

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. R. Haas

**Über die Auswirkungen von Valproinsäure auf  
Apoptose und Proliferation CD34-positiver MDS-  
Progenitorzellen in vitro**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Julia Herold  
2009

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Dekan Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Referent: Prof. Dr. Gattermann

Korreferent: Prof. Dr. MacKenzie

Für meine Eltern

<b>1</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
2.1	Myelodysplastische Syndrome (MDS)	2
2.1.1	Definition	2
2.1.2	Formen	2
2.1.3	Klassifikation	3
2.1.4	Häufigkeit	5
2.1.5	Diagnostik	5
2.1.6	Prognose	6
2.1.7	Therapie	8
2.2	Valproinsäure (VPA)	10
2.2.1	VPA in der Tumorthherapie	10
2.2.2	Chemischer Aufbau und pharmakologische Eigenschaften	11
2.2.3	VPA als HDAC-Inhibitor	13
2.2.4	VPA: präklinische Ergebnisse	14
2.2.5	VPA: klinische Ergebnisse	16
2.3	Stammzellen (SZ)	20
2.3.1	CD34-positive Stamm- und Progenitorzellen (PZ)	22
2.4	Apoptose	24
2.4.1	Mechanismen der Apoptose	25
2.4.2	Apoptose bei MDS	26
2.5	Fragestellungen	27

<b>3</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>28</b>
3.1	Materialien	28
3.1.1	Allgemeine Reagenzien, Materialien und Geräte	28
3.1.2	Medium	29
3.1.3	VPA	30
3.1.4	Stammzellgewinnung	30
3.1.4.1	Knochenmarkpunktion	30
3.1.4.2	Leukapherese	31
3.2	Methoden	32
3.2.1.1	Isolierung CD34-positiver hämatopoetischer Progenitorzellen aus Knochenmark (KM) - Punktaten	32
3.2.1.2	Isolierungen CD34-positiver PZ aus Leukapheresaten	33
3.2.2	Durchflusszytometrie	34
3.2.3	Allgemeine Zellkulturbedingungen	35
3.2.4	Bestimmung vitaler und toter Zellen mittels Zytometrie	35
3.2.5	Bestimmung der Apoptoserate	36
3.2.6	Bestimmung der Zellproliferation	37
3.2.7	Statistik	37
3.2.7.1	Normalverteilung	37
3.2.7.2	Apoptose- und Proliferationsrate	37
3.2.7.3	Signifikanz	38

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>39</b>
4.1	Normalverteilung aller Diagnosegruppen	39
4.1.1	Normalverteilung der Apoptoserate	40
4.1.2	Normalverteilung der Proliferationsrate	41
4.2	Apoptose: Vergleich aller Diagnosegruppen	42
4.3	Proliferation: Vergleich aller Diagnosegruppen	45
4.4	Signifikanz der Apoptose und Proliferation	47
4.4.1	Variable = VPA	47
4.4.2	Variable = Tag	47
4.5	Myelodysplastisches Syndrom (MDS)	48
4.5.1	FACS-Analyse MDS	48
4.5.2	Apoptose- und Proliferationsrate von MDS-PZ	49
4.5.3	Vergleich Hoch-Risiko MDS mit Niedrig-Risiko MDS	50
4.5.3.1	Apoptose	51
4.5.3.2	Proliferation	52
4.6	Leukapheresat	54
4.6.1	FACS-Analyse Leukapheresat	54
4.6.2	Apoptose- und Proliferationsrate bei Leukapherese-PZ	55
4.7	gesundes Knochenmark (KM)	57
4.7.1	FACS-Analyse gesundes KM	57
4.7.2	Apoptose- und Proliferationsrate von gesunden KM-PZ	58
4.8	Leukapheresat im Vergleich zu gesundem KM	60
4.8.1	Vergleich der Apoptoseraten	60
4.8.2	Vergleich der Proliferationsraten	62
4.9	Akute myeloische Leukämie (AML)	64
4.9.1	FACS-Analyse AML	64
4.9.2	Apoptose- und Proliferationsrate bei AML-PZ	65

