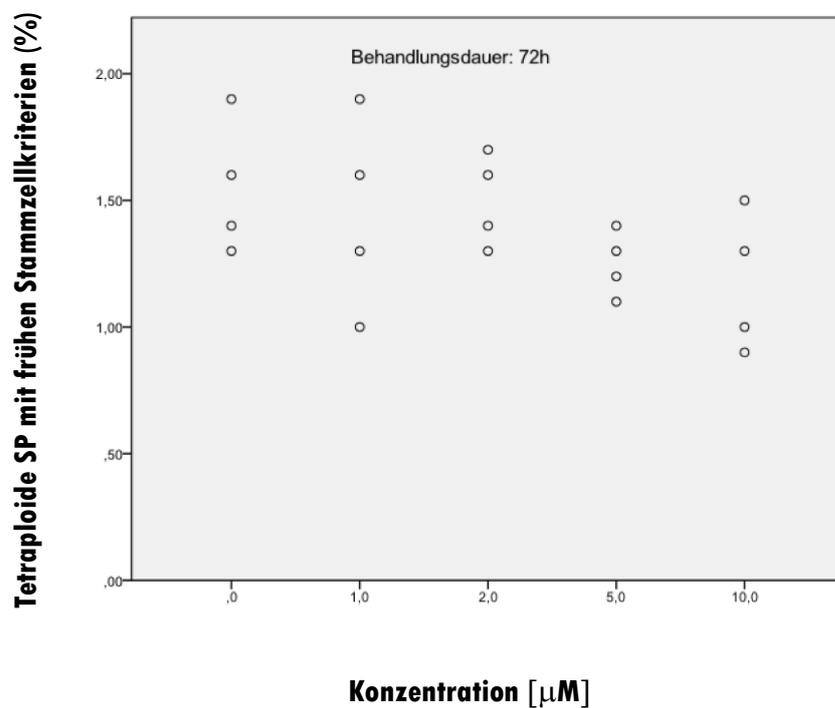


Abb. 31.2 Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 72 Stunden

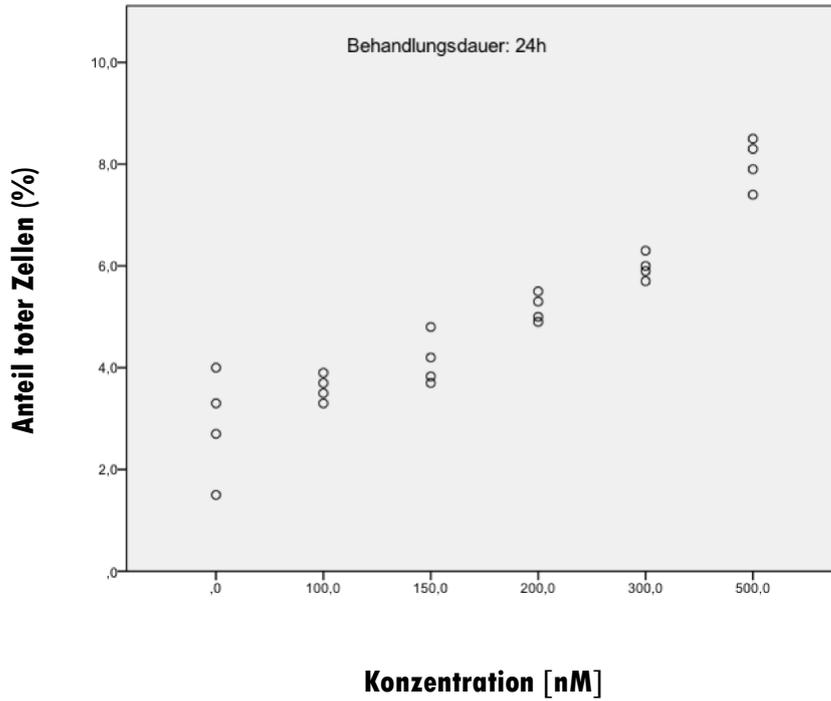


Abb. 32.1 Anteil toter Zellen nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 24 Stunden

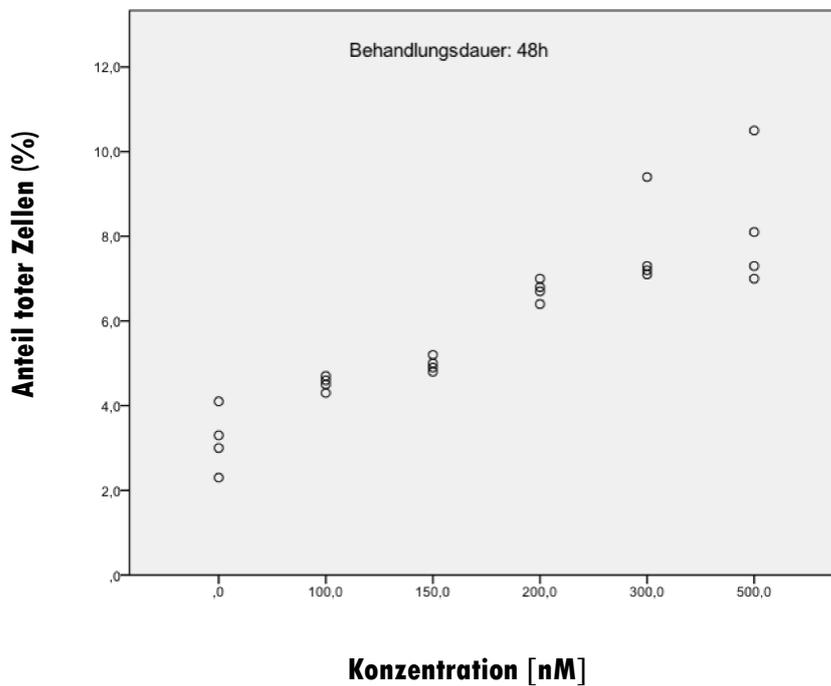


Abb. 33.1 Anteil toter Zellen nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 48 Stunden

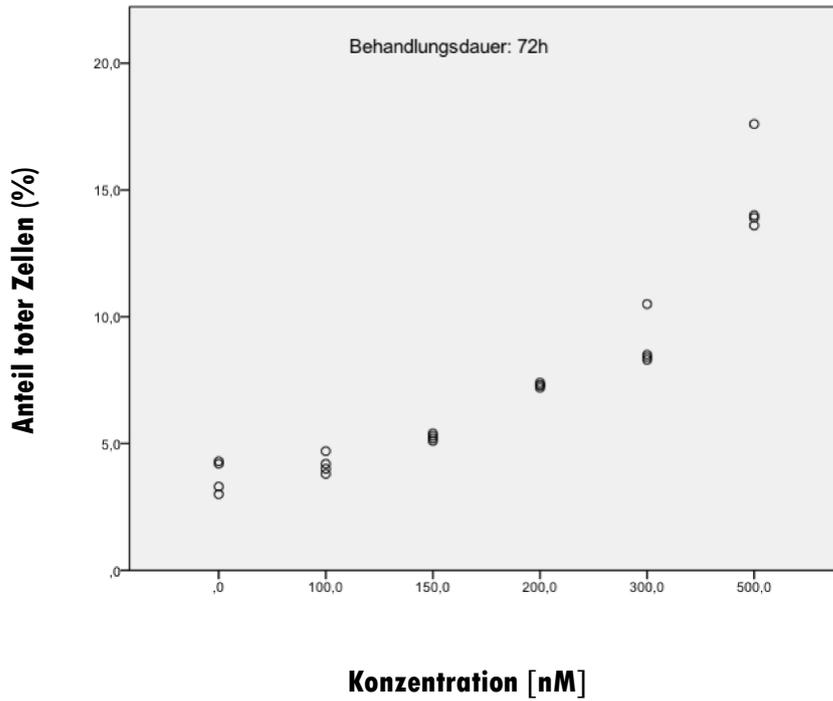


Abb. 33.2 Anteil toter Zellen nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 72 Stunden

