

**Rolle der Autophagie bei der Inhibierung der  
Lysin Demethylase KDM6B  
in kindlicher akuter lymphoblastischer  
Leukämie (ALL)**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades  
doctor medicinae (Dr. med.)**

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

**von Josephine Burges, geb. Platzke  
geboren am 28.07.1993 in Forst (Lausitz)**

## **Gutachter**

- 1 Prof. Dr. James F. Beck, Jena**
- 2 apl. Prof. Dr. Sebastian Scholl, Jena**
- 3 Prof. Dr. Paul-Gerhardt Schlegel, Würzburg**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 22. März 2021**

## Abkürzungsverzeichnis

$\Delta\psi_m$ /MMP	mitochondriales Membranpotential
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
CLL	chronische lymphoblastische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
Ct	<i>cycle threshold</i> (Schwellenwert)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	<i>deoxynucleoside triphosphates</i> (Desoxyribonukleosidtriphosphate)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	<i>eventfree survival</i> (ereignisfreies Überleben)
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i> (Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer)
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FKS	fetales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
h	<i>hour</i> (Stunde)
HLTV	human T-cell leukemia virus
IKZ	Inkubationszeit
ith	intrathekal
J	Jahre
KDM	Histonlysin-Demethylasen
KK	Korrelationskoeffizient
KM	Knochenmark
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
$\mu\text{l}$	Mikroliter
ml	Milliliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
mM	Millimolar
MMP	mitochondriales Membranpotential

MNC	<i>mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen)
MRD	minimale residuelle Resterkrankung
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
p53	Protein 53
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PI	Propidiumiodid
PPR	prednisone poor response
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI-1640	Zellkulturmedium, formuliert am <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s.	siehe
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Abweichung von dem Mittelwert)
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Umdrehungen
Wo.	Woche/-n
Z/Well	Zellen pro Well

# Inhalt

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Akute lymphoblastische Leukämien	3
2.1.1	Epidemiologie der kindlichen Leukämien	3
2.1.2	Definition und Ätiologie	3
2.1.3	Symptomatik und Diagnostik	4
2.1.4	Therapie der ALL und Prognose	5
2.1.5	Ursachen für prednisonone poor response (PPR) in Leukämien	7
2.2	Funktion und Inhibition von Histon-Lysin-Demethylasen	8
2.2.1	Epigenetik in der Kanzerogenese	8
2.2.2	Histon-Lysin-Demethylasen (KDM)	9
2.2.3	Tumorassoziierte KDM's	10
2.2.4	GSK-J4	11
2.3	Autophagie und Kanzerogenese	11
2.4	Zielstellung der Arbeit	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Material	15
3.1.1	Allgemein verwendetes Material und Geräte	15
3.1.2	Reagenzien und Kits	16
3.1.3	Patienten- und Knochenmarkspenderproben	17
3.1.4	Zelllinien	17
3.1.5	Medium und Puffer	18
3.1.6	Software	18
3.2	Methoden	18
3.2.1	Zellkultivierung	18
3.2.1.1	Auftauen und Kultivieren der kryokonservierten Zellen	18
3.2.1.2	Passagieren der Zellen	18
3.2.1.3	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	19
3.2.1.4	Fortführen der Zellkultur	19
3.2.1.5	Aussäen der Zellen für funktionelle Versuche	20
3.2.1.6	Einfrieren und Lagern der Zellen	20
3.2.2	Genexpressionsanalyse durch quantitative Real-Time-RT-PCR	20
3.2.2.1	Isolation der RNA und photometrische Messung	21
3.2.2.2	Reverse Transkription der RNA in cDNA	22
3.2.2.3	Durchführung der Real-Time-RT-PCR	23
3.2.2.4	Auswertung der Real-Time-RT-PCR	24
3.2.3	Wirkstoffapplikation	25
3.2.4	Durchflusszytometrische Analysen	25
3.2.4.1	Messung des mitochondrialen Membranpotentials	27
3.2.4.2	Zelltodanalyse	27
3.2.4.3	Autophagietest	28
3.2.4.4	Kompensationsmessung	28
3.2.4.5	Vorbereitung und Durchführung der durchflusszytometrischen Messungen	29
3.2.5	Statistische Analyse der Daten	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Relative mRNA-Expression des KDM6B-Gens in KM, CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen	31
4.2	Zellkulturexperimente an CCRF-CEM-Zellen und Jurkat-Zellen	32
4.2.1	Zelltoduntersuchung	32

4.2.1.1	Wirkung von GSK-J4 .....	32
4.2.1.2	Wirkung von Dexamethason.....	34
4.2.1.3	Kombinationsversuche .....	35
4.2.1.3.1	GSK-J4 und Dexamethason .....	35
4.2.1.3.2	GSK-J4 und Vincristin .....	38
4.2.2	Autophagieuntersuchung .....	41
4.2.2.1	Wirkung von GSK-J4 .....	41
4.2.2.2	GSK-J4 - Induktor oder später Hemmer der Autophagie? .....	42
4.2.2.3	Wirkung von Dexamethason.....	43
4.2.2.4	Kombinationsversuche .....	43
4.2.2.4.1	Dexamethason und GSK-J4 .....	43
4.2.2.4.2	Vincristin und GSK-J4 .....	44
4.2.3	Wirkung der Hemmung der Autophagie durch Chloroquin auf den Zelltod ....	45
4.2.3.1	Wirkung von Chloroquin .....	45
4.2.3.2	Kombination von Chloroquin und GSK-J4 .....	47
5	Diskussion.....	49
5.1	Relevanz der KDM6B in CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen.....	50
5.2	GSK-J4 als möglicher Kombinationspartner bei der Therapie der Leukämie .....	51
5.2.1	Wirkung von GSK-J4.....	51
5.2.2	Wirkung von Dexamethason .....	51
5.2.3	Kombination von GSK-J4 und Dexamethason .....	51
5.2.4	GSK-J4 und Vincristin .....	53
5.2.5	GSK-J4 und Chloroquin .....	56
5.3	GSK-J4 induziert Autophagie .....	57
5.4	Rolle der Autophagie in Kombinationsbehandlungen mit GSK-J4 .....	59
5.4.1	Autophagie-Steigerung durch GSK-J4 .....	59
5.4.2	Fehlende Autophagie-Modulation durch Dexamethason .....	60
5.4.3	GSK-J4 und Dexamethason.....	61
5.4.4	GSK-J4 und Vincristin .....	63
5.4.5	GSK-J4 und Chloroquin .....	66
6	Schlussfolgerung.....	68
7	Literatur- und Quellenverzeichnis .....	70
8	Anhang.....	76
8.1	Danksagung.....	76
8.2	Ehrenwörtliche Erklärung .....	77

## 1 Zusammenfassung

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. Durch die etablierten Therapiestrategien kann eine hohe Heilungsrate erzielt werden, jedoch ist die Prognose bei Kindern, die nicht oder nur wenig auf die Behandlung mit Glukokortikoiden ansprechen, weiterhin deutlich reduziert. Die Mechanismen, die eine solche Glukokortikoid-Resistenz bewirken, sind noch unzureichend erforscht und wahrscheinlich durch das Zusammenspiel mehrerer Mechanismen bedingt. Glukokortikoide wirken in Leukämiezellen vor allem, indem sie Apoptose auslösen, aber auch indem sie Autophagie induzieren.

Die Bedeutung epigenetischer Veränderungen an der Tumorentstehung und das Potential epigenetisch wirkender Enzyme als therapeutische Angriffspunkte werden zunehmend deutlicher. So beginnen derzeit die Histon-Lysin-Demethylasen (KDMs), eine Gruppe von 32 epigenetisch aktiven Proteinen, sich in der aktuellen Forschung als vielversprechende Angriffsziele herauszustellen. In mehreren Studien wurde ein Zusammenhang zwischen KDMs und der Entstehung verschiedener Tumorentitäten festgestellt. In einer früheren im onkologischen Forschungslabor der Kinderklinik am Universitätsklinikum Jena angefertigten Doktorarbeit wurde gezeigt, dass in ALL-Patienten eine erhöhte Expression der KDM6B mit einem geringeren Ansprechen auf die Glukokortikoid-Behandlung und einer insgesamt schlechteren Prognose assoziiert war.

Ziel dieser Arbeit war es, die potenzielle Rolle der KDM6B in der Glukokortikoid-Resistenz von ALL-Zellen zu evaluieren. Ein besonderer Schwerpunkt wurde hierbei auf die Funktion der Autophagie gelegt, da diese die Glukokortikoid-Sensibilität beeinflussen kann. Zur Inhibierung der KDM6B wurde der niedermolekulare Hemmstoff GSK-J4 eingesetzt. Die Wirkung von GSK-J4 wurde in zwei Glukokortikoid-resistenten ALL-Zelllinien, nämlich CCRF-CEM und Jurkat, geprüft. Um einen ersten Hinweis auf die Relevanz der KDM6B in den Zelllinien zu erhalten, wurde mittels Real-Time-RT-PCR eine vergleichende Analyse der KDM6B-Genexpression in den Zelllinien und Proben gesunder Knochenmarkspender durchgeführt. Während sich die KDM6B-Expression in CCRF-CEM-Zellen nicht von der in den Spenderzellen unterschied, wiesen Jurkat-Zellen eine deutlich höhere KDM6B-Expression auf.

## Zusammenfassung

In den Untersuchungen zur antineoplastischen Wirkung von GSK-J4 stellte sich der Inhibitor als Zelltod-induzierender Wirkstoff in beiden Zelllinien heraus. Darüber hinaus erwies sich GSK-J4 als ein Auslöser der Autophagie in CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen. Um im Weiteren zu prüfen, ob GSK-J4 zur Überwindung der Glukokortikoid-Resistenz geeignet sein könnte, wurde GSK-J4 in Kombination mit dem Glukokortikoid Dexamethason eingesetzt. In CCRF-CEM-Zellen offenbarte sich eine Dexamethason-sensibilisierende Wirkung der GSK-J4-Behandlung, während in Jurkat-Zellen kein derartiger Effekt zu verzeichnen war. Um außerdem einen möglichen Synergismus zwischen GSK-J4 und dem ALL-Standardtherapeutikum Vincristin zu überprüfen, folgten Kombinationsversuche mit diesen Wirkstoffen. Diese Kombination zeigte in keiner der Zelllinien eine kooperative Wirkung.

Parallel wurde jeweils die autophagozytotische Aktivität bestimmt, um potenzielle Zusammenhänge zwischen Autophagie und Zelltod bzw. Autophagie und Glukokortikoid-Sensibilisierung in den Kombinationsversuchen zu detektieren. Hier zeigten sich in Jurkat-Zellen keine Zusammenhänge. In CCRF-CEM-Zellen hingegen war die Glukokortikoid-Sensibilisierung mit einem erhöhten Autophagie-Level verbunden.

Die in diesen In-vitro-Untersuchungen erzielten Resultate zeigen, dass der KDM6B-Inhibitor GSK-J4 als Monotherapeutikum zytotoxische Wirksamkeit gegen ALL-Zellen entfaltet. Insbesondere zeigen sie zudem, dass mit GSK-J4 die Glukokortikoid-Resistenz in ALL-Zellen überwunden werden kann. Dieser sensibilisierende Effekt war allerdings auf eine von zwei untersuchten Zelllinien beschränkt. In einem denkbaren klinischen Einsatz von GSK-J4 müsste dessen Glukokortikoid-sensibilisierende Wirkung mithin einer personalisierten Prüfung unterzogen werden.



## 2 Einleitung

### 2.1 Akute lymphoblastische Leukämien

Der Begriff Leukämie wurde durch Virchow geprägt und bedeutet „weißes Blut“. Eine Leukämie ist im Allgemeinen eine systemische diffuse autonome Proliferation einer Leukozytenrasse, welche durch Vermehrung eines malignen Zellklons zur Expansion im blutbildenden Knochenmark und zum Ausschwemmen dieser Zellen in extrameduläre Organe und in die Blutbahn führen kann (Chen et al. 2010). Es werden verschiedene Formen der Leukämie unterschieden. So werden akute und chronische Formen entsprechend des klinischen Verlaufs eingeteilt. Je nach Ursprungszelle aus der lymphatischen Reihe und der myeloischen Reihe wird dieses hämatoonkologische Krankheitsbild als akute und chronische lymphatische bzw. myeloische Leukämie bezeichnet.

#### 2.1.1 Epidemiologie der kindlichen Leukämien

Leukämien sind laut dem Kinderkrebsregister der Universität Mainz mit 30,2 % die häufigsten malignen Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter (Stand 2018), wobei im Alter unter 15 Jahren eines von 1250 Kindern betroffen ist. Rund 50 % der Kinder erkranken bereits vor dem Schulalter. Jungen sind 20 % häufiger betroffen als Mädchen (Kaatsch et al. 2019). Im Kindesalter überwiegt der Anteil an ALL mit 80 %, gefolgt von der AML mit etwa 15 % (Bonaventure et al. 2017). Im Jahresbericht des Kinderkrebsregisters 2018 wird beschrieben, dass bis Mitte der 2000er Jahre in Deutschland eine langsame Zunahme der ALL (ca. 0,7 % pro Jahr) zu verzeichnen war, seitdem jedoch kein weiterer Anstieg beobachtet wurde. Es werden Lebensstiländerungen als Ursache für diesen Zuwachs vermutet (Spix et al. 2008).

#### 2.1.2 Definition und Ätiologie

Es handelt sich bei der ALL um eine maligne klonale Neoplasie hämatopoetischer Knochenmarkstammzellen, bei der eine frühe Vorstufe der Lymphozyten entartet ist und sich unkontrolliert vermehrt. Durch die daraus resultierende Verdrängung gesunder Knochenmarkzellen wird die normale Hämatopoese behindert. Der entstehende Differenzierungsblock der entarteten lymphatischen Vorläuferzellen führt dazu, dass unreife Lymphoblasten in das periphere Blut ausgeschwemmt und infolgedessen auch Organschäden verursacht werden. Es entsteht eine Trizytopenie. Die klinische Symptomatik resultiert aus einer fortschreitenden Knochenmarkinsuffizienz. Die Ätiologie ist schlussendlich noch nicht vollständig erforscht und verstanden. Allgemein ursächlich für

## Einleitung

die Krankheitsentstehung sind - insbesondere im Erwachsenenalter - im Laufe des Lebens erworbene maligne genetische Veränderungen im Knochenmark (Chen et al. 2010). Risikofaktoren hierfür sind ionisierende Strahlung und chemische Substanzen wie Benzol und Lost (Gluzman et al. 2015). Auch Zytostatika, welche eigentlich zur Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt werden, können im späteren Verlauf eine so genannte sekundäre ALL auslösen. Auch Virusinfekte mit HTLV1/2 sowie genetische Faktoren können das Erkrankungsrisiko erhöhen. So erkranken Kinder mit Trisomie 21 häufiger an einer ALL (Rabin und Whitlock 2009). Oft bleibt die Ursache der Leukämie jedoch unklar. Die kindliche ALL umfasst verschiedene genetische Entitäten mit bestimmten somatischen Mutationen. Hierbei handelt es sich um Aneuploidie, chromosomale Veränderungen, welche die Genexpression verändern oder zu der Bildung von Fusionsproteinen, Deletionen und Zugewinnen von DNA führen oder in DNA-Sequenzmutationen münden. Durchschnittlich enthalten kindliche ALL-Erkrankungstypen etwa 10 bis 20 nonsilent kodierende Mutationen zum Zeitpunkt der Diagnose und über doppelt so viele zum Zeitpunkt des Rezidivs. Viele dieser Mutationen beinhalten Störungen zellulärer Schlüsselprozesse. Hierzu gehören die transkriptionelle Regulation der Lymphozytenentwicklung und -differenzierung, die Zellzyklusregulation, der TP53-Retinoblastom-Protein-Tumorsuppressorsignalweg, der Wachstumsfaktorrezeptor-, RAS-, Phosphatidylinositol-3-Kinase- und JAK-STAT-Signalweg, der Nukleosidmetabolismus und epigenetische Modifikationen (Hunger und Mullighan 2015).

### **2.1.3 Symptomatik und Diagnostik**

Die Patienten klagen häufig über eine typische B-Symptomatik mit Abgeschlagenheit, Fieber, Gewichtsverlust und Nachtschweiß. Infolge der Panzytopenie im peripheren Blut besteht eine erhöhte Infektanfälligkeit. Der Anämie geschuldet treten häufig Müdigkeit, Blässe und Dyspnoe auf. Außerdem ist eine erhöhte Blutungsneigung aufgrund der Thrombozytopenie zu verzeichnen. Weitere Symptome sind Lymphknotenschwellungen (30 %), (Hepato-)Splenomegalie, hypertrophe Gingivitis, Meningeosis leucaemia, neurologische Ausfallerscheinungen, Knochenschmerzen bei kindlicher ALL und Verbrauchskoagulopathie geschuldete Blutungen (Information des DKFZ).

Die Diagnosestellung erfolgt unter Berücksichtigung der Symptomatik des klinischen Untersuchungsbefundes und des Blutbildes. Die Leukozytenzahl ist hier nicht entscheidend, da sie zu hoch, normal oder reduziert sein kann. Zur Diagnosesicherung erfolgt eine Knochenmarkpunktion mit Knochenmarkausstrich. Nur die unreifzelligen

## Einleitung

Leukozyten in Blut und Knochenmark sichern die Diagnose. Der Anteil der Blasten an den kernhaltigen Zellen im Knochenmark muss bei einer ALL definitionsgemäß über 25 % betragen. Es werden eine Zytochemie, Zytogenetik, molekulargenetische Untersuchungen und Immuntypisierung an Blutbild und Knochenmark durchgeführt. Die immunologische Charakterisierung der Oberfläche der Blasten erfolgt zur Differenzierung zwischen ALL und AML. Zur Detektion relevanter Chromosomenbrüche erfolgen zytogenetische Untersuchungen. So können die Patientenproben in verschiedene Gruppen eingeteilt werden: B-ALL, Vorläufer-B-ALL, Reife-B-ALL und T-ALL.

### 2.1.4 Therapie der ALL und Prognose

Klinische Studien haben gezeigt, dass es einige prognostisch relevante Faktoren gibt, die Einfluss auf die Schwere des Verlaufs der Erkrankung nehmen. Dazu gehören das initiale Alter und die Anzahl der weißen Blutkörperchen, der Immunphenotyp und die Art und Platzierung der Mutationen innerhalb des Erbguts sowie frühes Therapieansprechen (Hunger et al. 2013). Entspringt die Leukämie einer T-Zelllinie, was in rund 10-15 % der kindlichen ALL der Fall ist, verschlechtert sich die Prognose ebenfalls (Locatelli et al. 2012, Djavaheri-Mergny et al. 2019). In diesem Fall haben Leukozytenzahl und Alter einen geringeren Einfluss auf die Prognose, als wenn es sich um eine B-ALL handelt (Tasian et al. 2015). Ein schlechtes Ansprechen auf Glukokortikoide geht mit einer schlechteren Prognose einher. Gleiches gilt für den Fall eines Rezidivs, welches bei rund 15-25 % der Patienten auftritt (Hunger et al. 2013, Locatelli et al. 2012). Anhand der prognostischen Risikostratifizierung (s. Tabelle 1 nach Schrappe et al. 2000) wird die Therapie festgelegt.

<b>Faktor</b>	<b>günstige Prognose</b>	<b>ungünstige Prognose</b>
<b>Leukozyten</b>	< 20.000/ $\mu$ l	> 100.000/ $\mu$ l
<b>Alter</b>	1-5 Jahre (9 J.)	< 1 J., >10 J. (>14 J.)
<b>Ansprechen nach 7 d Prednison Vortherapie (plus ith. MTX)</b>	< 1.000 Blasten/ $\mu$ l	> 1.000 Blasten/ $\mu$ l
<b>Ansprechen auf initiale Induktionstherapie (Dauer 4-5 Wochen)</b>	M1-Mark	M2-, M3-Mark (NR Tag 33)
<b>Nachweis von MRD</b>	negativ nach 5 Wochen	positiv ( $> 10^3$ ) nach 12 Wochen
<b>Chromosomenzahl</b>	> 50	< 45
<b>Translokationen/Fusionsgene</b>	T(12;21)/TEL-AML1	t(9;22)/ BCR-ABL; t(4;11)/ MLL-AF4 sowie Fusionen mit AF9 oder ENL

M1-Mark < 5 % Blasten; M2-Mark > 5 %-< 25 % Blasten; M3-Mark > 25 % Blasten im KM

Tabelle 1: Übersicht prognosebestimmender Faktoren der ALL (Schrappe et al. 2000)

## Einleitung

Ziel der Therapie ist die Eradikation leukämisch transformierter Stammzellen mit kompletter Remission und Heilung. Die Chemotherapie ist auf vier tragende Elemente aufgebaut, wobei die Abfolge und Dosierung der Zytostatika exakt festgelegt ist. Die Steuerung orientiert sich an bestimmten Richtwerten. Da einzelne Substanzen sowohl als niedrig dosierte intravenöse Injektion als auch als hochdosierte Dauerinfusion verabreicht werden, stellt dies besondere Anforderungen an das Monitoring der Patienten. Zu beachten ist, dass sich die Durchführung an den Empfehlungen des jeweils gültigen Therapieprotokolls entsprechend der Risikoeinschätzung orientiert. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht möglicher Zytostatika, von denen nur eine Auswahl in festgesetzter Abfolge - entsprechend des Therapieprotokolls - zum Einsatz kommt.

Behandlungsteil	Zytostatika
1. Induktionstherapie (5 Wo.) mit anschließender Induktionskonsolidierung (4 Wo.)	Prednison oder Dexamethason, Vincristin, Daunorubicin, Asparaginase, Methotrexat, Cyclophosphamid, Cytarabin, 6-Mercaptopurin, Etoposid, Thioguanin
2. Extrakompartimenttherapie (8 Wo.)	6-Mercaptopurin, Methotrexat
3. Reinduktionstherapie (7 Wo.)	Dexamethason; Asparaginase; Doxorubicin, Vincristin, Cytarabin, Cyclophosphamid, Thioguanin
4. Erhaltungstherapie (bis zum Ablauf von 2 Jahren nach Diagnose)	6-Mercaptopurin, Methotrexat

Die Zeiten beziehen sich beispielhaft auf die Therapieabschnitte der Studien ALL-BFM

*Tabelle 2: Übersicht der Chemotherapeutika zur Behandlung der ALL (Escherich et al 2016)*

Die Therapieschemata variieren in Abhängigkeit davon, ob eine B-ALL oder eine Non-B-ALL vorliegt, und ob es sich um Hochrisikopatienten handelt. Bei hoher Leukämiezellzahl ( $> 25.000/\mu\text{l}$ ) wird im Vorfeld eine Vorphasetherapie mit Prednison und Vincristin angestrebt. Zur Therapieinduktion wird meist eine Kombination von Vincristin, einem Glukokortikoid und einer Asparaginase eingesetzt. In einigen Studien wurde bei Hochrisikopatienten ein Anthracyclin (Doxorubicin oder Daunorubicin) zugesetzt. Als Glukokortikoid wird in der Regel Prednison eingesetzt, Hochrisikopatienten erhalten Dexamethason. Dies führt in ca. 95 % der Fälle zur Vollremission. Als Prophylaxe einer ZNS-Beteiligung kommen im Zuge einer Extrakompartimenttherapie eine intrathekale und systemische Behandlung mit Methotrexat zum Einsatz. Bei Risikopatienten und manifestem ZNS-Befall erfolgt je nach Studienprotokoll eine Bestrahlung des Schädels, wenn der Patient älter als 1 Jahr ist. Des Weiteren wird als Reinduktionstherapie die Induktionstherapie wiederholt. Für mindestens 24 Monate folgt die Erhaltungstherapie mit bspw. Methotrexat. Für Patienten mit t(9;22) Translokation wird die zusätzliche

## Einleitung

kontinuierliche Gabe eines Tyrosinkinasehemmers (z. B. Imatinib) empfohlen. Nach fünf Jahren leben noch rund 90 % der betroffenen Kinder (Bonaventure et al. 2017). Eine Intensivchemotherapie erfordert Supportivmaßnahmen, wie beispielsweise Infektprophylaxe, besondere Ernährungsanpassungen, eine kurzfristig zu ermöglichende intensive Sepsistherapie bei Verdacht einer Infektion, eine suffiziente Schmerztherapie sowie den Ersatz von Blut und Plasmabestandteilen, aber auch eine umfassende psychosoziale Betreuung. Ist das Rezidivrisiko erhöht, ist eine allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation in erster Remission indiziert, wenn es einen HLA-identischen Geschwisterspender, einen haploidentischen oder einen unverwandten passenden Spender gibt. Innerhalb von drei bis vier Monaten nach dem Erreichen der Remission sollte die Transplantation durchgeführt werden. Zurzeit gelten als Indikation für eine Stammzelltransplantation die Translokation t(9;22) und/oder BCR-ABL-Rekombination sowie die Translokation t(4;11) und/oder MLL-AF4 Rekombination in Abhängigkeit vom molekularen Therapieansprechen. Ferner gilt dies auch bei eindeutig hoher Blastenlast (> 5 % Blasten im KM) nach 4- bis 5-wöchiger Induktionstherapie bei T-ALL, in Kombination mit einer hohen persistierenden MRD-Last im Verlauf der Konsolidierungstherapie (Escherich et al 2016). Neuere Therapieansätze und Kombinationsversuche betreffen unter anderem das Eingreifen in epigenetische Regulationsmechanismen und in die Autophagie-Vorgänge (Timms et al. 2016).

### **2.1.5 Ursachen für prednisone poor response (PPR) in Leukämien**

Die Reaktion der Zellen auf Glukokortikoide ist einer der stärksten Prädiktoren für den Therapieerfolg bei Kindern mit einer ALL (Dördelmann et al. 1999). Es wurde gezeigt, dass Dexamethason Autophagie in ALL-Zellen induziert und dass dieser Mechanismus von entscheidender Bedeutung bei der Abtötung der Leukämiezellen durch Glukokortikoide zu sein scheint (Grander et al. 2009, Dyczynski et al. 2018). So unterscheidet sich auch die Expression von 36 Autophagie-Genen in Glukokortikoid-resistenten B-ALL-Zellen von denen, die Glukokortikoid-sensibel sind. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass die Antwort der Autophagie auf die Glukokortikoid-Behandlung wichtig für den behandlungsassoziierten Zelltod in ALL-Zellen ist (Rothe et al. 2019). Auf der Suche nach den Ursachen der PPR und um auf dieser Basis neue Therapiekonzepte entwickeln zu können, wurden mehrere Ansätze in unterschiedlichen Signalwegen gefunden. Viele Mechanismen wurden bisher schon untersucht, um zu erklären, wie eine solche PPR entstehen kann. Jedoch ist festzuhalten, dass diese Resistenzentstehung auf Basis aller Daten bisher noch nicht völlig verstanden werden konnte. Glukokortikoidrezeptor- und Co-

## Einleitung

Chaperon-Veränderungen sind wahrscheinlich nicht die Ursache der Glukokortikoid-Resistenz. Es scheint sich vielmehr um ein Zusammenspiel mehrerer Mechanismen zu handeln (Bhadri et al. 2012). Unter anderem konnte in Studien gezeigt werden, dass die Lymphozyten-spezifische Protein-Tyrosinkinase (LCK) eine übermäßige Aktivität in solchen resistenten Zelllinien aufweist. Inhibitoren wie Dasatinib und Bosutinib konnten in vitro und in vivo diese Resistenz durchbrechen (Serafin et al. 2017). Auch Effekte am Glukokortikoid-Rezeptor, wie beispielsweise die Überexpression von AKT, einem Inhibitor der Glukokortikoid-Wirkung und somit auch der Glukokortikoid-induzierten Apoptose, kann eine solche Resistenz auslösen. Eine Blockade von AKT konnte ebenfalls die Resistenz mindern (Piovan et al. 2013). Auch epigenetische Veränderungen geraten immer mehr als neue potenzielle Therapieziele bei der Bekämpfung der Glukokortikoid-Resistenz in den Fokus. So konnten z. B. durch Hemmung der Histon-Deacetylase 4 T-ALL-Zellen für Etoposid-vermittelten Zelltod sensibilisiert werden (Gruhn et al. 2013). Ebenfalls liegt die KDM6B in AML- sowie in ALL-Zelllinien vermehrt vor (Li et al. 2018). Diesen Ansatz verfolgte ich in dieser Arbeit weiter.

## **2.2 Funktion und Inhibition von Histon-Lysin-Demethylasen**

### **2.2.1 Epigenetik in der Kanzerogenese**

Unter Epigenetik verstand man einst die Interaktion zwischen Umwelt und Genom. Heute umfasst dieser Begriff genetische Variationen, welche nicht durch Änderungen im genetischen DNA-Code erklärt werden können. Inbegriffen sind hier die DNA-Modifikation, RNA-Modifikation und Histon-Modifikation (Handy et al. 2011). In dieser Arbeit möchte ich hauptsächlich auf die Rolle der Histon-Modifikation, insbesondere der Histon-Methylierung eingehen. Es wird hierbei allgemein in Systeme von schreibenden, lesenden und löschenden Enzymkomplexen unterschieden. Eine Gruppe der ‚Löschenzyme‘ soll besonders hervorgehoben werden: die Histon-Lysin-Demethylasen (KDM). Es werden zwei in dieser Gruppe unterschieden: die Lysin-spezifische-Demethylase (LSD) und die Jumonji-C-Demethylase (JMJC). In einigen primären Tumoren wird gehäuft eine Überexpression einzelner Histon-Demethylasen nachgewiesen. Das macht sie zu bevorzugten Zielen für Therapieansätze. Zu den JMJC-Demethylasen gehört die KDM6B, auch JMJD3 genannt (Hojfeldt et al. 2013). Diese scheint vor allem bei der T-ALL eine bedeutende Rolle zu spielen (Ntziachristos et al. 2014).