<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>83</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>87</b>
<b>10</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>88</b>
<b>11</b>	<b>DANK</b>	<b>89</b>
<b>12</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>90</b>

# 1 ABSTRACT

## Über die Auswirkungen von Valproinsäure auf Apoptose und Proliferation CD34 - positiver MDS-Progenitorzellen in vitro

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind eine heterogene Gruppe erworbener Knochenmarkserkrankungen, die durch Reifungs- und Funktionsdefekte hämatopoetischer Zellen, ineffektive Hämatopoese und den möglichen Übergang in eine akute Leukämie gekennzeichnet sind. Ein wichtiger Pathomechanismus ist die Apoptose von hämatopoetischen Progenitorzellen als Folge eines klonalen Stammzelldefektes.

Außer der allogenen Stammzelltransplantation gibt es keine kurative Behandlung. Deshalb werden Medikamente benötigt, die zu einer Verbesserung der Knochenmarksfunktion führen. Valproinsäure (VPA) wird seit mehr als zwei Jahrzehnten erfolgreich und ohne schwerwiegende Nebenwirkungen vor allem in der Therapie von generalisierten und partiellen Krampfanfällen eingesetzt. Erst seit kurzem ist bekannt, dass VPA auch als Inhibitor von Histon-Deacetylasen wirkt und so Genregulation beeinflussen und Tumorsuppressorgene reaktivieren kann. In therapeutischen Konzentrationen induziert VPA in vitro die Differenzierung und/oder Apoptose von Karzinomzellen, transformierten hämatopoetischen Progenitorzellen sowie leukämischen Blasten von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML). In klinischen Studien wurde belegt, dass VPA vor allem bei Niedrigrisiko-MDS (NR-MDS) Erfolge erzielte.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Apoptose und Proliferation von CD34-positiven Progenitorzellen (PZ) des Knochenmarks (KM) von MDS-Patienten – unterteilt in Subgruppen mit verschiedenen hohen Blastenteilen im KM – unter Einfluss von VPA in vitro untersucht. Es wird dargestellt, wie gesunde PZ in vitro auf VPA reagieren, wie sich die Apoptoserate von AML-PZ durch Zusatz von VPA verändert und in wieweit der Wachstumsfaktor Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) die Wirkung von VPA beeinflusst.

Von 23 Patienten [10 Patienten mit MDS, 6 Probanden mit gesundem KM, 4 Leukapheresate von gesunden Stammzellspendern, 3 Patienten mit AML] wurde die KM-Probe mit MACS CD34 Progenitor Cell Isolation Kit aufbereitet. Die CD34-positiven PZ wurden im Doppelansatz mit ca. 100 000 Zellen/ml Medium, dem 100 µg VPA/ml Medium hinzugefügt wurde, inkubiert. An Tag 1 und Tag 4 wurde mittels Cell Death Detection ELISA<sup>plus</sup> Kit die Apoptoserate durch Nachweis von Histon-assoziierten DNA-Fragmenten in Form von Mono- und Oligonukleosomen bestimmt. Mit dem CellTiter 96<sup>®</sup> Kit wurde die Zellproliferation gemessen. Bei diesem Test reduzieren vitale Zellen Tetrazolium zu einem farbigen Formazan-Produkt.

VPA förderte die Apoptose und hemmte die Proliferation von MDS-PZ. Die Apoptoserate war bei Hochrisiko- (HR) MDS mit VPA höher als bei Niedrigrisiko- (NR) MDS. Die Proliferation verhielt sich reziprok dazu. VPA verstärkte den Wachstumsfaktor G-CSF: Durch G-CSF mobilisierte PZ aus gesundem KM wiesen unter VPA eine geringere Apoptoserate und eine höhere Proliferationsrate auf als ohne Zusatz von VPA. VPA (100 µg/ml Medium) förderte die Apoptose und hemmte die Proliferation von gesunden CD34-positiven KM-PZ. AML-PZ zeigten eine Abnahme der Apoptoserate und eine Zunahme der Proliferation. VPA hemmte nicht die Proliferation von AML-PZ.