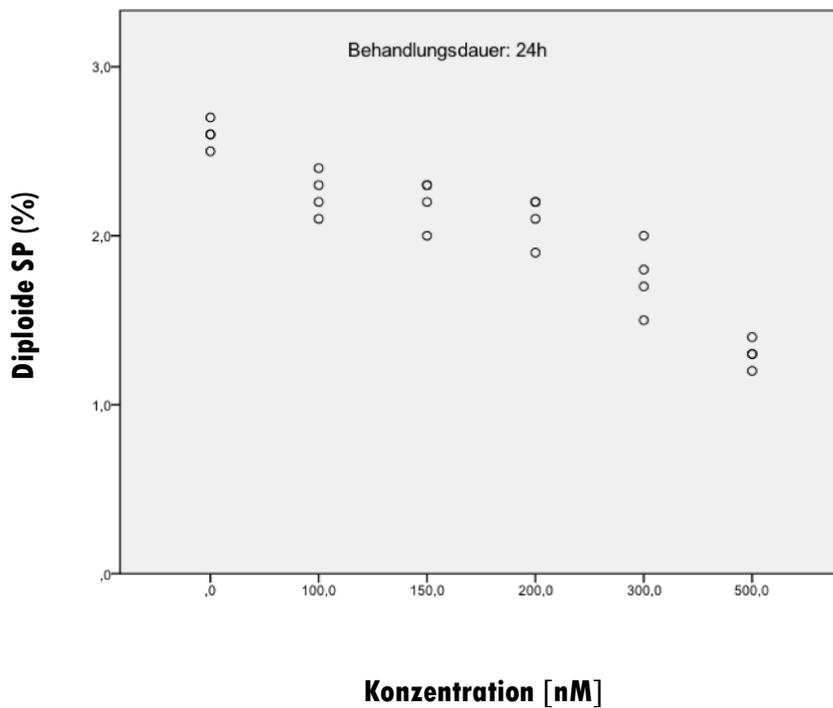


Abb. 34.1 Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 24 Stunden

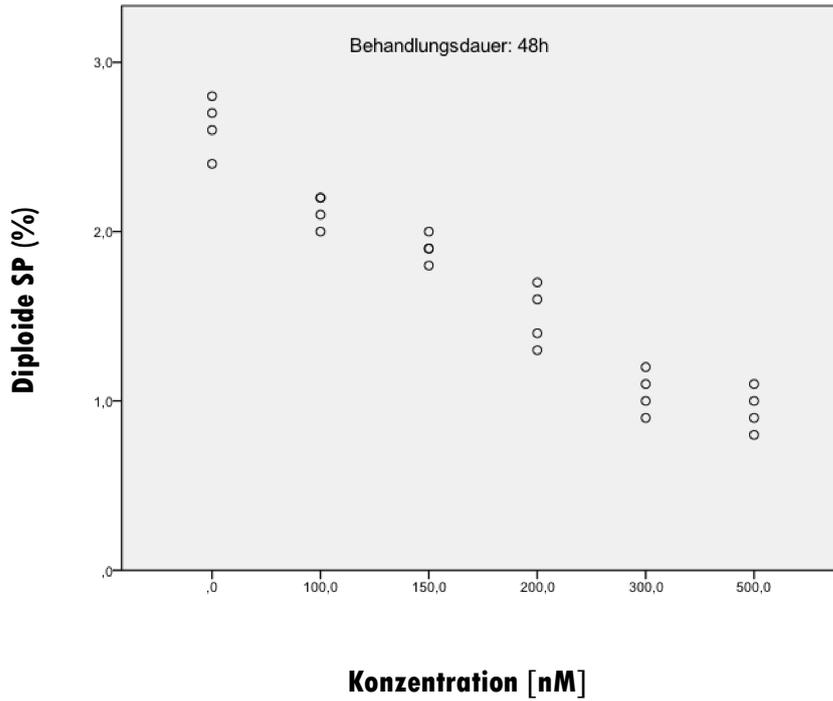


Abb. 35.1 Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 48 Stunden

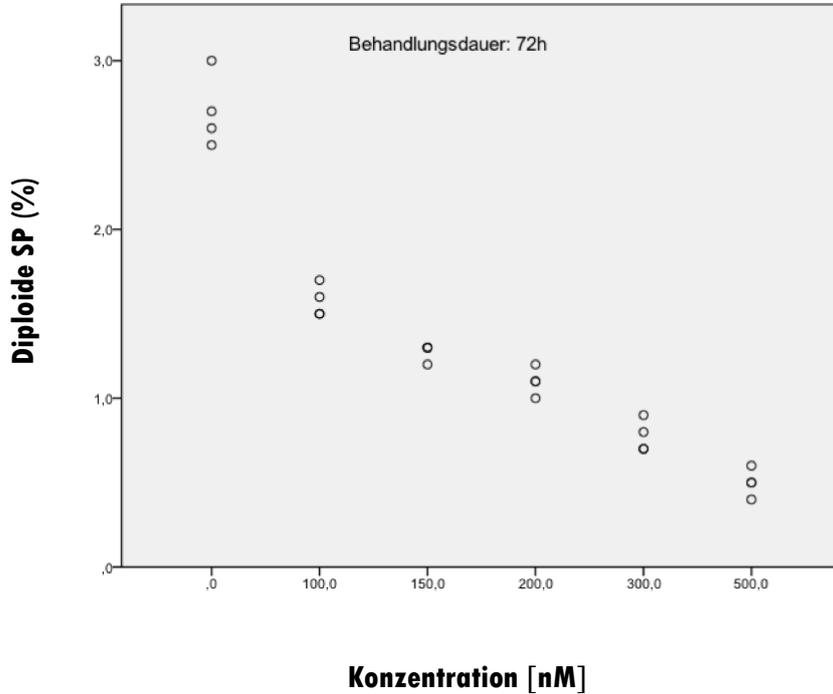


Abb. 35.2 Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 72 Stunden

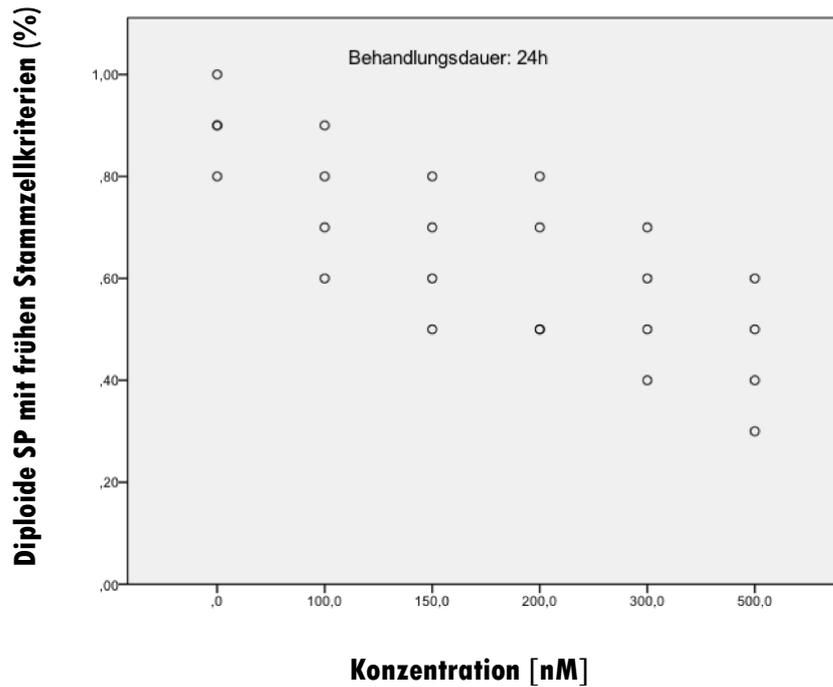


Abb. 36.1 Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 24 Stunden

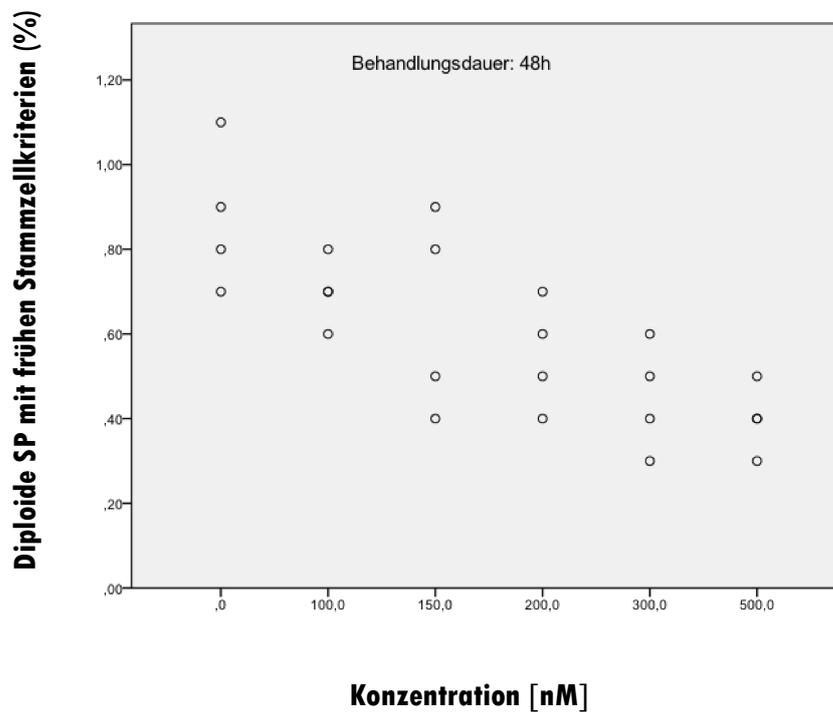


