

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Klinik der Ludwig-Maximilians-Klinik München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. med. Michael von Bergwelt

**Auswirkung der physiologischen Hypoxie auf das
Proliferations- und Apoptoseverhalten von Blasten der
akuten myeloischen Leukämie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Heidrun Drolle (geb. Prechtl)

aus Innsbruck

2020

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Fiegl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Torsten Haferlach

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2020

Meinem geliebten Opa Maximilian Prechtl

(1923-1999)

Abkürzungsverzeichnis

AML *akute myeloische Leukämie*
APL *Akute Promyelozytenleukämie*
AraC *Cytarabin*
AraCTP *Arabinofuranosylcytosintriphosphat*
ASXL1 *englisch additional sex combs-like1*
ATRA *All-trans Retinolsäure, All-trans Retinolsäure*
BrdU *Bromdesoxyuridin*
BSA *englisch bovine serum albumin*
c-kit *Tyrosinkinase CD117*
CR *komplette Remission*
DNA *Desoxyribonukleinsäure*
DNMT3A *DNA-Methyltransferase 3A*
DSMZ *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.*
FACS *englisch fluorescence-activated cell sorting*
FLT3 *englisch Fms-like tyrosine kinase 3*
FOXO3a *Forkhead-Box-Proteine*
HiDAC *high dose AraC*
HIF *Hypoxia-inducible Factors*
HRP *Merrettichperoxidase*
IDH *Isocitrat-Dehydrogenase*
K-RAS *englisch Kirsten rat sarcoma viral oncogene hololog*
LIC *leukemia initiating cells*
MDS *myelodysplastisches Syndrom, myelodysplastisches Syndrom*
mTORC1 *mammalian target of rapamycin complex 1*
PI *Propidiumiodid*
ROS *radical oxygen species*
VEGF *vascular endothelial growth factor*
WHO *Weltgesundheitsorganisation*
XIAP *X-linked inhibitor of apoptos*

1	Einleitung	1
1.1	Definition der akuten myeloischen Leukämie	1
1.2	Epidemiologie	1
1.3	Diagnose und WHO-Klassifikation	2
1.4	Ätiologie und Pathogenese	4
1.5	Klinik	5
1.6	Therapie	6
1.7	Prognose	8
1.8	Hämatopoetische Stammzellnische	10
1.9	Fragestellung	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Geräte	13
2.2	Software	14
2.3	Verbrauchsmaterialien	14
2.4	Reagenzien für Zellkultur	15
2.5	Chemotherapeutika	15
2.6	Sonstige Reagenzien	15
2.7	Antikörper	16
2.7.1	Primärantikörper	16
2.7.2	Sekundärantikörper	17
2.8	Puffer und Lösungen	17
2.8.1	Durchflusszytometrie	17
2.8.2	Western Blot	18
2.9	Zellkultur	20
2.9.1	AML Zelllinien	20
2.10	Primäre AML-Blasten	20
2.11	Bestimmung der Zellzahl	21
2.12	Zellkultur	22
2.13	In-vitro Zytotoxizitätsmessung	22
2.14	Durchflusszytometrie	23
2.14.1	Bestimmung der spontanen Apoptoserate	23
2.14.2	Zellzyklusanalysen	23
2.15	Western blot	24
3	Ergebnisse	27
3.1	Auswirkung von Hypoxie auf das Wachstumsverhalten von AML Blasten	27
3.2	Auswirkung von Hypoxie auf die Viabilität von AML-Blasten	28
3.2.1	Apoptoseverhalten der Zelllinie KG1a	29

3.2.2 Apoptoseverhalten der Zelllinie NB4	29
3.2.3 Apoptoseverhalten Zelllinie HL60	30
3.3 Verminderung der Proliferation unter physiologischer Hypoxie	30
3.4 Quantifizierung der Zellzyklusphasen	32
3.5 Einfluss von Hypoxie auf die Expression des zellzyklusregulatorischen Proteins p27	34
3.6 Konsequenzen von Hypoxie auf die antileukämische Effektivität von Cytarabin auf AML Blasten	35
3.7 Inhibierung des PI3K-Pathway	37
4 Diskussion	39
5 Zusammenfassung	47
6 Lebenslauf	49
7 Publikationsliste	50
8 Danksagung	52
9 Eidesstattliche Erklärung	53
10 Literaturverzeichnis	54
11 Abbildungsverzeichnis	59
12 Tabellenverzeichnis	60

1 Einleitung

1.1 Definition der akuten myeloischen Leukämie

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) handelt es sich um eine schwerwiegende maligne Erkrankung, bei der es aufgrund genetischer Mutationen in einer myeloischen Vorläuferzelle zu einer unkontrollierten Proliferation, gestörten Differenzierung und fehlender Apoptose kommt. Diese Proliferation des Klons im Knochenmark führt zu einer Verdrängung der normalen Hämatopoese und damit zur hämatologischen Insuffizienz. Die AML führt daher unbehandelt innerhalb weniger Monaten zum Tod [1, 2].

1.2 Epidemiologie

Die AML zählt mit einer Inzidenz von 3,4 Neuerkrankungen pro 100.000 zu den seltenen Erkrankungen. Tendenziell erkranken Männer im Verhältnis 1,4:1 häufiger an AML als Frauen.

Die Inzidenz steigt jedoch kontinuierlich mit dem Lebensalter an und erreicht in der Altersgruppe der über 70 jährigen mit > 20 Erkrankten pro 100.000 ihren Höhepunkt [3] (Abbildung 1). Das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt bei 63 Jahren. Für die Bundesrepublik Deutschland errechnet sich daher eine Zahl von ca. 3.600 Neuerkrankungen/ Jahr [4].

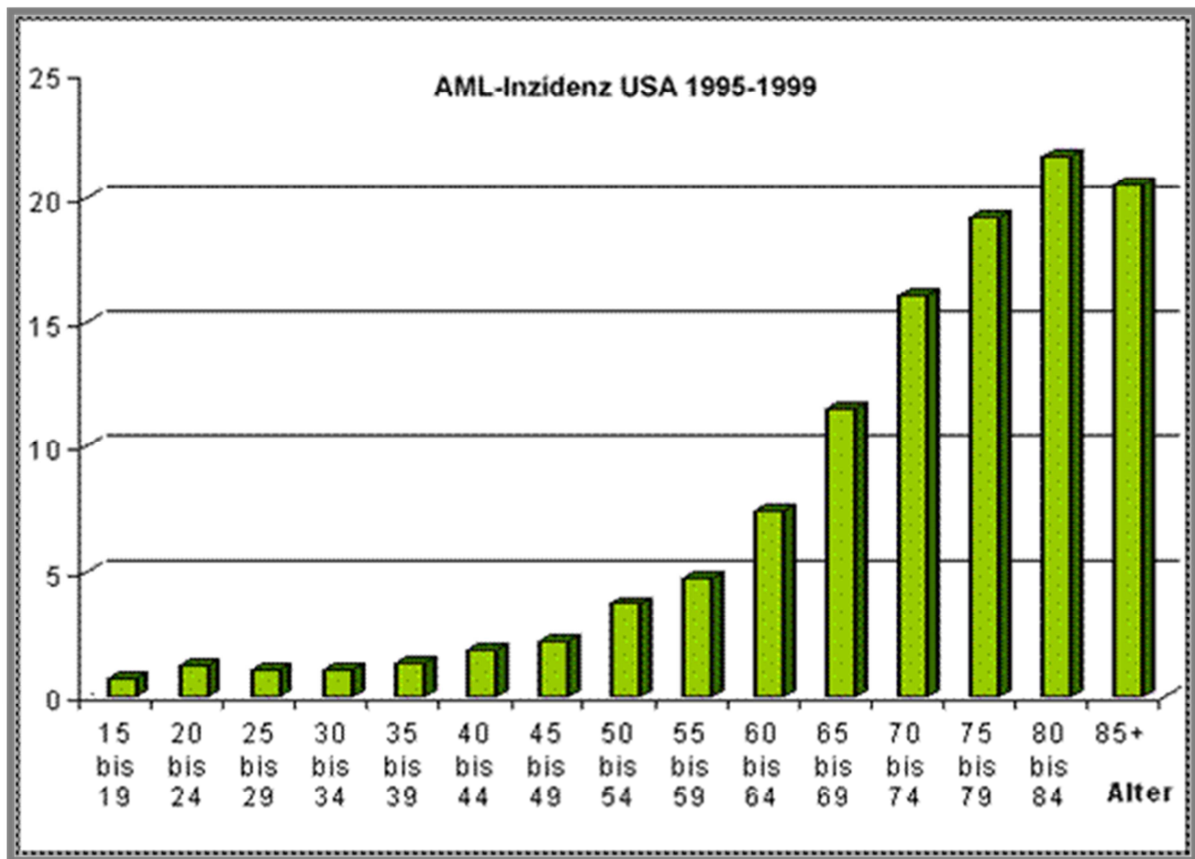


Abbildung 1: Inzidenz der AML (www.kompetenzzentrum-leukaemie.de)

1.3 Diagnose und WHO-Klassifikation

Für die Diagnose einer AML werden nach WHO bis auf wenige Ausnahmen (AML mit wiederkehrenden genetischen Veränderungen $t(15;17)$, $t(8;21)$, $inv(16)$ oder $t(16;16)$ sowie einige Fälle von Erythrozytenleukämie) das Vorliegen eines Blastenanteils von $\geq 20\%$ im Knochenmark oder peripherem Blut gefordert [1]. Die weitere Einteilung der akuten myeloischen Leukämien (AML) erfolgt entsprechend der WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2016 [5], in der neben morphologischen auch weitere Kriterien zur Einteilung herangezogen werden: so wird eine Subgruppe mit rekurrenten zytogenetischen Aberrationen unterschieden von solchen, die sekundär (therapieinduziert oder als Folge myelodysplastischer Syndrome) entstanden sind. Formen der AML, die keine dieser Kriterien erfüllen, werden weiterhin anhand der Blastenmorphologie klassifiziert [5, 6].

<u>Kategorie</u>	<u>Leukämieform</u>
AML mit häufigen genetischen Veränderungen	<ul style="list-style-type: none"> • AML mit t (8;21)(q22;q22); RUNX1/RUNX1T1* • AML mit abnormen Knochenmark-Eosinophilen [inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(q13;q22); CBFβ/MYH11]* • Akute Promyelozytenleukämie [AML mit (15;17)(q22;q12) (PML/RARA) und Varianten]* • AML mit Anomalien von 11q23 (MLL)
AML mit Dysplasie mehrerer Zellreihen	<ul style="list-style-type: none"> • Mit vorherigem myelodysplastischen oder myeloproliferativem Syndrom • Ohne vorheriges myelodysplastisches Syndrom
AML und myelodysplastisches Syndrom, therapiebedingt	<ul style="list-style-type: none"> • Alkylanzien, Topoisomerase-II-Hemmer bedingt • Andere Formen
Nicht anders klassifizierte AML	<ul style="list-style-type: none"> • AML minimal differenziert • AML ohne Ausreifung • AML mit Ausreifung • Akute myelomonozytäre Leukämie • Akute basophile Leukämie • Akute Panmyelose mit Myelofibrose • Granulozytäres Sarkom

* Die Diagnose lautet unabhängig vom Blastenanteil AML.

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der AML von 2016 [7]

1.4 Ätiologie und Pathogenese

In den meisten Fällen ist die Ätiologie unbekannt. Ionisierende Strahlung und/ oder zytotoxische Substanzen, wie Alkylantien und Topoisomerase-II-Inhibitoren, sind mit einem deutlich erhöhten Risiko für die Entwicklung einer akuten myeloischen Leukämie assoziiert.

Das Risiko, eine therapie-assoziierte AML zu entwickeln, ist bei der Kombination von ionisierenden Strahlen und zytotoxischer Substanzen zusätzlich erhöht [8, 9]. Ebenso stellt die Exposition gegenüber Benzol für die Entwicklung eines MDS oder einer AML einen entscheidenden Risikofaktor dar.

Das Risiko an einer AML zu erkranken, liegt bei aktiven Rauchern um 40% höher gegenüber Nichtrauchern und ehemalige Raucher haben ein 25% höheres Risiko als Personen, die nie geraucht haben, jeweils ohne Geschlechtsdisposition [10].

Der AML liegen genetische Veränderungen in hämatopoetischen Vorläuferzellen zugrunde. Diese transformierten Zellen werden als Leukämie induzierende Zellen (LIC) bezeichnet, wobei es sich hier nicht zwangsläufig um hämatopoetische Stammzellen handeln muss. Im Gegensatz zur gesamten leukämischen Zellpopulation besitzen LIC das Potential zur Selbsterneuerung. Ihr Anteil an der leukämischen Population ist jedoch gering. Sie können anhand ihrer funktionalen Eigenschaften (Repopulationsvermögen in Mäusen) oder aber aufgrund ihres Phänotyps (CD34+, CD38+, und HLA-DR+) identifiziert werden. Die Haupttumorlast wird jedoch von leukämischen Blasten gebildet, welche weder das Potential zur Selbsterneuerung noch der Proliferation besitzen. Diese Zellen werden als leukämischer Bulk bezeichnet. Dieser Bulk ist für die Symptome der AML, wie das Verdrängen der physiologischen Hämatopoese im Knochenmark und der daraus resultierenden Panzytopenie, verantwortlich. In manchen Fällen kann dieser Bulk auch zu einer Hyperleukozytose im peripheren Blut führen und Organischämien verursachen.

Die den malignen Transformationen zugrunde liegenden genetischen Veränderungen sind in einzelnen AML Subgruppen entschlüsselt worden. So hat die Identifikation der Funktion und des Mechanismus der Translokation (15;17) in der akuten Promyelozytenleukämie (APL) nicht nur zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie geführt, sondern ermöglichte auch die Entwicklung einer zielgerichteten Therapie:

Die balancierte Translokation zwischen den Chromosomen 15 und 17 führt zu einem Fusionsgen, welches als PML-RAR α bezeichnet wird. RAR α bindet in Abwesenheit seines Liganden all-trans Retinsäure an die DNA und führt dadurch zu einer Transkriptionsunterdrückung. Das onkogene Fusionsprotein PML-RAR α hält diese Interaktion auch in Anwesenheit des Liganden aufrecht und führt somit zu einer Differenzierungsblockade der Promyelozyten. Durch die systemische hochdosierte Therapie mit All-trans Retinolsäure (ATRA) wird RAR α als Teil des Fusionsprotein gebunden und die Transkription wiederhergestellt. Dies führt dann zur Differenzierung und Ausreifung der betroffenen Promyelozyten [11].

In den meisten Fällen ist jedoch eine einzige Mutation nicht ausreichend, um eine AML entstehen zu lassen. Vielmehr ist eine Reihe von genetischen Veränderungen an Zielstrukturen, welche für Differenzierungsprozesse wie FLT3, K-RAS oder c-kit notwendig, um einen Proliferationsvorteil zu bewirken. Andere bekannte Mutationen betreffen Gene der epigenetischen Regulation (IDH1/2, DNMT3A oder ASXL1) [12].

1.5 Klinik

Die Symptome der AML sind unspezifisch und vielfältig. Sie sind Folge der hämatopoetischen Insuffizienz mit (Pan-)zytopenien, welche durch die Verdrängung der normalen Hämatopoese durch die AML-Blasten hervorgerufen wird. Abhängig davon, welche Reihe(n) betroffen ist bzw. sind, leiden die Patienten an Leistungsminderung oder Müdigkeit (Anämie), gehäuften oder schweren Infekten, auch durch unübliche Erreger, sowie Fieber (Granulozytopenie) oder auch an Blutungskomplikationen wie Petechien und Zahnfleischbluten (Thrombozytopenie) [13]. Daneben können B-Symptome (ungewollter Gewichtsverlust, Nachtschweiß und unerklärtes Fieber) auftreten. Die Beschwerden treten meist nur kurz vor Diagnosestellung auf [14], jedoch können bei älteren Patienten auch prolongierte Krankheitsverläufe auftreten, wenn die AML z.B. sekundär auf dem Boden eines myelodysplastischen Syndroms (MDS) entsteht. Monozytär differenzierte Leukämien weisen häufiger als andere Formen extramedullären Manifestationen (Chlorome) auf [15], oder auch eine Gingivainfiltration, was gelegentlich zur Erstvorstellung beim Zahnarzt führt.