VPA hatte somit erwünschte Effekte bei NR-MDS-PZ in vitro und wird bereits klinisch mit Erfolg als Monotherapie bei dieser Untergruppe von MDS eingesetzt. Bei AML-PZ wirkt VPA in vitro und in vivo nicht zytoreduktiv. Somit sollte VPA bei AML nicht als Monotherapie eingesetzt werden, sondern eher wie erste erfolversprechende klinische Studien zeigten, in Kombination mit Decitabine, einem DNA-Methyltransferaseinhibitor. Dass VPA die Proliferation gesunder KM-PZ fördert, konnte hier nicht belegt werden. Werden die gesunden PZ jedoch durch Leukapherese (mit G-CSF) gewonnen, fördert VPA in vitro die Proliferation und hemmt die Apoptose. VPA könnte deshalb in Kombination mit G-CSF ein unterstützender Faktor für Differenzierungsinduktion, Proliferationsförderung und Apoptosehemmung bei der Therapie von Patienten mit NR-MDS sein.

## 2 EINLEITUNG

MDS werden zu den malignen hämatologischen Erkrankungen gezählt. Im Folgenden werden diese Erkrankung und ihre Therapie näher beleuchtet.

### 2.1 Myelodysplastische Syndrome (MDS)

#### 2.1.1 Definition

Seit über 50 Jahren ist bekannt, dass den akuten myeloischen Leukämien ein präleukämisches Stadium vorausgehen kann. Prospektive Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass diese häufig schleichend einsetzenden *Präleukämien* in nur 25 % tatsächlich in eine akute myeloische Leukämie (AML) übergehen. Deshalb wurde der frühere Begriff Präleukämie verlassen und durch die Bezeichnung *myelodysplastisches Syndrom* (MDS) ersetzt (vgl. AUL et al., 2004).

Myelodysplastische Syndrome sind erworbene Knochenmarkserkrankungen, die durch Reifungs- und Funktionsdefekte hämatopoetischer Zellen, ineffektive Hämatopoese und einen möglichen Übergang in eine akute myeloische Leukämie gekennzeichnet sind (vgl. GERMING et al., 2004). Es bestehen charakteristische morphologische Veränderungen des Knochenmarks und des Blutes sowie eine Verminderung der peripheren Blutzellen. Ein wichtiger Pathomechanismus ist die Apoptose von hämatopoetischen Vorläuferzellen als Folge eines klonalen Stammzelldefektes (vgl. BARRETT, 2000; WILLMAN, 2000). Charakteristisch ist beim MDS das hyperplastische Knochenmark bei peripherer Zytopenie (vgl. BERGER et al., 2002). Andere Pathomechanismen wie z.B. Interaktion von T-Lymphozyten mit Knochenmarkstroma und Freisetzung von inhibierenden Zytokinen (vgl. WILLMAN, 2000; AGUAYO, 2000) spielen wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle.

#### 2.1.2 Formen

Nach ätiologischen Gesichtspunkten werden primäre und sekundäre MDS unterschieden (siehe Tab. 1). Bei primären MDS, die über 90 % ausmachen, ist eine auslösende Ursache noch nicht bekannt. Das bevorzugte Auftreten von MDS im fortgeschrittenen Lebensalter wäre mit der Annahme einer Langzeitschädigung des Knochenmarks durch Umwelteinflüsse im Berufsleben und im privaten Bereich vereinbar (vgl. AUL et al., 2004). Wahrscheinlich spielen jedoch unvermeidliche altersabhängige oxidative Schäden der DNA und anderer Strukturen eine Rolle. Seit längerem ist bekannt, dass Mitochondrien wichtige Regulatoren und Effektoren der Apoptose sind, und es gibt Hin-

weise darauf, dass eine Dysfunktion von Mitochondrien zur Pathophysiologie des MDS beiträgt (vgl. GATTERMANN, 2000; GREENBERG, YOUNG, GATTERMANN, 2002).