Abb. 37.1 Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 48 Stunden

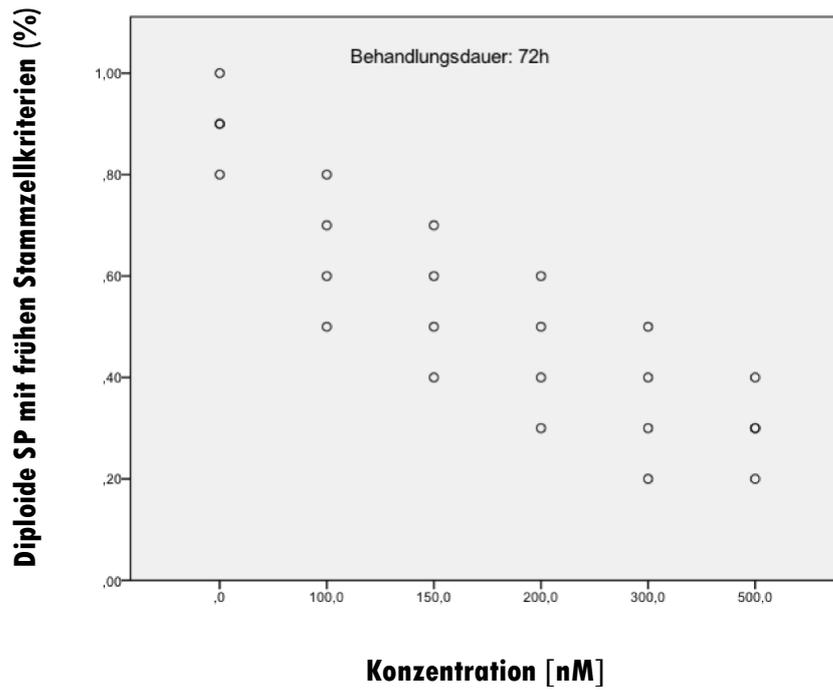


Abb. 37.2 Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 72 Stunden

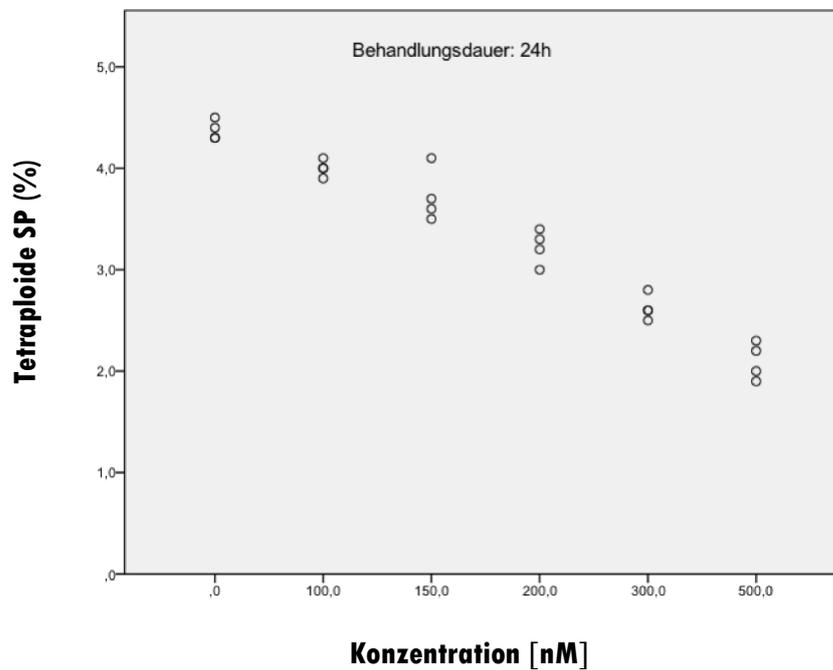


Abb. 38.1 Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 24 Stunden

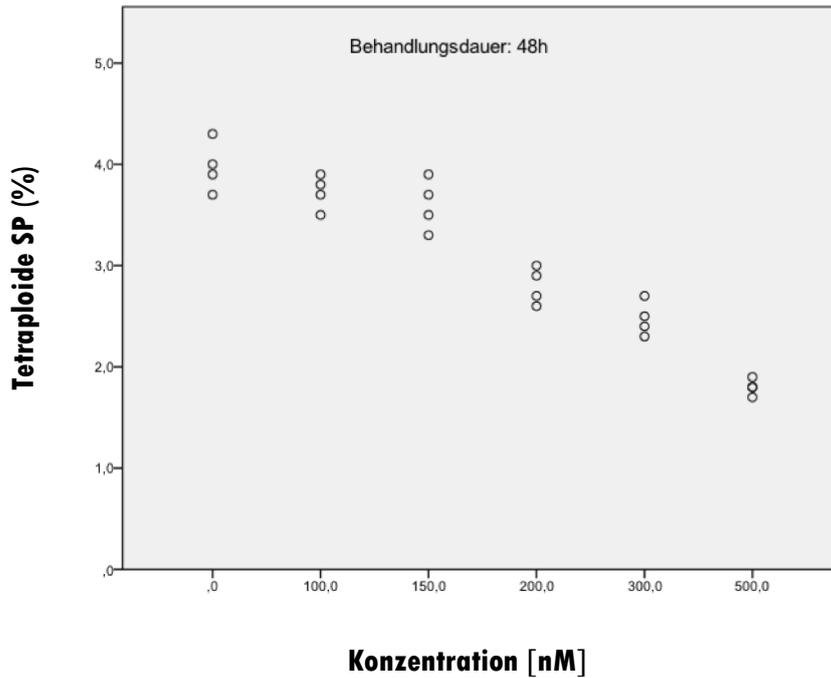


Abb. 39.1 Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 48 Stunden

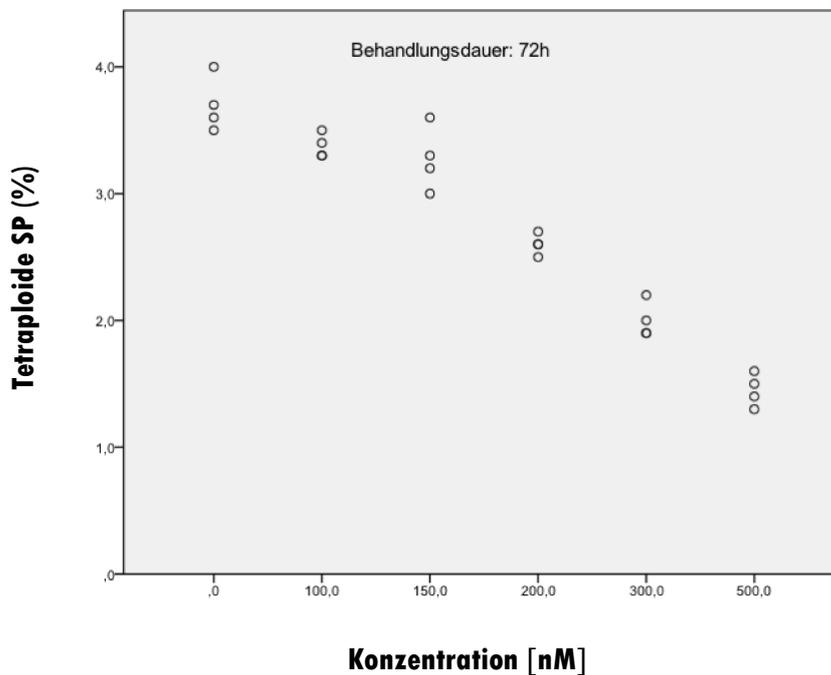


Abb. 39.2 Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 72 Stunden