Des Weiteren können eine Splenomegalie sowie eine Hepatomegalie vorliegen. Diese sind bedingt durch die Infiltration der jeweiligen Organe mit leukämischen Blasten. Zusätzlich kann eine lokalisierte bzw. generalisierte Lymphadenopathie vorliegen.

Bei Hyperleukozytose kann es zur Leukostase mit Mikrozirkulationsstörungen kommen, da einerseits die hohen Leukozytenzahlen zur Okklusion kleiner Gefäße führen kann, andererseits Blasten spezifischen Adhäsionsmoleküle exprimieren können, welche ihnen die Anheftung an die Endothelien erleichtert [16]. Dies kann letztlich zum Organversagen und zum Tod führen.

1.6 Therapie

Die AML ist ein hämatologischer Notfall und bedarf umgehender Therapieeinleitung. Dabei muss gemeinsam mit dem Patienten entschieden werden, ob ein kurativer oder ein palliativer Ansatz gewählt wird.

Als Entscheidungskriterien dienen krankheitsspezifische Charakteristika (zyto- und molekulargenetische Eigenschaften) sowie patientenspezifische Eigenschaften (Komorbidität, biologisches Alter, Patientenwunsch).

Wird ein kurativer Ansatz gewählt, erfolgt eine intensive Polychemotherapie. Diese setzt sich aus Induktions- und Postremissionstherapie zusammen. Grundlage verschiedener Induktionsregime ist eine Kombination aus Cytarabin (AraC) und einem Anthrazyklin. Diese Chemotherapeutika werden seit nunmehr 40 Jahren in der Behandlung der AML verwendet [17]. Als internationaler Standard kann das sogenannte „7+3“ Regime angesehen werden, dieses besteht aus Cytarabin 100 mg/m² täglich als kontinuierliche Infusion über 7 Tage, in Kombination mit Daunorubicin 60 mg/m² als Kurzinfusion an 3 Tagen.

Cytarabin ist ein sogenannter Antimetabolit, d.h. es wird nach dreifacher intrazellulärer Phosphorylierung zu AraCTP, dem eigentlich aktiven Metaboliten, in neu synthetisierte DNA anstelle von Cytidintriphosphat eingebaut, dort führt es zur Blockade von DNA Reperaturmechanismen, was letztlich zur Apoptose der Zellen führt. Dies bedeutet, dass hochproliferative Zellen mehr AraCTP in ihre DNA inkorporieren (Abbildung 2) und es daher auch eine gewisse Zellzyklusabhängigkeit von AraC gibt [17].

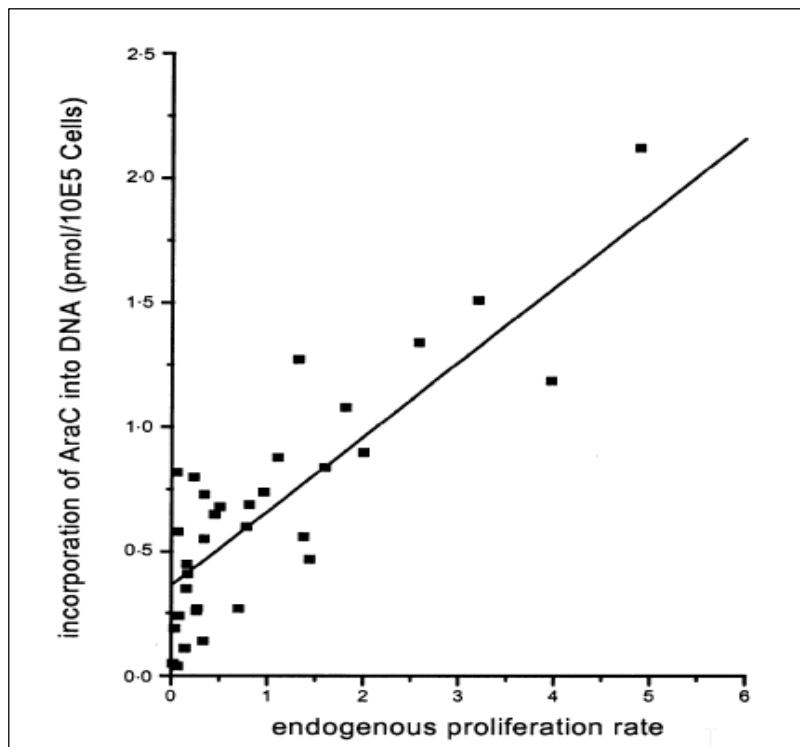


Abbildung 2: Aufnahme von AraC in Abhängigkeit von der Proliferation [17]

Ziel der Induktionstherapie ist das Erreichen einer kompletten Remission (CR), definiert als <5% Blasten im Knochenmark und Erholung des peripheren Blutbildes. Diese wird – je nach Alter und Risikoprofil, in ca. 60-80% aller Patienten mit AML erreicht [18]. Die anderen Patienten versterben entweder als Folge der Therapie oder weisen eine refraktäre Erkrankung auf.

Wurde eine komplette Remission der AML erreicht, folgt die Postremissionstherapie. Hier entscheidet das individuelle Risiko des Patienten über die Wahl der Postremissionstherapie. Handelt es sich um ein günstiges genetisches Risikoprofil, wird eine konventionelle Chemotherapie als Konsolidierung durchgeführt. Bei genetischen Hochrisikoprofilen sollte, wenn möglich, eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt werden. Lange Zeit war der Stellenwert der allogenen Stammzelltransplantation bei Patienten mit intermediärem Risikoprofil unklar. Die beiden randomisierten Studien der SAL (AML2003 und AML96) zeigten jedoch ein statistisch signifikant besseres Rezidiv-freies Überleben und einen Trend zu einem besseren Gesamtüberleben [19].

Die konventionelle Chemotherapie besteht aus 1-3 Zyklen Chemotherapie, welche als Konsolidierung 4-6 Wochen nach Erreichen der CR verabreicht werden. Sollte bis zum Zeitpunkt des Erreichens einer CR noch kein hochdosiertes AraC verabreicht worden sein, sollten 1-3 Zyklen HiDAC im Abstand von 6-8 Wochen verabreicht werden.

Liegt ein günstiges Risikoprofil vor, ist nach dem Erreichen einer CR vorerst keine Stammzelltransplantation notwendig. Sollte es jedoch zu einem Rezidiv der Grunderkrankung kommen, ist diese die Therapie der Wahl. Liegt ein Hochrisikoprofil vor, werden die Patienten nach Erreichen einer CR der allogenen Stammzelltransplantation zugeführt. Ähnlich verhält es sich mit Patienten, bei denen Chromosomenveränderung vorliegen, die weder der günstigen noch der ungünstigen Subgruppe zugeordnet werden können [20].

Patienten, die nach der Induktionstherapie keine adäquate Blastenclearance während der Aplasiephase aufweisen, profitieren ebenfalls von einer allogenen Stammzelltransplantation [21].

1.7 Prognose

Die häufigste Todesursache bei Patienten mit AML ist das Rezidiv. Die Rezidivrate nach erfolgreicher Induktionstherapie mit Erreichen einer CR ist abhängig von Postremissionstherapie und genetischem Risikoprofil und kann z. B. bei Patienten mit komplexem Karyotyp, die keine allogene Stammzelltransplantation erhalten, 100% betragen [18, 22].

Einen wesentlichen Einfluss auf die Prognose hat das Alter: mit höherem Alter sinkt die Chance auf das Erreichen einer kompletten Remission und es steigt weiterhin das Rezidivrisiko. So beträgt das 5-Jahres-Überleben bei Patienten unter 30 Jahren 60%, bei Patienten zwischen 45 und 54 Jahren 43% und bei Patienten zwischen 55 und 64 Jahren nur noch 23%. Im höheren Alter sinkt es weiter deutlich ab [23].

Den stärksten Einfluss auf die Prognose neben dem Patientenalter haben molekulare bzw. zytogenetische Veränderungen. Die molekular-zytogenetischen Veränderungen werden in drei prognostische Gruppen eingeteilt [24].

ELN Risikogruppe	Aberrationen
Günstig	t(8;21)(q22;q22; RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1p22) oder t(16;16)(p13.1;q22): CBFB-MYH11 Mutation NPM1 ohne FLT3-ITD (normaler Karyotyp) Biallelisch mutiertes CEBBPA
Intermediär	Mutiertes NPML mit FLT3-ITD ^{hoch} (normaler Karyotyp) Wildtyp-NPM1 ohne FLT3-ITD3 (normaler Karyotyp) oder mit FLT3-ITD ^{niedrig} (mit oder ohne ungünstige genetische Aberrationen t(9;11)(p11;q23); MLLT3-KMT2A zytogenetische Aberrationen die nicht als günstig oder ungünstig eingestuft werden
Ungünstig	t(6;9)(p23;q34);DEK-NUP214 t(v;11)(vq23); KMT2A-Genumlagerung t(9;22)(q34.1;q11.2);BCR-ABL1 inv(3)(q21q26.2)oder t(3;3)(q21;q26.2); GATA2, MECOM (EVIL) 5 oder del(5q);7;-17/abnl(17p) komplexer Karyotyp (>3 Aberrationen) monosomaler Karyotyp (Monosomie assoziiert mit mindestens einer weiteren Monosomie oder einer anderen strukturellen chromosomalen Aberration (außer CBF-AML) Wildtyp-NPM1 mit FLT3-ITD ^{hoch} Mutiertes RUNX1 Mutiertes ASXL1 Mutiertes TP53

Tabelle 2: molekular-zytogenetische Risikogruppen der AML gemäß der Klassifikation des European LeukemiaNet

Weitere prognostische Risikofaktoren stellen eine hohe LDH und ein hohe Leukozytenzahlen bei Erstdiagnose dar [25-29].

In der Abbildung 3 ist das Überleben der unter 60-jährigen abhängig vom zytogenetischen Risikoprofil der Patienten dargestellt. So zeigt sich ein 5-Jahresüberleben in der günstigen Risikogruppe von 52%, hingegen erreichen nur 14% der Patienten der ungünstigen Risikogruppe eine Überlebenszeit von 5 Jahren.

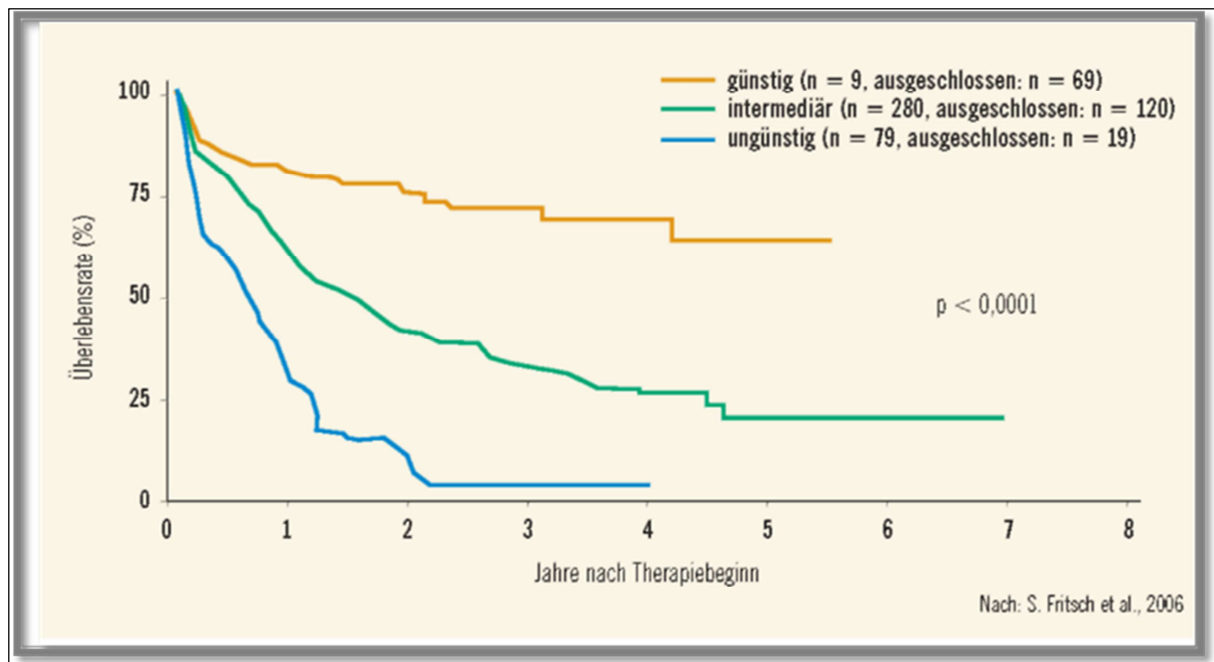


Abbildung 3: Überlebensrate zytogenetischer Risikogruppen [13]

1.8 Hämatopoetische Stammzellnische

Für die hohen Rezidivraten der AML sind leukämische Stammzellen verantwortlich, die die Chemotherapie überleben, um dann nach einem variablen Zeitraum erneut zu proliferieren und das klinisch manifeste Rezidiv verursachen. Der Lebensraum dieser Leukämie-induzierenden Zellen (und damit eine mögliche Ursache für den Schutz dieser Zellen) ist die Stammzellnische, die daher zunehmend für das Verständnis der Pathogenese der AML an Bedeutung gewinnt [30]. Die Stammzellnische im Knochenmark ist ein heterogenes und komplexes System, bestehend aus hämatopoetischen Zellen wie Monozyten, Makrophagen und hämatopoetischen Progenitoren, sowie nicht-hämatopoetischen Zellen wie mesenchymalen Stromazellen, Osteo- und Fibroblasten, die in einer komplexen Wechselwirkung stehen. So konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stromazellen AML-Blasten vor Chemotherapie-induzierter Apoptose durch Änderung ihrer Stoffwechselaktivität und Induktion von anti-apoptotischen Proteinen schützen [31, 32]. In Co-Kultur von AML-Blasten mit Stromazellen lag ein deutlich geringerer Anteil an apoptotischen Blasten vor, als in der ohne Stromazellen kultivierten Vergleichsgruppe, wenn diesen das nährstoffreiche Serum entzogen wurde oder diese mit AraC behandelt wurden. Welche Mechanismen

der Interaktion zwischen AML-Blasten und Stromazellen zugrunde liegen, ist nicht völlig geklärt.

Daneben gibt es zahlreiche nicht-zelluläre Komponenten, wie Temperatur, pH und den Sauerstoffpartialdruck [33, 34]. Im Knochenmark herrscht jedoch kein einheitlicher Sauerstoffpartialdruck, sondern es bestehen Areale mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen. Diese liegen zwischen 1 - 6% O₂ [35].

Insbesondere bei einem Sauerstoffkonzentrationen von $\leq 1\%$ O₂ scheint die zelluläre Differenzierung und Ausreifung inhibiert zu werden [36]. Eine wesentlichen Rolle für die Differenzierung spielen hierbei Sauerstoffradikale (ROS; radical oxygen species), die bei reduziertem Sauerstoffgehalt vermindert gebildet werden, weswegen Zellen in einem solchen Milieu vermindert differenzieren und ihr Stammzellpotential behalten können [37]. Damit ist der pO₂ ein wichtiger Bestandteil des Microenvironments, da er Einfluss auf das Selbsterneuerungspotential und die Differenzierung normaler hämatopoetischer Stammzellen nimmt.