Sekundäre myelodysplastische Syndrome sind nach Exposition des Patienten mit organischen Lösungsvermittlern (Benzol), nach vorausgegangener Chemotherapie und nach Radiatio oder kombinierter Radio- bzw. Chemotherapie beschrieben (vgl. MINNING, 1997; NISSE, 1995; PEDERSEN-BJERGAARD, 1991). Es ist bislang nicht gesichert, ob Pestizide, halogenierte Kohlenwasserstoffe, Haarfärbemittel, Alkohol oder Rauchen zur Entstehung von MDS führen können (vgl. GERMING et al., 2004).

Primäre MDS (de-novo-MDS)	Sekundäre MDS
Keine spezifische, auslösende Noxe bekannt; Langzeitschädigung des KM durch Umwelteinflüsse? Endogene oxidative Schäden? 90% der Fälle	Therapieinduziert: <ul style="list-style-type: none"> <li>- nach vorausgegangener Chemotherapie (Alkylanzien, Epipodophyllotoxin-Derivate, Cisplatin)</li> <li>- nach Strahlenbehandlung</li> <li>- nach kombinierter Chemotherapie</li> </ul> Durch andere leukämogene Noxen: <ul style="list-style-type: none"> <li>- organische Lösungsmittel (Benzol)</li> <li>- Pestizide (?)</li> </ul>

**Tabelle 1** : Einteilung der myelodysplastischen Syndrome nach auslösenden Ursachen;  
Quelle: AUL et al., 2004

### 2.1.3 Klassifikation

#### FAB-Group

Eine Klassifikation der unterschiedlichen MDS wurde erstmals 1982 von der French-American-British Cooperative Group (FAB-Group) vorgeschlagen (vgl. BENNETT, 1982). Wichtigstes Einteilungskriterium ist der Blastenanteil im KM. Weitere für die Gruppierung in Subtypen wichtige Kriterien sind der Blastenanteil im Blut, der Nachweis von AUER-Stäbchen, der Anteil der Ringsideroblasten im Knochenmark und die absolute Zahl der Monozyten im Blut (siehe Tab. 2).

Nach der FAB-Klassifikation wird die Diagnose einer refraktären Anämie (RA) gestellt, wenn Zeichen der Dyserythropoese in KM und Blut nachweisbar und medullärer und peripherer Blastenanteil normal sind. Treten zusätzlich mehr als 15 % Ringsideroblasten im Knochenmark auf, wird die Diagnose Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten gestellt (RARS). Meist finden sich zusätzlich Zeichen der Dysmega-

karyopoese wie Mikromegakaryozyten und Zeichen der Dysgranulopoese wie Pseudo-PELGER-Zellen und hypogranulierte Myelozyten.

Bei steigendem Blastenanteil bis 20 % im Knochenmark und 5 % im Blut wird die Diagnose einer refraktären Anämie mit Exzess von Blasten (RAEB) und bei einem Blastenanteil im Blut von mehr als 5 % oder dem Nachweis von AUER-Stäbchen die einer refraktären Anämie mit Exzess von Blasten in Transformation (RAEB-T) gestellt.

Als 5. Erkrankung wird die chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) in der FAB-Klassifikation zu den MDS gezählt. Diese ähnelt zytomorphologisch dem Subtyp der RAEB, wobei jedoch mehr als 1000 Monozyten/ $\mu$ l Blut als Diagnosekriterium gefordert werden.