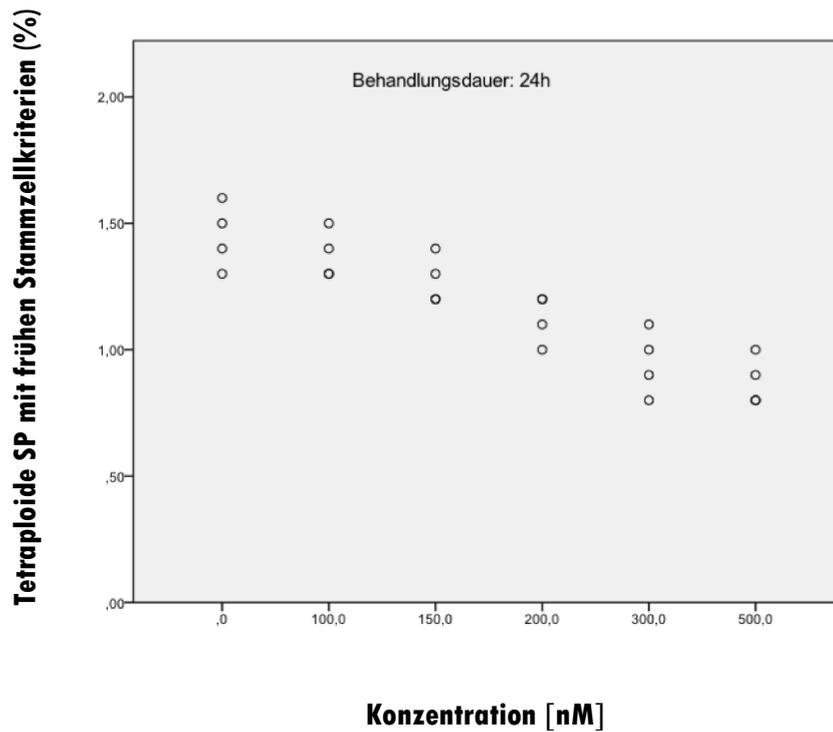


Abb. 40.1 Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 24 Stunden

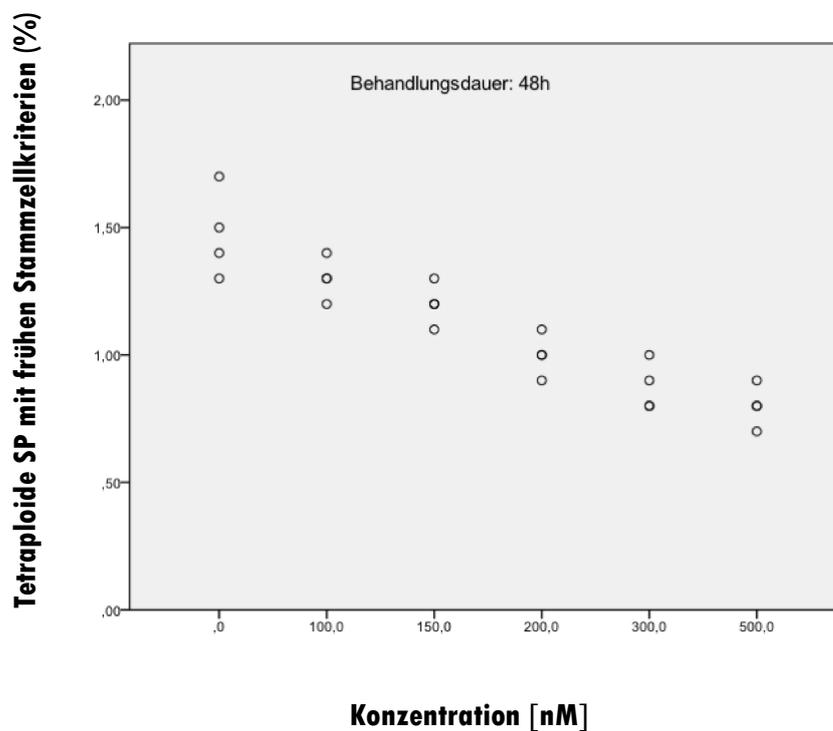


Abb. 41.1 Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 48 Stunden

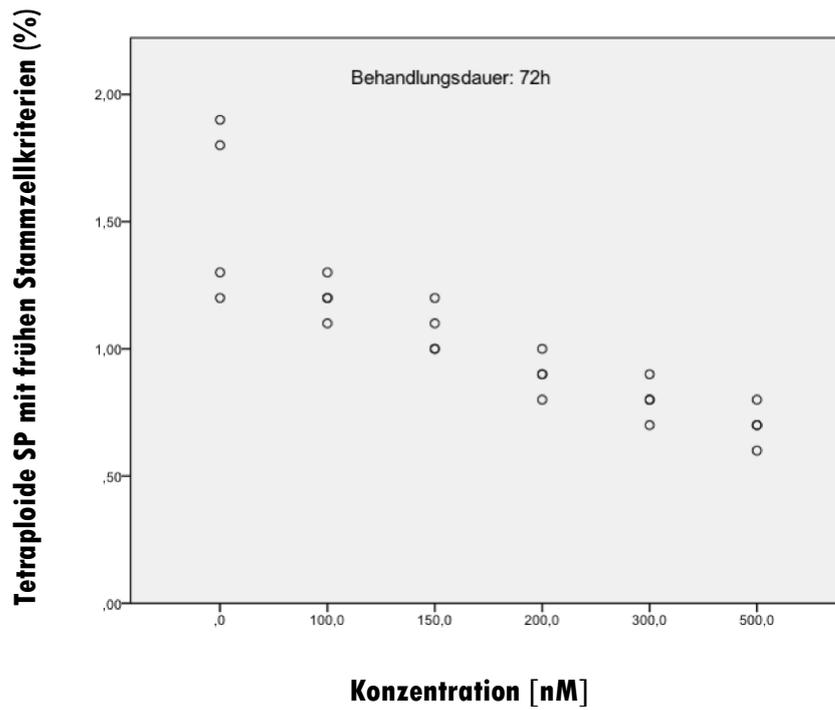


Abb. 41.2 Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 72 Stunden

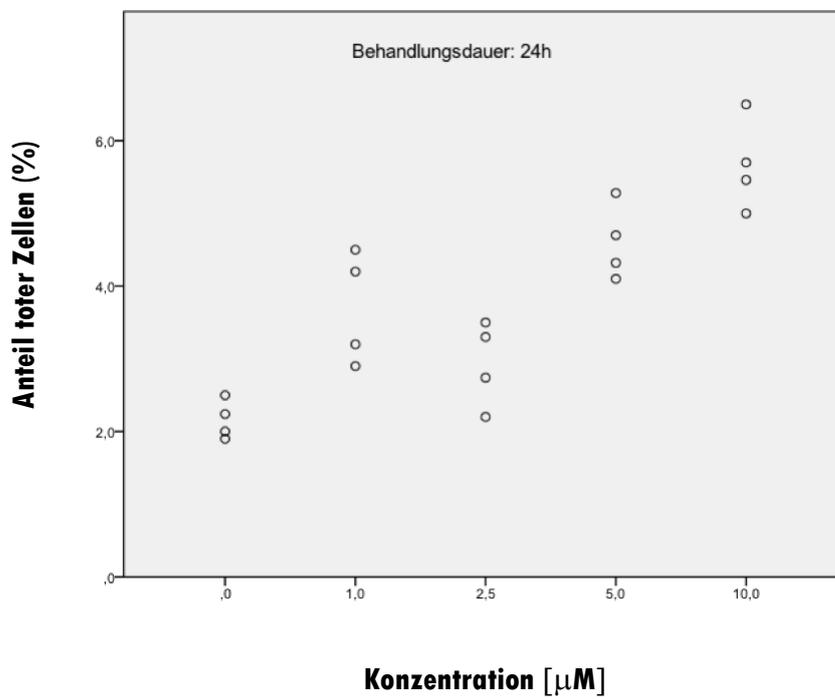


Abb. 42.1 Anteil toter Zellen nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 24 Stunden