Nachdem die Bedeutung des reduzierten pO₂ in der Stammzellnische in der gesunden Hämatopoese relevant zu sein scheint, liegt es nahe, diesen auch in der AML weiter zu untersuchen. Unklar ist, welche Werte der pO₂ im AML Knochenmark annimmt; bisherige Untersuchungen scheinen jedoch keine prinzipiellen Unterschiede – wie einen niedrigeren pO₂ – im AML Knochenmark zu belegen [38].

Trotzdem können Änderungen in der Biologie der AML-Blasten bereits bei einem O₂ Gehalt von 6% beobachtet werden. So wurden Änderungen im Proteinexpressionsmuster nachgewiesen [39] sowie eine verstärkte Aktivierung des mitogenen Kinase-Signalweges (MAPK) [2]. Dies ist von besonderer Bedeutung, da mehr als 50% der Erkrankten eine konstitutive Aktivierung von MAP-Kinasen aufweisen, welche im Zusammenhang mit der Entstehung und Aufrechterhaltung der AML diskutiert werden [40].

1.9 Fragestellung

Es wird zunehmend deutlich, dass zu einem gründlicheren Verständnis der Pathogenese und des Krankheitsverlaufs der AML die Rolle des Microenvironments im Knochenmark stärker berücksichtigt werden muss. Als eine wesentliche Komponente des Microenvironment wurde in den vergangenen Jahren der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) identifiziert.

Nachdem bereits einige Untersuchungen funktionelle Änderungen in AML Blasten als Antwort auf Veränderungen im pO_2 nachgewiesen haben, sollten hier weiterführende Untersuchungen und Charakterisierungen in der Antwort von AML Blasten auf einen reduzierten pO_2 wie in der hämatologischen Stammzellnische untersucht werden, insbesondere das Proliferationsverhalten und damit auch das Ansprechen von AML Blasten auf Chemotherapie. Im Einzelnen sollten folgende Fragen untersucht werden:

- Wie ändern sich Proliferation, Zellzyklus und Apoptose von AML Blasten (Zell-Linien & primäre AML Proben) unter unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrucken?
- Welche molekularen Mechanismen sind für potentielle Änderungen im Proliferationsverhalten verantwortlich?
- Beeinflusst der Sauerstoffpartialdruck die antileukämische Effektivität von Zytostatika und kann dieser zur Resistenzentstehung beitragen?
- Lassen sich Wege finden, eine solche Resistenz zu überwinden?

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Sterilwerkbank	LaminaFlow MD14	Camfil (Trosa, S)
CO ₂ -Inkubator	CB150	Binder (Tuttlingen, D)
+ 4°C Kühlschrank	Comfort	Liebherr (Nussbaumen, CH)
-20°C Gefrierschrank	Premium	Liebherr (Nussbaumen, CH)
-80°C Gefriertruhe	HERA freeze	Thermo (Waltham, US)
Hypoxie-Arbeitsstation	INVIVO ₂ 400	Ruskinn (Pencoed, South Wales, UK)
Gasmischer	GMQ 001	Ruskinn (Pencoed, South Wales, UK)
Orbitalschüttler	PS M3D	Thermo (Waltham, US)
Taumelwipptisch	Stuart™ SRT9	Biocote (Staffordshire, UK)
Vortexer	VORTEX-GENIE	Bender & Hobein AG (Zürich, CH)
Mikroskop	PrimoVert	Zeiss (Göttingen, D)
Spektralphotometer	OPTImax™	Molecular Devices (Sunnyvale, US)
Zentrifuge	Multifuge 3L	Heraeus (Hanau, D)
Zentrifuge	Biofuge 15	Heraeus (Hanau, D)
Laufkammer	XCell Sure Lock	Novex (San Diego, US)
Transferkammer	XCell Blot Module	Novex (San Diego, US)
Spannungsquelle	Power Ease 500	Novex (San Diego, US)
Durchflusszytometer	FACSCalibur™	BD bioscience (Franklin Lakes, US)

Einfrierbox	QUALIfreezer	Qualilab (Olivet, F)
Analysenwaage	BP210 S	Sartorius (Göttingen, D)
Präzisionswaage	BP6100	Sartorius (Göttingen, D)
ph-Meter	PH3110 Set1	WTW (Weilheim, D)
Entwicklermaschine	CURIX 60	AGFA (Mortsel,B)
Thermoblock	Thermostat 5320	Eppendorf (Hamburg, D)

2.2 Software

CellQuest™ Pro	BD bioscience (Franklin Lakes, US)
ModFit LT™	Verity Software House (Topsham, US)
Office 2010	Microsoft (Redmond, US)
SOFTmax® Pro	Molecular Devices (Sunnyvale, US)

2.3 Verbrauchsmaterialien

Eppendorfgefäße 1,5ml	Eppendorf AG (Hamburg, D)
FACS-Röhrchen	BD Falcon (Franklin Lakes, US)
Gel Blotting Paper	Whatmann GmbH (Dassel, D)
Hypercassette™	Amersham (Buckinghamshire, UK)
Hyperfilm™ECL™	Thermo (Waltham, US)
Kryoröhrchen	Sarstedt (Mümbrecht-Rommelsdorf, D)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Mümbrecht-Rommelsdorf, D)
Pipetten seriologisch (2/5/10/25ml)	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)
PVDF-Membran	Millipore (Bedford, MA, US)
PP-Röhrchen (15/50ml)	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)

Zellkulturplatten (6/12/24/96 Loch)	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)
Zellkulturflaschen (25/75cm ²)	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)

2.4 Reagenzien für Zellkultur

RPMI 1640 (1x)	Life Technologies (Karlsruhe, D)
fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom (Berlin, D)
L-Glutamin 200mM (100x)	Life Technologies (Karlsruhe, D)
Penicillin / Streptomycin (100x)	Life Technologies (Karlsruhe, D)
D-PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (1x)	Life Technologies (Karlsruhe, D)
Biocoll Separating Solution	Biochrom (Berlin, D)
Erythrozyten-Lysepuffer (EasyLyse™)	Dako (Glostrup, DK)
Trypanblau-Lösung (0,4%)	Life Technologies (Karlsruhe, D)

2.5 Chemotherapeutika

Cytarabin	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
-----------	-------------------------------

2.6 Sonstige Reagenzien

Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD bioscience (Heidelberg, D)
DC™ Protein Assay Kit	BioRad (München, D)
Dnase I	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
FITC BrdU Flow Kit	BD bioscience (Heidelberg, D)
Laemmli Sample Buffer (2x)	BioRad (München, D)
LY-29004	CellSignaling (Cambridge, UK)

PD-98059	CellSignaling (Cambridge, UK)
Proteins™ Dual Color Standard	BioRad (München, D)
RNase	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
SB-203580	CellSignaling (Cambridge, UK)
SuperSignal® West Dura Kit	Thermo (Waltham US)
SuperSignal® West Femto Kit	Thermo (Waltham US)
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche (Basel, CH)

2.7 Antikörper

2.7.1 Primärantikörper

Anti-P27/ Kip 1	BD bioscience (Heidelberg,D)
pAKT(S473)	Cell Signaling Technology Europe B.V. (Frankfurt am Main, D)
XIAP	Cell Signaling Technology Europe B.V. (Frankfurt am Main, D)
COX	Cell Signaling Technology Europe B.V. (Frankfurt am Main, D)
tAKT	Cell Signaling Technology Europe B.V. (Frankfurt am Main, D)
GAPDH	Cell Signaling Technology Europe B.V. (Frankfurt am Main, D)
MEK1/2	,Axon Medchem BV (Groningen,NL)

MAPK Inhibitor PD169316	Axon Medchem BV (Groningen,NL
-------------------------	-------------------------------

2.7.2 Sekundärantikörper

ECLTM anti-mouse HRP	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
----------------------	-------------------------------------

2.8 Puffer und Lösungen

2.8.1 Durchflusszytometrie

Annexin V Binding Puffer:	10mM HEPES pH 7.4 140mM NaCl 2,5mM CaCl ₂ gelöst in deionisiertem Wasser
---------------------------	--

PI-Workingsolution:	50µg/ml Propidium-Iodid gelöst in D-PBS
---------------------	--

FACS-Puffer:	2mM EDTA pH 7.2 0,1% bovine serum albumin (BSA) gelöst in D-PBS
--------------	---

DNA-Stainingsolution:	100µg/ml RNase 50µg/ml Propidium-Iodid gelöst in D-PBS
-----------------------	--

2.8.2 Western Blot

5 x Protein-Lysepuffer:	50mM TRIS HCL pH 7.5 650mM NaCl 25mM EDTA pH 8.0 5% TRITON X-100 gelöst in deionisiertem Wasser
1 x Protein-Lysepuffer:	5x Protein-Lysepuffer (im Verhältnis 1:5) 50mM NaCl 50µM Benzamidin 1mM PMSF 1mM Orthovanadat 10mM Natrium-Pyrophosphat 1 Protease-Inhibitor Tablette (pro 10ml) gelöst in deionisiertem Wasser
Proteinstandard 3mg/ml:	30mg Bovines Serum Albumin (BSA) gelöst in 10ml ultrapurem Wasser
2 x Protein-Loadingbuffer:	Laemmli Sample Buffer (2x) 200 mM DTT 5 % β-Mercaptoethanol
Sammelgelpuffer pH 6.8:	0,5M TRIS HCL 0,4 % SDS gelöst in deionisiertem Wasser
Trenngelpuffer pH 8.8:	1,5M TRIS HCL 0,4% SDS gelöst in deionisiertem Wasser

1 x Running-Buffer:	0,1M Glycin 25mM TRIS 0,1% SDS gelöst in deionisiertem Wasser
Transferpuffer:	0,1M Glycin 25mM TRIS 0,1% SDS 20% Methanol gelöst in deionisiertem Wasser
PBS-T:	10g/l PBS (Instamed) 0,1% TWEEN 20 gelöst in deionisiertem Wasser
PBS:	10g/l PBS (Instamed) gelöst in deionisiertem Wasser
Magermilch:	5 bzw. 10% Magermilchpulver gelöst in PBS-T
Primärantikörper:	Antikörper im Verhältnis (1:2000) 5 % Magermilch 0,02% Natriumazid gelöst in PBS-T
Sekundärantikörper:	Antikörper im Verhältnis (1:10000) 5% Magermilch Gelöst in PBS-T

Trenngele:	25% Trenngelpuffer 7,5-12% Acrylamid 0,1% Temed 0,05% Ammoniumpersulfat gelöst in deionisiertem Wasser
------------	--

Sammelgel:	25% Sammelgelpuffer 4% Acrylamid 0,1% Temed 0,05% Ammoniumpersulfat
------------	--

2.9 Zellkultur

2.9.1 AML Zelllinien

Folgende AML-Zelllinien wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) erworben:

Zelllinie	FAB	Beschreibung
KG-1a	M6	Komplex-aberranter Karyotyp
NB-4	M3	t(15;17)
HL-60	M2	p53 Deletion

Tabelle 3: verwendete AML-Zelllinien

2.10 Primäre AML-Blasten

Knochenmarkaspirate bzw. periphere Blutproben von AML Patienten wurden im Rahmen der Routineuntersuchung gewonnen. Überschüssiges Material wurde nach Einwilligung für wissenschaftliche Zwecke weiterverwendet. Ein entsprechendes Ethikvotum lag vor.

Knochenmarkaspirate bzw. periphere Blutproben wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS vermischt, in einem 50 ml Röhrchen auf 15 ml Biocoll Separation Solution überschichtet und für 15 Minuten bei 2100 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Danach befanden sich die mononukleären Zellen in der Interphase, welche vorsichtig abgenommen und in ein frisches Röhrchen überführt wurde. Die Zellsuspension wurde für weitere fünf Minuten bei 1500 rpm mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 10 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für zehn Minuten bei 4° C inkubiert.

Anschließend wurde der Überstand erneut abzentrifugiert, das Zellpellet einmal mit PBS gewaschen und in 10 ml Kultivierungsmedium aufgenommen. Die Zellen wurden direkt für die Versuchsansätze benutzt oder viabel eingefroren.

Für die viable Tiefkühlagerung wurden 20-50 Mio. Zellen mit 2 ml fetalem Kälberserum unter Zusatz von 10 % DMSO in ein Kryoröhrchen überführt. In einer speziellen Einfrierbox, wurden die Zellen dann über Nacht bei -80°C gelagert. Die Einfrierbox ist dabei mit Isopropanol befüllt, welches die Temperatur des Inhalts um konstant 1°C pro Minute senkt und somit ein schonendes Einfrieren der Zellen ermöglicht.

Zellen, die der Tiefkühlagerung wieder entnommen wurden, wurden in einem Wasserbad bei 37° C eine Minute lang aufgetaut und in 20 ml RPMI-Medium überführt. Der Überstand wurde dann für 5 Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert, das Zellpellet in 10 ml RPMI-Medium aufgenommen und die Zellzahl der viablen Zellen ermittelt.

2.11 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Die Zellsuspension wurde dafür im Verhältnis 1:1 mit einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung (anionischer Diazolfarbstoff) gemischt und in die Zählkammer pipettiert. Trypanblau bindet unspezifisch an Proteine des Zytosols und wird von vitalen Zellen nicht aufgenommen. Nicht viable Zellen färben sich daher dunkelblau. Für die Zählung wurde nur die Anzahl der vitalen Zellen in den definierten Quadranten der Zählkammer berücksichtigt und die Zellzahl der Zellsuspension mit der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{N \times 1000}{0,1 \times 0,5 \times z} = \text{Zellzahl pro ml Zellsuspension}$$

- N = Anzahl vitaler Zellen in den ausgezählten Quadranten
- 0,1 = Kammerfaktor der verwendeten Zählkammer
- 0,5 = Verdünnungsfaktor mit Trypanblau-Lösung
- z = Anzahl der ausgezählten Quadranten

2.12 Zellkultur

AML-Zelllinie sowie primäre AML-Blasten wurden in RPMI Medium unter Zusatz von 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. In allen Experimenten betrug die initiale Zelldichte der Zelllinien $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml. Primäre AML-Blasten wurden in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen / ml kultiviert.

Die Kultivierung unter Standardlaborbedingungen erfolgte bei 37°C unter Raumluft (21% O₂) und 5% CO₂. Zellkulturen unter reduziertem Sauerstoffpartialdruck wurden in einer Hypoxiearbeitsstation durchgeführt. In diesem geschlossenen System erfolgte die Kultivierung der Zellen bei 37°C unter 5% CO₂ und Sauerstoffkonzentrationen zwischen 12% - 1% O₂. Um eine Reoxygenierung durch Raumluft zu vermeiden, wurden alle Arbeitsschritte innerhalb der Hypoxiearbeitsstation durchgeführt.

2.13 In-vitro Zytotoxizitätsmessung

Das hell rosa Tetrazoliumsalz WST-1 wird in viablen Zellen mitochondrial von der Succinat-Dehydrogenase reduziert und in dunkelrotes Formazan umgewandelt, welches wiederum am Spektralphotometer gemessen werden kann. Dabei dient die Intensität des Farbumschlags als Maß für eine intakte Atmungskette und ist direkt proportional zur Zellzahl.

Nach 48h unter entsprechendem Sauerstoffmilieu wurden 25.000 Zellen in 100 µl RPMI in eine 96 Well-Platte pipettiert. Zur Erstellung von Dosis-Wirkungskurven erfolgte die

Zugabe von Cytarabin (1 – 10 µg/ml), und die Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 200 µl/Well für weitere 48 Stunden kultiviert. Anschließend wurden jeweils 20 µl WST-1 Reagenz zugegeben. Nach einer 2-4 stündigen Inkubationszeit bei 37°C wurden die Intensitäten der Formazanbildung bei 450nm photometrisch quantifiziert und daraus die IC50 errechnet. Der IC50-Wert gibt die Konzentration einer Substanz an, welche nötig ist um 50% der Zellrezeptoren oder Mikroorganismen in vitro zu blockieren.