## Einleitung

### 2.2.2 Histon-Lysin-Demethylasen (KDM)

Bei den KDM handelt es sich um Enzyme, welche die Histon-Methylierung durch Abspaltung einer bzw. je nach Enzym auch mehrerer Methylgruppen verändern (Thinnes et al. 2014, Hojfeldt et al. 2013). Bis vor wenigen Jahren war man der Ansicht, dass die Histon-Methylierung nur durch Histonaustausch oder DNA-Replikation verändert werden könne. Mit der Entdeckung des Enzyms Lysin-spezifische-Demethylase-1 (LSD1) änderte sich diese Lehrmeinung (Hojfeldt et al. 2013). Daraufhin wurden viele weitere Enzyme dieser Gruppierung entdeckt und erforscht. Es werden zwei Klassen unterschieden, zum einen die LSD-Familie und zum anderen die JMJC-Domäne-enthaltenden Enzyme (Shi und Tsukada 2013).

Die LSD-Familie beinhaltet zwei Enzyme – die LSD1 und die LSD2. Diese enthalten eine FAD-abhängige aminooxidaseähnliche Untereinheit (AOL-Einheit) sowie eine SWIRM-Untereinheit, welche typisch für chromatinassoziierte Enzyme ist. LSD-Enzyme können nur einfach und zweifach methylierte Histone modifizieren, jedoch keine Trimethylierungen verändern. Außerdem kann LSD1 auch modifizierte, nicht histonzugehörige Lysine demethylieren, beispielsweise den Transkriptionsfaktor p53 und die DNA-Methyltransferase 1 (Hojfeldt et al. 2013).

Die zweite Klasse – die JMJC-Demethylasen – beinhalten eine JMJC-katalytische Untereinheit (Klose et al. 2006). Diese scheint in über 30 humanen Proteinen enthalten zu sein. Nur ein Teil dieser Proteine fungieren als Histondemethylase. Auf der Basis dieser Untereinheit werden diese Enzyme in sieben Subfamilien eingeteilt. Für den Katalysationsprozess werden zwei Kofaktoren benötigt: Eisen und 2-Oxoglutarat (Hojfeldt et al. 2013). Zu diesen Gruppen gehören viele verschiedene Demethylasen, welche in Abbildung 1 gezeigt sind. Unter anderem zählt hierzu die KDM6B, die durch Modifizierung des Lysins an Histon H3K27 eine besondere Rolle bei der Genese der T-ALL zu spielen scheint. Die Expression dieses Enzyms wird vorrangig durch Inflammation sowie durch Kontakt mit viralen und onkogenen Stimuli angeregt. Es ist an neuronalen und epidermalen Differenzierungsprozessen beteiligt und hemmt die Zellreprogrammierung. Außerdem lassen einige Experimente vermuten, dass onkogenetische Programme in T-ALL-Zellen von der Interaktion zwischen KDM6B und dem NOTCH1-Gen abhängig sind (Ntziachristos et al. 2014). Analysen humaner Leukämiefälle zeigten, dass die KDM6B in vermehrtem Ausmaß in T-ALL-Zellen exprimiert ist, als es in normalen T-Zellen oder anderen Leukämiearten der Fall ist (Ntziachristos et al. 2014).

# Einleitung

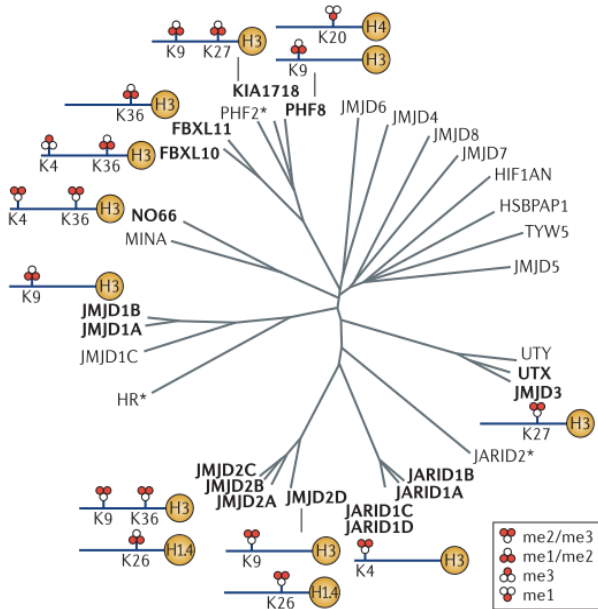


Abb. 1: Übersicht über die JMJC-Demethylasen und deren Zielstrukturen (Hojfeldt et al. 2013)

## 2.2.3 Tumorassoziierte KDM's

Im Zuge mehrerer Forschungsarbeiten wurde festgestellt, dass Veränderungen der Expression der KDM's mit der Entstehung verschiedener Tumorentitäten korrelieren. Einige Beispiele sind in Tabelle 3 aufgeführt (Hojfeldt et al. 2013). Im Besonderen soll in dieser Arbeit die Rolle der KDM6B bei der Entstehung der ALL beleuchtet werden. Es wurde gezeigt, dass dieses Enzym essenziell für die Initiation sowie den Erhalt der T-ALL zu sein scheint. Dies geschieht vorrangig durch epigenetische Interaktion mit dem onkogenen NOTCH1-Weg (Ntziachristos et al. 2014).

Histonlysine-Demethylase	Histon	Krankheitsassoziation
LSD1	H3K4me1/2 H3K9me1/2	Überexpression u.a. in Prostata-, Lungen-, Darm- und östrogenrezeptornegativen Blasenkrebs
LSD2	H3K4me1/2	Überexpression in Urothelkarzinomen
KDM2B	H3K36me1/2 H3K4me3	Überexpression in vielen Leukämien und Blasenkrebszellen
KDM6A	H3K27me2/3	Mutiert in Patienten mit Multiplem Myelom und CML, sowie in klarzelligen Nierenzellkarzinomen; Überexpression in Brustkrebs
KDM6B (JMJD3)	H3K27me2/3	Überexpression in Lungen- und Leberkrebs sowie in vielen hämatoonkologischen Erkrankungen; Überexpression in Neutrophilen von Patienten mit ANKA-assoziierten Vaskulitiden sowie in primären Hodgkin-Lymphomen

Tabelle 3: Übersicht gewählter KDM-assoziiierter Krankheiten (Hojfeldt et al. 2013)



## Einleitung

### 2.2.4 GSK-J4

Ein Inhibitor der KDM6B ist GSK-J4. Dieser ist weitgehend spezifisch für die KDM6B, wirkt jedoch mit geringerer Affinität auch auf das Enzym KDM5B inhibierend (Mathur et al. 2017). JMJC-Demethylasen sind insbesondere von zwei Cofaktoren abhängig,  $\alpha$ -Ketoglutarat und Eisen. GSK-J1 ist ein kompetitiver Inhibitor dieser zwei Cofaktoren (Heinemann et al. 2014). Da GSK-J1 eine sehr polare Carboxylgruppe enthält, ist es schlecht zellmembrangängig. Daher wurde GSK-J4 als eine Vorstufe (so genanntes Prodrug) entwickelt, um dieses Problem durch Maskierung mittels einer Esterbindung zu umgehen (Kruidenier et al. 2012). Durch Bindung eines dieser Inhibitoren an eine Seitenkette des Enzyms wird unter anderem die lipopolysaccharidinduzierte proinflammatorische Zytokinproduktion in Makrophagen reduziert (Thinnes et al. 2014).

GSK-J4 ist ein vielversprechendes Mittel zur selektiven Modulation des Levels von H3K27me3 in Zellen. Dies ist von Nutzen bei der Erforschung der Funktion dieser epigenetischen Modifikation und bei der Evaluation ihrer Rolle in der Zellfunktion. Zudem wird GSK-J4 zunehmend in Zellkulturen beim Kampf gegen Krebs erprobt. Hierbei sind vor allem Erfolge bei der Behandlung der ALL und des kindlichen Hirnstammglioms in experimenteller Umgebung gezeigt worden (Sakaki et al. 2015). Auch bei der Bekämpfung des Neuroblastoms zeigt GSK-J4 in Zell- und Maus-Modellen einen positiven Effekt (Lochmann et al. 2018). Außerdem wurde in Zellexperimenten festgestellt, dass die Hemmung der KDM6B durch GSK-J4 in GCB-DLBCL-Zellen direkt toxisch wirkt und dass dieser Inhibitor einen zellsensibilisierenden Effekt für verschiedene Chemotherapeutika bewirkt (Mathur et al. 2017). Weiter konnte in AML-Zellreihen bereits gezeigt werden, dass GSK-J4 durch Inhibition von Schlüsselregulatoren der DNA-Replikation nicht nur das Level an H3K27me3 senkt, sondern - dadurch mediiert - auch die Expression der HOX-Gene supprimiert. Diese sind unter anderem von wesentlicher Bedeutung bei dem Mechanismus der Resistenzfähigkeit von AML- und ALL-Zellen (Li et al. 2018, Alharbi et al. 2013).

### 2.3 Autophagie und Kanzerogenese

Autophagie ist ein Überbegriff für verschiedene stressensitive zelluläre Abbauege in eukaryotischen Zellen. In jeder Zelle laufen kontinuierlich auf einem basalen Niveau Autophagievorgänge ab (Dupont und Codogno 2016, Rubinsztein et al. 2012).

Es sind drei Formen der Autophagie bekannt. Zum einen gibt es die Mikroautophagie, bei welcher cytosolisches Material durch direkte Internalisierung im Lysosom abgebaut wird.

## Einleitung

Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie wird eine bestimmte markierte Teilmenge (KFERQ-Motiv) der Proteine selektiv abgebaut (Denton und Kumar 2019). Diese Arbeit betrachtet vor allem den Prozess der Makroautophagie näher, welche im Folgenden immer als Autophagie bezeichnet wird. Makroautophagie beinhaltet die Isolation und den anschließenden Abbau cytosolischen Materials. Insbesondere spielt sie eine Rolle bei der Qualitätskontrolle des Cytoplasmas und bei der Beseitigung von Proteinaggregaten, beschädigten Zellorganellen und intrazellulären Pathogenen. Außerdem ist sie beim Recycling und der Mengenkontrolle intrazellulärer Bestandteile wie Aminosäuren, Lipiden und Kohlenhydraten beteiligt und beeinflusst somit direkt die Regulation von Metabolismus und Energie (Morel et al. 2017). Überdies ist sie auch an Vorgängen beteiligt, welche Zellen vor Modifikationen schützen, die mit der Zellalterung zusammenhängen. Schlussendlich ist die Makroautophagie in Prozessen beteiligt, welche den Organismus beispielsweise vor Krebsleiden, Infektionen und neurodegenerativen Erkrankungen schützen (Rubinsztein et al. 2012, Morel et al. 2017). Auch Lebererkrankungen konnten mit einer fehlerhaften Autophagie in Verbindung gebracht werden (Djavaheri-Mergny et al. 2019). Makroautophagie beginnt – vereinfacht dargestellt – mit der Formation einer Phagophore – einer vorübergehend vorhandenen, becherförmigen Doppelmembranstruktur – welche zumeist aus dem ER hervorgeht (Initiation). Im Verlauf umschließt die Phagophore einen Teil des Zytoplasmas. Durch Membranerweiterung und -fusion entsteht ein Autophagosom (Elongation). Das Autophagosom fusioniert dann mit einem Lysosom. Es entsteht ein Autolysosom (Maturation). Der Inhalt des entstandenen Vesikels wird nun abgebaut und recycelt (Morel et al. 2017).

Reguliert wird dieser Prozess über Komplexe aus Autophagie-related-proteins (ATG) (Rubinsztein et al. 2012). Ein wichtiger physiologischer Inhibitor der Autophagie ist mTOR, welcher die Autophagie durch die Phosphorylierung der Autophagie-initiiierenden Kinase ULK 1 hemmt (Djavaheri-Mergny et al. 2019). Rapamycin (auch als Sirolimus bekannt), ein Hemmstoff von mTOR, kann die Autophagie auch in Zellen induzieren, die sich in einem optimalen Ernährungszustand befinden (Mizushima et al. 2011, Morel et al. 2017). In Abbildung 2 sind die einzelnen Schritte der drei Autophagievarianten ausführlich grafisch dargestellt (Morel et al. 2017).

## Einleitung

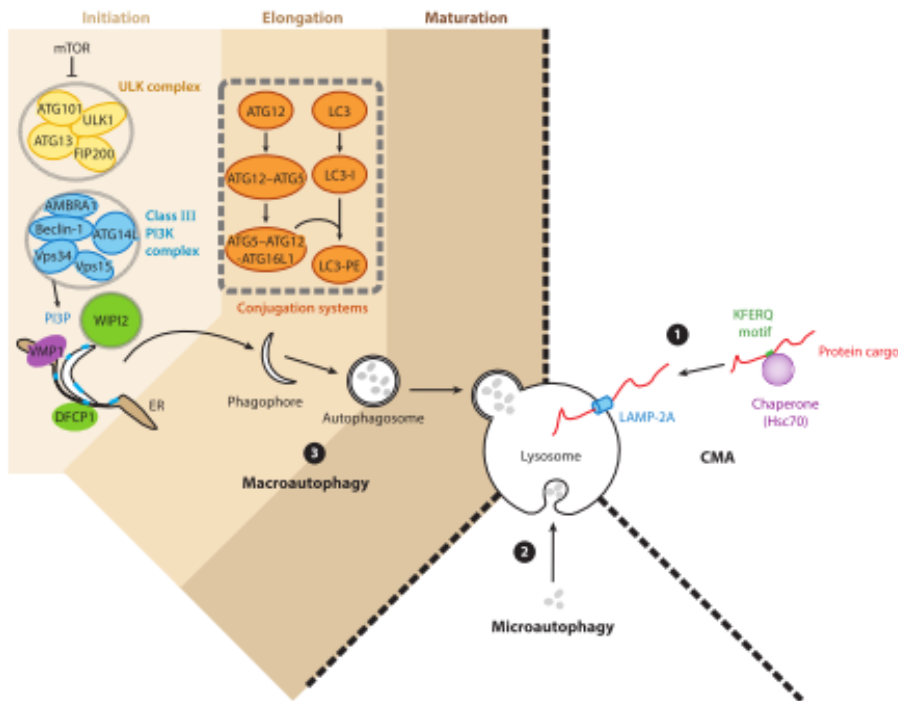


Abb. 2: Autophagievorgänge;

1) Chaperon-vermittelte

Autophagie

2) Microautophagie

3) Macroautophagie

(Morel et al. 2017)

Autophagie kann durch verschiedenste physiologische, aber auch pathologische Vorgänge ausgelöst werden (King et al. 2014, Morel et al. 2017). Sie spielt folglich eine Rolle bei der Gewebemöostase, der Stressanpassung, der Immunantwort und bei der Regulation von Entzündungsantworten (Morel et al. 2017). Autophagie schützt die Zelle als so genannter ‚survival pathway‘ vor chronischer Gewebsschädigung und Zelltod und kann somit einer Krebsinitiation und -progression vorbeugen (Codogno und Meijer 2005). Unter anderem bietet der Abbau depolarisierter Mitochondrien durch Vermeidung einer ROS-Überproduktion einen Schutz. Dem gegenüber steht, dass einmal entstandene Krebszellen durch Stimulation ihrer eigenen Autophagie ihre Überlebensfähigkeit erhöhen, in ihrer Metastasierung unterstützt werden und damit verbunden auch ihre Resistenz gegenüber Chemotherapeutika steigern können (Chen und White 2011, Sui et al. 2013, Manic et al. 2014). Auch Zelltod kann mit einer exzessiven Erhöhung der Autophagie einhergehen und stellt somit eine Alternative zum programmierten Zelltod dar (Debnath J 2005). Durch die Fähigkeit der Autophagie, Zelltod auszulösen, kann sich eine Autophagiesteigerung auch tumorsuppressiv auswirken. Der durch Autophagie ausgelöste Zelltod wird auch als programmierter Zelltod vom Typ II bezeichnet. Dieser tritt im Gegensatz zur Apoptose unabhängig von der Caspase-Aktivität auf. Somit fehlt die Nekrose-verbundene Entzündungsreaktion des Gewebes, welche anderenfalls die Tumorbildung fördern könnte (Bishop und Bradshaw 2018). Zudem sind aufgrund der kontrovers-kontextabhängigen Rolle der Autophagie in Bezug auf die Kanzerogenese sowohl Induktion als auch Hemmung der Autophagie mögliche Angriffspunkte der

## Einleitung

antitumorösen Therapie (Levy et al. 2017). Hemmung oder unkontrollierte Aktivierung der Autophagie sind assoziiert mit Krankheitsbildern wie Diabetes, Fettleibigkeit, kardiovaskulären, neurodegenerativen, chronisch inflammatorischen und immunologischen Erkrankungen, Infektionen, aber auch mit Krebserkrankungen wie Mamma-, Ovarial-, Prostata-, Lungen- und Hirntumoren (Morel et al. 2017).

Chloroquin ist ein Hemmstoff der Autophagie und verhindert den Abbau von Autophagosomen (Redmann et al. 2017). Dadurch reichern sich die durch die basale Autophagie entstandenen Autophagosomen in der Zelle an. Chloroquin und auch Hydroxychloroquin sind ursprünglich Anti-Malaria-Mittel und wurden in den letzten Jahren als vielversprechende Antikrebsmittel erprobt (Kimura et al. 2013).

### **2.4 Zielstellung der Arbeit**

Analysen humaner Leukämiefälle zeigten, dass die Expression von KDM6B (auch als JMJD3 bekannt) in T-ALL Zellen höher ausfällt als in normalen T-Zellen (Ntziachristos et al. 2014). Eine erhöhte KDM6B-Expression wurde auch in AML-Zellen gezeigt (Li et al. 2018). Im Zuge einer Doktorarbeit am Universitätsklinikum Jena konnte anhand von Patientenproben festgestellt werden, dass eine erhöhte Expression von KDM6B mit einer erhöhten Glukokortikoid-Resistenz assoziiert war und so ein schlechteres Therapieresultat zur Folge hatte. In der hier vorgelegten Arbeit soll überprüft werden, ob in zwei T-ALL-Zelllinien – CCRF-CEM und Jurkat – die Glukokortikoid-Resistenz durch Inhibition der KDM6B mittels GSK-J4 überwunden werden kann. Dazu muss initial die Wirkung von GSK-J4 auf die zwei Zelllinien untersucht werden. Des Weiteren soll untersucht werden, inwiefern die Autophagie und Änderungen des Autophagie-Ausmaßes durch Inhibition der KDM6B eine Rolle bei der Stereoid-Resistenz spielen. In diesem Zusammenhang soll mit Hilfe von Chloroquin überprüft werden, ob GSK-J4 die Autophagie induziert oder hemmt. Es soll außerdem untersucht werden, ob eine Kombination von Vincristin und GSK-J4 einen Vorteil gegenüber der alleinigen Therapie mit Vincristin bietet und ob dabei Änderungen des Autophagie-Ausmaßes eine Rolle spielen. Auch soll geklärt werden, inwiefern eine Kombination von GSK-J4 und Chloroquin Zelltod und Autophagie beeinflussen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

Die folgend aufgeführten Materialien und Chemikalien wurden direkt von den Herstellern bzw. über die Universitätsapotheke Jena bezogen.

##### 3.1.1 Allgemein verwendetes Material und Geräte

<b>Accu-jet® Pipette Controller</b>	BrandTech® Scientific
<b>BBD 6220 CO2 Brutschrank (CO<sub>2</sub> 5 %, 37 °C)</b>	Thermo Scientific
<b>BD FACSCanto™ II Durchflusszytometer</b>	BD Biosciences
<b>BD Falcon™ Rundbodenröhrchen, 5 ml</b>	BD Biosciences
<b>BioPhotometer plus</b>	Eppendorf
<b>Cellstar® Zellkulturplatten (6/12 Well)</b>	Greiner Bio-One GmbH
<b>Cellstar® Tubes, 15/50 ml</b>	Greiner Bio-One GmbH
<b>Cellstar® Kulturflasche, 5/20 ml</b>	Greiner Bio-One GmbH
<b>Cellstar® Serologische Pipette 1/2/5/10 ml</b>	Greiner Bio-One GmbH
<b>Centrifuge 5415R</b>	Eppendorf AG
<b>Combitips Plus 1,0/2,2/5,0/10,0/25,0 ml</b>	Eppendorf AG
<b>Einfrierautomat TRA-14</b>	Cryoson
<b>Eisbereiter</b>	Nordcap
<b>Eppendorf Reference®</b>	Eppendorf AG
<b>Kryoröhrchen 2 ml</b>	Greiner Bio-One GmbH
<b>Micro Amp optical Adhesive Film</b>	Applied Biosystems
<b>Micro Amp optical 96-Well Reaction Plate</b>	Applied Biosystems
<b>Mikroskop</b>	Carl Zeiss Jena, Leica
<b>Mikrozentrifuge</b>	Labaratory & Medical Supplies
<b>Multipette® plus</b>	Eppendorf AG
<b>Neubauer Zählkammer (Improved)</b>	Assistent Germany, Bad Blankenburg
<b>Nitrilhandschuhe</b>	Rösner-Mautby Meditrade
<b>Pasteur- Plastikpipetten, 3 ml</b>	Greiner Bio One GmbH
<b>Pipetten Eppendorf Reference variabel</b>	Eppendorf AG

## Material und Methoden

<b>5,0-10, 10-100, 50-200, 1000 µl</b>	
<b>Pipettenspitzen 10/200/1000 µl</b>	Eppendorf AG
<b>Pipettierhilfe accu-jet® pro</b>	Brand, Wertheim
<b>Präzisions-Quarzküvette</b>	Hellma, VWR International
<b>Safe Lock Röhrchen 0,5/1,5 ml</b>	Eppendorf AG
<b>Sterilwerkbank, HERA safe KS 12</b>	Thermo Scientific
<b>Vortex-Genie®2</b>	Scientific Industries, Inc., New York
<b>Wasserbad</b>	Julabo, GFL
<b>Zellzähler Counter AC-14</b>	Karl Hecht AG
<b>Zentrifuge Rotina 420R</b>	HETTICH, Bäch, Schweiz
<b>4 °C Kühlschrank, -20 °C Gefrierschrank</b>	
<b>7900HT Fast Real-Time PCR-System</b>	Applied Biosystems

### 3.1.2 Reagenzien und Kits

<b>BD™Cytometer Setup &amp; Tracking Beads</b>	BD Biosciences
<b>Chloroquin (Stammlösung 25mM)</b>	Enzo, life science
<b>Cyto-ID</b>	Enzo Life Sciences, Inc.
<b>Descosept AF, Desinfektionsmittel</b>	Dr. Schumacher GmbH
<b>Dexamethason (Stammlösung 10 nM)</b>	JENAPHARM®
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	Carl Roth
<b>DiIC<sub>1</sub>(5)</b>	Thermo Fischer/Molekular Probes
<b>Ethanol</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Fetales Kälberserum (FKS)</b>	PAA Laboratories
<b>Glutamin</b>	PAA Laboratories
<b>GSK-J4 (Stammlösung 5 mM)</b>	Cayman/Biomol
<b>Meliseptol® HBV Desinfektionstücher</b>	B. Braun Melsungen
<b>Omniscript® RT Kit QIAGEN</b>	QIAGEN
<b>PBS (phosphate buffered saline)</b>	PAA Laboratories
<b>pegGOLD Total-RNA-Kit</b>	Peqlab
<b>Penicillin G/Streptomycin</b>	PAA Laboratories
<b>Propidiumiodid, Stammlösung 1 mg/ml Endkonzentration: 2 µg/ml</b>	SIGMA, St. Louis, USA

## Material und Methoden

<b>RNase OUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor</b>	Invitrogen
<b>RPMI-1640 mit stabilem Glutamin</b>	PAA Laboratories
<b>TaqMan® Gene Expression Assay (Primer-Sonden, Universal PCR Master Mix)</b>	Applied Biosystems
<b>Triton X-100</b>	SIGMA
<b>Trypanblau 0,5 % (w/v) in PBS</b>	Biochrom AG, Berlin
<b>Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure, 1x/10x</b>	PAA Laboratories
<b>Vincristin (Stammlösung 1 mM)</b>	Hexal AG

### 3.1.3 Patienten- und Knochenmarkspenderproben

Durch andere kürzlich durchgeführte Experimente lag die isolierte komplementäre DNA (cDNA) der verwendeten acht Knochenmarkspenderproben bereits vor. Diese wurde bei -20 °C gelagert.

### 3.1.4 Zelllinien

**CCRF-CEM:** humane T-Zell-Leukämie-Zelllinie, 1964 etabliert aus dem peripheren Blut eines dreijährigen kaukasischen Mädchens mit akuter lymphoblastischer Leukämie in terminalem Rezidiv

Morphologie: teiladhärente Zellen, die als runde, vereinzelte Zellen in Suspension und adhärent als monomolekulare Schicht wachsen

Depositor: Dr. H. G. Drexler, ACC 240, Lot 6. - 20.03.2009, Braunschweig, DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)

Inkubation: 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>

**Jurkat:** humane T-Zell-Leukämie-Zelllinie, die 1976 aus dem peripheren Blut eines vierzehnjährigen an ALL erkrankten Jungen im ersten Rezidiv isoliert wurde

Morphologie: runde Zellen, die vereinzelt oder in Zellhaufen in Suspension wachsen

Depositor: Dr. Jun Minowada, ACC 282, Lot 15. 31.08.2009, DSMZ

## Material und Methoden

Inkubation: 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>

### 3.1.5 Medium und Puffer

Komplettmedium für CCRF-CEM und Jurkat:

500 ml – 90 %	RPMI-1640 [mit Ultraglutamin]
50 ml – 10 %	Fetales Kälberserum
100 units pro ml	Penicillin G
0,1 mg/ml	Streptomycin

### 3.1.6 Software

BD FACSDiva	BD Bioscience 2000
CompuSyn	Combosyn incorporated
OriginPro 2017G	OriginLab
7900 HT SDS 2.4.	Applied Biosystems

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultivierung

#### 3.2.1.1 Auftauen und Kultivieren der kryokonservierten Zellen

Die Zelllinie wurde bei einer Temperatur von -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Durch Auftauen eines Aliquots mit dem Inhalt von 0,5 Millionen Zellen (CCRF-CEM) bzw. 2 Mio. Zellen (Jurkat) im Wasserbad bei 37,0 °C konnte eine neue Zellkultur angesetzt werden. Unter der sterilen Werkbank wurden die aufgetauten Zellen in 16 ml Medium überführt. Folgend wurde die Zellsuspension für drei Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 6 ml frischem Komplettmedium resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen in eine unbeschichtete 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche gegeben. Die Inkubation der Stammkulturen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit. Die CCRF-CEM-Zellen wuchsen teils in Suspension und teils adhärent (teiladhärent). Jurkat-Zellen wuchsen in Suspension teils einzeln, teils in Klumpen. Die Zellen der Passagen 4 bis 29 wurden für die Versuche eingesetzt. Das Auftauen der Kryokulturen wurde freundlicherweise von Sabine Becker übernommen.

#### 3.2.1.2 Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage passagiert, um ein Überwachsen der Kultur zu vermeiden. Entsprechend wurden 1,5 bis 2 Millionen Zellen pro 75 cm<sup>2</sup>-Flasche von den CCRF-CEM-Zellen bzw. 3 bis 4 Millionen der Jurkat-Zellen eingesät. Zunächst wurde mittels einer serologischen Pipette unter sterilen Bedingungen das alte Medium entfernt



## Material und Methoden

und in einem 50 ml-Röhrchen gesammelt. Die 75 cm<sup>3</sup>-Kulturflasche wurde zweimal mit je 5 ml DPBS gespült. Aufgrund der Teiladhärenz der CCRF-CEM-Zellen wurde zur Ablösung haftender Zellen der Flaschenboden mit 2,5 ml 37 °C warmem Trypsin/EDTA überschichtet, für zweimal 5 min inkubiert und nach den ersten und zweiten 5 min durch sanftes Beklopfen gelöst. Durch Zugabe von 5 ml RPMI-Medium wurde die Trypsin-Wirkung gestoppt und danach die Kulturflasche erneut mit 10 ml des gleichen Mediums gespült. Die jeweiligen Spülflüssigkeiten wurden wiederum in dem 50 ml-Röhrchen gesammelt. Die Trypsinierungsschritte entfielen beim Umgang mit den Jurkat-Zellen. Im Anschluss wurde das nun gefüllte 50 ml-Röhrchen über Kopf geschwenkt und für 4-5 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mittels steriler Pasteurpipette in 10 ml frischem RPMI-Medium gelöst, bis eine homogene Suspension vorhanden war.