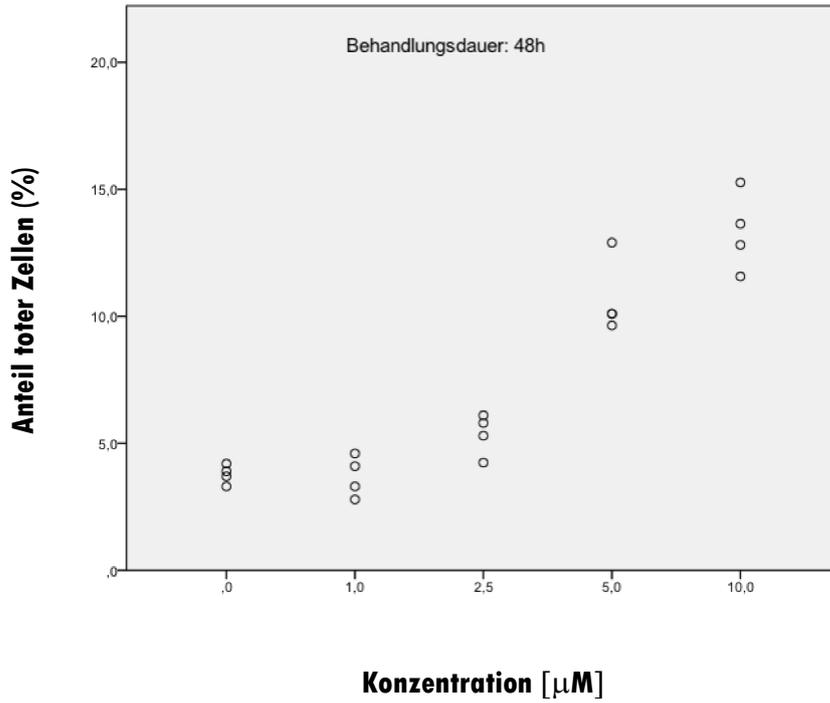


Abb. 43.1 Anteil toter Zellen nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 48 Stunden

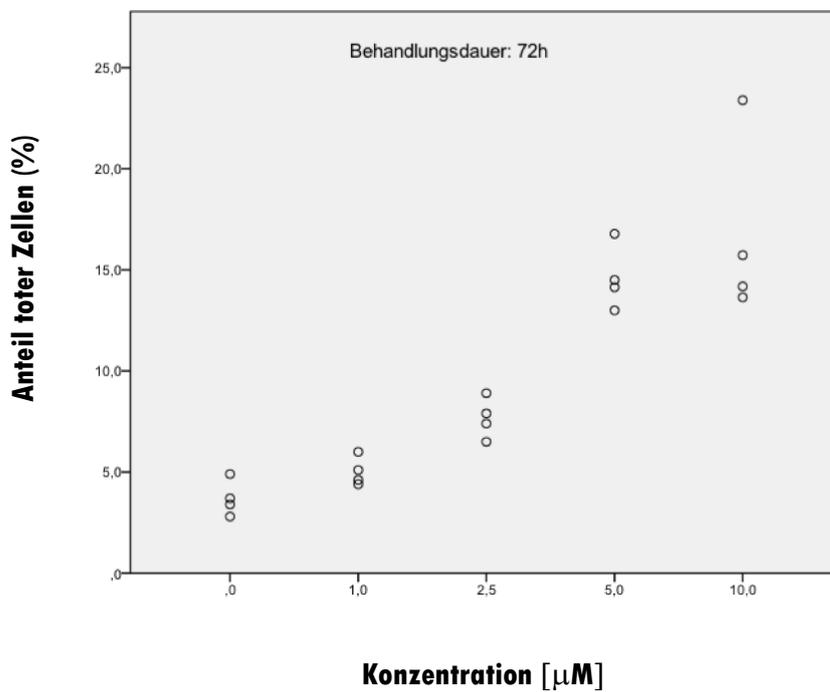


Abb. 43.2 Anteil toter Zellen nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 72 Stunden