2.14 Durchflusszytometrie

2.14.1 Bestimmung der spontanen Apoptoserate

Das Protein Annexin bindet Ca^{2+} -abhängig an Phosphatidylserin, welches sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran viabler Zellen befindet. Während der frühen Phase der Apoptose werden Phosphatidylserine an die Außenseite der Membran transloziert und von fluoreszenzgekoppeltem Annexin gebunden. Diese Fluoreszenz kann dann durchflusszytometrisch detektiert werden.

Die Gegenfärbung mit Propidiumiodid (PI) dient dem Zweck, apoptotische von nekrotischen Zellen zu unterscheiden. Da die Zellmembran nekrotischer Zellen durchlässig ist, wird PI in der DNA interkaliert und durchflusszytometrisch bestimmt. Damit kann der Anteil nekrotischer Zellen quantifiziert werden, da diese sowohl Annexin als auch PI positiv sind, während Zellen in der frühen Phase der Apoptose nur Annexin positiv sind.

2.14.2 Zellzyklusanalysen

Der Prozess der DNA-Replikation wird in verschiedene Phasen unterteilt. Je nach Zellzyklusphase liegt der Chromosomensatz einer Zelle einfach (haploid) oder doppelt (diploid) im Zellkern vor. Ein DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff wie Propidiumiodid (PI) ermöglicht es in einer Zellsuspension die Verteilung der Zellzyklusphasen an Hand des DNA-Gehalts der einzelnen Zellen durchflusszytometrisch darzustellen.

Nach einer Kultivierungsphase von 48h unter entsprechendem Sauerstoffmilieu wurden 5×10^5 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und der Überstand abzentrifugiert (5 Minuten, 1500 rpm). Anschließend wurden die Zellen mit 70%igem Ethanol versetzt und für 30 Minuten bei -20°C inkubiert, der Alkohol abzentrifugiert und verworfen. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch zusätzliches Anfärben von RNA zu verhindern, wurde eine 30minütige enzymatische Spaltung mit $100 \mu\text{g/ml}$ RNase durchgeführt und die Zellen anschließend mit $50 \mu\text{g/ml}$ PI-Lösung angefärbt.

Um den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus innerhalb einer bestimmten Zeitspanne zu quantifizieren, wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen BrdU eingesetzt. Dazu wurden nach 48h unter dem jeweiligen Sauerstoffmilieu AML-Zelllinien für jeweils 4h $10 \mu\text{M}$ BrdU exponiert. Aufgrund der sehr geringen *in-vitro* Proliferationsrate primärer AML-Blasten wurde die BrdU-Lösung hier bereits zu Beginn der Kultivierungsdauer zugegeben. Anschließend wurden ca. $0,5 \times 10^5$ Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt, der Überstand abzentrifugiert und die Zellen mit einer Cytifix/ Cytoperm-Lösung für 30 Minuten fixiert, um die Zellmembran durchlässig zu machen. Da für die Bindung des Antikörpers an das BrdU eine Denaturierung der DNA notwendig ist, wurde vor der Färbung mit $1 \mu\text{l}$ eines FITC markierten anti-BrdU Antikörpers ein enzymatischer Abbau mit $30\mu\text{g}$ DNase durchgeführt und mittels FACS der Anteil von BrdU, der in die DNA eingebaut wurde, ermittelt.

2.15 Western blot

Die Methode des Western blots ermöglicht es, spezifisch die Expression einzelner Proteine in Zellen nachzuweisen. Dazu werden die Zellen lysiert, der Gesamtproteingehalt jedes Zelllysats ermittelt und äquivalente Proteinmengen auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch Anlegen von Gleichstrom wandern die Proteine dann aufgrund ihrer negativen elektrischen Ladung zur Anode. Da sich kleiner Moleküle schneller fortbewegen als große, werden die Proteine somit aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes aufgetrennt. In einem zweiten Schritt werden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF-Membran) transferiert. Die Membran wird anschließend mit einem Primärantikörper inkubiert, der spezifisch gegen das gesuchte Protein gerichtet ist. Die Quantifizierung des

gebundenen Primärantikörpers erfolgt indirekt, wobei in der Regel chemolumineszierende Sekundärantikörpern verwendet werden, welche dann proportional zur Menge des gebundenen Primärantikörpers einen lichtsensitiven Röntgenfilm schwärzen.

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, in 50 - 100 µl Lysepuffer resuspendiert und unter wiederholtem Durchmischen mit einem Vortexmischer 30 Minuten lang auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette abgenommen.

Der Proteingehalt der einzelnen Proben wurde mit dem DCTM Protein Assay Kit quantifiziert. Dazu wurde in einer 96-Well-Platte eine Standardkurve pipettiert, die durch eine Verdünnungsreihe von 0,09 - 3,0 mg/ml BSA erstellt wurde. Auf die gleiche Platte wurden jeweils 2,5 µl der Lysate aufgetragen. Anschließend wurden in jedes Well 25 µl einer 1:6 Mischung aus Reagenz S/A und 200 µl Reagenz B zu gegeben und die Platte für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Intensität der entstandenen Blaufärbung ist direkt proportional zum Proteingehalt der Lysate und wurde bei einer Wellenlänge von 620 nm photometrisch quantifiziert.

Die Lysate wurden im Verhältnis 1:1 mit 2fach konzentriertem Laemmli-Loading-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert.

Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins wurde das Trenngel mit einer Konzentration zwischen 7,5% – 12% gegossen. Die 10x10cm Gele wurden in eine mit Runningbuffer gefüllte Laufkammer eingesetzt. Die erste Tasche wurde mit 7 µl ProteinsTM Dual Color Standard beladen. In die übrigen Taschen wurden jeweils 30 µg Lysat Gesamtprotein der einzelnen Proben eingesetzt.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte für ca. 90 Minuten bei 125V und 35mA. Im nächsten Schritt wurden die aufgetrennten Proteinfractionen für ca. 120min bei 25V und 125 mA auf eine 7x9 cm PVDF-Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran für ca. eine Stunde bei Raumtemperatur in 10%iger Magermilch inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blocken. Der Primärantikörper wurde in der Regel in einer Verdünnung von 1:2000 in 5%iger Magermilch eingesetzt. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte entweder für zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C. Um den nicht gebundenen Primärantikörper vollständig zu entfernen, wurde die Membran anschließend 2mal für ca. 5 Minuten mit PBS-Tween gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde entsprechend dem Ursprungsorganismus des

Primärantikörpers ausgewählt und in einer Verdünnung von 1:10.000 in 5%iger Magermilch eingesetzt. Zur quantitativen Bindung des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper wurde die Membran ca. 30 Minuten bei RT inkubiert, und anschließend zweimal mit PBS-Tween, und einmal mit reinem PBS für ca. 5 Minuten gewaschen. An den Sekundärantikörper ist das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt, welches zugegebenes Luminol oxidieren kann. Diese Reaktion emittiert ein detektierbares Lichtsignal. Zur Entwicklung wurden die Chemoluminiszenzsubstrate Luminol/ enhancer Solution und Stable Peroxide Solution im Verhältnis 1:1 vermischt und anschließend gleichmäßig mit einer Pipette auf der Membran verteilt. Die Membran wurde nun in eine Klarsichtfolie gegeben und eventuell eingeschlossene Luftblasen ausgestrichen. In einer speziellen, lichtundurchlässigen Entwicklungskassette wurde unter einer energiearmen Rotlichtlampe für unterschiedlich lange Zeiträume ein lichtsensitiver Röntgenfilm auf die Membran aufgelegt und der Film anschließend maschinell entwickelt.

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkung von Hypoxie auf das Wachstumsverhalten von AML Blasten

Es wurde der Effekt von physiologischer Hypoxie auf das Wachstumsverhalten von leukämischen Blasten unter unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (1% - 6% O₂) untersucht. Dazu wurden die AML-Zelllinien KG1a, HL-60 und NB4 verwendet.

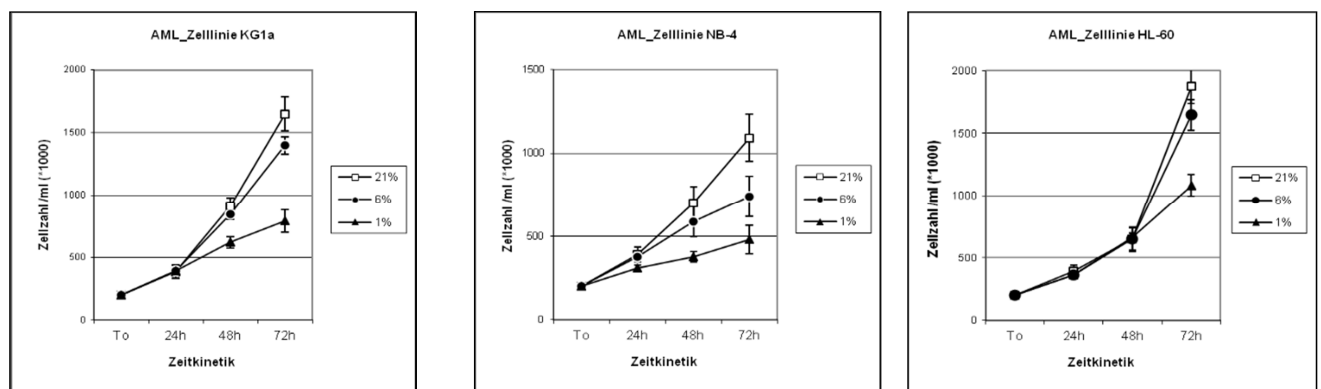


Abbildung 4: Wachstumskinetik für die Zelllinie KG1a, NB-4, HL60 (n=3)

In allen drei Zelllinien ist unter hypoxischen Bedingungen eine geringere Zellzahl im Vergleich zu Standardlaborbedingungen über eine Zeitspanne von 72 h feststellbar (Abbildung 4).

Während nach 24 Stunden noch keine Änderungen zu beobachten waren, zeigten sich erste Änderungen nach 48 Stunden: die Zellzahl der in reduzierter Sauerstoffkonzentration von 1-6% O₂ kultivierten Zellen war signifikant niedriger als die unter Standardlaborbedingungen (entspricht 100%): es fanden sich für 6% O₂ folgende Werte: KG1a: 93% (p<0,05), NB4: 84% (p<0,01) HL60: 96% (p<0,05), für 1% O₂ ergaben sich folgende Ergebnisse: KG1a: 68% (p <0,01), NB-4: 53% (p<0,01), HL60: 97% (p<0,05).

Am deutlichsten war der Unterschied nach 72 Stunden: hier war die Zellzahl unter Hypoxie in allen 3 Zelllinien signifikant geringer als unter Standardlaborbedingungen (6% O₂: KG1a: 85% (p<0,05), NB4: 68% (p<0,01), HL60: 88% (p<0,05), 1% O₂: KG1a: 48% (p<0,01), NB4: 44% (p<0,01), HL60: 58% (p<0,05)).

Es konnte somit eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Zellzahl und Sauerstoffkonzentrationen im AML Zellkulturmodell belegt werden. Da die geringeren Zellzahlen entweder Folge einer erhöhten Apoptose oder einer verringerten Proliferation sein können, wurde dies im Folgenden weiter untersucht.

3.2 Auswirkung von Hypoxie auf die Viabilität von AML-Blasten

Um die Viabilität der AML-Blasten zu überprüfen, wurden die Zellen mit FITC-Annexin V und Propidiumiodid (PI) gefärbt und mittels FACS-Analyse gemessen. Damit lässt sich zwischen Apoptose und Nekrose der Zellen unterscheiden. Während apoptotische Zellen nur Annexin positiv sind, sind nekrotische Zellen zusätzlich PI positiv.

Es zeigte sich, dass der Einfluss physiologischer Hypoxie auf die Viabilität der drei Zelllinien sehr heterogen ist

3.2.1 Apoptoseverhalten der Zelllinie KG1a

KG1a			
	21 % O ₂	6 % O ₂	1 % O ₂
24h	1,8 %	1,6 %	1,9 %
48h	2,0 %	2,1 %	1,3 %
72h	1,5 %	1,6 %	1,6 %

Tabelle 4: prozentualer Anteil der apoptotischen Zellen der Linie KG1a (n=3)

Unter Hypoxie kam es bei der Zelllinie KG1a zu keinem Zeitpunkt zu einer signifikanten Induktion von Apoptose (Tabelle 4). Dies impliziert, dass die geringere Zellzahl unter Hypoxie im Vergleich zu Standardlaborbedingungen Folge einer unterschiedlichen Proliferation ist.

3.2.2 Apoptoseverhalten der Zelllinie NB4

NB4			
	21 % O ₂	6 % O ₂	1 % O ₂
24h	9,2 %	11,2 %	18,6 %
48h	8,2 %	13,6 %	28,3 %
72h	8,5 %	19,1 %	37,5 %

Tabelle 5: prozentualer Anteil der apoptotischen Zellen der Linie NB4 (n=3)

Im Gegensatz dazu führt Hypoxie bei der Zelllinie NB4 zu einer signifikanten Apoptoseinduktion. Dieser Effekt wird nach 72 h am deutlichsten: hier stieg die Zahl apoptotischer Zellen bei 6% O₂ um das 2,2fache an ($p < 0,01$), bei 1% um das 4,4fache ($p < 0,01$, Tabelle 5). Hier kann also von einer Apoptoseinduktion als Ursache der

geringeren Zellzahl unter hypoxischen Bedingungen ausgegangen werden und weniger von einem geänderten Proliferationsverhalten.

3.2.3 Apoptoseverhalten Zelllinie HL60

HL60			
	21 % O ₂	6 % O ₂	1 % O ₂
24h	1,8 %	1,3 %	2,0 %
48h	2,3 %	2,2 %	2,6 %
72h	2,4 %	2,7 %	11,3 %

Tabelle 6: prozentualer Anteil apoptotischer Zellen der Linie HL60 (n=3)

Auch die Zelllinie HL60 zeigt nach einer Expositionsdauer von 72 h unter 1% O₂ eine signifikante Apoptoseinduktion (Anstieg apoptotischer Zellen um das 4,7 fache, $p < 0,05$, Tabelle 6).

3.3 Verminderung der Proliferation unter physiologischer Hypoxie

Im nächsten Schritt wurden die Effekte des reduzierten Sauerstoffpartialdrucks auf die Proliferationsrate mittels BrdU-Assays untersucht. Aufgrund der deutlichen Unterschiede im Wachstumsverhalten und der geringen Apoptoseinduktion durch Hypoxie wurden für diese Experimente die Zelllinie KG1a gewählt.