### 3.2.1.3 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Zur Zellbestimmung wurden 20 µl der Zellsuspension entnommen und gemeinsam mit 20 µl Trypanblau in einem Eppendorfhütchen im Verhältnis 1:2 gemischt, mit einem Votexer homogenisiert und vereinzelt. Davon wurden 10 µl in eine Neubauerzählkammer pipettiert. Zur Erfassung der Anzahl der Zellen in 1 ml Suspension wurde unter einem Mikroskop die Zellzahl in zwei der vier äußeren Quadrate, die je aus 16 Kleinquadraten bestehen, bestimmt. Das Volumen eines Großquadrats beträgt 0,1 µl (1 mm Seitenkante x 1 mm Seitenkante x 0,1 mm Schichtdicke). Unter Verwendung des sauren Farbstoffs Trypanblau, welcher sich nur in Zellen mit einer geschädigten Zellmembran ansammelt, konnte die Vitalität der Zellen beurteilt werden. Blau gefärbte Zellen haben dementsprechend ihre Vitalität verloren. Die Vitalität errechnet sich als Quotient aus der Anzahl lebender Zellen im Verhältnis zu der Gesamtzahl, multipliziert mit 100 %. Durch Multiplikation der erhaltenen Zellzahl mit 10.000 kann die Anzahl der Zellen pro ml berechnet werden. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors von Trypanblau (1:2) multipliziert man mit zwei und dividiert durch die Anzahl der Quadrate (in diesem Fall durch zwei).

$$\text{Zellen pro 1 ml Suspension} = \frac{\text{Zellzahl} \times 2 \times 10^4}{\text{Anzahl der Großquadrate}}$$

### 3.2.1.4 Fortführen der Zellkultur

Für jede zweite Passage wurde eine neue Kulturflasche mit der jeweils gewünschten Zellzahl angelegt. Vor jedem Passagievorgang wurde die Flasche mikroskopisch nach Dichte, Adhärenz und potenziellen Verunreinigungen der Zellkultur kontrolliert. Für den

## Material und Methoden

Passagierzeitraum von Montag bis Freitag wurden  $1,5 \times 10^6$  CCRF-CEM-Zellen eingesät, von Freitag auf Montag hingegen  $2,0 \times 10^6$ . Bei den Jurkat-Zellen handelte es sich um Passagierzahlen von 3 bzw. 4 Millionen Zellen. Hierbei wurde die gewünschte Sollzellzahl pro Flasche durch die ermittelte Zellzahl dividiert. Das so erhaltene Volumen der Zellsuspension mit der richtigen Zellanzahl wurde in eine sterile 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche eingesät, in der bereits Kompletmedium vorgelegt war. Das vorgelegte RPMI-Medium wurde so berechnet, dass die Flasche insgesamt 20 ml der neu entstandenen Zellsuspension enthielt. Im Inkubator verblieb die Kultur dann bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt sowie 95 % Luftfeuchtigkeit bis zum erneuten Passagieren.

### 3.2.1.5 Aussäen der Zellen für funktionelle Versuche

Nach der Bestimmung der Zellzahl erfolgte das Aussäen der suspendierten Zellen in 37 °C warmen RPMI-Medium. Dafür wurden die Zellen in frischem Medium verdünnt. Es wurden für den PI-/DiIC<sub>1</sub>(5)-/Cyto-ID-Autophagietest 150.000 Zellen pro Well für 48 h und 130.000 Zellen pro Well für Analysen über 72 h verwendet. Die Berechnung des zu verwendenden Volumens ergibt sich aus dem Sollwert, dividiert durch den Zählwert:

$$\frac{\text{Notwendiges Volumen} \left( \text{Wellzahl} \times 130.000 \text{ bzw. } 150.000 \frac{\text{Z}}{\text{Well}} \right)}{\text{in Neubauerkammer gezählte Zellzahl pro 1 ml}}$$

Nach Vorlage des benötigten Volumens an RPMI-Medium wurde die berechnete Menge an Zellsuspension in ein 50 ml-Tube pipettiert. Die Verdünnung wurde hierbei im Überschuss angesetzt. Unter Zuhilfenahme einer Multipette wurden pro Well 1 ml der Suspension ausgesät und anschließend für 24 h im Brutschrank inkubiert. Dabei wurden 12-Well-Platten verwendet. Vor jeder Behandlung erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Dichte und Adhärenz der Zellen.

### 3.2.1.6 Einfrieren und Lagern der Zellen

Zur dauerhaften Aufbewahrung der Zellen wurde die Zelllinie in Form eines Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert. Ein Aliquot beinhaltet zusätzlich zu den Zellen 5 % DMSO, 20 % FKS und 75 % RPMI-Medium.

### 3.2.2 Genexpressionsanalyse durch quantitative Real-Time-RT-PCR

Zur KDM-Expressionsanalyse mit Hilfe von quantitativer Real-Time-RT-Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde die cDNA von Spenderproben gesunder Probanden verwendet, die bereits von Rebekka Herrmann präpariert worden waren (Etikvotumnummer: 4066-04/14). Diese wurden bei -20 °C gelagert und zur Verwendung

## Material und Methoden

langsam bei Raumtemperatur aufgetaut. Außerdem wurden für die zwei Zelllinien Jurkat und CCRF-CEM jeweils zwei Expressionsanalysen für KDM6B durchgeführt. Hierfür wurde zunächst die RNA isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben.

### 3.2.2.1 Isolation der RNA und photometrische Messung

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem PegGOLD-Total-RNA-Kit®. Vor der RNA-Isolation wurden je 200.000 Zellen pro Well auf eine 6-Well-Kulturplatte ausgesät und nach 24-stündigem Wachstum wieder geerntet. Die Arbeitsschritte wurden äquivalent für beide Zelllinien durchgeführt, wobei nur CCRF-CEM-Zellen vor der Ernte mit Trypsin/EDTA inkubiert wurden. Zum Trennen der Zellen vom Medium wurden die Zellsuspensionen jeweils für drei Minuten bei 1800 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde auf Eis weiterverarbeitet. Nach der Zugabe von je 400 µl RNA-Lysis-Buffer-T wurde das gesamte Lysat auf eine DNA-Removing-Säule gegeben und für zwei Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen, der Unterstand mit 400 µl 70%-igem Ethanol vermischt und auf eine PerfectBind-RNA-Säule gegeben. Es folgte eine einminütige Zentrifugation bei 13000 U/min. So befand sich nun die RNA im Filter der Säule, der Unterstand konnte verworfen werden. Anschließend wurden 500 µl RNA-Washbuffer-I fünf Minuten auf der Säule belassen, wieder für 15 Sekunden bei 13000 U/min zentrifugiert und der Säulendurchfluss verworfen. Auf der Säule wurde danach für 15 Minuten mit 1,5 µl DNase I und 73,5 µl DNase Digestionbuffer I ein DNase-Verdau vorgenommen, um die DNA zu eliminieren. Anschließend wurden noch einmal 350 µl RNA-Washbuffer-I zur Säule gegeben und 15 Sekunden bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen. Danach wurden 500 µl RNA-Washbuffer-II auf die Säule pipettiert, für 15 Sekunden bei gleicher Geschwindigkeit zentrifugiert und der Unterstand verworfen. Dies wurde mit demselben Volumen RNA-Washbuffer-II und zweiminütiger Zentrifugation bei 13000 U/min wiederholt. Zum Schluss wurden 40 µl RNase-freies Wasser auf die PerfectBind-Säule pipettiert und dies ein letztes Mal für eine Minute bei 13000 U/min zentrifugiert, um die RNA zu eluieren. Im Unterstand der Säule wurde so die RNA der einzelnen Zelllinien aufgefangen und auf Eis weiterverarbeitet.

Mittels photometrischer Messung wurde die isolierte RNA quantifiziert. Hier wurde zunächst das Photometer mit RNase-freiem Wasser kalibriert. Entsprechend dem Verdünnungsfaktor wurden anschließend je 4 µl RNA und 76 µl RNase-freies Wasser in einer standardisierten Quarzküvette in das Photometer gestellt. Durch die Messung der Absorption bei 260 nm ( $A_{260\text{nm}}$ ) wurde die Konzentration bestimmt. Diese Wellenlänge entspricht dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Eine Absorptionseinheit

## Material und Methoden

entspricht 40 µg RNA pro ml. Die RNA-Konzentration kann somit wie folgt berechnet werden:

$$\text{RNA-Konzentration (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = A_{260\text{nm}} \times 0,04 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Um die Reinheit der Nukleinsäure-Lösung abzuschätzen, wurde eine weitere photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm, die dem Absorptionsmaximum von Proteinen entspricht, durchgeführt. Daraus wird der Quotient  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  berechnet. Liegt dieser zwischen einem Wert von 1,8 und 2,0, ist von reiner RNA ohne Proteinverunreinigungen auszugehen und die RNA kann weiterverarbeitet werden.

### 3.2.2.2 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Um eine Genexpressionsanalyse mit Hilfe der PCR durchzuführen, wird cDNA benötigt. Somit ist es notwendig, die isolierte RNA der Zelllinien mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umzuschreiben. Entlang eines RNA-Strangs wird hier mittels RNA-abhängiger DNA-Polymerase die komplementäre DNA synthetisiert. Durch die integrierte RNase-H-Funktion wird der hybridisierte RNA-Strang abgebaut. Zudem wird durch die zusätzliche DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität des Enzyms die Doppelstrang-cDNA erstellt.

Durchgeführt wurde die Reverse Transkription (RT) mit einem Omniscript® Kit der Firma QIAGEN. Hierbei wurden 0,5 µg RNA jeder Zelllinie mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 13 µl aufgefüllt. Zu diesen Proben wurden dann je 7 µl des folgenden Mix hinzu pipettiert.

Omniscript-Mix (je Probe aus dem QIAGEN Omniscript® RT Kit anzusetzen):

- 2 µl 10x Buffer-RT
- 2 µl dNTP-Mix
- 2 µl Random-Hexamer
- 0,25 µl RNase-Out (Invitrogen)
- 1 µl Omniscript-RT

Anschließend folgte eine einstündige Inkubation der Agentien bei 37 °C in einem Heizblock. Als Primer für die RT dienten die synthetisierten Random-Hexamer-Oligonukleotide. Das verwendete RNase-Out-Reagenz der Firma Invitrogen hemmte

## Material und Methoden

während des Prozesses die Zerlegung der RNA durch RNasen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die cDNAs bei -20 °C gelagert.

### **3.2.2.3 Durchführung der Real-Time-RT-PCR**

Die bereits isolierten cDNAs der Spenderproben wurden zur Quantifizierung der Genexpression verwendet. Diese wurden zunächst im Verhältnis 1:8 mit sterilem Wasser verdünnt, um eine ausreichende Menge für die PCR zu schaffen. Anschließend wurde für die KDM6B eine quantitative Real-Time-RT-PCR durchgeführt.

Das Prinzip der quantitativen Real-Time-RT-PCR beruht auf dem der herkömmlichen PCR. Durch Temperaturerhöhung auf über 90 °C kommt es zur Denaturierung der dsDNA in Einzelstränge. Die Primer-Sonde lagert sich durch Modulation der Temperatur an und die Elongation durch die temperaturbeständige Taq-Polymerase kann beginnen. Bei der Real-Time-RT-PCR kommt es in Echtzeit mit Hilfe besonderer fluorogener Sonden durch eine Fluoreszenzmessung zur Quantifizierung der synthetisierten DNA. Diese besitzen am 5'-Ende einen so genannten Quencher- und am 3'-Ende einen Reporterfarbstoff. Durch ein besonderes Energieübertragungssystem inhibiert dabei der Quencher das Fluoreszenzsignal des Reporters, sofern die Sonde intakt ist und beide Farbstoffe sich räumlich nah sind. Die Taq-Polymerase, die während der Elongation kontinuierlich Nukleotide anlagert, wirkt außerdem auch als 5'-3'-Exonuklease und entfernt am Ende jeder Elongation den Quencherfarbstoff am 5'-Ende. Somit wird das Fluoreszenzsignal des Reporters nicht mehr unterdrückt. Die Fluoreszenzintensität steigt proportional zu den PCR-Produkten an und erlaubt Rückschlüsse auf die amplifizierte DNA-Menge (Haras und Amoros 1994, Holland et al. 1991).

Die KDM6B-Expressionsanalyse wurde einmalig als Doppelbestimmung in CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen sowie als Referenz in Proben gesunder Knochenmarkspender durchgeführt. Vorbereitend für die PCR wurde jeweils ein 0,5 ml Safe-Lock-Tube mit 50 µl Reaktionsmix zur Doppelbestimmung gefüllt. Es wurden das KDM6B-Gen sowie das Referenzgen  $\beta_2$ -Mikroglobulin in den cDNA-Proben der CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen sowie in dem Knochenmarkpool und der Negativkontrolle untersucht.

## Material und Methoden

Der Reaktionsmix ergab sich für jede Probe aus:

11,25 µl sterilem Wasser

12,50 µl Universal PCR Mastermix

1,25 µl Primer-Sonden-Mix (Lysin-Demethylasen: FAM-Fluoreszenzfarbstoff,  $\beta_2M$ : VIC-Fluoreszenzfarbstoff).

Die zuvor eingefrorenen, verdünnten cDNA-Proben wurden anschließend aufgetaut und kurz zentrifugiert. Dann wurden jeweils 2 µl cDNA zu den 50 µl Reaktionsmix hinzugefügt. Folgend wurden die Proben wieder kurz gevortext und zentrifugiert. Zur doppelten Bestimmung der Proben wurden nun jeweils 25 µl in zwei Wells einer 96-Well-Platte pipettiert und mit einer Folie versiegelt. Diese Schritte wurden unter kontinuierlicher Kühlung auf Eis durchgeführt. Die 96-Well-Platte wurde ein letztes Mal zentrifugiert und folgend die quantitative Real-Time-RT-PCR mit dem 7900-HAT-Fast-Real-Time-RT-PCR System der Firma Applied Biosystem durchgeführt. Aufgezeichnet wurden die Ergebnisse mit Hilfe der Software SDS 2.4.

### 3.2.2.4 Auswertung der Real-Time-RT-PCR

Nach jedem PCR-Zyklus wird während der Real-Time-PCR mit Hilfe eines Detektors am Thermocycler die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs gemessen. Die erhobene Fluoreszenz ist dabei proportional zur amplifizierten DNA-Menge. Durch das Auftragen der einzelnen Fluoreszenzwerte ( $\Delta RN$ ) über die Zykluszahl ergibt sich für jede Probe eine so genannte Amplifikationskurve. Diese verläuft anfangs sehr flach, da die PCR-Produkte die Hintergrundfluoreszenz der Sonden (engl. *Baseline*) in diesem Bereich nicht überschreiten. Mit zunehmender Zykluszahl zeigt sich eine exponentielle Vermehrung der DNA, die sich in einem steilen Kurvenverlauf darstellt. Enzymerschöpfung und Substratverbrauch bedingen die Abflachung dieses Kurvenverlaufs am Ende der PCR. So entsteht eine sigmoide Amplifikationskurve für jede Probe. Dabei sollten die Kurven jeder Doppelbestimmung idealerweise identisch sein. Mit Hilfe der Auswertungssoftware wird der Verlauf jeder Amplifikationskurve verrechnet. Das Ergebnis ist der so genannte Cycle-Threshold Value ( $C_T$ -Wert), der die Zyklusanzahl angibt, bei der die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert (engl. *Cycle Threshold*) überschreitet. Das bedeutet, je höher der  $C_T$ -Wert, desto mehr PCR-Zyklen werden benötigt, um den Schwellenwert zu überschreiten und umso weniger cDNA ist somit in den Proben vorliegend. Dementsprechend hat jede Probe seinen eigenen  $C_T$ -Wert. Die  $C_T$ -Werte wurden für die Doppelbestimmungen gemittelt und nach der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode verrechnet. Bei dieser Methode werden zwei Differenzen als negativer Exponent zur Basis 2 berechnet. Eine

## Material und Methoden

Differenz ergibt sich durch die Normalisierung der gemittelten  $C_T$ -Werte der KDM6B zu den gemittelten  $C_T$ -Werten des Referenzgens  $\beta_2$ -Mikroglobulin:

$$\Delta C_T \text{Ziel} = C_T \text{Wert KDM} - C_T \text{Wert } \beta_2 \text{Mikroglobulin}$$

Die zweite Differenz repräsentiert die Normalisierung auf die  $C_T$ -Werte der Knochenmarkspenderproben. Dazu wurden die acht verwendeten Spenderproben gepoolt:

$$\Delta C_T \text{Kontrolle} = C_T \text{Wert Knochenmarkpool} - C_T \text{Wert } \beta_2 \text{Mikroglobulin}$$

Die Knochenmarkpoolwerte wurden als Bezugswerte gleich eins, d. h. 100 %, gesetzt. Somit zeigt sich die Expressionshöhe der KDM6B in den Zelllinien als ein Vielfaches der Expressionshöhe in gesunden Spenderproben. Berechnet wird dies mit folgender Formel:

$$\text{Expressionshöhe}_{KDM6B} = 2^{-(\Delta C_T \text{Ziel} - \Delta C_T \text{Kontrolle})}$$

### 3.2.3 Wirkstoffapplikation

In jedem Well wurde 1 ml Zellsuspension mit 130 000 bzw. 150 000 Zellen ausgesät und für 24 h ruhen gelassen. Vor jeder Behandlung erfolgte eine lichtmikroskopische Beurteilung der Konfluenz, Adhärenz und Vitalität der ausgesäten Zellen sowie die Planung der jeweiligen Verdünnungsreihe. Im Falle einer geplanten Kinetik wurde die Wirkstoffapplikation alle 12 h wiederholt. In Abhängigkeit vom verwendeten Wirkstoff erfolgte die Verdünnung in Medium bzw. DMSO. Aufgrund der toxischen Wirkung des DMSO auf das Zellsystem wurden diese Wells nicht mit den üblichen 10  $\mu$ l behandelt, sondern nur mit 2  $\mu$ l. Dementsprechend wurde die Verdünnungsreihe angepasst. Bei Weiterverdünnung in DMSO wurde die Negativkontrolle jeweils auch mit 2  $\mu$ l DMSO behandelt. In den Versuchen wurde GSK-J4 in DMSO verdünnt. Chloroquin, Dexamethason und Vincristin wurden in Medium versetzt. Nach erneuter Inkubation im Brutschrank für eine Dauer von 72 h wurden die Ergebnisse mittels einer FACS-Analyse ausgewertet.

### 3.2.4 Durchflusszytometrische Analysen

Unter Zuhilfenahme eines Durchflusszytometers (auch FACS-Gerät) konnten Untersuchungen bezüglich des mitochondrialen Membranpotenzials, des Zelltods und der Autophagie der Zellkultur durchgeführt werden. Zu deren Realisation wurden unterschiedliche Farbstoffe verwendet.

## Material und Methoden

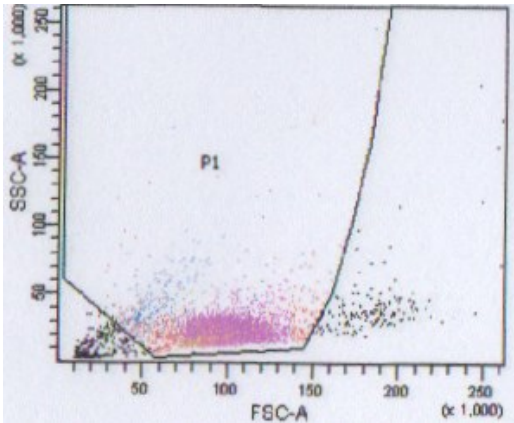
In einem FACS-Gerät wird innerhalb eines kurzen Zeitintervalls eine große Anzahl von Zellen mit Hilfe eines Flüssigkeitssystems in eine Messzelle geleitet. Dort können sie hinsichtlich molekularer und physikalischer Parameter beurteilt werden. Durch hydrodynamische Fokussierung in einer speziellen Quarzküvette ist es möglich, dass die Zellen präzise durch den monochromatischen Laserfokus geführt werden. Eine Anregungsoptik leuchtet die Zellen optimal aus. Abhängig von Zellgröße, Struktur und Fluoreszenzfärbung entstehen verschiedene optische Signale. Die ermittelten Lichtsignale, die von der Zelle ausgehen, werden durch eine Sammeloptik zu Detektoren geleitet und können so digitalisiert und auswertbar dargestellt werden. Das Vorwärtsstreulicht (engl.: *forward scatter*, FSC) entsteht durch die volumenabhängige Lichtbrechung und ist proportional zur relativen Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (engl.: *side scatter*, SSC) gibt Auskunft über die Granularität der Zellen und deren innere Kompartimente.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Messungen mittels des Geräts FACSCanto™ II der Firma Becton Dickinson GmbH durchgeführt. Mit Hilfe der BD-FACSDiva-Software (BD Bioscience, 2000) wurden die Daten analysiert. In Abhängigkeit der betrachteten Parameter besteht die Möglichkeit, die Zellen als einzelne Punkte in einem Koordinatensystem darzustellen. Für die Auswertung wurden pro Datensatz drei Dotplots (FSC/SSC, FSC/PI, FSC/DiIC<sub>1</sub>(5)) und zwei Histogramme (PI/Counts, DiIC<sub>1</sub>(5)/Counts) erstellt. Im PI Kanal wurde die PI-Intensität, im FITC-A-Kanal die Cyto-ID-Green-Intensität und im APC-A-Kanal die DiIC<sub>1</sub>(5)-Intensität gemessen. Es entstehen Punktwolken innerhalb der Dotplots, welche jeweils einer Zellpopulation entsprechen. Um diese näher definieren zu können und Zelltrümmer, Verunreinigungen, Zellklumpen sowie Dubletten auszuschließen, wird die Zellpopulation durch ein entsprechendes Gating passend abgegrenzt. Um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurde in jedem Durchgang die gleiche Gatingeinstellung pro Zelllinie angewendet. So entstand die Population 1 (P1), welche in der weiteren Auswertung betrachtet wurde. Als zusätzlicher, präzisierender Faktor wurde der Schwellenwert des Parameters FSC auf 10.000 hochgesetzt. Die Population P1 gliedert sich in lebende (P2) und tote (P3) Zellen, welche anhand von Zellgröße und PI-Fluoreszenz durch Gating voneinander abgegrenzt werden konnten. Für die Population P1 sowie für die Population P2 konnten Quadrantenplots erstellt werden, in denen das MMP der Autophagie gegenübergestellt wurde. Die Quadranten Q1 und Q2 beschreiben im Gegensatz zu Q3 und Q4 die Population mit intaktem MMP. Q2 und Q4 sind die Quadranten mit hoher Autophagie. Q1 und Q3 weisen eine basale Autophagie auf. Ein weiterer Plot trägt das MMP gegen die relative Zellgröße auf. In diesem werden mittels Gating die Population P4 mit intaktem MMP sowie die



## Material und Methoden

Population P5, welche ihr MMP schon verloren hat, aufgetragen. In Abbildung 3 ist beispielhaft ein Dotplot unbehandelter CCRF-CEM-Zellen in Abhängigkeit ihrer Größe (FSC-A) und Granularität (SSC-A) gezeigt.



*Abb. 3: Gegenüberstellung der Größe (FSC-A) und Granularität (SSC-A) der CCRF-CEM-Zellen. Zur Diskrimination der Zellen von Störsignalen. P1 entspricht der Population aller Zellen (tot und vital)*

### 3.2.4.1 Messung des mitochondrialen Membranpotentials

Das MMP wurde mit Hilfe des Farbstoffes DiIC<sub>1</sub>(5) beurteilt. Laut Herstellerinformationen handelt es sich um eine orange-fluoreszierende lipophile Substanz. Diese beinhaltet Sulfonatgruppen zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit. In Wasser ist es nur schwach fluoreszierend und bei Membraninkorporation gut photostabil. DiIC<sub>1</sub>(5) ist gekennzeichnet durch einen hohen Auslöschungskoeffizienten sowie einen kurzen angeregten Zustand in lipider Umgebung. DiIC<sub>1</sub>(5) durchdringt die Membran eukaryotischer Zellen und akkumuliert primär in Mitochondrien mit einem aktiven Membranpotential. Die Farbintensität des DiIC<sub>1</sub>(5) sinkt mit abnehmendem MMP.

### 3.2.4.2 Zelltodanalyse

Zur Zelltodanalyse wurde PI verwendet, dessen Prinzip auf der DNA-Fragmentation und dem DNA-Gehaltverlust in apoptotischen Zellen beruht. PI ist ein Fluorochrom und bindet stöchiometrisch an doppelsträngige DNA. Deshalb ist die Fluoreszenzemission proportional zu der Menge an DNA. Da das Molekül nur perforierte Zellmembranen bzw. Membranen mit gestörter Integrität überwinden kann, sind nur tote Zellen PI-positiv. PI-negative Zellen sind vital. Interkaliertes PI hat ein Emissionsmaximum von 617 nm und ein Absorptionsmaximum von 535 nm im orangen und roten Bereich. In Abbildung 4 ist ein relevanter Ausschnitt des Gatings zu sehen.

## Material und Methoden

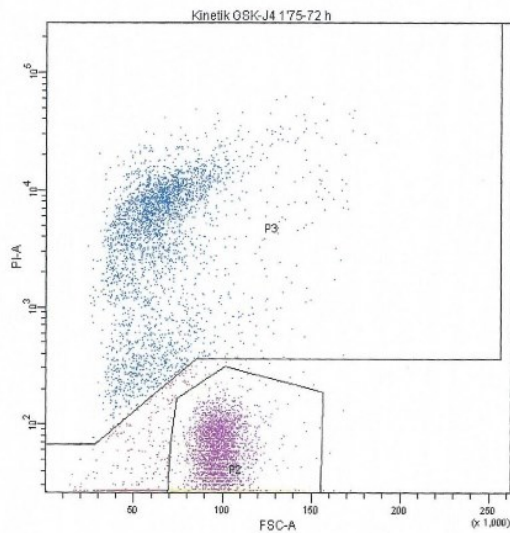


Abb. 4: Zu sehen ist die Gegenüberstellung von Zelltod (PI-A) und Zellgröße (FSC-A) aller Zellen (P1). Zwei Populationen werden unterschieden: P3 PI-positive Zellen, d. h. tote Zellen und P2 PI-negative Zellen mit zellkulturüblicher Zellgröße, d. h. lebendige Zellen

### 3.2.4.3 Autophagietest

Zur Beurteilung der Autophagie wurde der Fluoreszenzmarker Cyto-ID-Green benutzt. Die hier verwendete Zellvorbereitung wird in dem Absatz 3.2.4.5 genauer beschrieben. Dieser Farbstoff ist ein noch relativ neuer Farbstoff zur Detektion und Interpretation von Autophagievorgängen in Zellen (Chan et al. 2012). Aufgrund des ähnlichen Lichtspektrums von Cyto-ID und DiOC<sub>3</sub>(6) musste zur Analyse des mitochondrialen Membranpotenzials der Farbstoff DiIC<sub>1</sub>(5) verwendet werden. Cyto-ID-Green ist laut Herstellerinformationen ein kationischer, amphiphiler Markerfarbstoff. Er wurde so optimiert, dass Lysosomen kaum angefärbt werden, jedoch Prä-Autophagosomen, Autophagosomen und Autophagolysosomen eine starke Fluoreszenz aufweisen (Guo et al. 2015). Das bedeutet, dass der Farbstoff sich selektiv in Kompartimenten der Autophagie ansammelt und so durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten mit einer Kontrollprobe die Evaluation der Autophagieintensitätsänderung mittels der jeweiligen Behandlung der Zellen ermöglicht. Der dazu berechnete Autophagiefaktor ist ein Verhältnis der basalen Autophagie aus der jeweiligen Kontrollprobe und der gemessenen Autophagie. Demzufolge ist der Autophagiefaktor der Kontrollprobe 1. Werte über 1 drücken eine Autophagiesteigerung, Werte unter 1 eine Verminderung aus. Die Gesamtautophagie für jeden einzelnen Versuch berechnet sich aus den Quadranten Q2 und Q4 der Population der lebenden Zellen (P2).

### 3.2.4.4 Kompensationsmessung

Als Vorbereitung der eigentlichen Messungen musste vor der Neueinführung einer jeden Zellreihe eine Kompensationsreihe gemessen werden und dementsprechend das Gating an das Verteilungsmuster, bezogen auf Zellgröße und Granularität, angepasst werden. Hierzu wurden wieder die 12-Well-Platten genutzt. Es wurden 130.000 Zellen pro Well über 72 h inkubiert. Danach wurde nur eines der 4 unbehandelten Kompensationswells mit

## Material und Methoden

DiIC<sub>1</sub>(5) (siehe 3.2.4.1) versetzt. Im Anschluss erfolgte das Ernten der Zellen, wie in 3.2.4.5 beschrieben, mit dem Unterschied, dass auch hier nur eines der Wells mit Cyto-ID behandelt wurde. Auch mit dem Farbstoff PI wurde nur eines der Wells behandelt. Dieses Well wurde kurz vor der Zugabe des PI mit 55 µl 0,5%igen Triton X-100 behandelt. Durch das Triton X-100 wurde die Zellintegrität so zerstört, dass der Farbstoff in nahezu alle Zellen aufgenommen werden konnte und somit die Messung des PI mit einem nahezu 100%igen Zelltod als Kontrollwert ermittelt werden konnte. So entstand eine Negativkontrolle ohne jegliche Behandlung, eine PI-Kontrollprobe, eine DiIC<sub>1</sub>(5)-Kontrolle und eine mit Cyto-ID-behandelte Kontrolle. Diese wurden durchflusszytometrisch in einem Kompensationsprogramm analysiert. Anschließend wurde auf dieser Basis das Gating gegebenenfalls noch manuell präzisiert, um jegliche Fehler weitestgehend zu eliminieren.