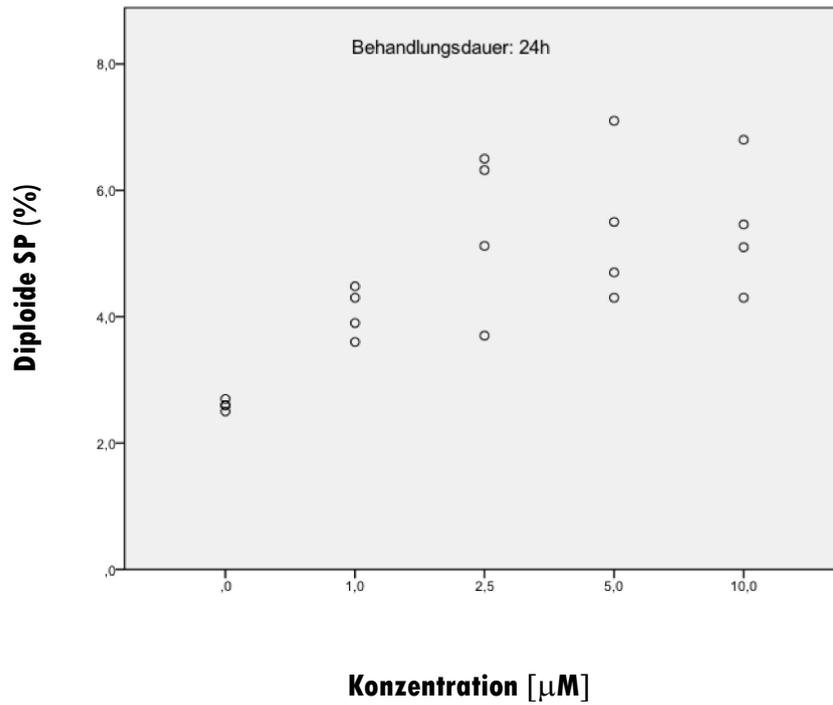


Abb. 44.1 Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 24 Stunden

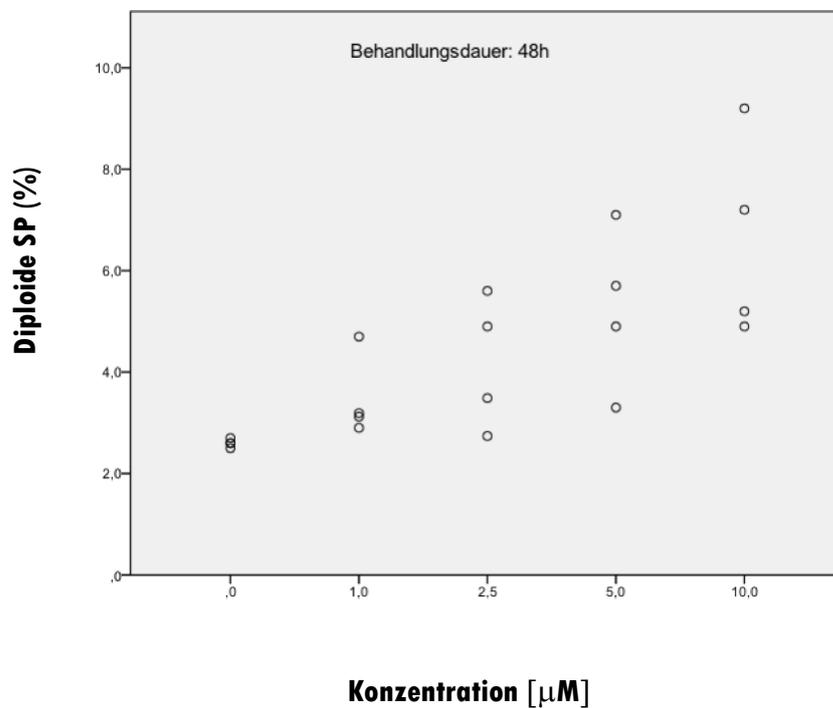


Abb. 45.1 Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 48 Stunden

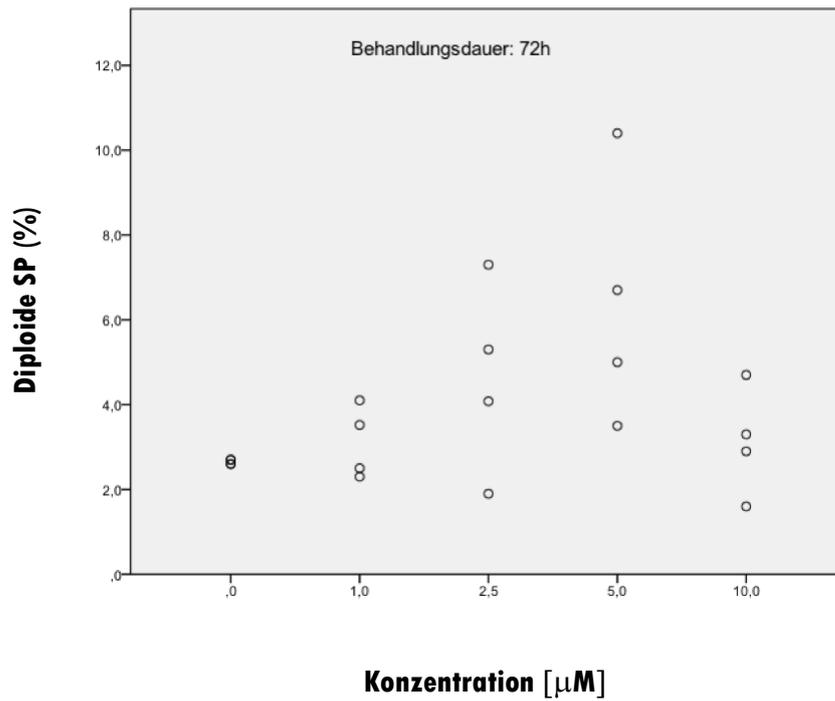


Abb. 45.2 Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 72 Stunden

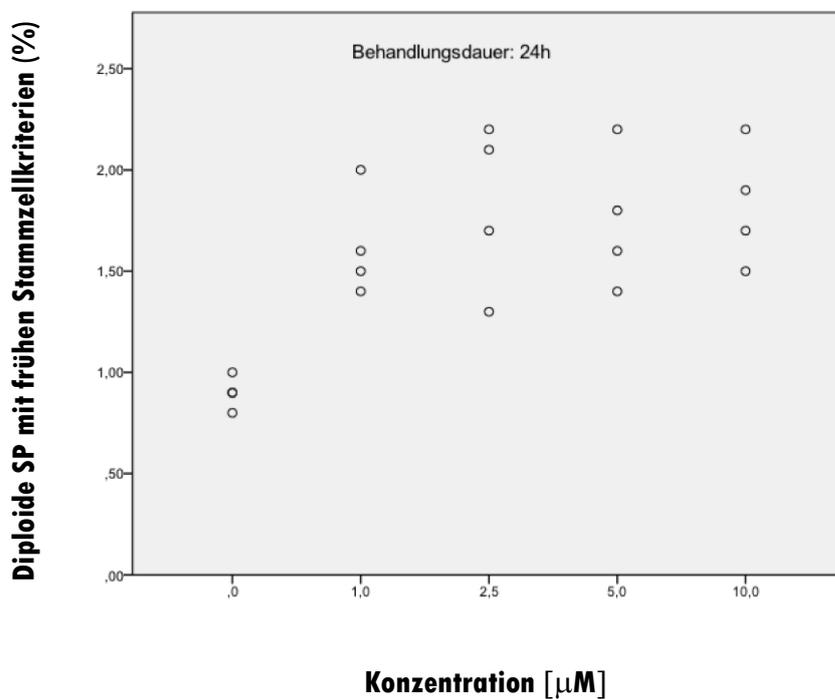


Abb. 46.1 Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 24 Stunden

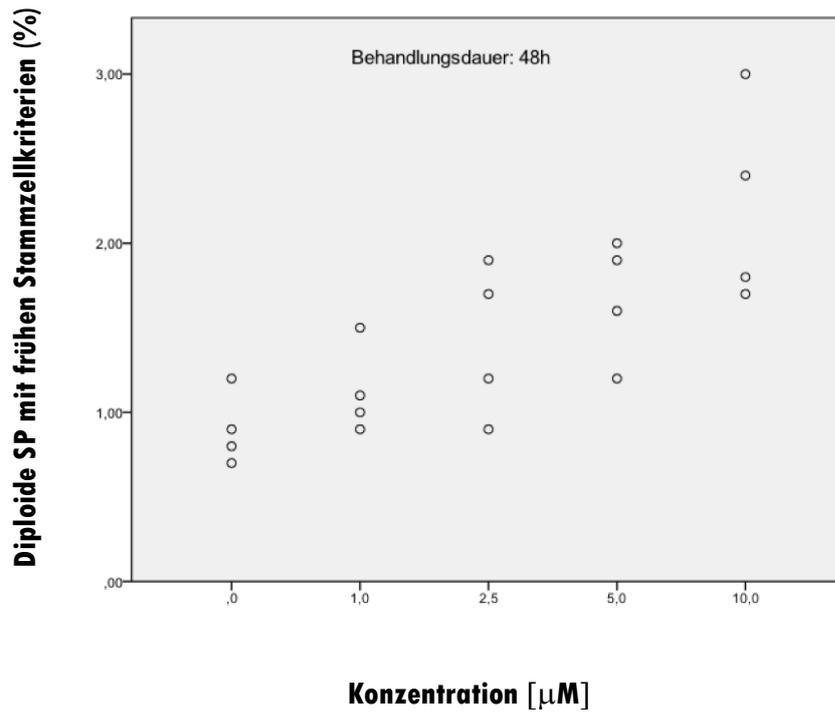


Abb. 47.1 Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 48 Stunden

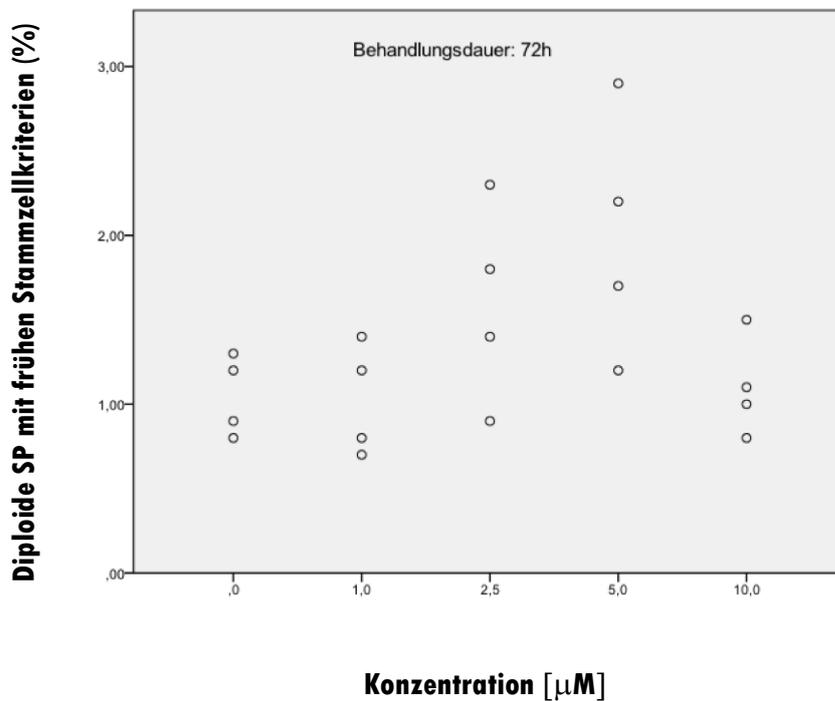


Abb. 47.2 Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 72 Stunden

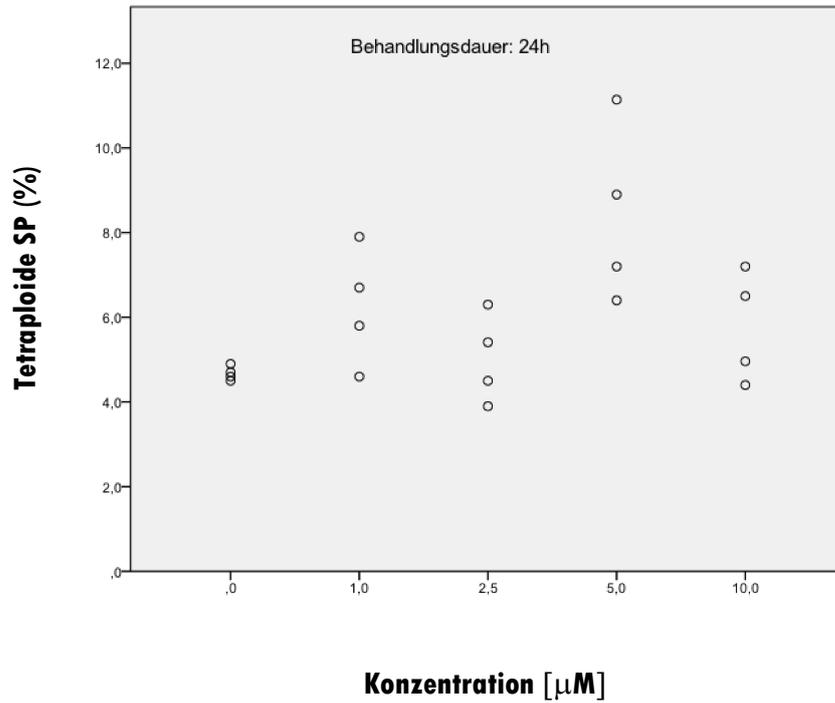


Abb. 48.1 Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 24 Stunden

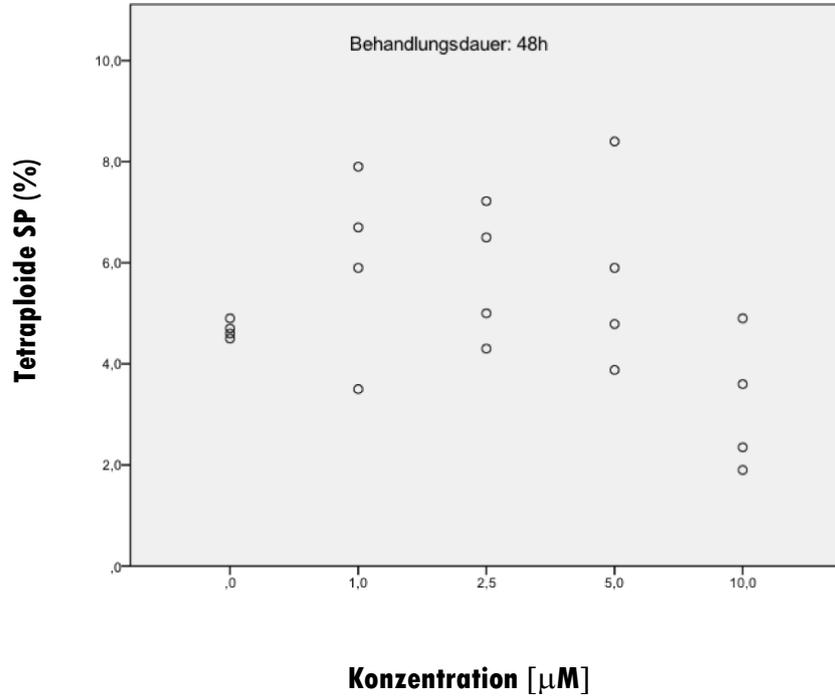


Abb. 49.1 Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 48 Stunden

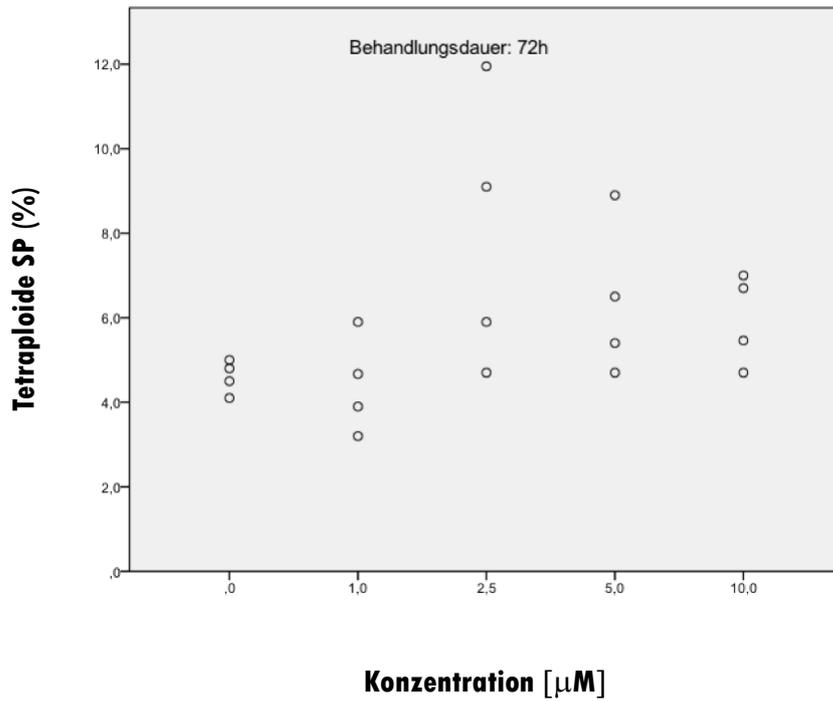


Abb. 49.2 Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 72 Stunden

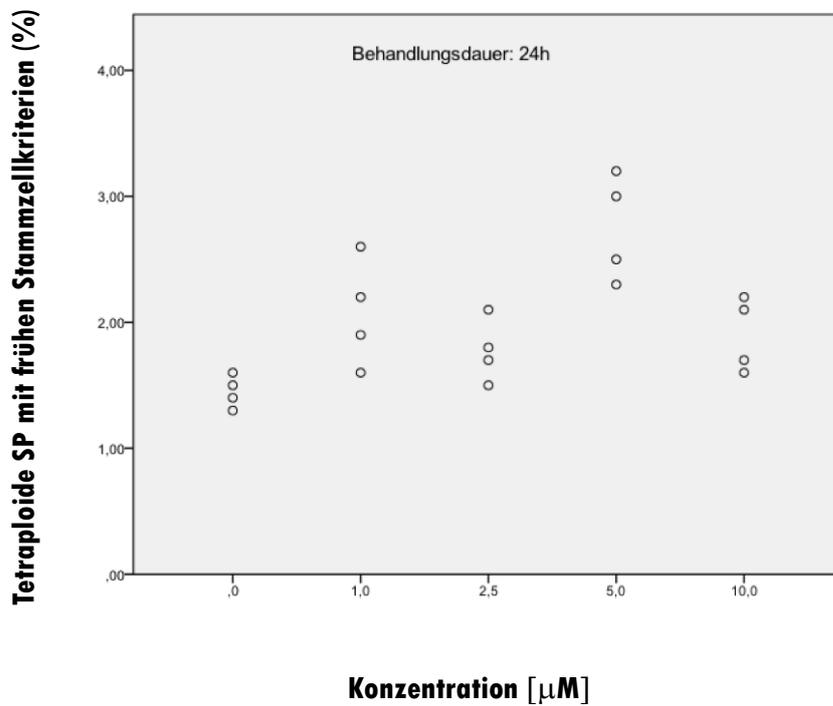


Abb. 50.1 Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 24 Stunden

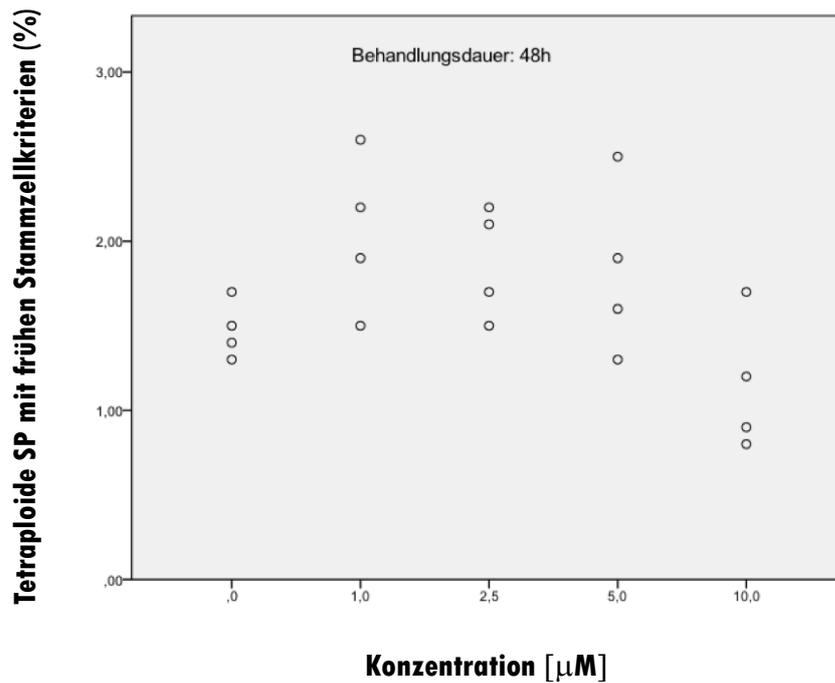


Abb. 51.1 Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 48 Stunden

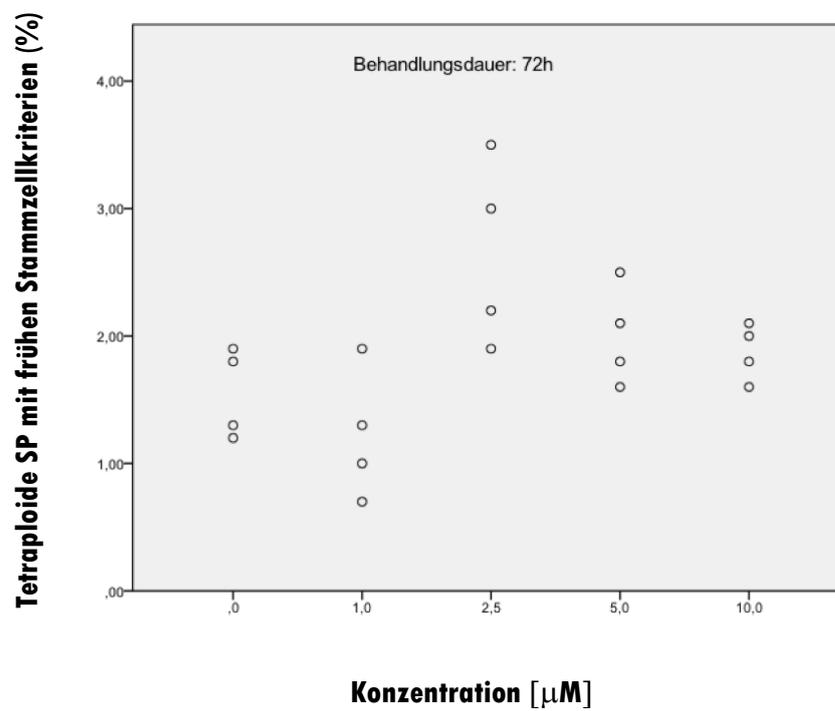


Abb. 51.2 Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 72 Stunden

---

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Hämatopoese	S. 31
Abb. 2: Aufbau eines Durchflusszytometers	S. 60
Abb. 3: Konfiguration des blauen (links) und roten Lasers (rechts)	S. 61
Abb. 4: Konfiguration des violetten (links) und UV-Lasers (rechts)	S. 61
Abb. 5: Gating Hierarchie	S. 76
Abb. 6: All events mit "Time window" – Gate	S. 77
Abb. 7: Time window mit Singlets-Gate	S. 77
Abb. 8: Singlets Plot mit "Dead cells"-Gate und "Live cells"-Gate	S. 78
Abb. 9: Vital cells und Subpopulationen im Hoechst-Blue- und Hoechst-Red-Fenster	S. 79
Abb. 10: G0/G1 Plot mit SP 2n-Gate	S. 80
Abb. 11: Diploide SP mit Early- und Intermediate-SP-Gate	S. 81