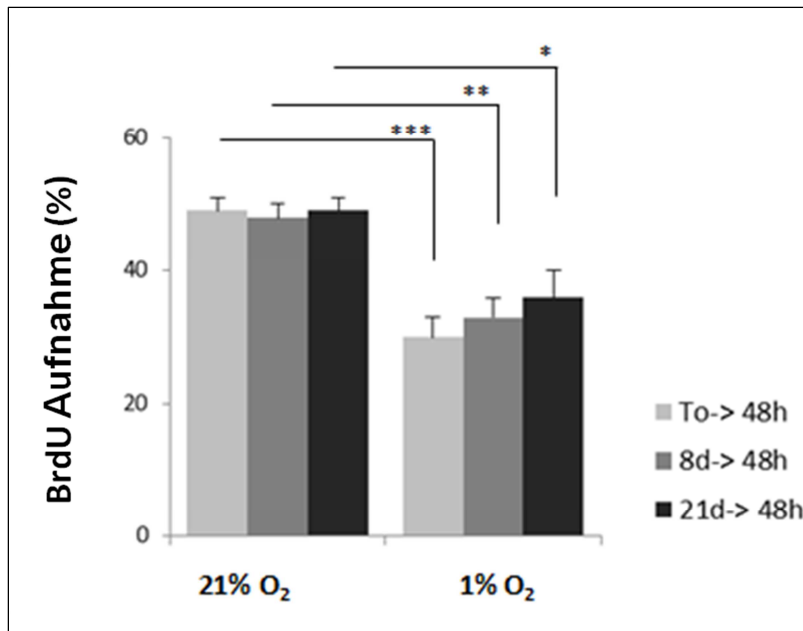


Abbildung 5: sauerstoffabhängige BrdU Aufnahme in der Zelllinie KG1a (n=3)

Bereits nach 48 h ließ sich eine signifikante Abnahme von BrdU positiven Zellen (49,3% vs. 30,3%, $p < 0,001$) unter physiologischer Hypoxie beobachten (Abbildung 5). Anschließend wurden Zellen parallel über einen Zeitraum von 8 und 21 Tagen unter 21% und 1% O₂ kultiviert und die BrdU Aufnahme nach 48 Stunden gemessen. Der Effekt der geringeren Proliferation war auch in diesem experimentellen Aufbau konstant (nach 8 Tagen 47,5% vs. 35,0%, $p < 0,01$ und nach 21 Tagen 49,4% vs. 38,1% $p < 0,05$), so dass vermutet werden kann, dass die Reduktion der Proliferation keine Akut- oder Stressreaktion der AML-Blasten auf ein geändertes Sauerstoffmilieu darstellt.

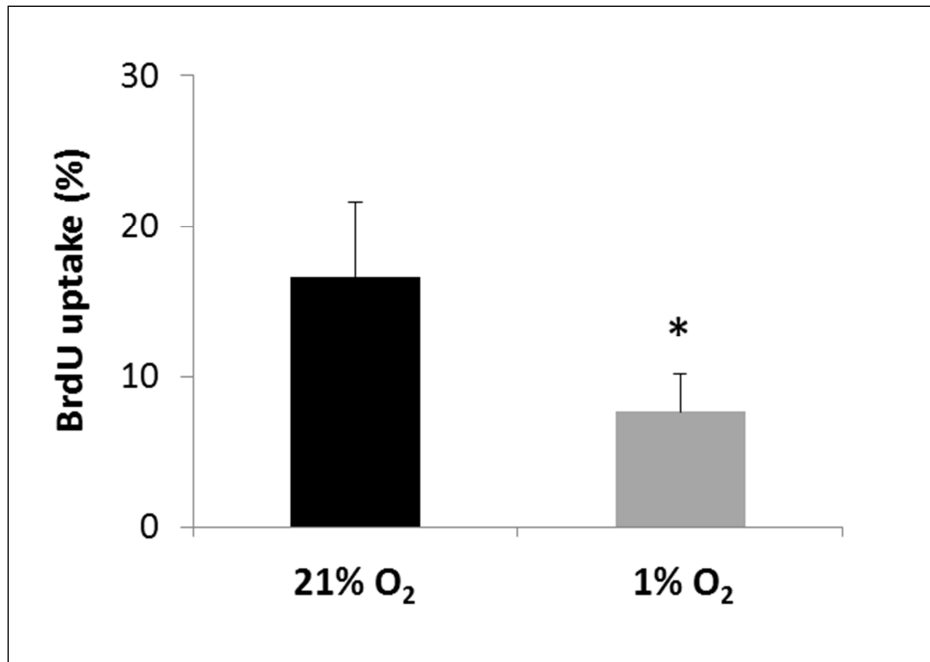


Abbildung 6: BrdU Aufnahme in primären AML-Proben (n=9)

Dieser Effekt konnte nicht nur in Zelllinien gezeigt werden, sondern wurde auch in primären AML-Zellen (n=9) beobachtet. Diese wurden für 24 Stunden unter 21% und 1% O₂ kultiviert. Hier zeigte sich im Median ein signifikanter Unterschied in der BrdU Aufnahme: während unter 21% O₂ 16,6% der Zellen BrdU positiv waren, waren dies nur 7,7% der Zellen unter Hypoxie (p<0,05, Abbildung 6).

3.4 Quantifizierung der Zellzyklusphasen

Konsequenterweise wurde als nächstes untersucht, in welcher Phase des Zellzyklus die Hypoxie eingreift. Dazu wurden Zellzyklusanalysen mit PI an der AML Zelllinie KG1a durchgeführt.

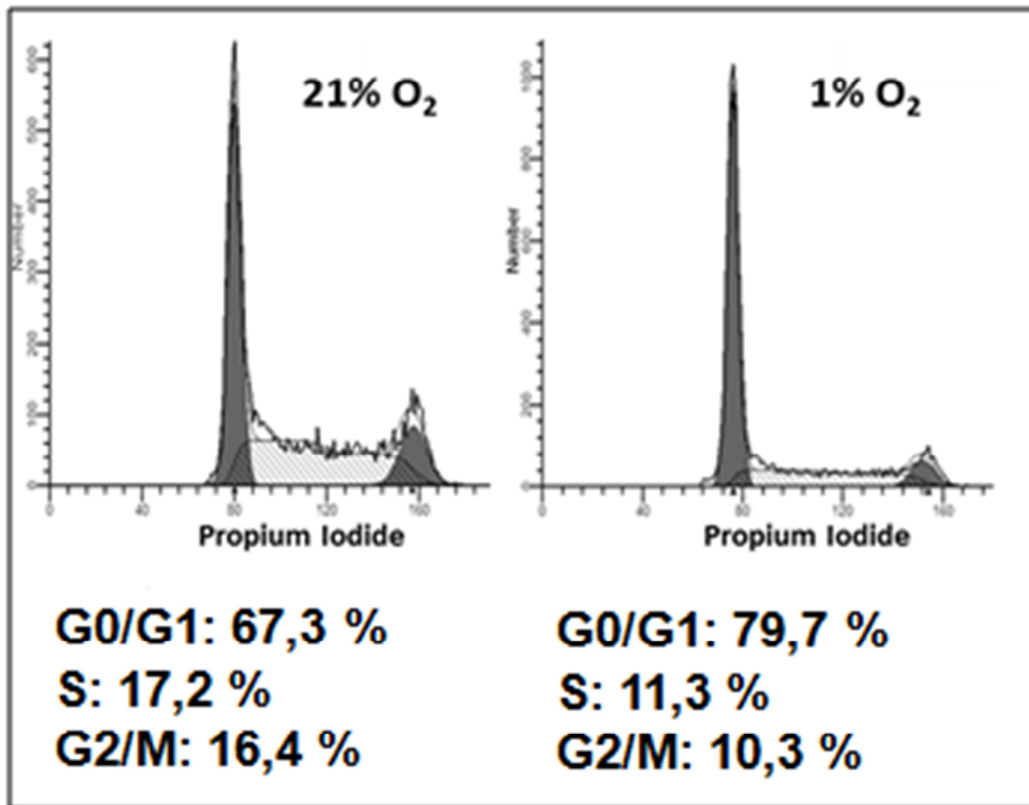


Abbildung 7: Verteilung der Zellzyklusphasen nach 48 h (repräsentatives Experiment)

Im Mittelwert (von 3 Versuchen) kam es bei Zellen, die in 1% O₂ inkubiert wurden, zu einer signifikanten Zunahme der G1-Phase auf 71,7% gegenüber 54,0 % unter 21% O₂ (p<0,01) sowie zu einer Abnahme der S-Phase (25,7% vs. 17,3%, p<0,05; Abbildung 7 zeigt ein repräsentatives Experiment). Unter 6% O₂ wurden keine signifikanten Zellzyklusveränderungen beobachtet.

3.5 Einfluss von Hypoxie auf die Expression des zellzyklusregulatorischen Proteins p27

Nachdem diese Daten eine verminderte Proliferation sowie eine Abnahme der S-Phase von AML Blasten unter einem reduzierten Sauerstoffpartialdruck zeigten, sollte nun der verantwortliche molekulare Mechanismus weiter untersucht werden. Der Zellzyklus wird durch ein komplexes Netzwerk regulatorischer Proteine gesteuert: entscheidend für die Progression des Zellzyklus von der G0 in die G1 Phase ist das Protein p27. Durch die Bindung mit p27 werden Cyclin-abhängige Kinasen inaktiviert und die Zelle verbleibt in der G0/G1 Phase. Daher wurde die Expression von p27 unter 1% O₂ mittels Western blot zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt.

Bereits nach 24 Stunden Exposition gegenüber 1% O₂ zeigte sich eine deutliche Induktion von p27, die nach 48 Stunden ein Maximum erreicht, welches dann über 96 Stunden stabil aufrechterhalten wurde (Abbildung 8).

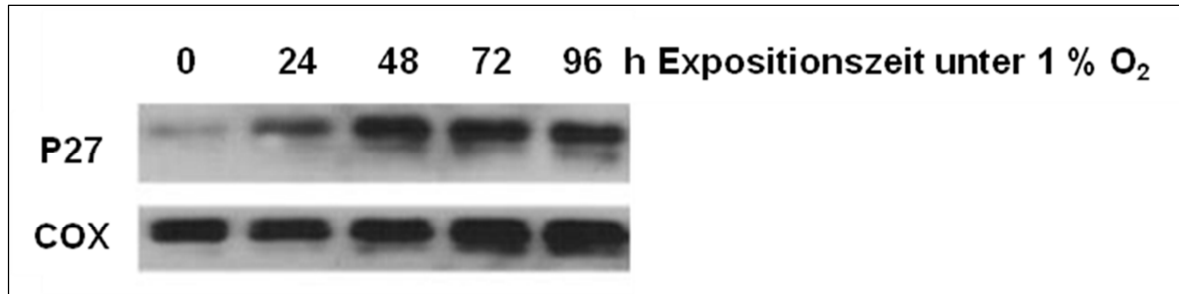


Abbildung 8: Induktion von p27 unter Hypoxie

3.6 Konsequenzen von Hypoxie auf die antileukämische Effektivität von Cytarabin auf AML Blasten

Als nächstes sollte nun geklärt werden, ob die beobachtete Veränderung des Proliferationsverhaltens einen Einfluss auf die antileukämische Wirksamkeit des Zytostatikums AraC hat, die von der in S-Phase befindlichen Zellzahl abhängig ist.

KG1-a		
	21 % O ₂	1 % O ₂
Medium	1,5 %	2,2 %
1 µg AraC/ml	23,5 %	8,0 %
10 µg AraC/ml	25,8 %	11,4 %

Tabelle 7: Apoptoseinduktion der Zelllinie KG1a unter AraC-Exposition (n=3)

Erwartungsgemäß zeigt die Zelllinie KG1a in der Kontrollgruppe keine Viabilitätsunterschiede ($p=0,116$) zwischen 21% und 1% O₂.

Eine signifikante Abnahme der Sensitivität gegenüber AraC zeigt sich jedoch bereits unter einer Konzentration von 1 µg/ml AraC (23,5% vs. 8,0% $p<0,01$, Tabelle 7).

NB4		
	21 % O ₂	1 % O ₂
Medium	11,9 %	30,4 %
1 µg AraC/ml	76,7 %	82,6 %
10 µg AraC/ml	91,9 %	91,2 %

Tabelle 8: Apoptoseinduktion der Zelllinie NB4 unter Arac-Exposition (n=3)

Die Zelllinie NB4 zeigt in der unbehandelten Kontrollgruppe bereits unter 1% O₂ eine signifikante Spontanapoptose. Unter Hypoxie und 1 µg AraC tritt eine Steigerung der Apoptoserate um das 2,6 fache auf (30,4% vs. 82,6%, $p<0,01$). Unter 21% O₂ und 10 µg

AraC waren 91,9% der Zellen apoptotisch. Unter hypoxischen Bedingungen sind 91,2% der Zellen ebenfalls apoptotisch und somit nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 8).

HL60		
	21 % O ₂	1 % O ₂
Medium	2,2 %	9,0 %
1 µg AraC/ml	20,5 %	25,5 %
10 µg AraC/ml	22,4 %	28,5 %

Tabelle 9: Apoptoseinduktion der Zelllinie HL60 unter AraC-Exposition (n=3)

Die Zelllinie HL60 ähnelt in ihrem Apoptoseverhalten der NB4. Unbehandelt zeigen HL60 Zelle unter 1% O₂ eine signifikante Apoptoseinduktion von 9% (p<0,05). Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Menge der Annexin-positiven Zellen nach AraC Behandlung, weder unter Exposition gegenüber 1 µm/ml AraC (p=0,610), noch unter 10 µm/ml AraC (p=0,319, Tabelle 9).

Im nächsten Schritt wurden potentielle weitere Mechanismen, welche für die reduzierte Chemosensitivität der AML-Blasten der Zelllinie KG1a unter physiologischer Hypoxie verantwortlich sein könnten, überprüft. Der Schwerpunkt lag auf Apoptose-inhibierenden Proteinen sowie auf pro-survival Pathways.

In der KG1a Zelllinie fand sich eine Induktion des antiapoptotischen Proteins XIAP, und zwar bereits nach 4 Stunden Hypoxie, und eine erhöhte Expression ließ sich bis 48 Stunden unter 1% O₂ nachweisen (Ende der Beobachtung).

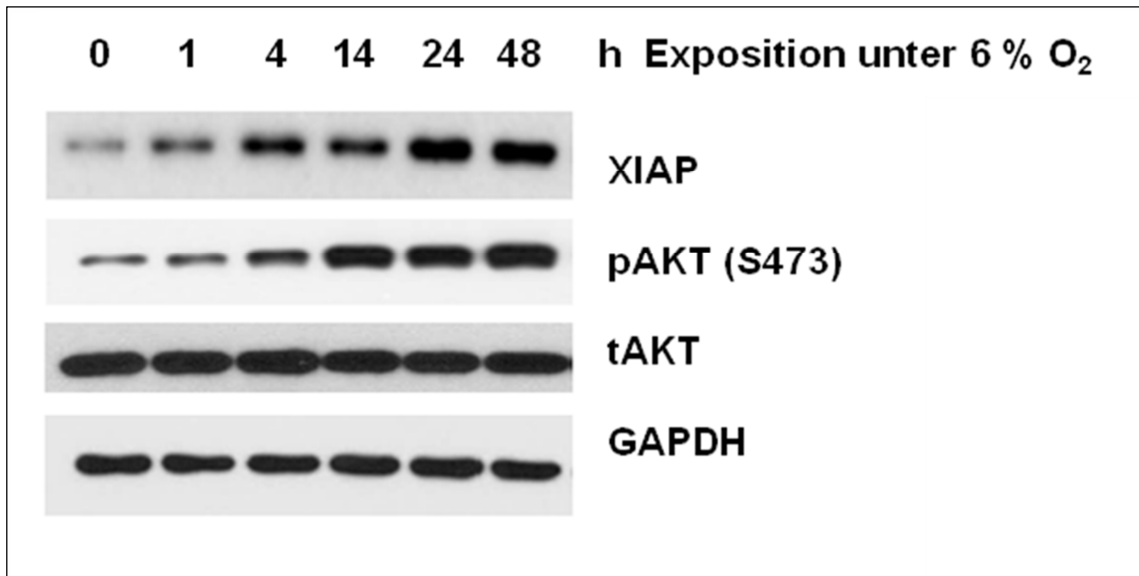


Abbildung 9: Induktion antiapoptotischer Proteine

Zusätzlich wurde eine Aktivierung der PI3K Signalkaskade beobachtet: es fand sich eine vermehrte Phosphorylierung von AKT (an S473) bei gleichbleibender Gesamtmenge von AKT (tAKT). Auch diese konnte bereits nach 4 Stunden unter Hypoxie festgestellt werden und war bis zum Endpunkt von 48 h nachweisbar (Abbildung 9).