### **3.2.4.5 Vorbereitung und Durchführung der durchflusszytometrischen Messungen**

Nach Anstellen und Entlüften des Systems wurden im Abstand von jeweils sieben Tagen neue CST-Beats angesetzt, welche einmal täglich vor den Messungen eingelesen wurden. Zur Herstellung werden 1 ml unsteriles DPBS mit 3 Tropfen der CST-Beats-Flüssigkeit gemischt und gevortext. Anschließend wurden die behandelten Platten unter dem Mikroskop beurteilt und Zelldichte sowie Vitalität abgeschätzt. An der Sterilbank wurden alle Wells mit 10 µl einer 1:10 Verdünnung des Farbstoffs DiIC<sub>1</sub>(5) mittels Multipette in Medium behandelt und für 45 bis 60 min. in den Brutschrank gestellt. Weiter erfolgte das Ernten der Platten. Zuerst wurden die Suspensionsüberstände der Wells mittels Pasteurpipette in separate FACS-Röhrchen überführt und dann mit jeweils 1 ml PBS ausgespült. Der Überstand wurde wieder in die FACS-Röhrchen überführt. Pro Well wurden nun 250 µl Trypsin pipettiert und die Platte dann für zweimal fünf Minuten im Brutschrank inkubiert; zwischendurch wurden sie sacht beklopft. Im Anschluss wurden zweimal jeweils 1 ml farbloses Medium pro Well pipettiert, die Zellen vereinzelt und wiederum in die FACS-Röhrchen überführt. Der Trypsinierungsvorgang entfiel bei den Jurkat-Zellen. Nach der Ernte wurden die Röhren über Kopf geschwenkt und bei 1800 U/min für 5 min. zentrifugiert. Weiter wurden die Überstände scharf abgekippt und auf einem Tupfer abgetropft. Das Zellpellet wurde mittels Eppendorfpipette in 1 ml farblosen Medium vereinzelt und mit 2 ml desselben aufgefüllt. Anschließend wurden die FACS-Röhrchen erneut bei 1800 U/min für 5 min. zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Das Zellpellet wurde wiederum lichtgeschützt in 240 µl verdünntem Cyto-ID resuspendiert (für 6 Wells: 1,5 µl Cyto-ID in 1,5 ml Medium) und für 30 min. im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die FACS-Röhrchen mit jeweils 3 ml farblosen Medium

## Material und Methoden

aufgefüllt, über Kopf geschwenkt und erneut bei 1800 U/min für 5 min zentrifugiert. Weiter wurden die Überstände erneut scharf abgekippt und auf Eis gestellt. Das verbleibende Zellpellet wurde in 500 µl Medium gelöst. Kurz vor der durchflusszytometrischen Messung wurde 1 µl PI in jedes Röhrchen gegeben und vor jeder Messung drei Mal kurz gevortext. Es wurden am Durchflusszytometer jeweils 10.000 Zellen pro Probe gemessen.

### **3.2.5 Statistische Analyse der Daten**

Für die Versuche, bei denen eine Wirkstoffkombination durchgeführt wurde, erfolgte die Auswertung mit Hilfe des Kombinationsindex<sup>1</sup> (CI-Werte) nach Chou und Talalay. Dabei wurde unterschieden in Synergismus ( $CI < 1$ ), Antagonismus ( $CI > 1$ ) und einen additiven Effekt ( $CI = 1$ ) (Chou 2010). Zur Analyse der Kombinationsindizes wurde das Programm „CompuSyn“ genutzt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Relative mRNA-Expression des KDM6B-Gens in KM, CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen

Zur Beurteilung der Relevanz des untersuchten Proteins wurde vorerst die mRNA-Expression des KDM6B-Gens in den Zelllinien CCRF-CEM und Jurkat sowie in den Zellen eines Pools von acht gesunden KM-Spendern untersucht. Der Wert der gesunden Probanden wurde als Referenzwert genutzt, da er die normale Expressionshöhe darstellt, und auf 1, d. h. 100 %, gesetzt. Somit ist erkennbar, dass CCRF-CEM-Zellen gering weniger *KDM6B* exprimierten (0,88), als dies bei gesunden Probanden der Fall war. Im Unterschied hierzu zeigte sich eine etwas mehr als 7-fach erhöhte Expression der *KDM6B* in den Jurkat-Zellen. Diese Beobachtungen sind in Abbildung 5 dargestellt.

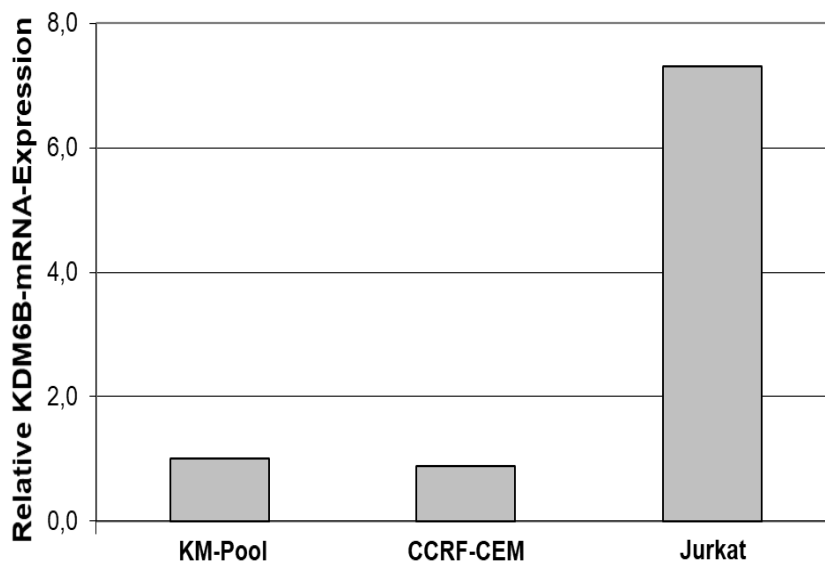


Abb. 5: Darstellung der relativen mRNA-Expression des KDM6B-Gens in Zellen gesunder KM-Spender, CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen mittels Real-Time-RT-PCR nach einmaliger Doppelbestimmung.

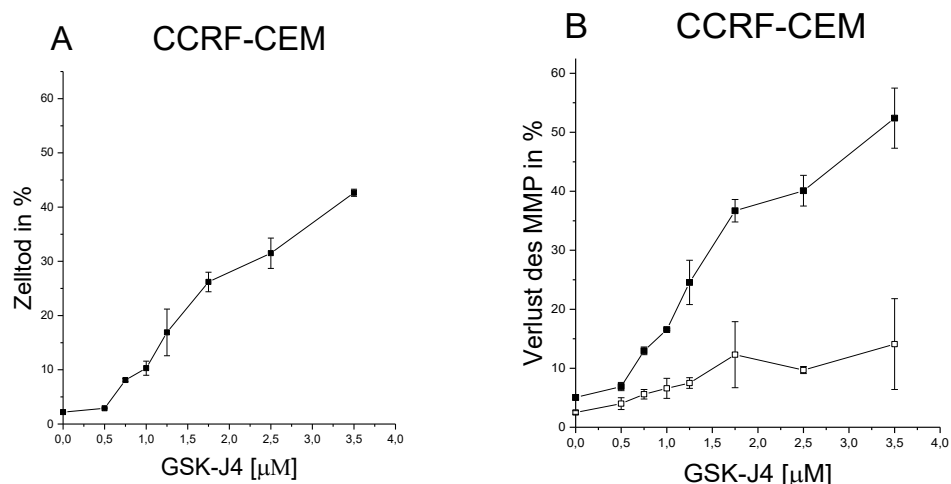
## 4.2 Zellkulturexperimente an CCRF-CEM-Zellen und Jurkat-Zellen

### 4.2.1 Zelltoduntersuchung

#### 4.2.1.1 Wirkung von GSK-J4

Mittels Behandlung der CCRF-CEM-Zellen mit GSK-J4 in Konzentrationen von 0 bis 3,5  $\mu\text{M}$  sollte zum einen die Zytotoxizität des Hemmstoffes in beiden Leukämiezelllinien getestet werden. Zum anderen sollte eine optimale Konzentration des Wirkstoffes gefunden werden, d. h. eine Konzentration, die einerseits die Autophagie deutlich steigert, andererseits aber nur wenig Zelltod auslöst. Oberhalb einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  GSK-J4 stieg der Zelltod der CCRF-CEM-Zellen nach 72-stündiger Behandlung nahezu linear an ( $R^2=0,986$ ), wie in Abbildung 6 A dargestellt. Bei einer Konzentration von 3,5  $\mu\text{M}$  waren über 40 % Zelltod zu verzeichnen. Der Verlust des MMP wies ebenfalls einen Aufwärtstrend auf. Dieser Trend ließ sich sowohl in der Population lebender als auch in der Population aller Zellen nachweisen. Das bedeutet, dass nicht nur die toten Zellen ihr MMP verloren hatten, sondern auch noch als lebend detektierte Zellen einen Verlust der Zellintegrität erlitten und kurz davor standen, ebenfalls zum Zelltod überzugehen. Dies zeigt Abbildung 6 B.

Auch die Jurkat-Zellen wurden über 72 h mit einer GSK-J4-Konzentrationsreihe zwischen 0 und 3,5  $\mu\text{M}$  behandelt. Hierbei zeigte sich eine viel höhere Empfindlichkeit der Zellen auf den KDM6B-Inhibitor, als dies bei den CCRF-CEM-Zellen der Fall war. In einem Bereich von 0,7 bis 1,25  $\mu\text{M}$  stiegen Zelltod als auch der Verlust des MMP stark. Auch hier zeigte sich eine konzentrationsabhängige Steigerung des Verlustes des MMP sowohl in lebenden als auch in PI-positiven Zellen. Der Zelltod stieg von etwa 4 % auf 80 % an. Diese Zusammenhänge sind in Abbildung 6 C und D dargestellt.



Legende siehe nächste Seite

## Ergebnisse

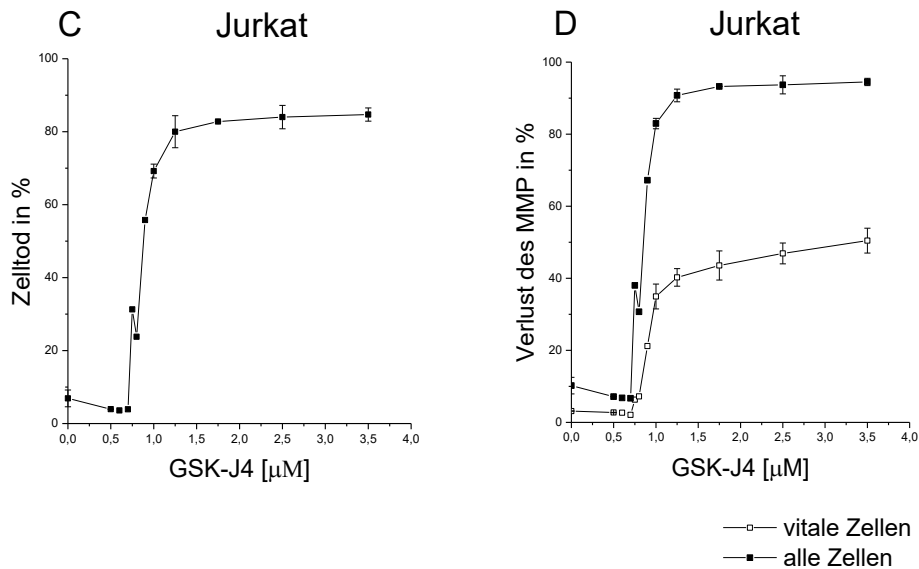


Abb. 6: Wirkung von GSK-J4. A) Zelltod in CCRF-CEM-Zellen. B) MMP-Verlust in CCRF-CEM-Zellen. C) Zelltod in Jurkat-Zellen. D) MMP-Verlust in Jurkat-Zellen. Zelltod und MMP-Verlust wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bzw. der DiIC<sub>1</sub>(5)-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils zwei Bestimmungen nach 72 h.

Da bei einer Konzentration von 1,75  $\mu\text{M}$  GSK-J4 im Mittel 26 % der Zellen gestorben waren, wurde unter Berücksichtigung der Autophagiewerte die Kinetik mit dieser Konzentration durchgeführt, um eine optimale Zeitspanne für die Hauptversuche zu evaluieren. Hierzu wurden Zellen zu den Zeiten 0, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h mit einer Konzentration von 1,75  $\mu\text{M}$  GSK-J4 behandelt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

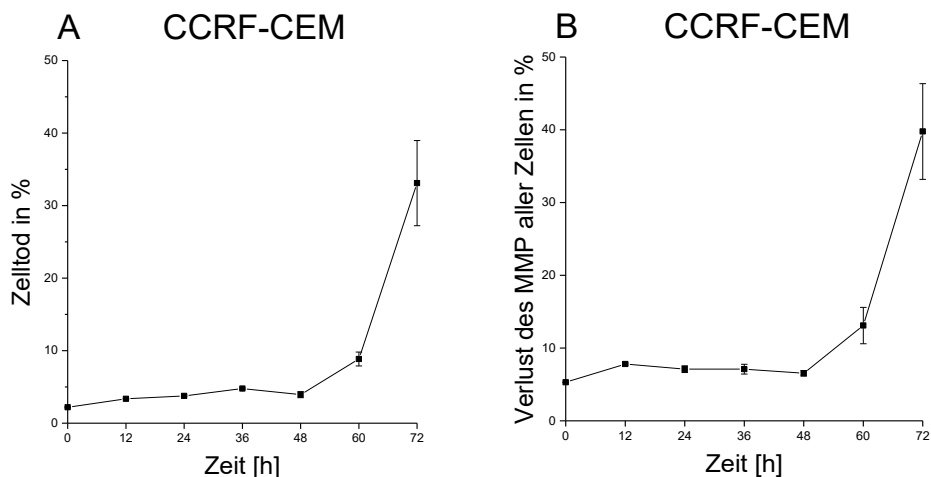


Abb. 7: Kinetik von GSK-J4 in CCRF-CEM-Zellen. A) Zelltod. B) MMP-Verlust. MMP-Verlust und Cyto-ID-Fluoreszenz wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme, der DiIC<sub>1</sub>(5)- bzw. der Cyto-ID-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils drei Bestimmungen nach Behandlung mit 1,75  $\mu\text{M}$  GSK-J4.

Deutlich wurde, dass der Zelltod erst nach 60 h auf etwa 9 %; nach 72 h auf rund 33 % anstieg (siehe Abb. 7 A). Denselben Trend zeigte auch der Verlust des MMP. Hier war in

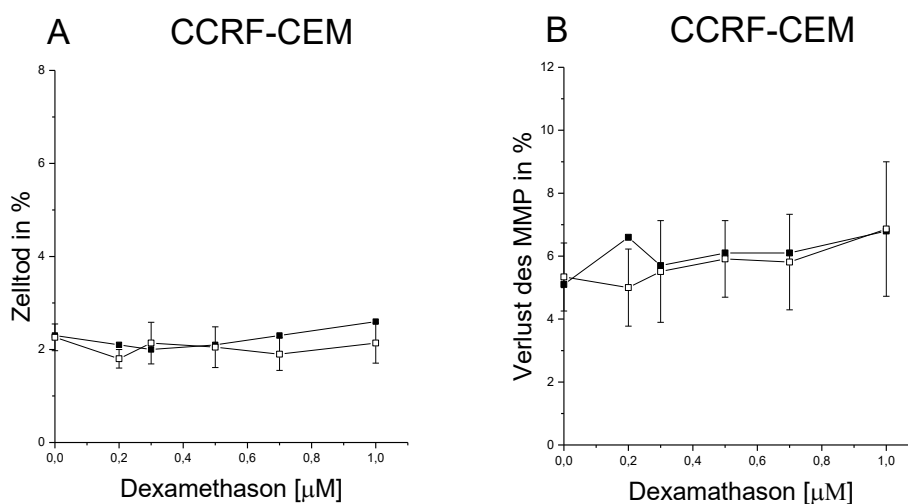
## Ergebnisse

derselben Zeitspanne ein Anstieg von etwa 15 % auf 40 % zu verzeichnen. Dies ist in Abbildung 7 B dargestellt. Daher wurde unter Berücksichtigung der Cyto-ID-Floreszenz eine Behandlungsdauer von 72 h für die Folgeversuche gewählt.

### 4.2.1.2 Wirkung von Dexamethason

Um die zytotoxische Wirkung von Dexamethason auf beide Zelllinien zu bestimmen, wurden CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen mit Dexamethason in aufsteigenden Konzentrationen (0; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 1  $\mu\text{M}$ ) über 72 h behandelt. Zudem erfolgte die Behandlung der CCRF-CEM-Zellen über 48 h, um einen möglichen zeitlichen Einfluss zu erfassen. Es zeigten sich keine signifikanten dosisabhängigen Veränderungen des Zelltods und des MMP in beiden Zelllinien. Der Zelltod in den CCRF-CEM-Zellen blieb konstant auf Werten zwischen 1,5 und 3 %. Dies galt für den Zeitraum von 48 h als auch für den Zeitraum von 72 h. Folglich waren hier keine zeitlichen Schwankungen zu detektieren. Es war zudem kein signifikant erhöhter Verlust des MMP zu verzeichnen. Die Versuche wurden für 48 h einmalig, für 72 h achtfach durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 8 A und B gezeigt.

Auch die Behandlung der Jurkat-Zellen mit Dexamethason bedingten Zelltodwerte zwischen 4 und 8 %. Es entstanden zwar größere Schwankungen des Zelltods, aber auch hier waren keine dosisabhängigen Steigerungen des Zelltods ersichtlich. Der Verlust des MMP schwankte zwischen 5 und 11 %. Dies ist in Abbildung 8 C und D dargestellt.



Legende siehe nächste Seite



## Ergebnisse

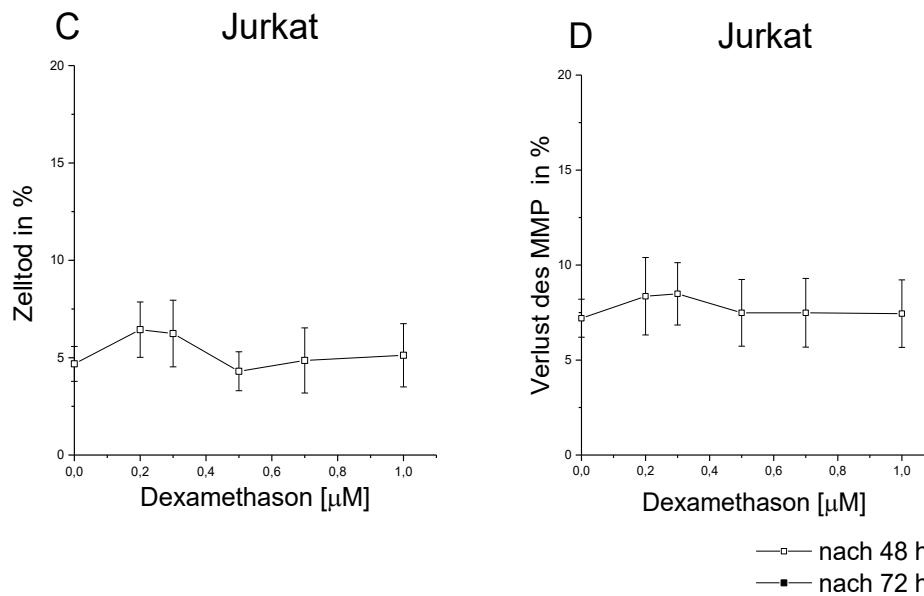


Abb. 8: Wirkung von Dexamethason. A) Zelltod in CCRF-CEM-Zellen. B) MMP-Verlust in CCRF-CEM-Zellen. C) Zelltod in Jurkat-Zellen. D) MMP-Verlust in Jurkat-Zellen. Zelltod und MMP-Verlust wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bzw. der DiIC<sub>1</sub>(5)-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Werte von jeweils einer Bestimmung nach 48 h und die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils acht Bestimmungen nach 72 h.

### 4.2.1.3 Kombinationsversuche

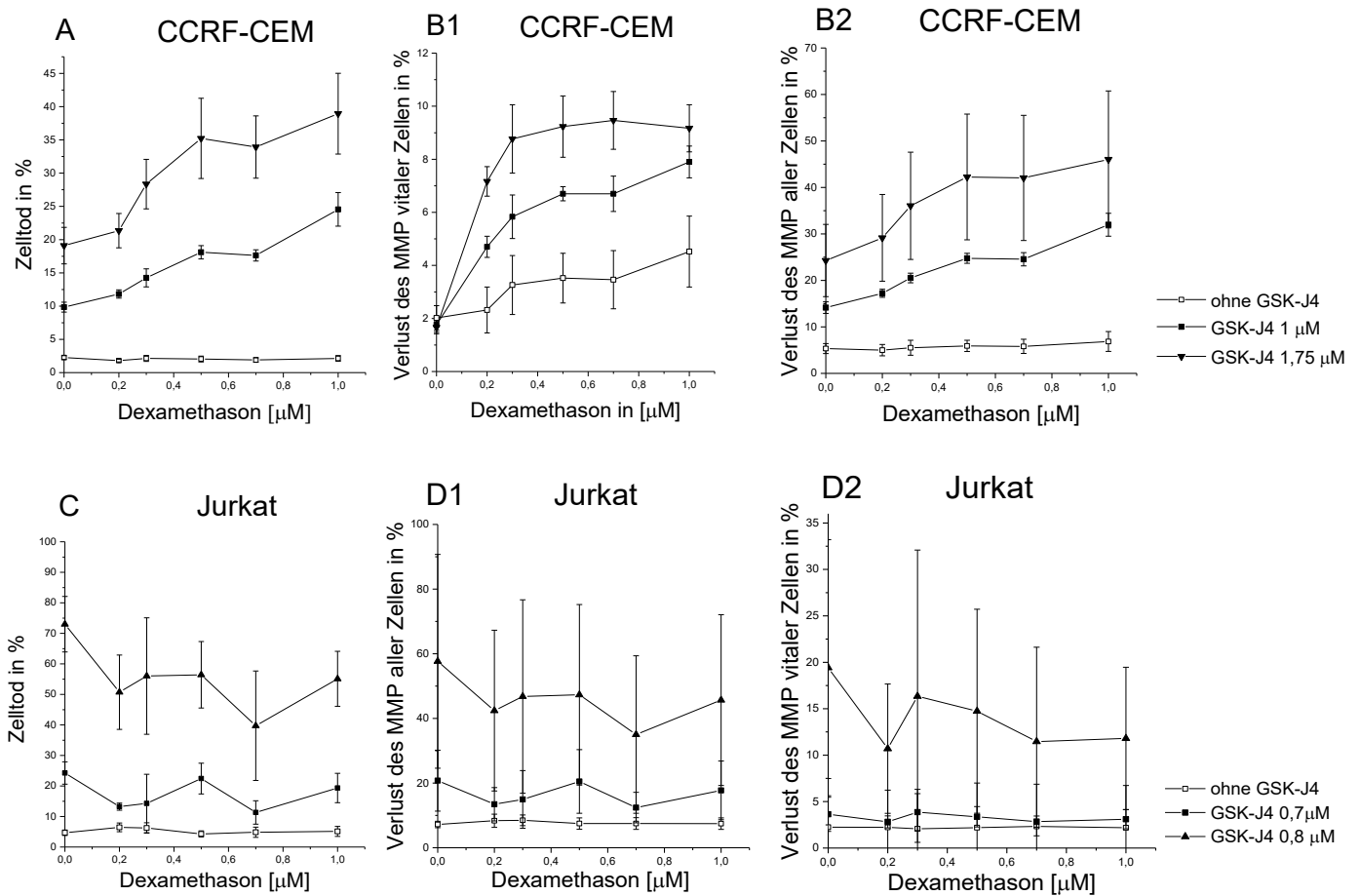
#### 4.2.1.3.1 GSK-J4 und Dexamethason

Die beiden Zellreihen wurden mit der in 4.2.1.2. verwendeten Dexamethason-Konzentrationsreihe und 0, 1, 1,75 und 2,5  $\mu\text{M}$  GSK-J4 behandelt. Hierbei konnte nochmals die Glukokortikoid-Resistenz der CCRF-CEM- als auch der Jurkat-Zellen gezeigt werden. Weder Zelltod noch der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials waren bei alleiniger Dexamethason-Behandlung angestiegen. In Kombination mit GSK-J4 in einer jeweils bestimmten Konzentration konnte eine Dexamethason-abhängige Steigerung des Zelltods sowie ein Verlust des MMP in CCRF-CEM-Zellen verzeichnet werden. Der Verlust des MMP wies diesen konzentrationsabhängigen Anstieg in der Population der vitalen als auch in der Population aller Zellen auf. Je mehr die Konzentration an GSK-J4 anstieg, desto höher fielen Zelltod und Membranpotentialverlust aus. Die Zelltodhöhe konnte durch Kombination beider Wirkstoffe in höchster Konzentration auf im Mittel etwa 39 % gesteigert werden. Diese Ergebnisse zeigen die Abbildungen 9 A, B1 und B2.

Jurkat-Zellen präsentierten sich erneut unsensibel gegenüber Dexamethason. Die Kombinationen der Dexamethason-Reihe mit GSK-J4 in den Konzentrationen 0,7 und 0,8  $\mu\text{M}$  erhöhten zwar den Zelltod und den Verlust des MMP in den vitalen als auch in

## Ergebnisse

allen Zellen, jedoch wurden diese nicht von der Dexamethason-Konzentration moduliert, sondern blieben auf dem Niveau, welches durch alleinige Behandlung mit GSK-J4 ausgelöst wurde. In höchster GSK-J4 Konzentration konnte durch Einzelbehandlung ein Zelltod von im Mittel 73 % ausgelöst werden. In Kombination mit Dexamethason schwankten die Zelltodwerte Dexamethason-unmoduliert um die 50 %. Diese Tendenz zeigten auch die Werte des MMP-Verlustes. Dies kann den Abbildungen 9 C, D1 und D2 entnommen werden.



**Abb. 9:** Wirkung der Kombination GSK-J4 und Dexamethason. A) Zelltod in CCRF-CEM-Zellen. B) MMP-Verlust in CCRF-CEM-Zellen. C) Zelltod in Jurkat-Zellen. D) MMP-Verlust in Jurkat-Zellen. Zelltod und MMP-Verlust wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bzw. der DiIC<sub>1</sub>(5)-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils bis zu acht Bestimmungen nach 72 h.

Die Überprüfung der Ergebnisse mit Hilfe des Chou-Talalay-Kombinationsindex (CI-Wert) zeigt Werte  $<1$ , d.h. einen deutlichen Synergismus beider Substanzen bei Kombination von Dexamethason und GSK-J4 in den Konzentrationen 1  $\mu\text{M}$  und 1,75  $\mu\text{M}$  in CCRF-CEM-Zellen (s. Tabelle 4).

## Ergebnisse

<b>GSK-J4 (µM)</b>	<b>Dexamethason (µM)</b>	<b>CI-Wert</b>
1	0,2	0,5
1	0,3	0,479
1	0,5	0,45
1	0,7	0,522
1	1	0,453
1,75	0,2	0,503
1,75	0,3	0,402
1,75	0,5	0,358
1,75	0,7	0,398
1,75	1	0,382

*Tabelle 4: Chou-Talalay-Kombinationsindex (CI-Wert) für Kombinationsbehandlung von GSK-J4 und Dexamethason in CCRF-CEM-Zellen. Bedeutung des Kombinationsindex: CI > 1 Antagonismus, CI < 1 Synergismus, CI = 1 rein additiver Effekt*

Die CI-Werte stiegen bei Behandlung der Jurkat-Zellen mit Dexamethason und GSK-J4 in erhöhtem Maße über 1, was für einen starken Antagonismus beider Zytostatika in Jurkat-Zellen spricht (s. Tabelle 5).

<b>GSK-J4 (µM)</b>	<b>Dexamethason (µM)</b>	<b>CI-Wert</b>
0,7	0,2	144,094
0,7	0,3	249,232
0,7	0,5	4742,45
0,7	0,7	929,945
0,7	1	2618,04
0,8	0,2	2308064
0,8	0,3	7395778
0,8	0,5	9482768
0,8	0,7	369814
0,8	1	1,0E+10

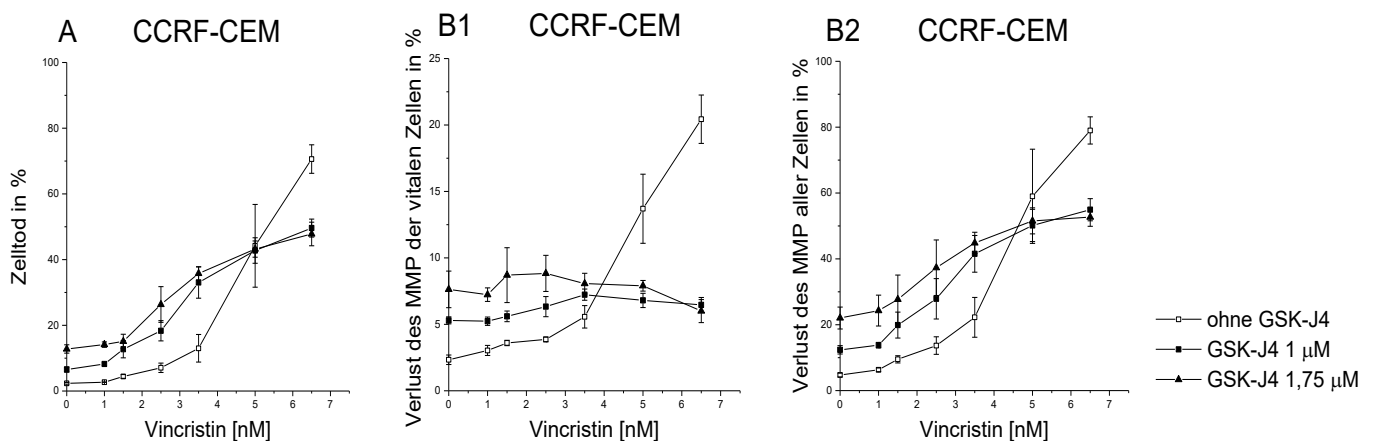
*Tabelle 5: Chou-Talalay-Kombinationsindex (CI-Wert) für Kombinationsbehandlung von GSK-J4 und Dexamethason in Jurkat-Zellen. Bedeutung des Kombinationsindex: CI > 1 Antagonismus, CI < 1 Synergismus, CI = 1 rein additiver Effekt*

# Ergebnisse

## 4.2.1.3.2 GSK-J4 und Vincristin

Im Weiteren wurde geprüft, ob die Behandlung mit GSK-J4 auch die Wirkung eines typischen Zytostatikums, hier Vincristin, verstärken könne. Die Kombination von Vincristin in den Konzentrationen 1, 1,5, 2,5, 3,5, 5 und 6,5 nM mit 0, 1 und 1,75 µM GSK-J4 zeigte in CCRF-CEM-Zellen eine konzentrationsabhängige Steigerung des Zelltods bis zu einer Vincristin-Konzentration von 5 nM. Bis zu diesem Wert fiel der Zelltod der allein mit Vincristin behandelten Zellen geringer aus als der der entsprechenden Kombinationsbehandlungen. Bei der höchsten Vincristinkonzentration (6,6 nM) war die Kombinationsbehandlung indes weniger wirksam als Vincristin allein. So zeigten sich durch Einzelbehandlung mit Vincristin Zelltodwerte von bis zu 72 % und in Kombination nur ein Zelltod von etwa 50 %. In den Abbildungen 10 A, B1 und B2 sind die beschriebenen Beobachtungen ersichtlich.