Myelodysplastische Syndrome/Subtypen	Medullärer Blasten-anteil	Peripherer Blasten-anteil	Andere Kriterien
RA	<5%	<1%	
RARS	<5%	<1%	>15% Ringsideroblasten
RAEB	5-19%	<5%	
RAEB-T	20-29%	>5%	AUER-Stäbchen
CMML	<20%	<5%	>1000 Monozyten/ $\mu$ l im Blut

**Tabelle 2:** FAB-Klassifikation myelodysplastischer Syndrome; Quelle: GERMING et al., 2004

## WHO-Klassifikation

1999 hat eine Arbeitsgruppe der WHO eine verfeinerte Unterteilung der myelodysplastischen Syndrome vorgeschlagen, die neben zytomorphologischen Befunden aus Blut und Knochenmark erstmals auch zytogenetische Befunde berücksichtigt (vgl. BENNETT, 2000; HARRIS, 1999; siehe Tab. 3).

Die wesentliche Neuerung in der WHO-Klassifikation ist die Definition einer Gruppe von refraktären Anämien mit oder ohne Ringsideroblasten mit multilineären Dysplasiezeichen.

Myelodysplastische Syndrome/Subtypen	Medullärer Blastenanteil	Peripherer Blastenanteil	Andere Kriterien
RA ohne multilineären Dysplasien (PRA)	<5%	<1%	
RA mit multilineären Dysplasien (RCMD)	<5%	<1%	
RARS ohne multilineären Dysplasien (PSA)	<5%	<1%	>15% Ringsideroblasten
RARS mit multilineären Dysplasien (RSCMD)	<5%	<1%	>15% Ringsideroblasten
RAEB I	5-10%	<5%	
RAEB II	11-19%	<20%	
5q-Anomalie	<20%	<20%	

**Tabelle 3:** WHO-Klassifikation myelodysplastischer Syndrome; Quelle: GERMING et al., 2004

#### 2.1.4 Häufigkeit

Es gibt nur wenige epidemiologische Untersuchungen zur Häufigkeit myelodysplastischer Syndrome. Untersuchungen an regionalen Krebsregistern zeigen, dass die myelodysplastischen Syndrome im höheren Lebensalter die häufigsten hämatologischen Erkrankungen darstellen (vgl. AUL, 1992). Die Inzidenz in der Gesamtbevölkerung liegt bei 4-12/100.000 pro Jahr, in der Gruppe der über 60-Jährigen bei 20-50/100.000 pro Jahr. Eine wirkliche Zunahme der Inzidenz konnte nicht gezeigt werden (vgl. AUL 1998; CARLI 1999; RADLUND, 1995). Eine scheinbare Zunahme ist eher durch verbesserte hämatologische Diagnostik bei älteren Patienten zu erklären (vgl. GERMING et al., 2004).

#### 2.1.5 Diagnostik

Die mikroskopische Untersuchung von Knochenmarkausstrichen steht im Mittelpunkt der Diagnostik (vgl. GERMING et al., 2004). Oftmals ist die eindeutige Diagnosestellung eines myelodysplastischen Syndroms durch die mikroskopische Untersuchung von Knochenmarkausstrichen möglich. Bei einem Teil der Patienten kann auch eine histologische Untersuchung einer Beckenkammbiopsie hilfreich sein, um speziell hypoplastische und myelofibrotische Varianten diagnostizieren zu können (vgl. BENNETT, 1994; GERMING 1999).

Das KM sollte zytologisch untersucht werden, um Dysplasien der roten Blutzellreihe und zytomorphologische Dysplasiekriterien der Granulozytopoese zu erkennen (vgl. GERMING et al., 2004).

Darüber hinaus sollte der Karyotyp der Knochenmarkzellen analysiert werden. Dies ist zum einen zur Diagnosesicherung durch Nachweis klonaler Aberrationen sinnvoll; zum anderen liefert der Karyotyp auch prognostische Aussagen (vgl. GREENBERG 1997; HAASE, 1995; PFEILSTÖCKER, 1999). Die Karyotyp-Anomalien bei den myelodysplastischen Syndromen stellen meist Verluste oder Zugewinne von genetischem Material dar, Translokationen sind eher selten. Zu den häufigsten Defekten zählen Deletionen an den Chromosomen 5, 7 und 20 sowie die Monosomie 7 und die Trisomie 8 (vgl. GERMING et al., 2004). Es findet sich jedoch eine große Vielfalt an Aberrationen ohne pathognomonische Befunde.