Abb. 12: Anteil toter Zellen nach einer CUR-Behandlungsdauer von 24 Stunden	S. 83
Abb. 13: Anteil toter Zellen nach einer CUR-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden	S. 84
Abb. 14: Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 24 Stunden	S. 85
Abb. 15: Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden	S. 86
Abb. 16: Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 24 Stunden	S. 87
Abb. 17: Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden	S. 88

---

Abb. 18: Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 24 Stunden	S. 89
Abb. 19: Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden	S. 90
Abb. 20: Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 24 Stunden	S. 91
Abb. 21: Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer CUR-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden	S. 92
Abb. 22: Anteil toter Zellen nach einer SAL-Behandlungsdauer von 24 Stunden	S. 94
Abb. 23: Anteil toter Zellen nach einer SAL-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden	S. 95
Abb. 24: Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 24 Stunden	S. 96
Abb. 25: Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden	S. 97
Abb. 26: Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 24 Stunden	S. 99
Abb. 27: Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden	S. 100
Abb. 28: Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 24 Stunden	S. 101
Abb. 29: Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden	S. 102
Abb. 30: Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 24	

---

Stunden	S. 103
Abb. 31: Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer SAL-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden	S. 105
Abb. 32: Anteil toter Zellen nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 24 Stunden	S. 107
Abb. 33: Anteil toter Zellen nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden	S. 108
Abb. 34: Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 24 Stunden	S. 109
Abb. 35: Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden	S. 110