Auch Jurkat-Zellen wurden über 72 h mit Vincristin in den oben genannten Konzentrationen bzw. mit einer Kombination aus der Vincristinreihe und GSK-J4 der Konzentrationen 0,7 und 0,8 µM behandelt und mittels FACS-Analyse ausgewertet. Ähnlich der Behandlung der CCRF-CEM-Zellen stieg der Zelltod durch Vincristin an. Ab 2,5 nM erhöhte sich der Zelltod im Mittel von 4,4 auf 81,5 %. GSK-J4 allein steigerte den Zelltod um etwa 20 bzw. 60 %. Mit einer Vincristinkonzentration von 1,5 nM sank der Zelltod im Mittel noch einmal um etwa 10 bzw. 20 % und stieg dann mit steigenden Vincristinkonzentrationen weiter an. Die Kurven näherten sich bei einer Konzentration von 6,5 nM Vincristin einander an. Auch der Verlust des MMP zeigte eine gleiche Tendenz wie die Messung des Zelltods, jedoch mit größeren Messabweichungen. Diese Beobachtungen werden in den Abbildungen 10 C, D1 und D2 grafisch dargestellt.



Legende siehe nächste Seite

## Ergebnisse

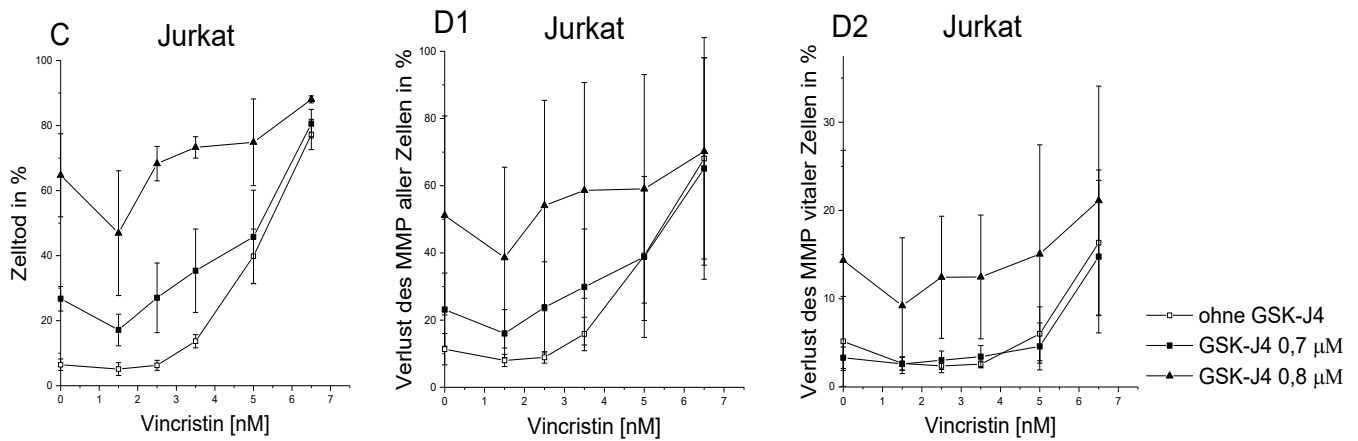


Abb. 10: Wirkung der Kombination GSK-J4 und Vincristin. A) Zelltod in CCRF-CEM-Zellen. B) MMP-Verlust in CCRF-CEM-Zellen. C) Zelltod in Jurkat-Zellen. D) MMP-Verlust in Jurkat-Zellen. Zelltod und MMP-Verlust wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bzw. der DiIC<sub>1</sub>(5)-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils bis zu acht Bestimmungen nach 72 h.

Die Analyse der Daten mittels Kombinationsindex nach Chou-Talalay zeigte Werte über 1, die in allen Kombinationsreihen für einen deutlichen Antagonismus der Substanzen in CCRF-CEM-Zellen sprachen (s. Tabelle 6).

GSK-J4 (μM)	Vincristin (nM)	CI-Wert
1	1	1,395
1	1,5	1,224
1	2,5	1,29
1	3,5	1,141
1	5	1,217
1	6,5	1,346
1,75	1	1,201
1,75	1,5	1,235
1,75	2,5	1,182
1,75	3,5	1,21
1,75	5	1,318
1,75	6,5	1,58

Tabelle 6: Chou-Talalay-Kombinationsindex (CI-Wert) für Kombinationsbehandlung von GSK-J4 und Vincristin in CCRF-CEM-Zellen. Bedeutung des Kombinationsindex: CI > 1 Antagonismus, CI < 1 Synergismus, CI = 1 rein additiver Effekt

## Ergebnisse

Auch in Jurkat-Zellen sprach die Auswertung des Kombinationsindex' nach Chou und Talalay der in Abbildung 10 C dargestellten Werte, für einen Antagonismus beider Substanzen (s. Tabelle 7).

GSK-J4 ( $\mu\text{M}$ )	Vincristin (nM)	CI-Wert
0,7	1,5	2,025
0,7	2,5	2,753
0,7	3,5	3,465
0,7	5	4,504
0,7	6,5	5,041
0,8	1,5	1,735
0,8	2,5	2,271
0,8	3,5	2,889
0,8	5	3,867
0,8	6,5	4,469

*Tabelle 7: Chou-Talalay-Kombinationsindex (CI-Wert) für Kombinationsbehandlung von GSK-J4 und Vincristin in Jurkat-Zellen. Bedeutung des Kombinationsindex: CI > 1 Antagonismus, CI < 1 Synergismus, CI = 1 rein additiver Effekt*

## 4.2.2 Autophagieuntersuchung

### 4.2.2.1 Wirkung von GSK-J4

Wie in 4.2.1.1. beschrieben, wurden CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen mit GSK-J4 in Konzentrationen von 0 bis 3,5  $\mu\text{M}$  behandelt. Die Cyto-ID-Fluoreszenz stieg in CCRF-CEM-Zellen mit aufsteigenden GSK-J4-Konzentrationen stetig an (s. Abb. 11 A). In Jurkat-Zellen zeigte sich der Zelltod bei Konzentrationen von 0,6, 0,7 und 0,8  $\mu\text{M}$  GSK-J4 stark erhöht (s. Abbildung 6 C), die Cyto-ID-Fluoreszenz hingegen war bei diesen Konzentrationen nur geringfügig und insignifikant erhöht (s. Abb. 11 B). Für die Kombinationsversuche nutzte ich aufgrund des starken Zelltodanstiegs in Jurkat-Zellen diese Konzentrationen (0,7 und 0,8  $\mu\text{M}$  GSK-J4), um gegebenenfalls eine weitere Steigerung von Zelltod und Cyto-ID-Fluoreszenz durch eine Wirkstoffkombination hervorrufen zu können. In CCRF-CEM-Zellen waren höhere Konzentrationen von 1 und 1,75  $\mu\text{M}$  GSK-J4 sinnvoll, da diese einerseits die gemessene Autophagie-Fluoreszenz deutlich steigerten und andererseits nur wenig Zelltod auslösten. Bei 3,5  $\mu\text{M}$  GSK-J4 zeigte sich die Cyto-ID-Fluoreszenz in beiden Zelllinien mehr als doppelt so hoch, wie die basale Cyto-ID-Fluoreszenz der unbehandelten Zellen, d. h. der auf 1 gesetzten basalen Autophagierate der Zellen.

Bei der Betrachtung der zeitlichen Veränderungen der Autophagie in CCRF-CEM-Zellen, sichtbar durch die in Abbildung 11 C dargestellte Kinetikuntersuchung, zeigte sich – ähnlich dem Zelltodanstieg – erst nach 60 h eine Fluoreszenzsteigerung. Somit ist eine Zeitspanne von 72 h eine gute Behandlungsdauer für die Folgeversuche.

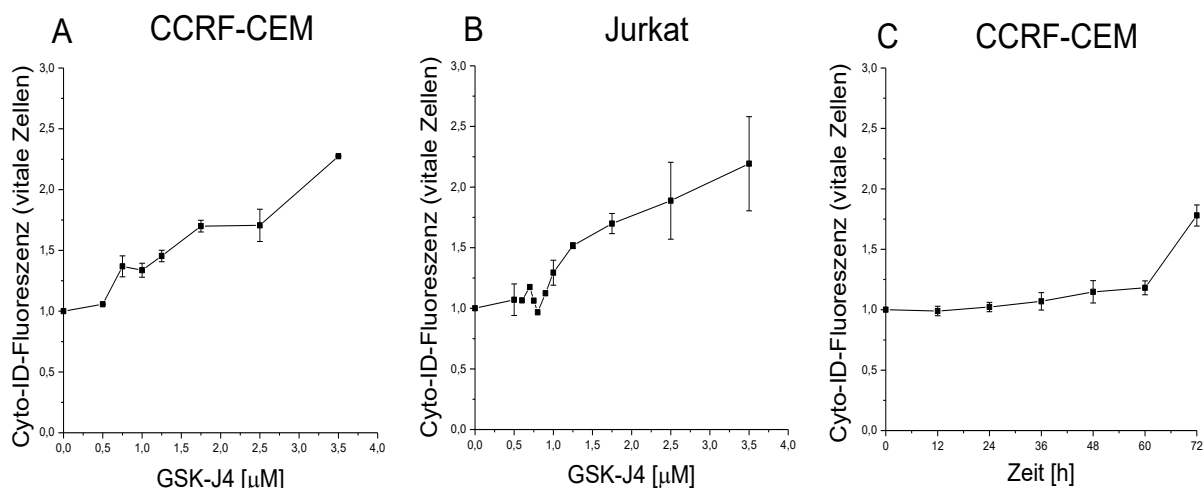


Abb. 11: Autophagie-Wirkung von GSK-J4. A) Cyto-ID-Fluoreszenz in CCRF-CEM-Zellen nach 72 h. B) Cyto-ID-Fluoreszenz in Jurkat-Zellen nach 72 h. C) Kinetik von GSK-J4 in CCRF-CEM-Zellen über 72 h nach Behandlung mit 1,75  $\mu\text{M}$  GSK-J4. Die Cyto-ID-Fluoreszenz wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse der Cyto-ID-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils zwei Bestimmungen.

## Ergebnisse

### 4.2.2.2 GSK-J4 - Induktor oder später Hemmer der Autophagie?

Für den Nachweis, dass GSK-J4 tatsächlich die Autophagie stimuliert - und nicht etwa durch eine späte Hemmung der Autophagie den lysosomalen Abbau der Autophagosomen hemmt, was auch zu einer erhöhten Cyto-ID-Fluoreszenz führen würde - ist die Kombination von GSK-J4 mit einem Inhibitor der Autophagie, in diesem Fall der Fusion von Autophagosom und Lysosom, sinnvoll. Mit steigender Chloroquin-Konzentration erhöhte sich die Cyto-ID-Fluoreszenz in den CCRF-CEM- sowie in den Jurkat-Zellen. In Kombination mit GSK-J4 steigerte sich die Cyto-ID-Fluoreszenz je nach Chloroquin-Konzentration auf das 9- bis 13-fache in CCRF-CEM-Zellen und in Jurkat-Zellen auf etwa das 2,5- bis 5-fache der basalen Zellautophagierate. Je höher die Chloroquin-Konzentration in Kombination mit GSK-J4 anstieg, desto höher fiel die Steigerung der Cyto-ID-Fluoreszenz aus. Die Fluoreszenz überstieg in Kombination die Summe der Einzel-Cyto-ID-Fluoreszenzen von GSK-J4 und Chloroquin. Diese Differenz wurde vor allem in CCRF-CEM-Zellen deutlich sichtbar. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 12 dargestellt.

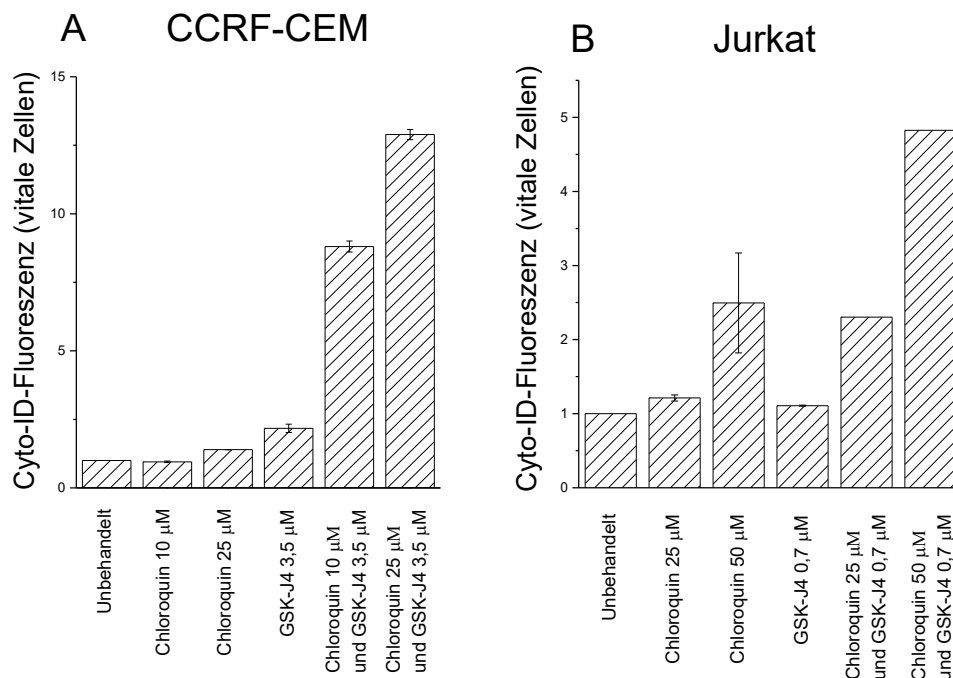


Abb. 12: Autophagie-Wirkung von GSK-J4 und Chloroquin. A) Cyto-ID-Fluoreszenz in CCRF-CEM-Zellen. B) Cyto-ID-Fluoreszenz in Jurkat-Zellen. Die Cyto-ID-Fluoreszenz wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse der Cyto-ID-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils einer bzw. zwei Bestimmungen nach 72 h.



## Ergebnisse

### 4.2.2.3 Wirkung von Dexamethason

CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen wurden mit Dexamethason in aufsteigender Konzentration (0, 0,2, 0,3, 0,5, 0,7, 1  $\mu$ M) über eine Zeitspanne von 72 h behandelt. Zudem erfolgte die Behandlung der CCRF-CEM-Zellen mit Dexamethason über 48 h, um einen möglichen Einfluss der Zeit zu erfassen. Die gemessene Cyto-ID-Fluoreszenz zeigte in beiden Zelllinien keine Dosisabhängigkeit gegenüber Dexamethason. Die Autophagiefaktoren unterschieden sich nur wenig nach 24 und 72 h. Die Grafiken in Abbildung 13 stellen diese Beobachtungen dar.

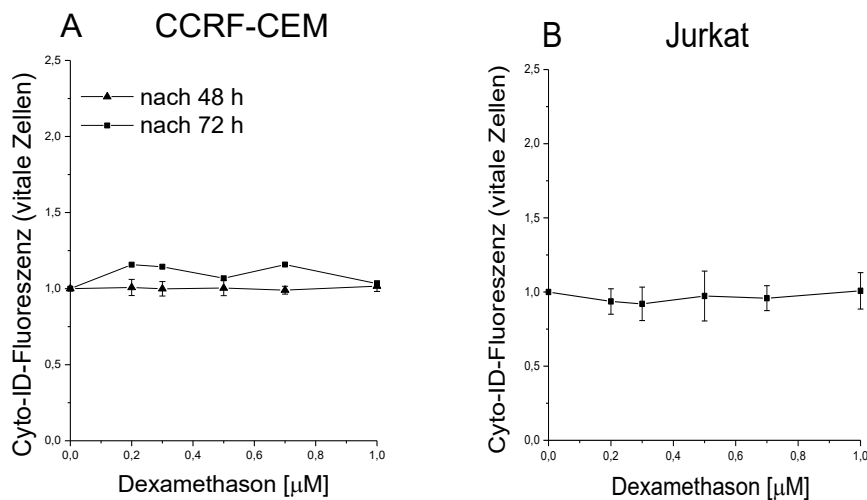


Abb. 13: Autophagie-Wirkung von Dexamethason. A) Cyto-ID-Fluoreszenz in CCRF-CEM-Zellen. B) Cyto-ID-Fluoreszenz in Jurkat-Zellen. Die Cyto-ID-Fluoreszenz wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse der Cyto-ID-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils einer Bestimmung nach 48 h bzw. acht Bestimmungen nach 72 h.

### 4.2.2.4 Kombinationsversuche

#### 4.2.2.4.1 Dexamethason und GSK-J4

CCRF-CEM-Zellen wurden mit einer Kombination aus der in 4.2.2.3. verwendeten Dexamethason-Konzentrationsreihe und GSK-J4 der Konzentrationen 0, 1, 1,75 und 2,5  $\mu$ M behandelt. Dexamethason modulierte die Autophagie-Intensität der Zellreihe nicht. In Kombination mit den unterschiedlichen GSK-J4-Konzentrationen konnten starke Schwankungen der Autophagie verzeichnet werden, jedoch wurde keine Dexamethason-vermittelte Steigerung sichtbar. Auffällig ist, dass niedrige Konzentrationen von Dexamethason die GSK-J4-induzierte Autophagie im Mittel zu erniedrigen schienen. Dies war jedoch aufgrund der Schwankungen als nicht signifikant einzuschätzen. Auffallend war zudem, dass die mittleren Cyto-ID-Fluoreszenzen in CCRF-CEM-Zellen in Kombination stets über denen der Einzelbehandlung mit Dexamethason lagen. Die Abbildung 14 A zeigt aufgrund der Übersichtlichkeit die Ergebnisse für die Kombination von Dexamethason und

## Ergebnisse

GSK-J4 in den Konzentrationen von 0, 1 und 1,75  $\mu\text{M}$  in CCRF-CEM-Zellen. Auch in den Jurkat-Zellen änderte sich die Cyto-ID-Fluoreszenz durch Kombinationsbehandlung der Dexamethasonreihe mit 0,7 und 0,8  $\mu\text{M}$  GSK-J4 nicht konzentrationsabhängig. Anders als bei CCRF-CEM-Zellen, war auch in Kombination keine signifikant höher ausfallende Fluoreszenz als durch alleinige Behandlung mit Dexamethason zu verzeichnen. In Abbildung 14 B sind diese Erkenntnisse verdeutlicht.

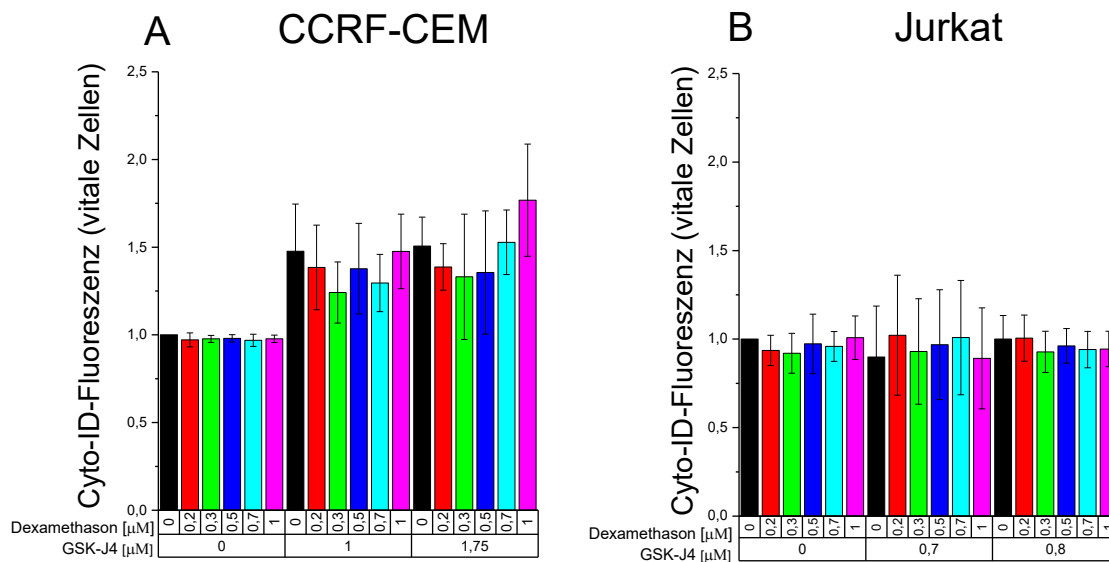


Abb. 14: Autophagie-Wirkung von Dexamethason und GSK-J4. A) Cyto-ID-Fluoreszenz in CCRF-CEM-Zellen. B) Cyto-ID-Fluoreszenz in Jurkat-Zellen. Die Cyto-ID-Fluoreszenz wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse der Cyto-ID-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils acht Bestimmungen nach 72 h.

### 4.2.2.4.2 Vincristin und GSK-J4

CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen wurden mit Vincristin in den Konzentrationen 1, 1,5, 2,5, 3,5, 5 und 6,5 nM und mit GSK-J4 behandelt. Ab einer Konzentration von 5 nM Vincristin stieg in CCRF-CEM-Zellen die Cyto-ID-Fluoreszenz in der Vincristinkontrollreihe konzentrationsabhängig, während in Kombination mit GSK-J4 (1 und 1,75  $\mu\text{M}$ ) die Cyto-ID-Fluoreszenz bereits ab 2,5 nM stetig zunahm. Zudem nahm die Fluoreszenz in der Vincristinkontrolle bei 6,5 nM nur um etwa 50 % des Basalwertes zu, während bei der Kombinationsbehandlung mit GSK-J4 eine Verdoppelung der autophagozytotischen Aktivität zu verzeichnen war. Dies geschah unabhängig davon, ob 1 oder 1,75  $\mu\text{M}$  GSK-J4 in Kombination eingesetzt wurden. Die Abbildung 15 A zeigt diese Beobachtungen.

Die Jurkat-Zellen wurden über 72 h mit Vincristin (0 – 6,5 nM) bzw. mit einer Kombination aus der Vincristinreihe und GSK-J4 der Konzentrationen 0,7 und 0,8  $\mu\text{M}$  behandelt und mittels FACS-Analyse ausgewertet. Die Cyto-ID-Fluoreszenz änderte sich hier hingegen

## Ergebnisse

– im Vergleich zu den Veränderungen der CCRF-CEM-Zellen – nicht signifikant und wurde nicht von der Vincristinkonzentration moduliert (s. Abb. 15 B). Die Fluoreszenzsteigerung fiel auch hier in CCRF-CEM-Zellen höher aus als in den Jurkat-Zellen. Dies ist der Abbildung 15 zu entnehmen.

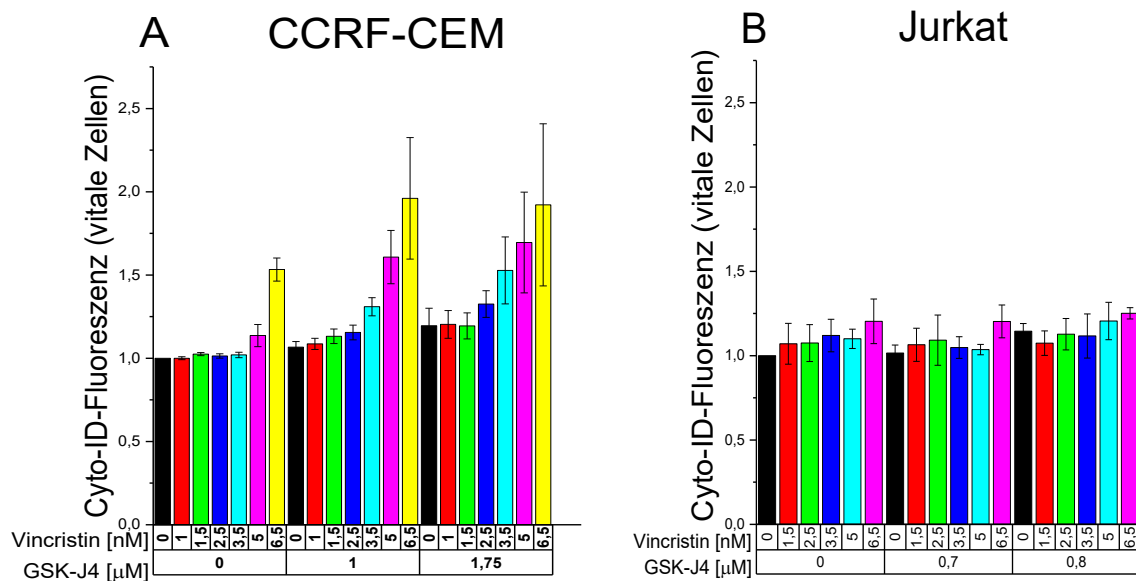


Abb. 15: Autophagie-Wirkung von Vincristin und GSK-J4. A) Cyto-ID-Fluoreszenz in CCRF-CEM-Zellen. B) Cyto-ID-Fluoreszenz in Jurkat-Zellen. Die Cyto-ID-Fluoreszenz wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse der Cyto-ID-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils acht Bestimmungen nach 72 h.

### 4.2.3 Wirkung der Hemmung der Autophagie durch Chloroquin auf den Zelltod

#### 4.2.3.1 Wirkung von Chloroquin

CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen wurden über 72 h mit Chloroquin, einem Hemmstoff des Autophagosomen-Abbaus, in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Es sollte hierbei die Toxizität des Stoffes auf die beiden Zelllinien überprüft werden. Chloroquin steigerte den Zelltod in CCRF-CEM-Zellen bis zu einer Konzentration von 50  $\mu$ M nicht. Die Messung des Verlustes des MMP bestätigte diese Beobachtung unterstützend. Auffallend war hier, dass bei einer Chloroquinkonzentration von 5  $\mu$ M Zelltod und MMP-Verlust vorübergehend um etwa 0,5 % sanken. Diese Beobachtungen zeigen die Abbildungen 16 A und B.

Die Behandlung von Jurkat-Zellen mit Chloroquin über 72 h zeigte bis 25  $\mu$ M keinen Anstieg von Zelltod und MMP-Verlust. Bei einer Konzentration von 50  $\mu$ M stieg der Zelltod im Gegensatz zu den Versuchen mit CCRF-CEM-Zellen auf mehr als das 3-Fache an.

## Ergebnisse

Unterstützt wurde diese Beobachtung durch den gleichzeitigen verstärkten Abfall des MMP bei dieser Konzentration. In Jurkat-Zellen war zudem keine Zelltodminderung durch niedrige Konzentrationen Chloroquin ersichtlich. Diese Daten sind aus Abbildung 16 C und D entnehmbar.