### 2.1.6 Prognose

Es lassen sich verschiedene Risikogruppen unterscheiden, abhängig von KM-Befund, peripheren Zellzahlen, LDH-Wert und Karyotyp. Nach Diagnosestellung versterben innerhalb von sechs Monaten etwa 20 % der Patienten, während weitere 20 % sechs Jahre und länger überleben können. Eine Risikostratifizierung zur Zuordnung von Patienten zu bestimmten Therapieverfahren erscheint aus diesem Grunde unbedingt erforderlich (vgl. GERMING et al., 2004).

Das International-Prognostic-Scoring-System (IPSS) (siehe Tab. 4) ist ein Instrument, bei dem Knochenmarkblastenanteil, Anzahl der Zytopenien im Blut und Karyotyp berücksichtigt werden. So werden vier Prognosegruppen (Niedrigrisiko, Intermediärrisiko I, II und Hochrisiko) unterschieden (vgl. GREENBERG, 1997). Die Überlebenswahrscheinlichkeit und die Wahrscheinlichkeit des Überganges in eine Leukämie unterscheiden sich zwischen den Risikogruppen erheblich.

<b>Punktzahl</b>	<b>0</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>1,5</b>	<b>2</b>
Medullärer Blastenanteil (%)	0-4	5-10	-	11-20	21-29
Anzahl der peripheren Zytopenien*	0-1	2-3	-	-	-
Zytogenetische Risikogruppe **	niedrig	mittel	hoch	-	-
<b>Risikogruppen</b>	<b>Score</b>				
Niedriges Risiko	0				
Intermediäres Risiko I	0,5-1				
Intermediäres Risiko II	1,5-2				
Hohes Risiko	>2,5				

**Tabelle 4:** Das International-Prognostic-Scoring-System (IPSS) zur Prognoseabschätzung bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom; Quelle: GERMING et al., 2004

\*Thrombozyten <100 000/μl, Hb <10g/dl, Granulozyten <1500/μl

\*\*niedriges Risiko: normaler Karyotyp, 5q-, 20q-, Y;

hohes Risiko: komplexe Karyotypveränderungen (>= 3 Anomalien), Chromosom-7-Defekte; mitt-

leres Risiko: alle anderen Anomalien

Liegt zum Diagnosezeitpunkt kein Karyotyp vor, können ähnlich gute prognostische Aussagen mit Hilfe des Düsseldorf-Scores (siehe Tab. 5) gemacht werden, der statt der zytogenetischen Daten die Laktatdehydrogenase (LDH) im Serum als Prognoseparameter berücksichtigt (vgl. AUL, 1992).

#### Düsseldorf-Score

	<b>Grenzwert</b>	<b>Punktzahl</b>
Hämoglobin	>=9 g/dl	1
Thrombozyten	>= 100 000/μl	1
Laktatdehydrogenase	erhöht	1
Medullärer Blastenanteil	>=5%	1
<b>Risikogruppe</b>	<b>Score</b>	
Niedriges Risiko (A)	0	
Intermediäres Risiko (B)	1-2	
Hohes Risiko (C)	3-4	

**Tabelle 5:** Düsseldorf-Score zur Prognoseabschätzung bei myelodysplastischem Syndrom; Quelle: GERMING et al., 2004

### 2.1.7 Therapie

Durch risikoadaptierte Behandlungen sind wesentliche Fortschritte erzielt worden. Patienten mit einem Hochrisiko-MDS ohne schwere Begleiterkrankungen werden intensive, potenziell toxische Therapieformen angeboten, während bei Patienten mit günstiger Prognose eher supportive Therapiemaßnahmen indiziert sind.