3.7 Inhibierung des PI3K-Pathway

Die beobachtete Aktivierung der PI3K/AKT Signalkaskade stellt eine Möglichkeit dar, durch die leukämische Blasten unter Hypoxie weniger chemosensibel werden. Es sollte daher untersucht werden, ob dieses Phänomen durch eine PI3K Inhibition umkehrbar ist. Dazu wurde der PI3K Inhibitor LY294002 (10 μ M) verwendet.

Während LY294002 alleine keinerlei Apoptoseinduktion induzierte, konnte durch die Kombination von LY294002 mit 4 μ M Cytarabin der Anteil apoptotischer Zellen unter Normoxie signifikant erhöht werden (von 35,8% auf 48,0%, $p < 0,05$), dies entspricht einer Sensitivierung von KG1a gegenüber AraC.

KG1a		
	21 % O₂	1 % O₂
Medium	5,5 %	3,6 %
LY294002	7,3 %	4,5 %
AraC	35,8 %	26,3 %
Arac+LY294002	48 %	44,2 %

Tabelle 10: PI3K-Inhibition relative Werte (n=3)

Interessanterweise ließ sich dieser Effekt auch unter Hypoxie beobachten: durch Zugabe von LY2942002 zu AraC kam es zu einer Steigerung des Anteils apoptotischer Zellen von (26,3% auf 44,2%., $p < 0,05$). Dieser unterschied sich damit nicht mehr signifikant von dem Wert unter Normoxie (Tabelle 10).

4 Diskussion

Die AML ist eine seltene maligne Erkrankung hämatopoetischer Vorläuferzellen, bei der es aufgrund genetischer Mutationen zur unkontrollierten Proliferation, gestörten Differenzierung und fehlender Apoptose kommt. Diese Proliferation des Klon im Knochenmark führt zu einer Verdrängung der normalen Hämatopoese und damit zur hämatologischen Insuffizienz. Daneben gibt es aber noch andere Faktoren, die an der Entstehung der AML beteiligt sind. So ist das Microenvironment eine relevante Komponente des Knochenmarks, die eine wichtige Rolle in der (Patho-)physiologie der gesunden und der malignen Hämatopoese spielt. Das Microenvironment besteht aus zellulären und nicht zellulären Komponenten. Zu den relativ gut verstandenen zellulären Komponenten zählen die Endothelzellen, Osteoklasten, Osteozyten, Adipozyten und mesenchymale Stromazellen [41]. Zu den nicht zellulären Komponenten gehören u. a. der pH-Wert und der Sauerstoffpartialdruck. Die Auswirkung des Sauerstoffpartialdruck auf das Proliferationsverhalten, die Apoptose und die Proteinexpression bei der AML ist Gegenstand dieser Arbeit.

Im gesunden Knochenmark herrschen hypoxische Bedingungen mit einem Gradienten von ca. 6% O₂ nahe den Blutgefäßen bis unter 1% O₂ in der Peripherie vor [42, 43]. Mit der Entfernung von den sauerstoffreicheren Blutgefäßen nimmt der pO₂ ab, bis hin zu Arealen mit einem Sauerstoffgehalt von unter 1% O₂; dieses Milieu entspricht der physiologischen hämatopoetischen Stammzellnische [43-48]. In einer direkten Messung im lebenden Mausmodell konnte ein Wert von 1,3% O₂ in der hämatopoetischen Stammzellnische ermittelt werden [49]. Dieses Nebeneinander von unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen ist beim gesunden Knochenmark normal und ist so ebenfalls im Knochenmark von Patienten mit AML nachweisbar [2]. Interessanterweise treten aber unter chemotherapeutischer Therapie oder Strahlentherapie Veränderungen der O₂ Werte im Knochenmark auf:

Es zeigten sich höhere O₂ Werte bei chemotherapeutisch behandeltem oder bestrahltem Knochenmark [49]. In dieser Arbeit wurden sowohl intravaskuläre als auch extravaskuläre pO₂-Werte ermittelt. Bei einer subletalen Bestrahlung (4,5 Gy) war die intravaskuläre Sauerstoffkonzentration unverändert 2,6% O₂, wohingegen der Gradient zwischen intravaskulärem und extravaskulärem Sauerstoffkonzentration verschwand und die extravaskuläre Sauerstoffkonzentration auf dasselbe Niveau wie der

intravaskuläre Sauerstoffkonzentration anstieg. Bei einer Bestrahlung mit 9,5 Gy in Kombination mit Busulfan konnten ausgedehnte Gefäßschäden festgestellt werden, eine Abgrenzung zwischen intravaskulärem und extravaskulärem Raum war nicht mehr möglich.

Während somit zwar im Knochenmark ein zum restlichen Organismus reduzierter pO_2 nachgewiesen werden konnte, ist dies nicht zwangsläufig hypoxisch, sondern eher als physiologisch anzusehen und es werden seitens des betroffenen Gewebes keinerlei Maßnahmen unternommen, um diesen Zustand zu ändern. Hypoxie hingegen, also die Verminderung des pO_2 unter den vom Gewebe benötigten Wert, ist ein Stressor, der durch verschiedene Maßnahmen beseitigt werden soll: *Hypoxia-inducible Factor* ist einer der wichtigsten durch Hypoxie induzierten Regulationsmechanismen. Es handelt sich hier um einen heterodimeren Komplex, der aus HiF1 α , HiF2 α und HiF3 α besteht [50, 51]. Während HiF1 α als Indikator für das Vorliegen von akuter Hypoxie gilt, liegt HiF2 α eher bei chronischer Hypoxie vor [52, 53]. Liegt akute Hypoxie vor, kommt es zur Hemmung der Hydroxylase (ein Enzym, welches die Integration einer Hydroxygruppe in ein Molekül bewirkt), da sie Sauerstoff als Co-Substrat benötigt. HiF1 α ist nun in der Lage, vom Zytoplasma in den Zellkern zu translozieren und dort als Transkriptionsfaktor für die Expression u.a. von VEGF zu wirken. VEGF wiederum ist für die Bildung neuer Blutgefäße essentiell. Dies bedeutet, dass HiF1 α und VEGF als indirekte Indikatoren für das Vorliegen von akuter Hypoxie angesehen werden können.

Im Zellmodell konnte jedoch auch gezeigt werden, dass HiF1 α ein wichtiger Regulator für den Zellzyklusarrest darstellt, da es unter hypoxischen Bedingungen zur Erhöhung der cyclinabhängigen Kinasen p21 und p27 führt [54] (auf den Stellenwert von p27 wird im weiteren Verlauf noch eingegangen).

In soliden Tumoren werden erhöhte HiF1 α Werte als prognostisch ungünstig gewertet [55-66]. Eine Überexpression korreliert mit Tumorwachstum und Therapieresistenz, was wiederum für Tumorrezidive verantwortlich sein kann [67]. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass im Knochenmark von Patienten mit AML keine signifikanten Unterschiede zwischen der Expression von HiF1 α und VEGF im Vergleich zum gesunden Knochenmark bestehen [38]. Tendenziell, jedoch nicht signifikant unterschiedlich, wiesen gesunden Knochenmarksproben eine etwas erhöhte HiF1 α Expression auf, was vermutlich aber auf die Tatsache beruht, dass reifere Zellen konstitutionell mehr HiF1 α exprimieren als unreife AML Blasten [38]. Andererseits ging

eine Erhöhung von HiF1 α in AML-Blasten mit normalem Karyotyp mit einer besseren Prognose einher [68]. Unklar bleibt hier aber, ob dies tatsächlich vermehrte Hypoxie widerspiegelt, oder aber einen Surrogatmarker für Mutationen, welche die Proteinexpression von HiF1 α beeinflussen, darstellt [39]; schließlich kann die Expression von HiF1 α auch durch Tumorsuppressorgene beeinflusst werden. So führt p53 [69, 70] oder GSK3 zu einer Supprimierung [71], während die Onkogene PI3K/AKT [71, 72] oder mTORC1 [73] zu einer Hochregulation von HiF1 α führen. FLT3-ITD vermag ebenso Einfluss auf die Translation von HiF1 α über die PI3K/AKT Signalkaskade zu nehmen [51].

Dies bedeutet, dass HiF1 α nicht ausschließlich als ein Indikator für das Vorliegen von Hypoxie gewertet werden kann, da HiF1 α von Tumorsuppressorgenen, Onkogenen und von FLT3-ITD in seiner Expression beeinflusst werden kann.

Auch wenn eine generelle bzw. ausgeprägtere Hypoxie bei der AML (im Vergleich zum gesunden Knochenmark) nicht gefunden werden kann, so sind doch Konsequenzen eines erniedrigten pO₂ bei der AML zu verzeichnen: u. a. induzieren diese unter einer Sauerstoffkonzentration von 6% O₂ die Expression des Oberflächenmarkers CXCR4 [42].

CXCR4 zählt zu der Familie der Chemokinrezeptoren und wird von vielen Zellen des blutbildenden Systems exprimiert, unter anderem von hämatopoetischen Stammzellen. CXCR4 ist der Rezeptor des Liganden CXCL12, welcher unter anderem von Knochenmarkstromazellen exprimiert wird. CXCR4-exprimierende Zellen wandern entlang eines CXCL12 Gradienten, was relevant für das *homing* hämatopoetischer Zellen ist [74]. Bei der AML besitzt CXCR4 eine prognostische Bedeutung, da eine erhöhte CXCR4 Expression mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet ist [2, 42], während eine niedrige CXCR4 Expression mit einem längeren *overall survival* und einer geringeren Rezidivrate bei Patienten mit AML oder MDS assoziiert ist [75].

CXCR4 scheint aber auch in soliden Tumoren von Bedeutung zu sein, da beispielsweise beim Prostatakarzinom oder dem Mammakarzinom die CXCR4 Expression an der Metastasierung und Progression der Erkrankung beteiligt zu sein scheint [76, 77].

Aber auch die Expression von FLT3 wird durch das Sauerstoffmilieu im Knochenmark beeinflusst. Bei einer Sauerstoffkonzentration von 1% O₂ tritt eine vom Mutationsstatus unabhängige Herunterregulierung dieses Proteins auf [78]. FLT3 ist ein Oberflächenrezeptor mit intrazellulärer Tyrosinkinaseaktivität und ein entscheidender Faktor für die Proliferation und Differenzierung myeloischer Zellen [79]. FLT3 kann aber

auch bei der AML mutiert vorliegen. Die häufigste FLT3 Mutation ist die FLT3 internal tandem duplication (ITD), welche in ca. 15-30% der AML auftritt und mit einer ungünstigen Prognose vergesellschaftet ist [80]. Liegt eine solche FLT3 ITD vor, führt dies zu einer konstitutiven, d.h. Liganden-unabhängigen Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade, wie STAT5, RAS/AKT und MAPK [81-83].

Es wurden daher verschiedene Tyrosinkinaseinhibitoren hinsichtlich ihrer antileukämischen Effektivität untersucht. So wurde beispielsweise gezeigt, dass Midostaurin in Kombination mit Chemotherapie in einer großen Phase-III-Studie bei 717 Patienten mit neu diagnostizierter AML und aktivierenden FLT3-Mutation zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens nach 4 Jahren von 44,3 % auf 51,4 % führte [84]. Trotzdem sind diese Daten eher als ernüchternd zu bewerten, möglicherweise kann dies an der beobachteten veränderten Biologie des FLT3-Rezeptors unter hypoxischen Bedingungen liegen.

Diese Daten belegen bereits die Relevanz des reduzierten Sauerstoffpartialdruckes auf die maligne und physiologische hämatopoetische Stammzellnische. Der Einfluss des reduzierten Sauerstoffpartialdruckes auf AML Blasten geht jedoch noch weiter, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen.

Es konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten AML Zellkulturen unter einem reduzierten Sauerstoffpartialdruck eine deutlich reduzierte Zellzahl aufwiesen, jedoch war die Ursache dafür unterschiedlich: während die Zelllinien NB4 und HL60 eine signifikante Apoptoseinduktion aufwiesen, war dies bei der Zelllinie KG1a nicht zu beobachten.

Die Apoptoseinduktion unter Hypoxie bei den Zelllinien NB4 und HL60 könnte evtl. Folge einer Affektion des p53 Stoffwechsels sein (HL60 sind p53 defizient und NB4 weisen eine p53 Mutation auf), da der Verlust von p53 dazu führt, dass Zellen unter dem Einfluß von Hypoxie nicht mehr in der Lage sind, den durch HiF1 α vermittelten Zellzyklusarrest zu induzieren [85] und daher stattdessen in Apoptose gehen. Da es sich hierbei dann aber evtl. um eine zelllinienspezifische Stressreaktion handelt und nicht um einen eher generellen Mechanismus, wurde der weitere Schwerpunkt auf das geänderte Proliferationsverhalten gelegt.

Hier zeigte sich bei der Zelllinie KG1a ebenso eine deutliche Abnahme der Zellzahl, dies beruhte jedoch auf einer signifikanten Abnahme der proliferierenden Zellen im BrdU-Assay unter hypoxischen Bedingungen. Diese letzteren Ergebnisse konnten in primären

AML Zellen bestätigt werden, was impliziert, dass dieser Mechanismus – und nicht die Apoptoseinduktion – eher den tatsächlichen Gegebenheiten im Knochenmark bei der AML entspricht.

Als mögliche Ursache der verminderten Proliferation unter Hypoxie fand sich ein Zellzyklusarrest in der G₀/G₁ Phase mit Abnahme der S-Phase. Eine mögliche Ursache dieses G₀/G₁ Phase Arrests könnte in der beobachteten Zunahme des Proteins p27 in den hypoxischen Zellen liegen.

Die Übergänge des Zellzyklus werden durch Cdk-Komplexe reguliert. Cdk-Inhibitorische Proteine können, indem sie an den CDK-Komplex binden, diese inaktivieren und den Zellzyklusprogress somit verhindern. Für den Übergang von der G₁-Phase in die S-Phase nimmt das Protein p27 eine Schlüsselrolle ein, da es an Cyclin D oder auch Cdk4 bindet und deren katalytische Aktivität (Phosphorylierung von pRb) inhibiert. Erhöhte p27 Konzentrationen führen somit zu einem Zellzyklusarrest, und in bisher publizierten Experimenten (Primärzellen) wurde gezeigt, dass die Induktion von p27 für einen Hypoxie vermittelten Zellzyklusarrests verantwortlich sein könnte. Interessanterweise war die Induktion von p27 dabei in der Arbeit von Goda et al. abhängig [85], in der Arbeit von Gardner et al. wiederum unabhängig von einer HIF1 α Aktivierung [86]. Ob und inwieweit HIF α an der p27 Induktion bei der AML involviert ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Diese Beobachtung der reduzierten Proliferation von AML Blasten unter Hypoxie ist deswegen von Interesse, weil ein wesentlicher Bestandteil der Chemotherapie in der Behandlung der AML das Nukleosid Cytarabin ist. Zur Aktivierung wird Cytarabin nach intrazellulärer Aufnahme dreifach phosphoryliert und dadurch in Cytosinarabinosidtriphosphat (AraCTP) umgewandelt, die eigentlich aktive Form. Dann wird es als Antimetabolit in die neu synthetisierte DNA während der S-Phase eingebaut und führt dabei zu Strangabbrüchen und zur Blockierung von Reparaturmechanismen und somit schlussendlich zum Absterben der Zelle. Der antileukämische Effekt von Cytarabin korreliert somit mit der Inkorporation von AraCTP in die DNA und somit mit der S-Phase [87].