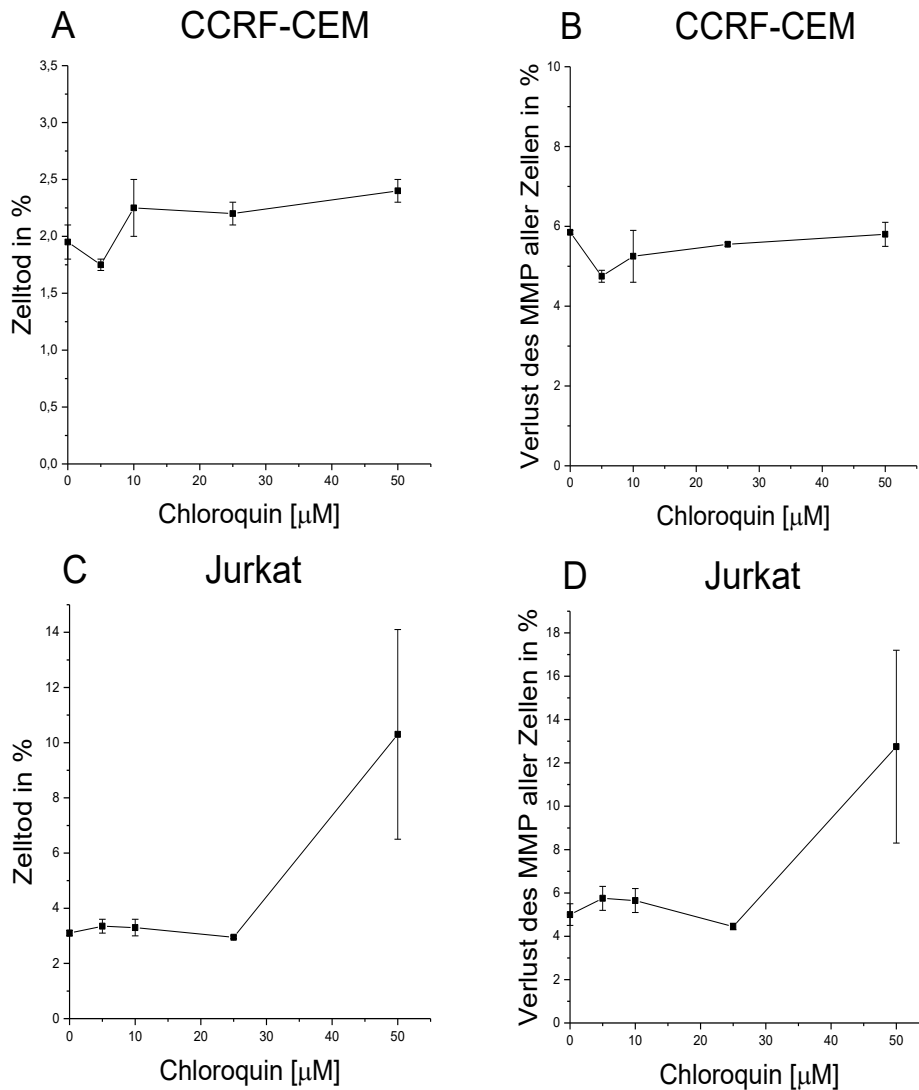


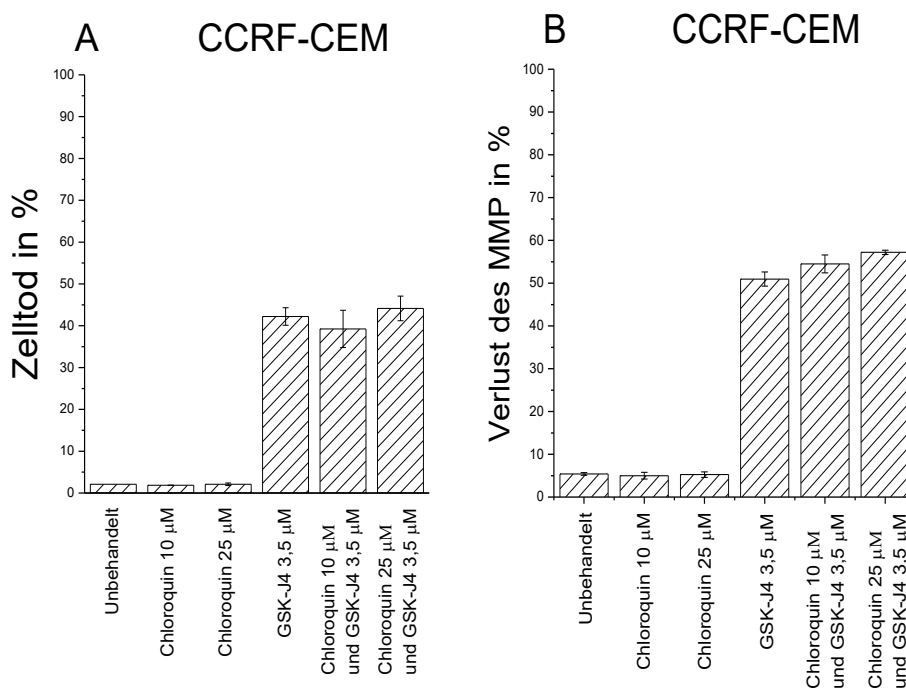
Abb. 16: Wirkung von Chloroquin. A) Zelltod in CCRF-CEM-Zellen. B) Verlust des MMP in CCRF-CEM-Zellen. C) Zelltod in Jurkat-Zellen. D) Verlust des MMP in Jurkat-Zellen. Zelltod und MMP-Verlust wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bzw. der DiIC<sub>1</sub>(5)-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils zwei Bestimmungen nach 72 h.

## Ergebnisse

### 4.2.3.2 Kombination von Chloroquin und GSK-J4

Um die zytotoxische Wirkung der Kombination eines Autophagie-Hemmstoffes mit einem Induktor zu untersuchen, wurden CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen mit Chloroquin und GSK-J4 behandelt und Zelltod sowie MMP-Verlust betrachtet. Hierbei wurden Chloroquin-Konzentrationen zwischen 5 und 50  $\mu\text{M}$  verwendet. Es zeigte sich erneut, dass Chloroquin allein keine Steigerung des Zelltods und des MMP-Verlustes in CCRF-CEM-Zellen bewirkte (s. 4.2.3.1). GSK-J4 in Kombination mit Chloroquin zeigte ebenfalls keine signifikant höhere Zellsterblichkeit als die Einzelbehandlung mit GSK-J4. Ähnlich verhielt sich das MMP. Dies wird in Abbildung 17 A und B gezeigt.

Durch die Behandlung der Jurkat-Zellen zeigte sich der Zelltod durch Kombination von GSK-J4 der Konzentration 0,7  $\mu\text{M}$  und Chloroquin (25 und 50  $\mu\text{M}$ ), welche bei alleiniger Behandlung nicht bzw. nur schwach toxisch waren, stark erhöht. In Kombination mit 50  $\mu\text{M}$  Chloroquin konnte der Zelltod von 10 bzw. 23 % durch jeweilige Einzelbehandlung auf im Mittel 76 % gesteigert werden. In Abbildung 17 C und D sind Zelltod und Verlust des MMP nach 72 h dargestellt.



Legende siehe nächste Seite

## Ergebnisse

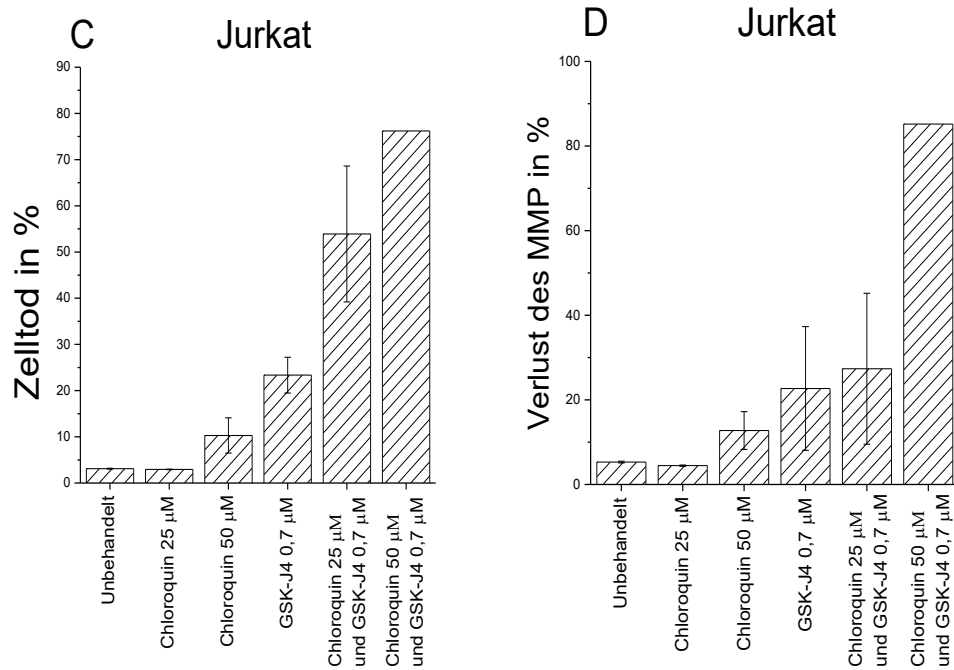


Abb. 17: Wirkung von Chloroquin und GSK-J4. A) Zelltod in CCRF-CEM-Zellen. B) Verlust des MMP in CCRF-CEM-Zellen. C) Zelltod in Jurkat-Zellen. D) Verlust des MMP in Jurkat Zellen. Zelltod und MMP-Verlust wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme bzw. der DiIC<sub>1</sub>(5)-Einfärbung bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils zwei Bestimmungen nach 72 h.

### 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde beschrieben, dass GSK-J4 ein Induktor der Autophagie in den betrachteten Leukämiezelllinien ist. Die Kombination von GSK-J4 mit typischen Zytostatika wie Vincristin oder Glukokortikoiden wie Dexamethason können je nach Zellreihe und *KDM6B*-Expression eine Erhöhung des Zelltods bewirken und somit möglicherweise auch in vivo bei schlechtem Ansprechen auf Dexamethason die Therapieergebnisse verbessern. Es ist jedoch Vorsicht geboten, da nicht jede Kombination bessere Ergebnisse als eine Einzelbehandlung bietet. Es konnte kein durchgängiger signifikanter und direkter Zusammenhang zwischen der Veränderung der Autophagie durch GSK-J4 und der Erhöhung des Zelltods beobachtet werden. Jedoch könnte die Wechselwirkung zwischen Autophagie und Zelltod von der Höhe der Expression des betrachteten Zielgens abhängen. Der Zelltod-erhöhende Effekt der Kombinationsbehandlungen ist am ehesten durch komplexere Mechanismen, als alleinig auf die Autophagie-Induktion durch GSK-J4 zurückzuführen. Das Überwinden der Resistenz gegenüber Glukokortikoiden wird in dieser Arbeit definiert als Wiedergewinn des Dexamethason-modulierten Anstiegs des Zelltods. Dieses Überwinden konnte nur in der Zelllinie mit normaler Expressionshöhe der *KDM6B*, d. h. bei CCRF-CEM-Zellen beobachtet werden.

Die Untersuchungen wurden an zwei T-ALL-Zelllinien – Jurkat und CCRF-CEM – durchgeführt, um so die Ergebnisse valide bestätigen zu können. Diese differieren in ihrem Expressionsmuster des untersuchten Angriffspunktes *KDM6B*. Somit ist eine Evaluation möglich, ob auch Probanden mit normaler Expression von *KDM6B* einen Vorteil durch Behandlung mit GSK-J4 haben könnten. Zur Darstellung des Zelltods verwendete ich zum einen die PI-Färbung, um tote Zellen zu erkennen, zum anderen benutzte ich DiIC<sub>1</sub>(5) zum Nachweis der Zellen, die ihr MMP verloren haben und somit dem Verlust ihrer zellulären Integrität nahe waren, um so das Ergebnis der PI-Messung zu bestätigen (Lemasters et al. 1998). Es wurden mit beiden Indikatoren grundsätzlich übereinstimmende Wirkungen ermittelt. Somit sind dies zwei Wege, um die zytotoxische Wirkung der Behandlung zu beschreiben und so den zellschädigenden Effekt der Agenzien doppelt zu überprüfen. Außerdem wurden die Versuche in der Regel mehrfach durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Messungen gewährleisten zu können und die Aussagekraft somit zu stärken.

### 5.1 Relevanz der *KDM6B* in CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen

Die Expression der *KDM6B* unterschied sich in den zwei betrachteten Zelllinien. CCRF-CEM-Zellen zeigten eine ähnliche Expression des Gens wie die Vergleichsprobe gesunder Knochenmarkspender. Jurkat-Zellen hingegen wiesen eine mehr als 7-fach gesteigerte Expression auf. Hier ist zu vermuten, dass Jurkat-Zellen sensibler auf eine Inhibition durch GSK-J4 reagieren könnten als CCRF-CEM-Zellen. Die Expressionsmenge der Gene und die Produktion der genkodierenden Proteine korrelieren nicht in jedem Fall miteinander. Es wird angenommen, dass veränderte Transkriptionslevel eines Genes zu 34-73 % mit Veränderungen des korrespondierenden Proteins korrelieren (Li und Biggin 2015, Vogel und Marcotte 2012). In diesem Fall wurde eine solche Korrelation bereits in T-ALL-Zellen nachgewiesen (Ntziachristos et al. 2014). Zudem konnte eine unterschiedliche Reaktion beider Zelllinien in den folgend durchgeführten Versuchen mehrfach gezeigt werden.

In Jurkat-Zellen war eine niedrigere GSK-J4-Konzentration notwendig, als in CCRF-CEM-Zellen, um eine Erhöhung des Zelltods zu erreichen. Zudem fiel das Ausmaß des Zelltods in Jurkat-Zellen durch GSK-J4 in gleicher Konzentration höher aus (etwa 80 %), als in CCRF-CEM-Zellen (etwa 40 %). Die Zellen mit höherer *KDM6B*-Expression reagierten also sensibler auf Inhibition der *KDM6B*.

Eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Expressionshöhen der beiden T-ALL-Linien könnte in den unterschiedlichen Krankheitsstadien der Patienten vor Zellkulturbeginn begründet sein. Jurkat-Zellen stammen von einem Patienten mit einem ersten Rezidiv, CCRF-CEM-Zellen von einer Patientin mit einem terminalen Stadium der ALL. Möglicherweise könnte sich das Expressionsmuster von *KDM6B* mit dem ALL-Krankheitsverlauf verändern, wie es schon für die CML in Bezug auf die *KDM5A*-Expression beschrieben ist. Hier wurden höhere *KDM5A*-Ausprägungen, vor allem in frühen Stadien, vorgefunden, die mit zunehmendem Krankheitsverlauf abnahmen (Zhou et al. 2015). Eine andere Studie zeigte einen Anstieg der Expression der *KDM6B* im metastasierten Stadium des Prostatakarzinoms und somit eine gesteigerte Expression in späten Stadien der Tumorentstehung (Xiang et al. 2007). Das zeigt, dass sich die Modulation einzelner Gene innerhalb eines Krankheitsbildes im Verlauf ändern kann. Gene bzw. Genregulatoren können im zeitlichen Verlauf hoch- oder herabreguliert werden. Um diese These zu prüfen, wäre hier eine Analyse der *KDM6B*-Genexpression während des Krankheitsverlaufs in unterschiedlichen Stadien aufschlussreich.



### **5.2 GSK-J4 als möglicher Kombinationspartner bei der Therapie der Leukämie**

#### **5.2.1 Wirkung von GSK-J4**

Beide Zelllinien reagierten – wie in 5.1 bereits angemerkt – unterschiedlich auf die Behandlung mit GSK-J4. So zeigten sich Jurkat-Zellen sensibler für GSK-J4, als CCRF-CEM-Zellen. Ursächlich für die verstärkte Wirksamkeit des KDM6B-Inhibitors in Jurkat-Zellen könnte die vermehrte Expression der *KDM6B* sein. Somit könnte der Inhibitor hier eine verstärkte Wirkung zeigen, da das Protein vermehrt produziert und somit möglicherweise eine höhere Relevanz für das Überleben der Zellen und die Pathogenese in dieser Zelllinie innehat. Die Inhibition wäre auf Grund dessen ein effektiver Angriffspunkt und hätte in Zellen höherer Expression eine verstärkte Wirkung. Das könnte bedeuten, dass in Zellen mit normalem Expressionslevel der *KDM6B* – wie hier die CCRF-CEM-Zellen – durch gleiche Konzentrationen GSK-J4 weniger Schaden entstünde und diese somit weniger angegriffen werden würden. Dies wäre ein Vorteil bei der Therapie, da dann möglicherweise gesunde Zellen mit normal niedriger KDM6B-Expression weniger durch GSK-J4 beeinträchtigt und somit geschont werden würden.

#### **5.2.2 Wirkung von Dexamethason**

Es konnte gezeigt werden, dass weder die Jurkat- noch die CCRF-CEM-Zellen Glukokortikoid-sensibel sind. Dies wurde auch schon vorher in anderen Publikationen gezeigt (Moharram et al. 2017, Serafin et al. 2017, Ling Gu 2010, Beesley et al. 2006). Es sind Dexamethason-resistente und -sensitive Subtypen der CCRF-CEM-Zelllinie bekannt (Medh et al. 2003, Norman und Thompson 1977). Die in den Versuchen verwendete CCRF-CEM-Zelllinie ist die Dexamethason-resistente Ursprungslinie. Dieses Wissen dient – ebenso wie der Nachweis der Autophagie-Wirkung von GSK-J4 – als Grundlage dieser Arbeit, da das Prinzip der Überwindung eben dieser Resistenz gegenüber Glukokortikoiden erforscht werden soll und für diese Fragestellung somit vorausgesetzt sein muss.

#### **5.2.3 Kombination von GSK-J4 und Dexamethason**

Eine Kombination von GSK-J4 und Dexamethason konnte in CCRF-CEM-Zellen eine teils signifikant Dexamethason-abhängige Zelltodsteigerung sowie einen signifikant Dexamethason-abhängigen Verlust des MMP auslösen. So kann in diesem Fall die Glukokortikoid-Resistenz durch Kombination dieser beiden Wirkstoffe überwunden und das Therapieansprechen verbessert werden. Es zeigte sich ein deutlicher Synergismus

## Diskussion

beider Wirkstoffe. Zudem könnten so niedrigere Wirkspiegel durch Kombination notwendig sein und somit weniger Nebenwirkungen auftreten (Reza Bayat Mokhtari et al. 2017). Ähnliche Ergebnisse konnten durch GSK-J4 bereits in anderen Tumorerkrankungen gezeigt werden. Beispielsweise wurde in Experimenten mit GCB-DLBCL-Zellen festgestellt, dass die Hemmung der KDM6B durch GSK-J4 toxisch wirkte und dass dieser Wirkstoff einen sensibilisierenden Effekt der Zellen für verschiedene Standardchemotherapeutika bewirkte (Mathur et al. 2017).

Dem gegenüber zeigten die Jurkat-Zellen zwar einen vermehrten Zelltod und Verlust des MMP, diese Größen waren jedoch unabhängig von der Dexamethason-Konzentration und zudem größeren Schwankungen unterworfen. Also ist hier von keiner Sensibilisierung für Glukokortikoide auszugehen. Der Anteil an toten Zellen fiel bei kombinierter Behandlung mit Dexamethason und GSK-J4 sogar etwas geringer aus. So lässt sich unter Beachtung der Mittelwerte ein antagonistischer Effekt vermuten, welcher durch CI-Werte über 1 im Chou-Talalay-Kombinationsindex deutlich bewiesen werden konnte. Demnach war bei den Jurkat-Zellen – im Gegensatz zu den Versuchen mit CCRF-CEM-Zellen – nur der zelltoderhöhende Effekt durch GSK-J4, jedoch keine Glukokortikoid-sensibilisierende Wirkung nachzuweisen.

Durch die grundsätzliche Zelltodsteigerung könnte daher bei Glukokortikoid-Resistenz auch bei Jurkat-Zellen eine Behandlung mit GSK-J4 in Erwägung gezogen werden. Dabei ist dann jedoch aufgrund fehlender Modulation des Zelltods durch Dexamethason und des beobachteten Antagonismus eine Kombinationsbehandlung nicht sinnvoll, da die Kombination mit Dexamethason den Zelltod nicht weiter steigerte und GSK-J4 allein den Zelltod effektiver anhub als die Kombination. Das Ausmaß des Zelltods war in Jurkat-Zellen schon bei niedrigeren Konzentrationen GSK-J4 als in CCRF-CEM-Zellen zu verzeichnen. Somit sind in vivo potenziell weniger Nebenwirkungen aufgrund niedrigerer notwendiger Wirkspiegel, potenziell möglicher Monotherapie sowie fehlender Interaktionen und Nebenwirkungen durch Dexamethason zu vermuten. Zudem ist auffallend, dass der Zelltod in Jurkat-Zellen höher als in CCRF-CEM-Zellen ausfällt. Also zeigte sich das sensiblere Ansprechen der Jurkat-Zellen auf GSK-J4 nicht nur durch das Ansprechen auf niedrigere Konzentrationen, sondern auch in der deutlich höheren erreichbaren Zellsterblichkeit.

## Diskussion

Die Unterschiede der beiden T-ALL-Linien könnten zum einen in der unterschiedlichen Expressionshöhe des KDM6B-Gens begründet sein. Zum anderen könnten weitere potenzielle Einflussfaktoren die Unterschiede der Zelllinien in puncto Alter und Geschlecht der Ursprungspatienten sein. Wie bereits erwähnt wurden die Zellen der CCRF-CEM-Zelllinie aus einem dreijährigen Mädchen im terminalen Rezidiv gewonnen, die Jurkat-Zellen entstammen der Leukämie eines 14-jährigen Jungen im ersten Rezidiv (Schneider et al. 1977, Foley et al. 1965). Somit unterschieden sie sich im Zeitpunkt der Zelllinienetablierung. Bezüglich des Alters zählt der Jurkat-Ursprungspatient zur Hochrisikogruppe, was ebenfalls einen Einfluss auf das Zellansprechen haben könnte. Weiterhin ist denkbar, dass unterschiedliche Mutationen in den Zelllinien ursächlich für diese Unterschiede sind. GSK-J4 beeinflusst zwar vorrangig die KDM6B, jedoch sind insgesamt drei relevante Enzyme beschrieben. Hierzu zählen auch die Enzyme KDM6A und im geringeren Maße die KDM5-Subfamilie. Somit können auch Veränderungen dieser Angriffspunkte des Inhibitors die Ergebnisse beeinflusst haben (Kruidenier et al. 2012, Heinemann et al. 2014).

Unter Beachtung all dieser Umstände zeigt sich, dass GSK-J4 ein potenter Wirkstoff zur Sensibilisierung der Leukämie für Glukokortikoide sein kann. Jedoch ist nicht grundsätzlich von einer solchen Wirkung auszugehen. Aus diesen Gründen sind personalisierte Ansätze notwendig. Vor einer Behandlung müsste also geklärt werden, ob eine Therapie mit GSK-J4 angebracht oder eine Kombinationstherapie sinnvoll wäre. Möglicherweise könnte die KDM6B-Genexpressionsanalyse ein geeigneter Screening-Parameter für diese Fragestellung sein. Hier ist jedoch noch weitere Forschung notwendig, um eine Allgemeingültigkeit postulieren zu können.

### 5.2.4 GSK-J4 und Vincristin

Im Zuge dieser Arbeit wurde auch eine Analyse des Zelltods in beiden Zelllinien unter Kombinationsbehandlung mit Vincristin und GSK-J4 durchgeführt. Vincristin, eines der typischen Zytostatika in der Behandlung der ALL, bewirkte in beiden Zellreihen mit steigenden Konzentrationen vermehrt Zelltod. Eine Sensibilität beider Zelllinien für Vincristin wurde bereits in der Literatur beschrieben (Beesley et al. 2006). Der Zelltod-steigernde Effekt ist auch in dieser Kombinationsvariante in Jurkat-Zellen höher (auf etwa 80 %), als in CCRF-CEM-Zellen (auf etwa 50 %).

## Diskussion

Bis zu einer Vincristin-Konzentration von 5 nM war der ausgelöste Zelltod in CCRF-CEM-Zellen durch Kombination mit GSK-J4 steigerbar. Jedoch schwächte eine Kombination beider Stoffe die Wirksamkeit des Vincristins (Zelltod und MMP-Verlust) in höheren Konzentrationen ab. Hier schienen sich die beiden Wirkstoffe bei höheren Vincristin-Konzentrationen entgegengesetzt verhalten zu haben. Die Analyse der CI-Werte bestätigte den antagonistischen Effekt. Somit wäre die Kombination beider Wirkstoffe nur bei niedrigeren Vincristin-Konzentrationen sinnvoll. Diese wäre in diesem Fall jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht so effektiv, wie eine hochdosierte Monotherapie mit Vincristin. Darum ist diese Kombination in CCRF-CEM-Zellen eher weniger praktikabel und birgt das Risiko, die Effektivität des Vincristins herabzusetzen.

Durch kombinierte Behandlung der Jurkat-Zellen mit beiden Wirkstoffen kann ein vermehrter Zelltod erreicht werden. Dieser Effekt wird bei niedrigen Konzentrationen zunächst abgeschwächt (1,5 nM), steigt dann aber kontinuierlich weiter an. Da sich die Zytotoxizität der Kombinationsbehandlung – wie im Falle der CCRF-CEM-Zellen – auch hier der Toxizität der Monotherapie mit Vincristin annähert, wäre eine Kombination – wenn überhaupt – eher bei niedrigeren Konzentrationen sinnvoll, da bei höheren Vincristin-Konzentrationen die Wirksamkeit zu sinken scheint. Es zeigte sich auch in dieser Zelllinie ein Antagonismus beider Wirkstoffe. Trotz der Annäherung der Höhe des Zelltods durch Monotherapie mit Vincristin und durch die Kombinationstherapie mit GSK-J4 (0,8 µM) bewirkt die Kombinationstherapie (Vincristin 6,5 nM) einen signifikant höheren Zelltod als Vincristin (6,5 nM) allein. Zudem ist die Kombination von GSK-J4 (0,8 µM) mit niedrigeren Konzentrationen von Vincristin (3,5 nM) bezüglich des Zelltodausmaßes ebenso effektiv, wie die alleinige Behandlung mit Vincristin in höheren Konzentrationen (6,5 nM). Somit wären hier durch Kombination niedrigere Wirkspiegel des Vincristins notwendig und gegebenenfalls Nebenwirkungen zu reduzieren (Reza Bayat Mokhtari et al. 2017). Folglich könnte die Kombination in Jurkat-Zellen trotz antagonistischer Tendenzen sinnvoll sein, wenn sich hierdurch in klinischer Analyse die Nebenwirkungen reduzieren ließen. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass die Behandlung von DLBCL-Zellen mit GSK-J4 einen chemosensibilisierenden Effekt für Rituximab, Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin und Prednisolon aufzeigt (Mathur et al. 2017). Somit konnte in diesen Zellen einer lymphoproliferativen Erkrankung eine Steigerung des Zelltods durch Kombination beider Agentien bewirkt werden. Auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte durch die Kombination von Vincristin und GSK-J4 teilweise eine Erhöhung des Zelltods durch eine Kombinationsbehandlung

## Diskussion

nachgewiesen werden. Ein synergistischer Effekt war jedoch nicht nachzuweisen. Da es sich um zwei verschiedene lymphoproliferative Tumore handelt, könnte die unterschiedliche Wirkung derselben Wirkstoffkombination hierin begründet liegen.

Auch bei dieser Wirkstoffkombination wäre das Finden eines Markers notwendig, um die Voraussetzungen für eine solche Therapie zu klären. Auch käme die Expressionsanalyse der *KDM6B* als ein potenzieller und noch zu erprobender Marker in Frage. Aufgrund der Annäherung der Zelltodwerte bei höheren Vincristin-Konzentrationen ist nicht auszuschließen, dass sich bei höheren Konzentrationen ebenfalls eine Abschwächung der Vincristin-Wirkung zeigen könnte. Folglich ist hier Vorsicht geboten.

Beide Zelllinien unterscheiden sich in ihren Mutationen, in Patientenalter und Geschlecht sowie im Krankheitsstadium. Der Einfluss der unterschiedlichen Mutationen konnte bereits durch Untersuchungen mit GSK-J4 an AML-Zellen beschrieben werden. Dabei korrelierte die Höhe der *KDM6B*-Genexpression mit dem Vorhandensein unterschiedlicher Mutationsmuster, vor allem unterschiedlicher Translokationen (Li et al. 2018). Die Expression des Zielgens ist in CCRF-CEM-Zellen vermindert und könnte folglich in puncto Relevanz niedriger einzuschätzen sein. Der Zelltod befand sich in Kombinationsbehandlung bei 7 nM Vincristin auf in etwa demselben Niveau wie der Zelltod, der durch alleinige Behandlung mit GSK-J4 bei höchster untersuchter Konzentration ausgelöst wurde. Zudem schien der Kurvenverlauf in Kombination bei dieser Kombination abzuflachen. So ist möglich, dass GSK-J4 den Zelltod aufgrund der niedrigeren Relevanz der *KDM6B* in CCRF-CEM-Zellen nur bis zu diesen 40 % Zelltod zu steigern vermag und dann keinen weiteren additiven Effekt aufweist. Dem widersprechen auch die Ergebnisse durch die Kombination von GSK-J4 und Dexamethason nicht, da auch hier keine wesentliche Steigerung über das maximal beobachtete GSK-J4 Zelltodlevel bei Einzelbehandlung von etwa 40 % beobachtet werden konnte. Somit ist die Wirksamkeit der Behandlung mit GSK-J4 möglicherweise bedeutend vom Level der *KDM6B* abhängig.

Beiden Zelllinien gemein war die antagonistische Wirkung beider Wirkstoffe auf den Zelltod. Dies könnte damit zusammenhängen, dass Vincristin als ein Spindelgift in die Funktion der Mikrotubuli eingreift und einen Zellzyklusarrest in der Metaphase auslöst (Himes 1991). Es wurde in der Literatur auch eine zytotoxische Wirkung des Vincristins beim Durchlaufen der G1-Phase in ALL-Zellen postuliert. Eine weitere Studie zeigte jedoch, dass durch Zellzyklusarrest in der G1-Phase diese Wirkung nicht mehr beobachtet werden

## Diskussion

konnte. Somit zeigte sich dieser Effekt nur, wenn die Zellen nicht in dieser Phase arretiert blieben (Kothari et al. 2016, Delgado und Chambers 2018). GSK-J4 hingegen bewirkt in etwa 50 % der Zellen ein Verbleib der Zellen in der G0- bzw. der G1- oder S-Phase. In Mitose- bzw. G2-Phase verbleiben nur etwa 3 % der Zellen (Ntziachristos et al. 2014). Da Vincristin seine Wirkung vor allem in der Mitosephase zeigt, sich jedoch durch GSK-J4 nur ein kleiner Anteil der Zellen in dieser Phase des Zellzyklus befinden, könnte sich hierin eventuell der antagonistische Effekt begründen.