Abb. 36: Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 24 Stunden	S. 111
Abb. 37: Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden	S. 112
Abb. 38: Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 24 Stunden	S. 114
Abb. 39: Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden	S. 115
Abb. 40: Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 24 Stunden	S. 116
Abb. 41: Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer PKC412-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden	S. 117
Abb. 42: Anteil toter Zellen nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 24	

---

Stunden	S. 119
Abb. 43: Anteil toter Zellen nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden	S. 120
Abb. 44: Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 24 Stunden	S. 122
Abb. 45: Anteil der diploiden SP an der diploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden	S. 123
Abb. 46: Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 24 Stunden	S. 124
Abb. 47: Anteil der diploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der diploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden	S. 125
Abb. 48: Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 24 Stunden	S. 127
Abb. 49: Anteil der tetraploiden SP an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden	S. 128
Abb. 50: Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 24 Stunden	S. 129
Abb. 51: Anteil der tetraploiden SP mit frühen Stammzellkriterien an der tetraploiden Hauptpopulation nach einer 4-HPR-Behandlungsdauer von 48 und 72 Stunden	S. 130

---

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: FAB-Klassifikation und Immuntypisierung der AML*	S. 18
Tabelle 2: Geräte und Verbrauchsmaterialien *	S. 48
Tabelle 3: Allgemeine Chemikalien*	S. 51
Tabelle 4: Potenzielle Therapeutika	S. 52
Tabelle 5: Reagenzien zur Bestimmung von SP*	S. 53
Tabelle 6: Lebend-Tot-Marker*	S. 54
Tabelle 7: EDV-Software	S. 54
Tabelle 8: Curcumin-Ansätze	S. 67
Tabelle 9: Salinomycin-Ansätze	S. 69
Tabelle 10: Midostaurin-Ansätze	S. 71
Tabelle 11: Fenretinide-Ansätze	S. 74