Wenn sich nun unter 1% O₂ weniger Zellen in der S-Phase befinden, synthetisieren weniger Zellen DNA; da nur diese Zellen in der S-Phase vulnerabel gegenüber Cytarabin sind, nicht hingegen Zellen in der G₀/G₁ Phase, sinkt die antileukämische

Effektivität von Cytarabin. Dadurch könnten AML Blasten, die eigentlich sensibel gegenüber AraC wären, in tief hypoxischen Arealen des Knochenmarks eine (reversible, umgebungsgebundene) Resistenz gegenüber AraC entwickeln.

Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass die AML Zelllinie KG1a unter Hypoxie signifikant weniger sensibel gegenüber dem S-Phase spezifischen Zytostatikum AraC war (21% O₂ 24% vs. 1% O₂ 8% apoptotische Zellen, p<0,01).

Die verminderte Progression des Zellzyklus ist jedoch nicht der einzige Mechanismus, der die verminderte Chemoresistenz unter Hypoxie erklären könnte, da es in einer AML Zelllinie unter physiologischer Hypoxie zu einer Induktion des antiapoptotischen Proteins XIAP kommt. XIAP bindet die Caspasen 3, 7 und 9 und verhindert dadurch die Induktion der zellulären Apoptose. Hohe intrazelluläre Spiegel von XIAP schützen damit die Zelle vor Exekution der Apoptose und sind somit protektiv, und konsequenterweise weisen AML-Patienten mit einem günstigen Risikoprofil (und damit einer besseren Prognose) deutlich niedrigere Spiegel an XIAP auf als Patienten mit einem intermediären oder schlechten Risikoprofil [88].

Aktuelle Arbeiten konnten zeigen, dass XIAP auch Einfluss auf die Expression von HiF1 α nehmen kann. Es fungiert als Regulator der Lys63-linked Polyubiquitinierung und kann dadurch Einfluss auf die Expression von HiF1 α nehmen [89]. Neu an der hier gemachten Beobachtung ist aber, dass die Menge an XIAP offensichtlich nicht nur statisch vom Subtyp der AML abhängt, sondern auch von der Umgebung, in der sich die entsprechende Zelle aufhält.

Neben dem Zellzyklusarrest und der Induktion von XIAP konnte noch ein dritter Mechanismus identifiziert werden, durch den Blasten unter Hypoxie eine vermehrte Chemotherapieresistenz erreichen können: der Aktivierung der PI3K/AKT Signalkaskade (Abbildung 10). Dieser Signaltransduktionsweg ist entscheidend an Zellfunktionen, wie der Differenzierung, der Apoptose und der Zellzyklusprogression, beteiligt [90].

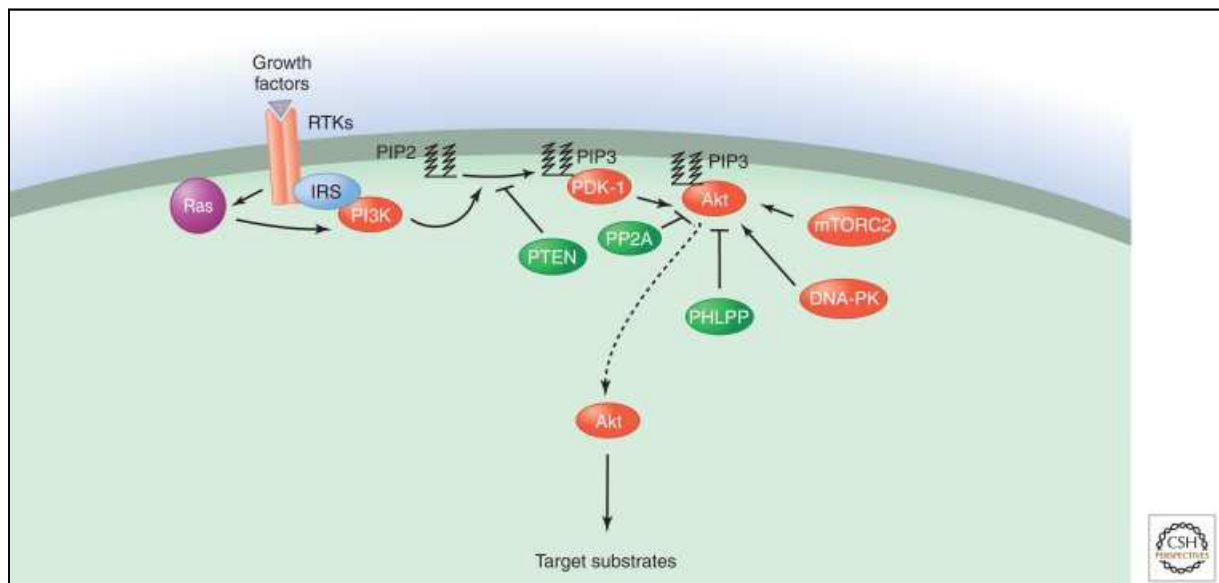


Abbildung 10: PI3K-PKB/Akt Pathway [91]

Bislang war bekannt, dass eine Aktivierung von PI3K/AKT über verschiedene Mechanismen erfolgen kann, wie einerseits die Aktivierung durch Onkogene wie FLT3-ITD, andererseits aber auch durch autokrine Wachstumsfaktoren wie VEGF. Eine konstitutionelle Aktivierung von PI3K/AKT findet man aber auch bei ca. 50-80% aller Patienten mit AML [92]; diese induziert die Proliferation und das Überleben der leukämischen Blasten. Hypoxie stellt nun einen weiteren Weg der Aktivierung neben den klassischen Aktivatoren und der konstitutionellen Aktivierung dar: unter physiologischer Hypoxie kommt es zu einer Aktivierung der MEK/Erk Signalkaskade. Diese ist jedoch nicht im gleichen Maße wie unter Normoxie von RAS/Raf1 abhängig. Letztlich ist die Aktivierung unter Hypoxie noch nicht endgültig geklärt, hier erscheint aber eine Beiteiligung von von *lipid rafts* möglich.[2].

Das aktivierte (phosphorylierte AKT) kann unter anderem auch via FOXO3a auf die Expression von p27 wirken und damit Einfluss auf den Zellzyklus nehmen [93, 94].

Aufgrund dieser Erkenntnisse ist von einer besonderen Bedeutung der PI3k/AKT Signalkaskade, hinsichtlich der Pro-Survival Wirkung unter physiologischer Hypoxie auszugehen

Daher wurde versucht, über die Blockade dieses Signalweges diesen protektiven Pro-Survival Effekt zu reduzieren und die AML-Blasten gegenüber AraC wieder zu

sensibilisieren. Es zeigte sich, dass der PI3K-Inhibitor LY294002 zwar selbst keinen Einfluss auf die Viabilität der AML-Blasten hatte. Interessanterweise konnte aber in der Kombination aus AraC und PI3K-Inhibitor eine Erhöhung der apoptotischen AML-Blasten unter Hypoxie beobachtet werden. Somit könnte die Hypoxie-induzierte Chemoresistenz in AML-Blasten überwunden und dadurch hypoxische Zellen wieder chemosensibel gemacht werden können. Während LY294002 nicht in vivo eingesetzt werden kann, stehen andere PI3K Inhibitoren zur Verfügung. Der PI3K Inhibitor Alpelisib wurde 2019 von der FDA in Kombination mit Fulvestrant zugelassen. Diese Kombination führt beim fortgeschrittenen Mammakarzinom im Vergleich zur alleinigen antihormonellen Behandlung zu einem signifikant verlängertem progressionsfreien Überleben [95]. Somit stehen bereits klinisch erprobte Inhibitoren zur Verfügung, die auch in der AML aufgrund der geschilderten Beobachtungen untersucht werden sollten.

Somit könnte ein besseres Verständnis des Microenvironments in der AML zur Entwicklung bzw. zum Einsatz zielgerichteter Substanzen für eine effektivere Behandlung der AML beitragen.

5 Zusammenfassung

Bei der AML handelt es sich um eine maligne Erkrankung, bei der es aufgrund genetischer Mutationen in myeloischen Vorläuferzellen zur unkontrollierten Proliferation, gestörter Differenzierung und fehlenden Apoptose kommt. Diese Proliferation des Klons resultiert in einer Verdrängung der normalen Hämatopoese und damit zur hämatologischen Insuffizienz. Die AML führt unbehandelt innerhalb weniger Monaten zum Tod. Mittels intensiver Behandlung kann zwar bei ca. 60-80% der Patienten initial eine CR erreicht werden, ca. die Hälfte dieser Patienten erleidet jedoch ein Rezidiv. Somit können nur ca. 30-40% aller Patienten mit AML dauerhaft geheilt werden.

Das Microenvironment im Knochenmark mit seinen verschiedenen Komponenten stellt eine Nische dar, welche AML-Blasten die Möglichkeit bieten könnte, eine sehr intensive Chemotherapie zu überdauern und letztlich zum Rezidiv zu führen. In dieser Arbeit wurde speziell auf die Hypoxie als Komponente des Microenvironments eingegangen.

Es zeigte sich in 3 AML Zelllinien (NB4, HL60 und KG1a) eine signifikante Abnahme der Zellzahl unter physiologischer Hypoxie. Während die Zelllinien NB4 und HL60 unter Hypoxie eine Apoptoseinduktion zeigten (21% O₂: 8,5%% vs. 1% O₂: 37,5%, p<0,01) war dies bei der KG1a Zelllinie nicht der Fall, hier zeigte sich im BrdU-Assays eine signifikante Abnahme proliferierender Zellen (nach 48 Stunden: 21% O₂ 49,3% vs. 1% O₂ 30,3% p<0,01), ein Effekt, der auch in hypoxischen Langzeitkulturen zu beobachten war. Ähnliche Ergebnisse ließen sich auch in primären AML-Zellen (n=10) erzielen mit einer signifikanten 2,1fachen Abnahme der Proliferation in Hypoxie (21% O₂ 16,6% vs. 1% O₂ 7,7%, p<0,05). Als mögliche Ursache der verminderten Proliferation unter Hypoxie fand sich ein Zellzyklusarrest in der G0/G1 Phase (21%: O₂ 54,0% vs. 71,7% unter 1% O₂, p<0,01) mit Abnahme der S-Phase (21% O₂ 26,7% vs. 1% O₂ 17,3% p<0,05), welcher durch eine Induktion des Zellzyklus-inhibitorischen Proteins p27 mit induziert wurde.

Als Konsequenz konnte gezeigt werden, dass die AML Zelllinie KG1a unter Hypoxie signifikant weniger sensibel gegenüber dem S-Phase spezifischen Zytostatikum AraC war (21% O₂ 23,5% vs. 1% O₂ 8,0% apoptotische Zellen, p<0,01).

Als weitere Ursache einer verminderten Chemosensibilität fand sich eine Induktion des antiapoptotischen Proteins XIAP, sowie eine Aktivierung der PI3K Signalkaskade.

Durch Inhibierung dieser Signalkaskade mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 konnte die Chemosensibilität gegenüber AraC unter Hypoxie wiederhergestellt werden (Steigerung des Anteils apoptotischer Zellen von 26,3% auf 44,2%, $p < 0,05$)

Zusammengefasst belegen diese Daten einen deutlichen Einfluss der Hypoxie auf AML Zellen. Es ließen sich verschiedene Mechanismen identifizieren, durch die Hypoxie die Chemosensibilität von AML Blasten reduziert. Verschiedene dieser Mechanismen, wie die PI3K Inhibition, könnten einen neuen Ansatz für die Behandlung der AML darstellen.

6 Lebenslauf

7 Publikationsliste

Physiological hypoxia prevents bile salt-induced apoptosis in human and rat hepatocytes.

Hohenester S, Vennegeerts T, Wagner M, Wimmer R, Drolle H, Rieger C, Denk GU, Rust C, Fiegl M.

Liver Int. 2014 Sep;34(8):1224-31. doi: 10.1111/liv.12368. Epub 2013 Nov 20.

The bone marrow microenvironment is a critical player in the NK cell response against acute myeloid leukaemia in vitro.

Vasold J, Wagner M, Drolle H, Deniffel C, Kütt A, Oostendorp R, Sironi S, Rieger C, Fiegl M.

Leuk Res. 2015 Feb;39(2):257-62. doi: 10.1016/j.leukres.2014.12.001. Epub 2014 Dec 9.

Hypoxia regulates proliferation of acute myeloid leukemia and sensitivity against chemotherapy.

Drolle H, Wagner M, Vasold J, Kütt A, Deniffel C, Sotlar K, Sironi S, Herold T, Rieger C, Fiegl M.

Leuk Res. 2015 Jul;39(7):779-85. doi: 10.1016/j.leukres.2015.04.019. Epub 2015 May 7.

Microenvironmental hypoxia regulates FLT3 expression and biology in AML.

Sironi S, Wagner M, Kuett A, Drolle H, Polzer H, Spiekermann K, Rieger C, Fiegl M.

Sci Rep. 2015 Nov 30;5:17550. doi: 10.1038/srep17550.

IL-8 as mediator in the microenvironment-leukaemia network in acute myeloid leukaemia.

Kuett A, Rieger C, Perathoner D, Herold T, Wagner M, Sironi S, Sotlar K, Horny HP, Deniffel C, Drolle H, Fiegl M.

Sci Rep. 2015 Dec 17;5:18411. doi: 10.1038/srep18411.

Favorable Outcome of Sequential HLA-Haploidentical Transplantation Using Ptcy As GvHD Prophylaxis in High Risk AML and MDS of the Elderly

Alessia Fraccaroli, Dusan Prevalsek, Sarah Elena Häbe, Veit Bücklein, Christoph Schulz, Heidrun Drolle, Susanne Fritsch, Georg Ledderose, Michael von Bergwelt, Wolfgang Hiddemann and Johanna Tischer

Blood 2018 132:3458; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-119103>

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Fiegl, der mir diese Arbeit überlassen hat und mir stets für Fragen und Diskussionen zur Verfügung stand. Seine konstruktiven Anregungen machten diese Arbeit erst möglich.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Michaela Wagner, die mit viel Enthusiasmus an der praktischen Umsetzung einen maßgeblichen Anteil trägt.

Meiner lieben Freundin Dana, danke ich für die wunderbaren gemeinsamen Jahre während dem Studium.

Meiner Mutter möchte ich unabhängig von dieser Arbeit für Ihre Liebe und Ihre Unterstützung die sie mir zeitlebens entgegenbringt danken.

Meinem Mann John gilt mein besonderer Dank weit über diese Arbeit hinaus, er hat vermutlich mehr über die AML erfahren, als er ursprünglich wollte. Ohne seine unermüdliche Unterstützung wäre mein Lebensweg so nicht möglich gewesen.