### 5.2.5 GSK-J4 und Chloroquin

Derzeit sind Chloroquin und sein Derivat Hydroxychloroquin die einzigen Medikamente, die in klinischen Studien angewendet werden, um die Autophagie zu beeinflussen (Towers und Thorburn 2016). So konnte durch die Kombination herkömmlicher Chemotherapeutika mit Chloroquin die Therapie von Glioblastom, Melanom und Hirnmetastasen in klinischen Studien verbessert werden (Towers et al. 2020). In der Literatur zeigte sich zudem, dass die Behandlung von Prä-B-ALL-Zellen mit Chloroquin sowie dessen Kombination mit Vincristin das Zellüberleben verringerte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch Unterdrückung der Autophagie ALL-Zellen für eine Anti-Tumor-Therapie sensibilisiert werden können (Sheikh-Zeineddini et al. 2020).

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Zelltodeffekt der Kombination eines Inhibitors der Autophagie mit GSK-J4 untersucht, um mögliche therapeutische Optionen einer solchen Kombination zu evaluieren. Die Behandlung der CCRF-CEM-Zellen mit Chloroquin führte zu keiner signifikanten Erhöhung des Zelltods. Die Kombination von Chloroquin mit GSK-J4 erhöhte die Zellsterblichkeit nicht signifikant über das Level des Zelltods, welches durch alleinige Behandlung mit GSK-J4 ausgelöst wurde. Auf Grund dessen ist eine Kombination der beiden Wirkstoffe in dieser Zelllinie nicht sinnvoll.

In Jurkat-Zellen konnte bei alleiniger Behandlung mit Chloroquin eine leichte Zelltodsteigerung durch höhere Konzentrationen beobachtet werden. Dies könnte damit zusammenhängen, dass Chloroquin in Jurkat-Zellen, jedoch nicht in CCRF-CEM-Zellen, eine Steigerung des ROS-Niveaus bewirkt und dadurch eine vermehrte oxidative Stressreaktion und darauffolgend eine Zelltodsteigerung auslöst (Hounjet et al. 2019). Die Kombination mit GSK-J4 zeigte auch bei niedrigeren Chloroquin-Konzentrationen eine Steigerung des Zelltods. Dieser scheint bei 0,7  $\mu\text{M}$  GSK-J4 Chloroquin-konzentrationsabhängig anzusteigen. Die Kombination von 0,7  $\mu\text{M}$  GSK-J4 und 50  $\mu\text{M}$

## Diskussion

Chloroquin führte zu einem Zelltod von etwa 75 % und ist der Monotherapie mit 0,7  $\mu\text{M}$  GSK-J4 überlegen. Somit ist in Jurkat-Zellen eine Kombination von GSK-J4 und Chloroquin sinnvoll.

Analog zu den anderen zwei Kombinationsversuchen könnten diese unterschiedlichen Beobachtungen in beiden Zelllinien mit den verschiedenen Expressionsniveaus des Zielgens zusammenhängen. Zudem unterschieden sich die Zelllinien – wie zuvor beschrieben – in vielen Punkten, die ebenfalls Einfluss genommen haben könnten. Der steigende Effekt des Chloroquins auf das ROS-Niveau in Jurkat-Zellen, welcher nicht in CCRF-CEM-Zellen beobachtet werden konnte, könnte den starken zytotoxischen Effekt der Kombinationsbehandlung auf Jurkat-Zellen ebenfalls begründen (Hounjet et al. 2019).

### 5.3 GSK-J4 induziert Autophagie

Für den indirekten Nachweis, dass GSK-J4 die Autophagie induziert und nicht hemmt, wurde eine in diesem Kontext häufig angewandte Methode genutzt. In diesem Versuch wurde durch Chloroquin, einem bekannten Hemmstoff der Verschmelzung von Autophagosomen mit Lysosomen, der Autophagic flux gehemmt (Towers und Thorburn 2016). Die Behandlung mit Chloroquin allein löste in CCRF-CEM-Zellen eine Erhöhung der Cyto-ID-Fluoreszenz um etwa 40 % der Fluoreszenz der unbehandelten Zellen aus. Die Behandlung der Zellen mit GSK-J4 bei einer Konzentration von 3,5  $\mu\text{M}$  zeigte eine Floreszenzsteigerung von 120 %. Die Kombination beider Agentien erhöhte die Fluoreszenz in Bezug auf die unbehandelten Zellen um 1190 % des Referenzwertes. Würden beide Agentien den Autophagic flux hemmen, ließe sich die Floreszenz bei vollständiger Blockade durch Chloroquin durch einen weiteren Inhibitor nicht weiter steigern als nur auf das Ausmaß, in welchem sie durch Einzelbehandlung mit Chloroquin verändert wurde. Selbst wenn Chloroquin die Autophagie nicht vollständig hemmen würde, wäre bei einer Kombination mit einem weiteren Hemmstoff nur ein additiver Effekt zu erwarten. Die Kombination beider Agentien erwirkte jedoch eine überproportionale Steigerung des Autophagie-Signales, was als Evidenz für eine Autophagie-induzierende Wirkung von GSK-J4 gewertet werden kann.

Dieses Prinzip des Nachweises des Autophagic flux wird häufig angewandt und ist nicht an Chloroquin als Autophagieinhibitor gebunden. Es können auch andere an den Lysosomen angreifenden Inhibitoren der Autophagie, wie beispielsweise Bafilomycin, zum Nachweis der Wirkung eines Medikamentes auf die Autophagie genutzt werden (Hongfeng

## Diskussion

Yuan 2017). Der Nachweis der Autophagosomenzahl kann auch durch Verwenden eines Immunoblots erfolgen. Hier kann LC3-II als Indikator der Autophagie genutzt werden, da die Konzentration von LC3-II mit der Anzahl der Autophagosomen korreliert und somit ein guter Indikator für die Formation von Autophagosomen ist (Mizushima und Yoshimori 2014, Yukiko Kabeya 2000). Dasselbe Prinzip wurde in dieser Arbeit angewendet, indem eine Kombination des zu erforschenden Agens GSK-J4 mit Chloroquin als Inhibitor der Autophagie und Cyto-ID als Indikator der Autophagie erfolgte.

Ähnliche Ergebnisse wie in den CCRF-CEM-Zellen konnten in geringerem Ausmaß ebenfalls durch die Kombinationsversuche von GSK-J4 und Chloroquin in Jurkat-Zellen nachgewiesen werden. Die Ursache für das verringerte Ausmaß der Differenz könnte darin liegen, dass die Jurkat-Zellen aufgrund der erhöhten *KDM6B*-Expression sensibler auf eine Monotherapie mit GSK-J4 ansprechen, da das kodierende Protein vermehrt vorhanden ist und somit der Einfluss der Inhibition einen größeren Einfluss hat. Anders als bei CCRF-CEM-Zellen wirkt der Inhibitor selbst schon stark zytotoxisch bei minimalem Anstieg der Autophagieintensität. Das bedeutet, dass niedrigere GSK-J4-Konzentrationen für eine starke Zelltodsteigerung ausreichend waren. Diese Konzentrationen hatten jedoch nur eine geringe Steigerung der Autophagie bei alleiniger Behandlung zur Folge. Daher fiel dieser Autophagie-steigernde Prozess, wie auch Abbildung 11 zeigt, erst bei höheren Konzentrationen ins Gewicht.

Zusammenfassend scheint GSK-J4 ein Induktor der Autophagie zu sein, da sich vor allem in den Kombinationsversuchen mit GSK-J4 und Chloroquin, einem bekannten Inhibitor der Autophagie (Kimura et al. 2013, Amaravadi et al. 2011), eine Steigerung derselben, über die der alleinigen Behandlung mit entweder GSK-J4 oder Chloroquin hinaus, zeigte. Somit haben sich die beiden Effekte addiert, indem GSK-J4 die Autophagie angeregt und Chloroquin in diesem Fall den Abbau der nun durch GSK-J4 induziert erhöhten Anzahl der Autophagosomen blockiert hat. Insofern konnte in diesem Versuch erstmalig an Leukämiezellen der Nachweis gelingen, dass GSK-J4 Autophagie induziert. Eine Autophagie-induzierende Wirkung konnte auch bereits bei Inhibitoren anderer Histon-Demethylasen beobachtet werden, wie beispielsweise durch die Hemmung der Histon-H3K4-Demethylase (*KDM1A/LSD1*) mit 2-PCPA und auch durch GSK-LSD1 (Wang et al. 2017).



### 5.4 Rolle der Autophagie in Kombinationsbehandlungen mit GSK-J4

Im Zuge aller Zellexperimente wurden zusätzlich mittels Cyto-ID-Detektion durchflusszytometrisch Veränderungen der Autophagie bestimmt. Ziel war es, nach Zusammenhängen zwischen Autophagie, Zelltod und Glukokortikoid-Resistenz-Überwindung zu suchen. Die Literatur zeigt, dass durch Obatoclax, durch Herunterregulieren von Proteinen der BCL-2-Familie und durch die Induktion von Autophagie und Apoptose Glukokortikoidresistenz in ALL-Zellen überwunden werden konnte (Heidari et al. 2010). Zudem wurde bereits in Studien nachgewiesen, dass durch das Unterbinden der Autophagie in lymphatisch-proliferativen Krankheiten in Zellen eines Burkitt-Lymphomes sowie in denen eines histozytischen Lymphoms die Überwindung dieser Resistenz erreicht werden konnte (Jiang et al. 2015). Deshalb ist ein Zusammenhang zwischen Autophagie und Resistenzüberwindung möglich und wurde im Weiteren untersucht.

#### 5.4.1 Autophagie-Steigerung durch GSK-J4

Die Behandlung der Zellen mit GSK-J4 löste in beiden Zelllinien eine Erhöhung des Zelltods wie auch der Autophagie aus. Die Jurkat-Zelllinie reagierte in puncto Zelltod sensibler auf GSK-J4, als die CCRF-CEM Zellen. Folglich waren für die Behandlung der Jurkat-Zellen mit GSK-J4 geringere Mengen des Wirkstoffes notwendig, um dasselbe Ausmaß an Zelltod zu erreichen. Die Steigerung des Autophagie-Faktors zeigte jedoch im Gegensatz dazu in beiden Zelllinien einen ähnlichen Verlauf und korrelierte eher mit dem Anstieg des Zelltods in CCRF-CEM-Zellen. In höchster verwendeter Konzentration des GSK-J4 (hier 3,5  $\mu$ M) zeigte sich eine Verdoppelung (2 – 2,5-fach) der Autophagie in beiden Zelllinien. Trotz steilerem Anstieg von Zelltod und MMP-Verlust in den Jurkat-Versuchen stieg die Autophagie-Fluoreszenz – ähnlich wie in den CCRF-CEM Zellen – stetig an und nicht S-förmig wie Zelltod und MMP-Verlust in diesem Versuch. Der starke Zelltodanstieg in Jurkat-Zellen korrelierte nicht mit einem verstärkten Anstieg der Autophagie. So war die Autophagie am Punkt des stärksten Zelltodanstiegs nur leicht erhöht und stieg erst steiler an, als die Zelltodkurve abflachte. Das könnte bedeuten, dass der zelltodsteigernde Effekt von GSK-J4 bei vermehrter *KDM6B*-Expression nicht primär über Induktion der Autophagie abläuft bzw. Autophagie-vermittelt, sondern durch andere Mechanismen zustande kommt. Jedoch war der Zelltod-steigernde Effekt bei normal hoher Expression der *KDM6B*, wie hier in den CCRF-CEM-Zellen, mit einer Autophagie-Erhöhung assoziiert. Somit scheint die Induktion der Autophagie durch GSK-J4 und deren Effekte zum einen von der GSK-J4-Konzentration abhängig zu sein, zum anderen

## Diskussion

scheinen Zelltodanstieg und Autophagie-Korrelation abhängig von der Sensibilität der Zelllinie und damit eventuell auch abhängig von der *KDM6B*-Expression zu sein. Somit könnte der Zelltod-fördernde Effekt in beiden Zelllinien auf unterschiedlichen Grundlagen abhängig von dem Expressionsniveau zu erklären sein.

Somit ist ein Autophagie-vermittelter Zelltod durch GSK-J4 in CCRF-CEM-Zellen (geringe *KDM6B*-Expression) denkbar und in Jurkat-Zellen (erhöhte *KDM6B*-Expression) eher weniger als potenziell auslösender Faktor anzusehen. In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass GSK-J4 in Keimzelltumorzellen unter anderem die Zellproliferation inhibierte, das Fortschreiten des Zellzyklus unterdrückte, den Zelltod durch Apoptose und Nekrose aktivierte und daher Einfluss auf mehrere verschiedene Zellprozesse hatte (Mandal et al. 2017). Ebenso sollte man bedenken, dass GSK-J4 als ein Wirkstoff auf epigenetischer Ebene in der Regel mehrere Gene beeinflusst, welche je nach Mutationsmuster und Krankheit unterschiedliche Relevanz für Progress und Prognose der Erkrankung haben können (Mathur et al. 2017). Demnach ist wohl am ehesten ein multifaktorieller Wirkmechanismus zu vermuten.

### 5.4.2 Fehlende Autophagie-Modulation durch Dexamethason

Die Behandlung der CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen zeigte, dass die hier untersuchten Glukokortikoid-resistenten Zellen durch Behandlung mit Dexamethason keine Änderungen der Autophagie zeigten. Das bedeutet, dass durch Dexamethason nicht nur keine Zelltoderhöhung und kein erhöhter Verlust des MMP verursacht wurde, sondern auch, dass durch diese Behandlung keine zelluläre Stresssituation ausgelöst wurde, die eine Steigerung des Zellumsatzes und des Autophagic flux auslösen würde. Da die Wirksamkeit der Glukokortikoide laut Literatur wesentlich von der Induktion der Autophagie abzuhängen scheint, ist es nachvollziehbar, dass eine Steigerung der Autophagie durch Dexamethason in resistenten Zellreihen, wie in den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen ersichtlich, ausbleibt (Grander et al. 2009). Die Zelllinien Raji (Burkitt-Lymphom) und U-937 (histozytisches NHL), welche für zwei weitere lymphoproliferative Erkrankungen stehen, verhalten sich hingegen etwas anders. Auch sie zeigen in der Literatur ein schlechtes Ansprechen auf Dexamethason, jedoch ist eine Dexamethason-vermittelte Steigerung der Autophagie zu verzeichnen (Jiang et al. 2015). Die Gründe für die unterschiedliche Wirkung sind bisher nicht hinreichend erforscht und könnten auf unterschiedliche Resistenzmechanismen hindeuten. Da im zweiten Fall, in welchem Dexamethason die Autophagie in Raji- und U-937-Zellen erhöht, durch Inhibition der

## Diskussion

Autophagie die Resistenz überwunden werden konnte, zeigt sich erneut die Dualität der Rolle von Autophagie in der Tumorgenese lymphoproliferativer Erkrankungen – zum einen Zelltod-sensibilisierend und zum anderen Resistenz-induzierend zu wirken.

### 5.4.3 GSK-J4 und Dexamethason

Wie in 5.2.3. erwähnt tendierten Zelltod sowie der Verlust des MMP in den Versuchen mit der CCRF-CEM-Zellreihe zu einer Dexamethason-abhängigen Steigerung und somit zu einer Wiederherstellung der Glukokortikoid-Wirkung. Dies galt jedoch nicht für die Versuche mit der Jurkat-Zelllinie. In diesen zeigte sich in Kombination mit GSK-J4 nur ein grundsätzlich erhöhter Zelltod, welcher kein klares Modulationsschema durch die aufsteigenden Dexamethason-Konzentrationen vermuten ließ. Hier ist nun zu prüfen, ob diese unterschiedlichen Reaktionen der beiden Zellreihen auch korrelierende Unterschiede in deren Autophagie zeigen.

In den Versuchen mit CCRF-CEM-Zellen war bei Kombination von Dexamethason mit GSK-J4 ein signifikant höheres Cyto-ID-Fluoreszenzlevel zu detektieren, als durch Einzelbehandlung mit Dexamethason nachzuweisen war. Im Gegensatz hierzu war das Cyto-ID-Fluoreszenzlevel der Kombinationsbehandlung mit GSK-J4 im zelltodrelevanten Bereich der Jurkat-Zellen nicht signifikant höher, als es durch Einzelbehandlung mit Dexamethason ausgelöst wurde. Somit zeigte sich in den Dexamethason-sensibilisierten Zellen in Kombination ein signifikant höheres Autophagie-Level als durch die Dexamethason-Behandlung und in den Jurkat-Zellen mit nur erhöhtem Zelltodniveau keine Erhöhung des Autophagie-Levels.

Zudem zeigten CCRF-CEM-Zellen im Mittel einen stufenhaften Abfall der Cyto-ID-Fluoreszenz bei niedrigen GSK-J4 Konzentrationen, jedoch dann ab 0,5  $\mu$ M einen erneuten Anstieg. Das bedeutet, dass keine durchgängige Dexamethason-abhängige Steigerung der Fluoreszenz – wie sie der Zelltod zeigte – sichtbar war. Da Zelltod und Verlust des MMP keine Abfälle bei oben genannten Dexamethason-Konzentrationen zeigen, ist hier kein direkter Zusammenhang feststellbar. In Jurkat-Zellen änderte sich die Autophagie-Fluoreszenz nicht signifikant in Abhängigkeit von den aufsteigenden Dexamethason-Konzentrationen in den Kombinationsversuchen. Der Antagonismus der Kombination von Dexamethason und GSK-J4 auf den Zelltod in Jurkat-Zellen spiegelte sich nicht durch Änderungen der Autophagie bzw. des Autophagie-Levels wider und zeigte somit keinen direkten Zusammenhang.

## Diskussion

So scheint die Rolle der Autophagie auf die Zelltodsteigerung, die durch GSK-J4 in Jurkat-Zellen ausgelöst wurde, eher gering zu sein. Hier bewirkte GSK-J4 keine Steigerung des Autophagosomen-Levels oder eine Dexamethason-vermittelte Modulation. Dieses Verhalten war nicht verwunderlich, da in Jurkat-Zellen schon in den Vorversuchen für eine sichtliche Steigerung der Autophagie GSK-J4-Konzentrationen von über 1  $\mu\text{M}$  notwendig waren. Aufgrund der hohen Zytotoxizität von GSK-J4 in den Vorversuchen verwendete ich in diesem Versuch nur Konzentrationen bis zu 0,8  $\mu\text{M}$ , welche allein noch keine Autophagie-Induktion auslösten. Die KDM6B-Genexpression war in den Jurkat-Zellen höher. Das könnte bedeuten, dass die inhibierende Wirkung auf die KDM6B einen größeren Einfluss auf den Zelltod in diesen Zellen hatte als der Zelltod, der durch Induktion der Autophagie ausgelöst werden konnte. Zudem ließen sich Jurkat-Zellen nicht für Glukokortikoide sensibilisieren. Die Glukokortikoid-Wirkung basiert wesentlich auf der Induktion der Autophagie (Laane et al. 2009). Da diese Sensibilisierung durch die Kombinationsbehandlung nicht wiederhergestellt werden konnte, ist nicht verwunderlich, dass auch die Modulation der Autophagie nicht wiederhergestellt wurde. Der Zelltodsteigernde Effekt von GSK-J4 in Jurkat-Zellen ist somit nicht direkt auf seine Autophagie-induzierende Wirkung, sondern eher auf andere Mechanismen, wie möglicherweise dessen inhibierende Wirkung auf KDM6B zurückzuführen.

In CCRF-CEM-Zellen war durch Kombination von GSK-J4 und Dexamethason ein höheres Autophagie-Level zu verzeichnen, jedoch zeigte sich keine signifikante Dexamethason-abhängige Modulation der Autophagie. Kleine, nicht signifikante Schwankungen der Autophagie scheinen sich nicht modulierend auf die Höhe des Zelltods auszuwirken. Aufgrund der zentralen Relevanz der Autophagie für die Zytotoxizität von Dexamethason auf Leukämiezellen liegt nahe, dass das beobachtete erhöhte Autophagie-Niveau, welches durch die Kombinationsbehandlung von Dexamethason und GSK-J4 verzeichnet werden konnte, eine bedeutende Rolle für die Glukokortikoid-Sensibilisierung in CCRF-CEM-Zellen spielen könnte. Die Literatur zeigt, dass Obatoclastin und Rapamycin durch vermehrte Autophagosomen-Formation zu einer Re-Sensibilisierung Glukokortikoid-resistenter ALL-Zellen für Dexamethason führten. So konnte durch Behandlung Glucocorticoid-resistenter Zellen eine vermehrte Bildung von Autophagosomen nach 4-stündiger Behandlung mit niedrig dosiertem Obatoclastin und Dexamethason durch vermehrtes Vorkommen von LC3-II detektiert werden. Ebenso war die Stereoid-Sensibilisierung durch Rapamycin, einem Induktor der Autophagie, durch Inhibition von m-TOR mit vermehrter autophagozytischer

## Diskussion

Aktivität verbunden. Kombinierte man diese Wirkstoffe mit Inhibitoren der Autophagie, verschwand die Glukokortikoid-sensibilisierende Wirkung, die vermehrte Autophagosomen-Formation und LC3-II-Bildung (Bonapace et al. 2010, Heidari et al. 2010). Diese Beobachtungen unterstützen die Vermutung, dass eben dieses erhöhte Niveau an Autophagie in CCRF-CEM-Zellen ausschlaggebend für die re-sensibilisierende Wirkung für Dexamethason sein könnte.

### 5.4.4 GSK-J4 und Vincristin

Vincristin allein beeinflusste in CCRF-CEM-Zellen ab Konzentrationen von 5 nM die Autophagie. Hier konnte durch ansteigende Konzentrationen des Vincristin eine konzentrationsabhängige Steigerung der Cyto-ID-Fluoreszenz detektiert werden. Mit diesem recht sprunghaften Anstieg des Zelltods stieg auch der Autophagiefaktor signifikant an und belegte so die Rolle der Autophagie bei der Behandlung der CCRF-CEM-Zellen mit Vincristin. Diese Beobachtung findet sich auch in der Literatur wieder. Yang postulierte eine Autophagie-induzierende Wirkung von Vincristin (Yang et al. 2014). Durch Kombination mit GSK-J4 in CCRF-CEM-Zellen war nicht nur der Zelltod bereits bei niedrigeren Konzentrationen des Vincristin erhöht, sondern auch die Autophagie-Fluoreszenz begann bereits bei niedrigeren Vincristin-Konzentrationen anzusteigen. Interessanterweise war der Zelltod in den Kombinationsbehandlungen nur so lange höher bzw. auf gleichem Niveau wie die Vincristin-Einzelbehandlung, solange sich die Autophagie unter einem Faktor von etwa 1,5 befand. Dies entsprach der Autophagie-Fluoreszenzhöhe, die durch alleinige Behandlung mit 6,5 nM Vincristin ausgelöst wurde. Interessant wäre nun zu wissen, ob dieser Wert die optimale Autophagie-Grenze für die Wirksamkeit des Vincristin darstellt, d. h. ob sich auch bei höheren Vincristin-Konzentrationen und weiterhin steigendem Zelltod die Autophagie auf diesem Niveau halten würde, oder ob diese Beobachtungen unabhängig voneinander sind. Jedoch ist zu beachten, dass bereits bei diesen Konzentrationen eine Zellsterblichkeit von über 70 % ausgelöst wurde und der weitere Spielraum nach oben als recht klein einzuschätzen ist. Dies könnte bedeuten, dass es für Medikamente optimale Autophagie-Levels gibt, in denen sie optimal wirken und somit durch Targeting der Autophagie Therapieoptima und -ansprechen personalisiert präzisiert werden könnten. Hierzu finden sich jedoch noch keine Studien, die einen solchen Zusammenhang beschreiben. In der Literatur wird jedoch bereits vermutet, dass es eine individuelle Autophagie-Schwelle geben könnte, bei welcher die Autophagie der Zelle nicht mehr als Überlebensweg dient, sondern zum Zelltod führt (Kriel und Loos 2019). Dieser Prozess ist jedoch noch nicht vollständig verstanden.

## Diskussion

Infolgedessen ist auf diesem Gebiet noch weitere Forschung notwendig.

Vincristin allein löste ebenfalls in den Jurkat-Zellen vermehrt Zelltod aus. Der Cyto-ID-Fluoreszenz-Faktor schwankte nur wenig zwischen 1 und 1,25. Es zeigte sich also keine signifikante Vincristin-abhängige Modulation der Autophagie, wie sie bei der Behandlung der CCRF-CEM-Zellen zu beobachten war. Jedoch war ein minimaler Vincristin-vermittelter Anstieg der Fluoreszenz ersichtlich, welche bei 6,5 nM Vincristin signifikant höher war als bei 0 nM. Auch die Mittelwerte wiesen eine steigende Tendenz auf. Folglich war eine tendenzielle Steigerung der Cyto-ID-Fluoreszenz nachweisbar, wenn auch nicht signifikant in den Zwischenschritten. Durch kombinierte Behandlung der Jurkat-Zellen mit GSK-J4 und Vincristin konnte des Weiteren ein vermehrter Zelltod beobachtet werden, welcher den der Einzelbehandlung übertraf. Dieser Effekt wurde durch niedrige Vincristin-Konzentrationen vorerst abgeschwächt (1,5 nM), stieg dann aber im Verlauf im Mittel kontinuierlich weiter an. Diese anfänglich abfallende Tendenz korrelierte nicht mit Veränderungen des Autophagie-Faktors bei selbigen Vincristin-Konzentrationen. Insofern war hier kein direkter Zusammenhang zwischen Zelltod und kleinerer intermittierender Autophagie-Veränderungen ersichtlich. Der Cyto-ID-Fluoreszenz-Faktor schwankte auch durch Kombinationsbehandlung ebenfalls nur wenig zwischen 1 und 1,25. Werden die Autophagie-Faktoren bei den Konzentrationen 0 und 6,5 nM betrachtet, zeigten sie aber zugleich eine minimale Vincristin-vermittelte Steigerung der Fluoreszenz. Beim Vergleichen der Autophagie-Level bei alleiniger Behandlung mit Vincristin und in Kombination mit Vincristin und 0,8  $\mu$ M GSK-J4 sind sie bei 0 nM Vincristin signifikant, und bei 6,5 nM im Mittel durch Kombinationsbehandlung höher. Somit zeigt sich in diesem Versuch zumindest eine Autophagie-erhöhende Tendenz, wenn auch nicht so ausgeprägt, wie durch die Behandlung der CCRF-CEM-Zellen. Beide Zelllinien unterschieden sich zudem im Ausmaß der Autophagie-Fluoreszenzsteigerung durch Vincristinbehandlung bzw. dessen Kombination mit GSK-J4. In CCRF-CEM-Zellen stieg sie durch Behandlung bis auf das Doppelte des Basalwertes an. In den Jurkat-Zellen fiel dies weitaus geringer aus.

Die Rolle der Autophagie erschien auch in diesem Versuch in Jurkat-Zellen – im Vergleich zu CCRF-CEM-Zellen – eher geringer. Laut Mathur et al. spielte bei der Kombinationsbehandlung von DLBCL-Zellen mit Vincristin und GSK-J4 die Induktion von Apoptose eine wesentliche Rolle. Hier wurde durch diese Wirkstoffkombination in etwa 35 % der Zellen Apoptose ausgelöst (Mathur et al. 2017). Auch in Jurkat-Zellen könnte der zytotoxische Effekt des GSK-J4 und dessen Kombination mit Vincristin wesentlich über

## Diskussion

diesen Prozess ablaufen. Warum die beiden betrachteten Zelllinien jedoch so unterschiedlich reagieren, könnte möglicherweise durch die unterschiedliche Relevanz der KDM6B in beiden Zelllinien, aber auch durch unterschiedliche Mutationsmuster der Jurkat- und CCRF-CEM-Zellen erklärbar sein (Moharram et al. 2017). So überschneiden sich nach Moharram et al. in CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen nur 19 der onkogen vermuteten mutierten Genabschnitte. In CCRF-CEM-Zellen zeigten sich 31, in Jurkat-Zellen 117 onkogene Mutationen, welche in der jeweils anderen Zelllinie nicht nachgewiesen werden konnten (Moharram et al. 2017). Daher sind unterschiedliche Effekte bestimmter Therapieansätze möglich, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit ersichtlich sind. Folglich konnte auch in diesem Versuch durch Kombination von GSK-J4 mit Vincristin kein einheitlicher zellkulturübergreifender Zusammenhang zwischen Autophagie und Zelltod postuliert werden. So war in CCRF-CEM-Zellen die Beeinflussung des Zelltods durch Autophagie-Veränderung denkbar. Jurkat-Zellen hingegen zeigten einen solchen Einfluss weniger deutlich. Jedoch ist aufgrund des mittleren Anstiegs der Autophagie-Fluoreszenz nicht ausgeschlossen, dass auch in Jurkat-Zellen die Autophagie-Entwicklung einen Einfluss auf den Zelltod gehabt haben könnte.