9 Eidesstattliche Erklärung

Drolle, Heidrun

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegend Dissertation mit dem Thema

Auswirkung der physiologischen Hypoxie, auf das Proliferations- und Apoptoseverhalten von Blasten der akuten myeloischen Leukämie

Selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 23.01.2020

Ort, Datum

Heidrun Drolle

10 Literaturverzeichnis

1. Southam, C.M., et al., *A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions*. *Cancer*, 1951. **4**(1): p. 39-59.
2. Fiegl, M., et al., *Physiological hypoxia promotes lipid raft and PI3K-dependent activation of MAPK 42/44 in leukemia cells*. *Leukemia*, 2010. **24**(7): p. 1364-7.
3. Tallman, M.S., D.G. Gilliland, and J.M. Rowe, *Drug therapy for acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2005. **106**(4): p. 1154-63.
4. *Leukämien in Deutsche 2012*. 2012.
5. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. *Blood*, 2016. **127**(20): p. 2391-405.
6. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group*. *Br J Haematol*, 1976. **33**(4): p. 451-8.
7. Sabattini, E., et al., *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview*. *Pathologica*, 2010. **102**(3): p. 83-7.
8. Vardiman, J.W., et al., *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes*. *Blood*, 2009. **114**(5): p. 937-51.
9. Allan, J.M. and L.B. Travis, *Mechanisms of therapy-related carcinogenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(12): p. 943-55.
10. Fircanis, S., et al., *The relation between cigarette smoking and risk of acute myeloid leukemia: an updated meta-analysis of epidemiological studies*. *Am J Hematol*, 2014. **89**(8): p. E125-32.
11. Serve, H., et al., *Sorafenib In Combination with Standard Induction and Consolidation Therapy In Elderly AML Patients: Results From a Randomized, Placebo-Controlled Phase II Trial*. *ASH Annual Meeting Abstracts*, 2010. **116**(21): p. 333-.
12. Li, L. and X.M. Sun, *[Research on molecular markers for epigenetic changes in myeloid malignancies]*. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2013. **30**(6): p. 687-92.
13. Lowenberg, B., J.R. Downing, and A. Burnett, *Acute myeloid leukemia*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(14): p. 1051-62.
14. Fritsch, S., et al., *[Diagnostics and therapy of acute myeloid leukemia]*. *Dtsch Med Wochenschr*, 2006. **131**(43): p. 2401-6.
15. Byrd, J.C., et al., *Extramedullary leukemia adversely affects hematologic complete remission rate and overall survival in patients with t(8;21)(q22;q22): results from Cancer and Leukemia Group B 8461*. *J Clin Oncol*, 1997. **15**(2): p. 466-75.
16. Blum, W. and P. Porcu, *Therapeutic apheresis in hyperleukocytosis and hyperviscosity syndrome*. *Semin Thromb Hemost*, 2007. **33**(4): p. 350-4.
17. Braess, J., et al., *Proliferative activity of leukaemic blasts and cytosine arabinoside pharmacodynamics are associated with cytogenetically defined prognostic subgroups in acute myeloid leukaemia*. *Br J Haematol*, 2001. **113**(4): p. 975-82.
18. Shah, A., et al., *Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: a population-based study*. *Br J Haematol*, 2013. **162**(4): p. 509-16.
19. Heidrich, K., et al., *Allogeneic hematopoietic cell transplantation in intermediate risk acute myeloid leukemia negative for FLT3-ITD, NPM1- or biallelic CEBPA mutations*. *Ann Oncol*, 2017. **28**(11): p. 2793-2798.
20. Stelljes, M., et al., *Allogeneic transplantation versus chemotherapy as postremission therapy for acute myeloid leukemia: a prospective matched pairs analysis*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(4): p. 288-96.

21. Kern, W., et al., *Early blast clearance by remission induction therapy is a major independent prognostic factor for both achievement of complete remission and long-term outcome in acute myeloid leukemia: data from the German AML Cooperative Group (AMLCG) 1992 Trial*. Blood, 2003. **101**(1): p. 64-70.
22. Thein, M.S., et al., *Outcome of older patients with acute myeloid leukemia: an analysis of SEER data over 3 decades*. Cancer, 2013. **119**(15): p. 2720-7.
23. Juliusson, G., et al., *Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed*. Blood, 2012. **119**(17): p. 3890-9.
24. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel*. Blood, 2017. **129**(4): p. 424-447.
25. Pastore, F., et al., *Combined molecular and clinical prognostic index for relapse and survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia*. J Clin Oncol, 2014. **32**(15): p. 1586-94.
26. Buchner, T., et al., *Age-related risk profile and chemotherapy dose response in acute myeloid leukemia: a study by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group*. J Clin Oncol, 2009. **27**(1): p. 61-9.
27. Wahlin, A., et al., *Prognostic significance of risk group stratification in elderly patients with acute myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 2001. **115**(1): p. 25-33.
28. Wheatley, K., et al., *Prognostic factor analysis of the survival of elderly patients with AML in the MRC AML11 and LRF AML14 trials*. Br J Haematol, 2009. **145**(5): p. 598-605.
29. Farag, S.S., et al., *Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8461*. Blood, 2006. **108**(1): p. 63-73.
30. Blau, O., *Bone marrow stromal cells in the pathogenesis of acute myeloid leukemia*. Front Biosci (Landmark Ed), 2014. **19**: p. 171-80.
31. Samudio, I., et al., *Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction*. J Clin Invest, 2010. **120**(1): p. 142-56.
32. Konopleva, M., et al., *Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins*. Leukemia, 2002. **16**(9): p. 1713-24.
33. Cipolleschi, M.G., P. Dello Sbarba, and M. Olivotto, *The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells*. Blood, 1993. **82**(7): p. 2031-7.
34. Ivanovic, Z., *Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm*. J Cell Physiol, 2009. **219**(2): p. 271-5.
35. Yin, T. and L. Li, *The stem cell niches in bone*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1195-201.
36. Mohyeldin, A., T. Garzon-Muvdi, and A. Quinones-Hinojosa, *Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(2): p. 150-61.
37. Abdel-Wahab, O. and R.L. Levine, *Metabolism and the leukemic stem cell*. J Exp Med, 2010. **207**(4): p. 677-80.
38. Drolle, H., et al., *Hypoxia regulates proliferation of acute myeloid leukemia and sensitivity against chemotherapy*. Leuk Res, 2015. **39**(7): p. 779-85.
39. Fiegl, M. and K. Spiekermann, *Hypoxia and expression of hypoxia-related proteins in acute myeloid leukemia*. Leuk Res, 2011. **35**(5): p. 573-4.
40. Towatari, M., et al., *Constitutive activation of mitogen-activated protein kinase pathway in acute leukemia cells*. Leukemia, 1997. **11**(4): p. 479-84.
41. Krause, D.S. and D.T. Scadden, *A hostel for the hostile: the bone marrow niche in hematologic neoplasms*. Haematologica, 2015. **100**(11): p. 1376-87.
42. Fiegl, M., et al., *CXCR4 expression and biologic activity in acute myeloid leukemia are dependent on oxygen partial pressure*. Blood, 2009. **113**(7): p. 1504-12.

43. Harrison, J.S., et al., *Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers*. Blood, 2002. **99**(1): p. 394.
44. Suda, T., K. Takubo, and G.L. Semenza, *Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche*. Cell Stem Cell, 2011. **9**(4): p. 298-310.
45. Chow, D.C., et al., *Modeling pO_2 distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models*. Biophys J, 2001. **81**(2): p. 685-96.
46. Chow, D.C., et al., *Modeling pO_2 distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model*. Biophys J, 2001. **81**(2): p. 675-84.
47. Nombela-Arrieta, C., et al., *Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(5): p. 533-43.
48. Parmar, K., et al., *Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(13): p. 5431-6.
49. Spencer, J.A., et al., *Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals*. Nature, 2014. **508**(7495): p. 269-73.
50. Lee, K.E. and M.C. Simon, *From stem cells to cancer stem cells: HIF takes the stage*. Curr Opin Cell Biol, 2012. **24**(2): p. 232-5.
51. Peng, G. and Y. Liu, *Hypoxia-inducible factors in cancer stem cells and inflammation*. Trends Pharmacol Sci, 2015. **36**(6): p. 374-83.
52. Koh, M.Y. and G. Powis, *Passing the baton: the HIF switch*. Trends Biochem Sci, 2012. **37**(9): p. 364-72.
53. Holmquist-Mengelbier, L., et al., *Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype*. Cancer Cell, 2006. **10**(5): p. 413-23.
54. Goda, N. and M. Kanai, *Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism*. Int J Hematol, 2012. **95**(5): p. 457-63.
55. Bangoura, G., et al., *Prognostic significance of HIF-2alpha/EPAS1 expression in hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(23): p. 3176-82.
56. Giatromanolaki, A., et al., *Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival*. Br J Cancer, 2001. **85**(6): p. 881-90.
57. Birner, P., et al., *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer*. Cancer Res, 2000. **60**(17): p. 4693-6.
58. Hui, E.P., et al., *Coexpression of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha, carbonic anhydrase IX, and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma and relationship to survival*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(8): p. 2595-604.
59. Koukourakis, M.I., et al., *Hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha expression is independent of anemia in patients with stage I endometrial cancer*. Anticancer Res, 2002. **22**(6C): p. 4137-40.
60. Matsuyama, T., et al., *Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in esophageal squamous cell carcinoma*. Cancer Sci, 2005. **96**(3): p. 176-82.
61. Noguera, R., et al., *HIF-1alpha and HIF-2alpha are differentially regulated in vivo in neuroblastoma: high HIF-1alpha correlates negatively to advanced clinical stage and tumor vascularization*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(23): p. 7130-6.
62. Scrideli, C.A., et al., *Prognostic significance of co-overexpression of the EGFR/IGFBP-2/HIF-2A genes in astrocytomas*. J Neurooncol, 2007. **83**(3): p. 233-9.
63. Sivridis, E., et al., *Association of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha with activated angiogenic pathways and prognosis in patients with endometrial carcinoma*. Cancer, 2002. **95**(5): p. 1055-63.

64. Theodoropoulos, V.E., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 alpha expression correlates with angiogenesis and unfavorable prognosis in bladder cancer*. Eur Urol, 2004. **46**(2): p. 200-8.
65. Trastour, C., et al., *HIF-1alpha and CA IX staining in invasive breast carcinomas: prognosis and treatment outcome*. Int J Cancer, 2007. **120**(7): p. 1451-8.
66. Wu, X.H., C. Qian, and K. Yuan, *Correlations of hypoxia-inducible factor-1alpha/hypoxia-inducible factor-2alpha expression with angiogenesis factors expression and prognosis in non-small cell lung cancer*. Chin Med J (Engl), 2011. **124**(1): p. 11-8.
67. Mimeault, M. and S.K. Batra, *Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells*. J Cell Mol Med, 2013. **17**(1): p. 30-54.
68. Deeb, G., et al., *Hypoxia-inducible factor-1alpha protein expression is associated with poor survival in normal karyotype adult acute myeloid leukemia*. Leuk Res, 2011. **35**(5): p. 579-84.
69. Ravi, R., et al., *Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha*. Genes Dev, 2000. **14**(1): p. 34-44.
70. Yamakuchi, M., et al., *P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(14): p. 6334-9.
71. Mottet, D., et al., *Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta pathway in HepG2 cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 31277-85.
72. Zhang, Q., et al., *Hypoxia-induced HIF-1 alpha accumulation is augmented in a co-culture of keloid fibroblasts and human mast cells: involvement of ERK1/2 and PI-3K/Akt*. Exp Cell Res, 2006. **312**(2): p. 145-55.
73. Bernardi, R., et al., *PML inhibits HIF-1alpha translation and neoangiogenesis through repression of mTOR*. Nature, 2006. **442**(7104): p. 779-85.
74. Sison, E.A. and P. Brown, *The bone marrow microenvironment and leukemia: biology and therapeutic targeting*. Expert Rev Hematol, 2011. **4**(3): p. 271-83.
75. Spoo, A.C., et al., *CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia*. Blood, 2007. **109**(2): p. 786-91.
76. Nasser, M.W., et al., *Crosstalk between chemokine receptor CXCR4 and cannabinoid receptor CB2 in modulating breast cancer growth and invasion*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e23901.
77. Chetram, M.A., A.S. Don-Salu-Hewage, and C.V. Hinton, *ROS enhances CXCR4-mediated functions through inactivation of PTEN in prostate cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **410**(2): p. 195-200.
78. Sironi, S., et al., *Microenvironmental hypoxia regulates FLT3 expression and biology in AML*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 17550.
79. Reindl, C., et al., *Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3700-7.
80. Levis, M., *Midostaurin approved for FLT3-mutated AML*. Blood, 2017. **129**(26): p. 3403-3406.
81. Tse, K.F., G. Mukherjee, and D. Small, *Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation*. Leukemia, 2000. **14**(10): p. 1766-76.
82. Okamoto, M., et al., *Lyn is an important component of the signal transduction pathway specific to FLT3/ITD and can be a therapeutic target in the treatment of AML with FLT3/ITD*. Leukemia, 2007. **21**(3): p. 403-10.
83. Kiyoi, H., et al., *Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain*. Oncogene, 2002. **21**(16): p. 2555-63.

84. Stone, R.M., et al., *Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation*. N Engl J Med, 2017. **377**(5): p. 454-464.
85. Goda, N., et al., *Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(1): p. 359-69.
86. Gardner, L.B., et al., *Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 7919-26.
87. Braess, J., et al., *The pharmacodynamic basis for the increased antileukaemic efficacy of cytosine arabinoside-based treatment regimens in acute myeloid leukaemia with a high proliferative activity*. Br J Haematol, 2000. **110**(1): p. 170-9.
88. Tamm, I., et al., *XIAP expression correlates with monocytic differentiation in adult de novo AML: impact on prognosis*. Hematol J, 2004. **5**(6): p. 489-95.
89. Park, C.V., I.G. Ivanova, and N.S. Kenneth, *XIAP upregulates expression of HIF target genes by targeting HIF1alpha for Lys63-linked polyubiquitination*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(16): p. 9336-9347.
90. Polak, R. and M. Buitenhuis, *The PI3K/PKB signaling module as key regulator of hematopoiesis: implications for therapeutic strategies in leukemia*. Blood, 2012. **119**(4): p. 911-23.
91. Hemmings, B.A. and D.F. Restuccia, *The PI3K-PKB/Akt pathway*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(4).
92. Horne, G.A., R. Kinstrie, and M. Copland, *Novel drug therapies in myeloid leukemia*. Pharm Pat Anal, 2015. **4**(3): p. 187-205.
93. Nho, R.S. and P. Hergert, *FoxO3a and disease progression*. World J Biol Chem, 2014. **5**(3): p. 346-54.
94. Santamaria, C.M., et al., *High FOXO3a expression is associated with a poorer prognosis in AML with normal cytogenetics*. Leuk Res, 2009. **33**(12): p. 1706-9.
95. Markham, A., *Alpelisib: First Global Approval*. Drugs, 2019. **79**(11): p. 1249-1253.

11 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Inzidenz der AML (www.kompetenzzentrum-leukaemie.de).....	2
Abbildung 2: Aufnahme von AraC in Abhängigkeit von der Proliferation [17]	7
Abbildung 3: Überlebensrate zytogenetischer Risikogruppen [13].....	10
Abbildung 4: Wachstumskinetik für die Zelllinie KG1a, NB-4, HL60 (n=3)	27
Abbildung 5: sauerstoffabhängige BrdU Aufnahme in der Zelllinie KG1a (n=3)	31
Abbildung 6: BrdU Aufnahme in primären AML-Proben (n=9).....	32
Abbildung 7: Verteilung der Zellzyklusphasen nach 48 h (repräsentatives Experiment).....	33
Abbildung 8: Induktion von p27 unter Hypoxie	34
Abbildung 9: Induktion antiapoptotischer Proteine.....	37
Abbildung 11: PI3K-PKB/Akt Pathway [91]	45

12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der AML von 2016 [7]	3
Tabelle 3: molekular-zytogenetische Risikogruppen der AML gemäß der Klassifikation des European LeukemiaNet	9
Tabelle 4: verwendete AML-Zelllinien	20
Tabelle 5: prozentualer Anteil der apoptotischen Zellen der Linie KG1a (n=3).....	29
Tabelle 6: prozentualer Anteil der apoptotischen Zellen der Linie NB4 (n=3).....	29
Tabelle 7: prozentualer Anteil apoptotischer Zellen der Linie HL60 (n=3).....	30
Tabelle 8: Apoptoseinduktion der Zelllinie KG1a unter AraC-Exposition (n=3).....	35
Tabelle 9: Apoptoseinduktion der Zelllinie NB4 unter Arac-Exposition (n=3).....	35
Tabelle 10: Apoptoseinduktion der Zelllinie HL60 unter AraC-Exposition (n=3).....	36
Tabelle 11: PI3K-Inhibition relative Werte (n=3).....	38