Diese Unterschiede zwischen beiden Zelllinien zogen sich durchgängig durch die Ergebnisse der in der Arbeit durchgeführten Versuche. GSK-J4 schien seine zytotoxische Wirkung in Einzelbehandlung als auch in Kombinationsbehandlungen in Jurkat-Zellen nicht, und in CCRF-CEM-Zellen mit Hilfe von Veränderungen der Autophagie zu zeigen. GSK-J4 führte in murinen differenzierten embryonalen Stammzellen zur Aktivierung des DNA-Schadensantwortsystems, zu einem zwei- bis dreifachen Anstieg der apoptotischen Zellen und zu einem Zellzyklusarrest, welcher vorrangig die G1-Phase betraf (Hofstetter et al. 2016). Ntziachristos et al. beschrieben unter anderem, wie GSK-J4 in unterschiedlichen T-ALL-Zelllinien, darunter auch Jurkat- und CCRF-CEM-Zellen, Zelltod auslöste. Demnach komme die Wirkung durch Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest zustande (Ntziachristos et al. 2014).

In einer vorangegangenen Doktorarbeit der Arbeitsgruppe wurde der Zelltodmechanismus, welcher durch GSK-J4 ausgelöst wurde, in CCRF-CEM- sowie in Jurkat-Zellen untersucht. Hier wurde festgestellt, dass Caspasen-vermittelter Zelltod in Jurkat-Zellen einen großen Anteil des Zelltodeffekts ausmachte. In CCRF-CEM-Zellen war deren Einfluss jedoch eher gering (Walter 2017). Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse ergänzen diese Erkenntnisse. Somit könnte der zytotoxische Effekt des GSK-J4 in CCRF-CEM-Zellen

## Diskussion

unter anderem bedeutend von Autophagie-Veränderungen abhängen und in Jurkat-Zellen vermehrt durch Caspase-abhängige Zelltodmechanismen vermittelt werden.

### 5.4.5 GSK-J4 und Chloroquin

Chloroquin allein bewirkte in CCRF-CEM- sowie in Jurkat-Zellen einen ähnlichen Anstieg der Cyto-ID-Fluoreszenz. Aus diesem Grunde ist die unterschiedliche Reaktion des Zelltods, welcher in Jurkat-Zellen im Gegensatz zu den CCRF-CEM-Zellen bei höheren Chloroquin-Konzentrationen anstieg, am ehesten auf die bereits erwähnte Chloroquin-vermittelte vermehrte ROS-Produktion in Jurkat-Zellen zurückzuführen und weniger auf Veränderungen der Autophagie (Hounjet et al. 2019). Durch Kombination von Chloroquin und GSK-J4 – Inhibitor und Induktor der Autophagie – zeigte sich ein zelltodsteigernder Effekt nur bei Behandlung der Jurkat-Zellen. In CCRF-CEM-Zellen war diese Wirkung durch Kombination beider Wirkstoffe nicht zu ermitteln. Der Zelltod stieg hier nicht signifikant über die alleinige Zelltodwirkung des GSK-J4 an. Ein überadditiver Effekt der Autophagie konnte vor allem in CCRF-CEM-Zellen, jedoch nur in geringerem Maße bei Jurkat-Zellen verzeichnet werden. So ist in diesem Versuch kein modulierender Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Autophagie-Fluoreszenzentwicklung und dem Zelltod in CCRF-CEM-Zellen ersichtlich. In Jurkat-Zellen hingegen war eine vermehrte Cyto-ID-Fluoreszenz auch mit einem höheren Zelltodniveau assoziiert. GSK-J4 scheint die Wirkung des Chloroquins in Jurkat-Zellen zu verstärken. Da auch schon durch Einzelbehandlung der Jurkat-Zellen mit Chloroquin ein Zelltod-steigernder Effekt ersichtlich war und dieser bereits mit vermehrter Produktion von ROS in dieser Zelllinie in Zusammenhang gebracht wurde, entstand dieser zelltodsensibilisierende Effekt möglicherweise durch ein Zusammenspiel von erhöhtem oxidativem Stress und daraus resultierender Autophagie-Modulation. Jedoch wurde bereits eine Autophagie-unabhängige Wirkung des Chloroquins postuliert. So konnte in AML-Zellen nachgewiesen werden, dass Chloroquin sowohl in Wildtyp- als auch in an Schlüsselpunkten der Autophagie (Atg5 bzw. Rb1cc1) modifizierten Zellen wirksam war (Chen et al. 2017). So könnten auch andere Angriffspunkte des Chloroquins eine Rolle gespielt haben. Zu diesen Angriffspunkten gehören zudem die Änderung des pH-Wertes in Endosomen verbunden mit der Verminderung des Abbaus verschiedener Chemotherapeutika in diesem Zellorganell, die Induktion von DNA-Schäden durch DNA-Interkallation sowie die Destabilisation der lysosomalen Membran mit darauf folgendem Anstoßen des intrinsischen Apoptoseweges (Lee und Tannock 2006, Boya et al. 2003, Chen et al. 2017). Der genaue Wirkmechanismus des Chloroquins ist bisher noch nicht vollständig geklärt



## Diskussion

und scheint vielschichtig sowie möglicherweise auch abhängig von der Tumorentität zu sein (Chen et al. 2017), wodurch ein multifaktorieller Einfluss denkbar ist.

### **6 Schlussfolgerung**

In dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse zur Bedeutung der Inhibition der KDM6B bei der Behandlung von Patienten mit ALL in Glukokortikoid-resistenten Zelllinien gewonnen werden. Die KDM6B könnte ein wirksamer Angriffspunkt in der Therapie der ALL sein. Die Expression dieses Enzyms könnte als möglicher Screening-Parameter von Nutzen sein, um Hochrisiko-Konstellationen schon früh identifizieren zu können und intensiviertere Therapien bzw. individualisierte Therapieschemata einzuleiten.

Auch die wesentliche Rolle der Autophagie bei der Wiederherstellung der Glukokortikoid-Wirkung konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Sensibilisierung gegenüber Glukokortikoiden mit Hilfe von GSK-J4 ist zelllinienspezifisch und wenn diese erreicht wurde, zeigte sich ein synergistischer Zelltodeffekt. Es konnte aufgezeigt werden, dass GSK-J4 ein Induktor der Autophagie in Leukämiezellen ist, wobei der Zelltod zelllinienspezifisch entweder vorrangig wie in der Literatur beschrieben Caspase-abhängig oder wie in dieser Arbeit ersichtlich Autophagie-abhängig abzulaufen schien. Möglicherweise war das unterschiedliche Einschlagen dieser zwei Wege von der Höhe der KDM6B-Expression abhängig.

Durch Kombination des KDM6B-Inhibitors mit Vincristin könnte zelllinienspezifisch eine Dosisreduktion der Einzelkomponenten ermöglicht und damit potenziell vielleicht auch Nebenwirkungen verringert werden. Allerdings führten einige Wirkstoffkombinationen zu antagonistischen Wirkungen, so dass in diesen Fällen die Einzeltherapien den Kombinationen vorzuziehen wären. Auf Patienten zugeschnittene Therapien mit individuellen Modifikationen sind deshalb auch in dieser Konstellation vonnöten.

Die Kombinationswirkung von GSK-J4 mit Autophagie-Inhibitoren ist ebenso zelllinienspezifisch und kann zu einer Dosisreduktion der Einzelkomponenten bei gleichem Zelltodeffekt führen. So ist es auch hier sinnvoll, einen personalisierten Ansatz zu verfolgen. Die unterschiedlichen Reaktionen der ALL-Zelllinien auf dieselben Behandlungen könnten auf unterschiedliche Mutationen und Expressionsmuster in den Zelllinien zurückzuführen sein.

Ein Teil der Kombinationsbehandlungen waren der Einzeltherapie mit GSK-J4 nicht überlegen. Hier wäre eine Monotherapie denkbar. Für eine solche Entscheidung sind

## Schlussfolgerung

jedoch Marker von Nöten, um die Personen zu detektieren, die bei schlechtem Therapieansprechen einen Vorteil von dieser Behandlung haben könnten.

In Zukunft ist es möglich, dass sich die KDM6B als ein vielversprechender Prognosemarker und als therapeutischer Angriffspunkt beim Kampf gegen Leukämie etabliert. Da dieses Enzym ubiquitär vorkommt und auch an anderen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt zu sein scheint, ist es notwendig, die Funktion der KDM6B weiter zu untersuchen, um die Auswirkungen der Inhibition auf den Organismus besser einschätzen zu können. Aufgrund dieser Komplexität ist weitere Grundlagenforschung erforderlich, bevor eine solche Therapie etabliert werden könnte.

## 7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Alharbi RA, Pettengell R, Pandha HS, Morgan R. 2013. The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia*, 27 (5):1000-1008.
- Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM, Weiss WA, Takebe N, Timmer W, DiPaola RS, Lotze MT, White E. 2011. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res*, 17 (4):654-666.
- Beesley AH, Palmer ML, Ford J, Weller RE, Cummings AJ, Freitas JR, Firth MJ, Perera KU, de Klerk NH, Kees UR. 2006. Authenticity and drug resistance in a panel of acute lymphoblastic leukaemia cell lines. *Br J Cancer*, 95 (11):1537-1544.
- Bhadri VA, Trahair TN, Lock RB. 2012. Glucocorticoid resistance in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *J Paediatr Child Health*, 48 (8):634-640.
- Bishop E, Bradshaw TD. 2018. Autophagy modulation: a prudent approach in cancer treatment? *Cancer Chemother Pharmacol*, 82 (6):913-922.
- Bonapace L, Bornhauser BC, Schmitz M, Cario G, Ziegler U, Niggli FK, Schafer BW, Schrappe M, Stanulla M, Bourquin JP. 2010. Induction of autophagy-dependent necroptosis is required for childhood acute lymphoblastic leukemia cells to overcome glucocorticoid resistance. *J Clin Invest*, 120 (4):1310-1323.
- Bonaventure A, Harewood R, Stiller CA, Gatta G, Clavel J, Stefan DC, Carreira H, Spika D, Marcos-Gragera R, Peris-Bonet R, Piñeros M, Sant M, Kuehni CE, Murphy MFG, Coleman MP, Allemani C, Group CW. 2017. Worldwide comparison of survival from childhood leukaemia for 1995–2009, by subtype, age, and sex (CONCORD-2): a population-based study of individual data for 89 828 children from 198 registries in 53 countries. *The Lancet Haematology*.
- Boya P, Gonzalez-Polo RA, Poncet D, Andreau K, Vieira HL, Roumier T, Perfettini JL, Kroemer G. 2003. Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. *Oncogene*, 22 (25):3927-3936.
- Chan LL, Shen D, Wilkinson AR, Patton W, Lai N, Chan E, Kuksin D, Lin B, Qiu J. 2012. A novel image-based cytometry method for autophagy detection in living cells. *Autophagy*, 8 (9):1371-1382.
- Chen HY, White E. 2011. Role of autophagy in cancer prevention. *Cancer Prev Res (Phila)*, 4 (7):973-983.
- Chen J, Odenike O, Rowley JD. 2010. Leukaemogenesis: more than mutant genes. *Nat Rev Cancer*, 10 (1):23-36.
- Chen X, Clark J, Wunderlich M, Fan C, Davis A, Chen S, Guan JL, Mulloy JC, Kumar A, Zheng Y. 2017. Autophagy is dispensable for Kmt2a/Mll-Mllt3/Af9 AML maintenance and anti-leukemic effect of chloroquine. *Autophagy*, 13 (5):955-966.
- Chou TC. 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*, 70 (2):440-446.
- Codogno P, Meijer AJ. 2005. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2:1509-1518.
- Debnath J BE, Kroemer G. . 2005. Does Autophagy Contribute To Cell Death. *Autophagy* 1:66–74.
- Delgado M, Chambers TC. 2018. Microtubules play an essential role in the survival of primary acute lymphoblastic leukemia cells advancing through G1 phase. *Cell Cycle*, 17 (14):1784-1796.
- Denton D, Kumar S. 2019. Autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ*, 26 (4):605-616.
- Djavaheri-Mergny M, Giuriato S, Tschan MP, Humbert M. 2019. Therapeutic Modulation of Autophagy in Leukaemia and Lymphoma. *Cells*, 8 (2).

## Literatur- und Quellenverzeichnis

- Dördelmann M, Reiter A, Borkhardt A, Ludwig W-D, Götz N, Viehmann S, Gadner H, Riehm H, Schrappe M. 1999. Prednisone Response Is the Strongest Predictor of Treatment Outcome in Infant Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*, Vol 94, No 4:pp 1209-1217.
- Dupont N, Codogno P. 2016. Autophagy transduces physical constraints into biological responses. *Int J Biochem Cell Biol*, 79:419-426.
- Dyczynski M, Vesterlund M, Bjorklund AC, Zachariadis V, Janssen J, Gallart-Ayala H, Daskalaki E, Wheelock CE, Lehtio J, Grander D, Tamm KP, Nilsson R. 2018. Metabolic reprogramming of acute lymphoblastic leukemia cells in response to glucocorticoid treatment. *Cell Death Dis*, 9 (9):846.
- Escherich G, Schrappe M, Creutzig U. 2014. [www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/025-014I\\_S1\\_Akute\\_lymphoblastische\\_Leukaemie\\_ALL\\_2016-04.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-014I_S1_Akute_lymphoblastische_Leukaemie_ALL_2016-04.pdf). "Zugriff:10.04.2020"
- Foley GE, Lazarus H, Farber S, Uzman BG, Boone BA, Mccarthy RE. 1965. Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer*, 18 (4):522-529.
- Gluzman DF, Sklyarenko LM, Zavelevich MP, Koval SV, Ivanivska TS, Rodionova NK. 2015. OVERVIEW ON ASSOCIATION OF DIFFERENT TYPES OF LEUKEMIAS WITH RADIATION EXPOSURE. *Experimental Onkology*.
- Grander D, Kharaziha P, Laane E, Pokrovskaja K, Panaretakis T. 2009. Autophagy as the main means of cytotoxicity by glucocorticoids in hematological malignancies. *Autophagy*, 5 (8):1198-1200.
- Gruhn B, Naumann T, Gruner D, Walther M, Wittig S, Becker S, Beck JF, Sonnemann J. 2013. The expression of histone deacetylase 4 is associated with prednisone poor-response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, 37 (10):1200-1207.
- Guo S, Liang Y, Murphy SF, Huang A, Shen H, Kelly DF, Sobrado P, Sheng Z. 2015. A rapid and high content assay that measures cyto-ID-stained autophagic compartments and estimates autophagy flux with potential clinical applications. *Autophagy*, 11 (3):560-572.
- Handy DE, Castro R, Loscalzo J. 2011. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation*, 123 (19):2145-2156.
- Haras D, Amoros JP. 1994. [Polymerase chain reaction, cold probes and clinical diagnosis]. *Sante*, 4 (1):43-52.
- Heidari N, Hicks MA, Harada H. 2010. GX15-070 (obatoclox) overcomes glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia through induction of apoptosis and autophagy. *Cell Death Dis*, 1:e76.
- Heinemann B, Nielsen JM, Hudlebusch HR, Lees MJ, Larsen DV, Boesen T, Labelle M, Gerlach LO, Birk P, Helin K. 2014. Inhibition of demethylases by GSK-J1/J4. *Nature*, 514 (7520):E1-2.
- Himes RH. 1991. Interactions of the catharanthus (Vinca) alkaloids with tubulin and microtubules. *Pharmacol Ther* 51:257-267.
- Hofstetter C, Kampka JM, Huppertz S, Weber H, Schlosser A, Muller AM, Becker M. 2016. Inhibition of KDM6 activity during murine ESC differentiation induces DNA damage. *J Cell Sci*, 129 (4):788-803.
- Hojfeldt JW, Agger K, Helin K. 2013. Histone lysine demethylases as targets for anticancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 12 (12):917-930.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (16):7276-7280.
- Hongfeng Yuan MH, Ricardo C.T. Aguiar , Fan Cheng , Shou-Jiang Gao. 2017. Tenovin-6 inhibits proliferation and survival of diffuse large B-cell lymphoma cells by blocking autophagy. *Oncotarget*.

## Literatur- und Quellenverzeichnis

- Hounjet J, Habets R, Schaaf MB, Hendrickx TC, Barbeau LMO, Yahyanejad S, Rouschop KM, Groot AJ, Vooijs M. 2019. The anti-malarial drug chloroquine sensitizes oncogenic NOTCH1 driven human T-ALL to gamma-secretase inhibition. *Oncogene*, 38 (27):5457-5468.
- Hunger SP, Mullighan CG. 2015. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med*, 373 (16):1541-1552.
- Hunger SP, Loh ML, Whitlock JA, Winick NJ, Carroll WL, Devidas M, Raetz EA, Committee COGALL. 2013. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 60 (6):957-963.
- Jiang L, Xu L, Xie J, Li S, Guan Y, Zhang Y, Hou Z, Guo T, Shu X, Wang C, Fan W, Si Y, Yang Y, Kang Z, Fang M, Liu Q. 2015. Inhibition of autophagy overcomes glucocorticoid resistance in lymphoid malignant cells. *Cancer Biol Ther*, 16 (3):466-476.
- Kaatsch P, Grabow D, Spix C. German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2018 (1980-2017). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, 2019
- Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Isaka Y. 2013. Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. *Cancer Res*, 73 (1):3-7.
- King JS, Veltman DM, Insall RH. 2014. The induction of autophagy by mechanical stress. *Autophagy*, 7 (12):1490-1499.
- Klose RJ, Kallin EM, Zhang Y. 2006. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet*, 7 (9):715-727.
- Kothari A, Hittelman WN, Chambers TC. 2016. Cell cycle-dependent mechanisms underlie vincristine-induced death of primary acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Research*, 76 (12): 3553–3561.
- Kriel J, Loos B. 2019. The good, the bad and the autophagosome: exploring unanswered questions of autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ*, 26 (4):640-652.
- Kruidenier L, Chung CW, Cheng Z, Liddle J, Che K, Joberty G, Bantscheff M, Bountra C, Bridges A, Diallo H, Eberhard D, Hutchinson S, Jones E, Katso R, Leveridge M, Mander PK, Mosley J, Ramirez-Molina C, Rowland P, Schofield CJ, Sheppard RJ, Smith JE, Swales C, Tanner R, Thomas P, Tumber A, Drewes G, Oppermann U, Patel DJ, Lee K, Wilson DM. 2012. A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature*, 488 (7411):404-408.
- Laane E, Tamm KP, Buentke E, Ito K, Kharaziha P, Oscarsson J, Corcoran M, Bjorklund AC, Hultenby K, Lundin J, Heyman M, Soderhall S, Mazur J, Porwit A, Pandolfi PP, Zhivotovsky B, Panaretakis T, Grander D. 2009. Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. *Cell Death Differ*, 16 (7):1018-1029.
- Lee CM, Tannock IF. 2006. Inhibition of endosomal sequestration of basic anticancer drugs: influence on cytotoxicity and tissue penetration. *Br J Cancer*, 94 (6):863-869.
- Lemasters JJ, Nieminen A-L, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B. 1998. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1366:177-196.
- Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. 2017. Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*, 17 (9):528-542.
- Li JJ, Biggin MD. 2015. Statistics requantitates the central dogma. *Science*, 347.
- Li Y, Zhang M, Sheng M, Zhang P, Chen Z, Xing W, Bai J, Cheng T, Yang FC, Zhou Y. 2018. Therapeutic potential of GSK-J4, a histone demethylase KDM6B/JMJD3 inhibitor, for acute myeloid leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol*, 144 (6):1065-1077.
- Ling Gu CZ, Huajun Liu, Ju Gao, Qiang Li, Dezhi Mu, Zhigui Ma. 2010. Rapamycin sensitizes T-ALL cells to dexamethasone-induced apoptosis. *Journal of*

## Literatur- und Quellenverzeichnis

- Experimental & Clinical Cancer Research 2010, 29:150.
- Locatelli F, Schrappe M, Bernardo ME, Rutella S. 2012. How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 120 (14):2807-2816.
- Lochmann TL, Powell KM, Ham J, Floros KV, Heisey DAR, Kurupi RIJ, Calbert ML, Ghotra MS, Greninger P, Dozmorov M, Gowda M, Souers AJ, Reynolds CP, Benes CH, Faber AC. 2018. Targeted inhibition of histone H3K27 demethylation is effective in high-risk neuroblastoma. *Sci Transl Med*, 10 (441).
- Mandal C, Kim SH, Kang SC, Chai JC, Lee YS, Jung KH, Chai YG. 2017. GSK-J4-Mediated Transcriptomic Alterations in Differentiating Embryoid Bodies. *Mol Cells*, 40 (10):737-751.
- Manic G, Obrist F, Kroemer G, Vitale I, Galluzzi L. 2014. Chloroquine and hydroxychloroquine for cancer therapy. *Mol Cell Oncol*, 1 (1):e29911.
- Mathur R, Sehgal L, Havranek O, Kohrer S, Khashab T, Jain N, Burger JA, Neelapu SS, Davis RE, Samaniego F. 2017. Inhibition of demethylase KDM6B sensitizes diffuse large B-cell lymphoma to chemotherapeutic drugs. *Haematologica*, 102 (2):373-380.
- Medh RD, Webb MS, Miller AL, Johnson BH, Fofanov Y, Li T, Wood TG, Luxon BA, Thompson EB. 2003. Gene expression profile of human lymphoid CEM cells sensitive and resistant to glucocorticoid-evoked apoptosis. *Genomics*, 81 (6):543-555.
- Mizushima N, Yoshimori T. 2014. How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy*, 3 (6):542-545.
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27:107-132.
- Moharram SA, Shah K, Kazi JU. 2017. T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells Display Activation of Different Survival Pathways. *J Cancer*, 8 (19):4124.
- Morel E, Mehrpour M, Botti J, Dupont N, Hamai A, Nascimbeni AC, Codogno P. 2017. Autophagy: A Druggable Process. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 57:375-398.
- Norman MR, Thompson EB. 1977. Characterization of a glucocorticoid-sensitive human lymphoid cell line. *Cancer Res*, 37 (10):3785-3791.
- Ntziachristos P, Tsirigos A, Welstead GG, Trimarchi T, Bakogianni S, Xu L, Loizou E, Holmfeldt L, Strikoudis A, King B, Mullenders J, Becksfort J, Nedjic J, Paietta E, Tallman MS, Rowe JM, Tonon G, Satoh T, Kruidenier L, Prinjha R, Akira S, Van Vlierberghe P, Ferrando AA, Jaenisch R, Mullighan CG, Aifantis I. 2014. Contrasting roles of histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, 514 (7523):513-517.
- Piovan E, Yu J, Tosello V, Herranz D, Ambesi-Impombato A, Da Silva AC, Sanchez-Martin M, Perez-Garcia A, Rigo I, Castillo M, Indraccolo S, Cross JR, de Stanchina E, Paietta E, Racevskis J, Rowe JM, Tallman MS, Basso G, Meijerink JP, Cordon-Cardo C, Califano A, Ferrando AA. 2013. Direct reversal of glucocorticoid resistance by AKT inhibition in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*, 24 (6):766-776.
- Rabin KR, Whitlock JA. 2009. Malignancy in children with trisomy 21. *Oncologist*, 14 (2):164-173.
- Redmann M, Benavides GA, Berryhill TF, Wani WY, Ouyang X, Johnson MS, Ravi S, Barnes S, Darley-Usmar VM, Zhang J. 2017. Inhibition of autophagy with bafilomycin and chloroquine decreases mitochondrial quality and bioenergetic function in primary neurons. *Redox Biol*, 11:73-81.
- Reza Bayat Mokhtari, Tina S. Homayouni, Narges Baluch, Evgeniya Morgatskaya, Sushil Kumar, Bikul Das, Yeger H. 2017. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*, 8 (23):38022-38043.
- Rothe K, Porter V, Jiang X. 2019. Current Outlook on Autophagy in Human Leukemia: Foe in Cancer Stem Cells and Drug Resistance, Friend in New Therapeutic Interventions. *Int J Mol Sci*, 20 (3).

## Literatur- und Quellenverzeichnis

- Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. 2012. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 11 (9):709-730.
- Sakaki H, Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Watarai H, Suzuki S, Seino S, Seino M, Ohta T, Nagase S, Kurachi H, Kitanaka C. 2015. GSKJ4, A Selective Jumonji H3K27 Demethylase Inhibitor, Effectively Targets Ovarian Cancer Stem Cells. *Anticancer Research*
- Schneider U, Schwenk H-U, Bornkam G. 1977. Characterization of EBV-GENOME negative " and " null " T " cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-hodgkin lymphoma *Int J Cancer*, 19:621-626.
- Schrapppe M, Reiter A, Ludwig W-D, Harbott J, Zimmermann M, Hiddemann W, Niemeyer C, Henze G, Feldges A, Zintl F, Kornhuber B, Ritter J, Welte K, Gadner H, Riehm H. 2000. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. *Blood*, 95 (11):3310.
- Serafin V, Capuzzo G, Milani G, Minuzzo SA, Pinazza M, Bortolozzi R, Bresolin S, Porcu E, Frasson C, Indraccolo S, Basso G, Accordi B. 2017. Glucocorticoid resistance is reverted by LCK inhibition in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 130 (25):2750-2761.
- Sheikh-Zeineddini N, Safaroghli-azar A, Salari S, Bashash D. 2020. C-Myc inhibition sensitizes pre-B ALL cells to the anti-tumor effect of vincristine by altering apoptosis and autophagy: Proposing a probable mechanism of action for 10058-F4. *European Journal of Pharmacology*, 870.
- Shi YG, Tsukada Y. 2013. The discovery of histone demethylases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5 (9).
- Spix C, Eletr D, Blettner M, Kaatsch P. 2008. Temporal trends in the incidence rate of childhood cancer in Germany 1987-2004. *Int J Cancer*, 122 (8):1859-1867.
- Sui X, Chen R, Wang Z, Huang Z, Kong N, Zhang M, Han W, Lou F, Yang J, Zhang Q, Wang X, He C, Pan H. 2013. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis*, 4:e838.
- Tasian SK, Loh ML, Hunger SP. 2015. Childhood acute lymphoblastic leukemia: Integrating genomics into therapy. *Cancer*, 121 (20):3577-3590.
- Thinnes CC, England KS, Kawamura A, Chowdhury R, Schofield CJ, Hopkinson RJ. 2014. Targeting histone lysine demethylases - progress, challenges, and the future. *Biochim Biophys Acta*, 1839 (12):1416-1432.
- Timms JA, Relton CL, Judith Rankin, Strathdee G, McKay JA. 2016. DNA methylation as a potential mediator of environmental risks in the development of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Epigenomics*.
- Towers CG, Thorburn A. 2016. Therapeutic Targeting of Autophagy. *EBioMedicine*, 14:15-23.
- Towers CG, Wodetzki D, Thorburn A. 2020. Autophagy and cancer: Modulation of cell death pathways and cancer cell adaptations. *J Cell Biol*, 219 (1).
- Vogel C, Marcotte EM. 2012. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet*, 13 (4):227-232.
- Walter E. 2003. Evaluierung des Histon-Lysin-Demethylasen-Isoenzym-Expressions-musters in kindlicher akuter lymphoblastischer Leukämie [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Wang Z, Long QY, Chen L, Fan JD, Wang ZN, Li LY, Wu M, Chen X. 2017. Inhibition of H3K4 demethylation induces autophagy in cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1864 (12):2428-2437.
- Xiang Y, Zhu Z, Han G, Lin H, Xu L, Chen CD. 2007. JMJD3 is a histone H3K27 demethylase. *Cell Res*, 17 (10):850-857.



## Literatur- und Quellenverzeichnis

- Yang M, Zeng P, Kang R, Yu Y, Yang L, Tang D, Cao L. 2014. S100A8 contributes to drug resistance by promoting autophagy in leukemia cells. *PLoS One*, 9 (5):e97242.
- Yukiko Kabeya NM, Takashi Ueno, Akitsugu Yamamoto, Takayoshi Kirisako, Takeshi Noda, Eiki Kominami, Yoshinori Ohsumi and Tamotsu Yoshimori. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal*, Vol. 19 No.21: pp. 5720±5728.
- Zhou M, Zeng J, Wang X, Wang X, Huang T, Fu Y, Sun T, Jia J, Chen1 C. 2015. Histone demethylase RBP2 decreases miR-21 in blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Oncotarget*, 6 (2):1249-1261.

## 8 Anhang

### 8.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, um einigen Personen meinen Dank aussprechen. Ich möchte Herrn Prof. Dr. Beck für die freundliche Betreuung sowie die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge in den wöchentlichen Besprechungen danken.

Weiterer Dank gebührt auch Dr. Sonnemann für den Vorschlag des Themas, die zahlreichen Tipps während der Labortätigkeit sowie die wertvollen Unterredungen und nicht zuletzt für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Sabine Becker für die Hilfe bei der praktischen Durchführung der Versuche, das Bestellen der notwendigen Materialien, die persönlichen Gespräche, die hilfreichen Ratschläge und das angenehme Arbeitsklima. Außerdem möchte ich mich bei den Studenten bedanken, die während meiner Laborzeit mit mir geschwitzt und gejubelt haben, wenn meine Experimente gelungen sind und mir mit Rat und Tat beiseite standen.

Tiefen Dank möchte ich meiner Familie, besonders meinem Ehemann sowie meinen Eltern aussprechen, die mich über die lange Dauer meines Studiums, während der Forschungszeit und auch der Zeit des Schreibens dieser Arbeit bedingungslos unterstützt, motiviert und mir Mut zum Durchhalten gegeben haben.

## Anhang

### **8.2 Ehrenwörtliche Erklärung**

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

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

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. James Beck, Dr. Jürgen Sonnemann, Sabine Becker,

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

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

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

Jena, 19.04.2021

Unterschrift des Verfassers