Da etwa die Hälfte der Patienten mit MDS das 70. Lebensjahr überschritten hat, können intensive Chemotherapien und allogene Stammzelltransplantationen nur einem kleinen Teil der Patienten angeboten werden (vgl. GERMING et al., 2004).

Weitere Therapieansätze sind die immunmodulatorische Therapie (Antilymphozyten- und Antithrombozytenglobulin; vgl. JONASOVA, 1998; MOLLDREM, 2002), Farnesyltransferaseinhibitoren, Differenzierungs-Induktoren wie All-Transretinsäure (ATRA; vgl. AUL et al., 1993; NAIR et al., 1998; STASI, 2002), DNA-Methyltransferaseinhibitoren (5'-Azacytidine, Decitabine; vgl. GARCIA-MANERO et al., 2004; YANG et al., 2003; CAMERON et al., 1999) und HDAC-Inhibitoren (Butyrate, TSA, Valproinsäure; vgl. KUENDGEN, et al., 2004, 2005, 2006; BUG et al., 2005; PILATRINO et al., 2005; DE FELICE et al., 2005; REZACOVA et al., 2006).

Außer der allogenen Blutstammzelltransplantation, die nur für einen kleinen Teil der Hochrisikopatienten unter 50 Jahren, die über einen HLA-identischen Spender verfügen, in Frage kommt, gibt es keine kurative Behandlung für Patienten, die an MDS erkrankt sind (vgl. AUL, 2004; GERMING, 2004). Eine intensive Chemotherapie ist mit großen Risiken verbunden, da es sich im Allgemeinen um ältere, multimorbide Patienten handelt. Wegen des Risikos therapieassoziierter Komplikationen ist eine intensive Chemotherapie in frühen Krankheitsstadien ohne erkennbare leukämische Transformation nicht gerechtfertigt. Bei fortgeschrittenen Krankheitsstadien gab es bislang keine wirksame Alternative zur intensiven Chemotherapie. Die hiermit erzielten lang anhaltenden Remissionen liegen bei 20% (siehe Kap. 2.1.6). Eine neue Option stellt die epigenetische Behandlung mit demethylierenden Substanzen (5-Azacytidin, Decitabin) und/oder HDAC-Inhibitoren dar.

Bei der Therapie des MDS sind alle Medikamente willkommen, die zu einer Verbesserung der Knochenmarksfunktion mit Anstieg der Blutzellzahlen, verminderter Transfusionsbedürftigkeit, verminderter Infektanfälligkeit oder verminderter Blutungsneigung führen. Wenn es gelingen würde, durch verbesserte Ausreifung der hämatopoetischen Zellen (z.B. durch einen Differenzierungsinduktor wie VPA) auch das

Risiko des Übergangs in eine akute Leukämie zu vermindern, wäre dies sehr zu begrüßen.

## **2.2 Valproinsäure (VPA)**

### **2.2.1 VPA in der Tumortherapie**

In der Neurologie wird seit Jahrzehnten VPA bei der Therapie von generalisierten und partiellen Krampfanfällen eingesetzt. VPA wird als Stimmungsstabilisator und als Therapeutikum für Migräneanfälle und neuropathische Schmerzen angewandt (vgl. LÖSCHER, 1999).

Valproinsäure ist eine kurzkettige Fettsäure und gehört zu den Inhibitoren der Histon-Deacetylase (HDAC, siehe Kap. 2.2.3). Seit einigen Jahren wird Valproinsäure auch in der Therapie von malignen hämatopoetischen Erkrankungen eingesetzt. Viele Arbeiten haben bewiesen, dass VPA – neben anderen kurzkettigen Fettsäuren wie Butyrat und Phenylacetat – das Wachstum und die Differenzierung maligner Zellen *in vitro* beeinflusst (vgl. CINATL, 1997; KISHI, 1994; WERLING, 2000; TITTLE, 1992). Neuere Experimente von zwei Forschungsgruppen haben gezeigt, dass die durch VPA induzierte Tumorzell-Differenzierung an die HDAC–Inhibition gekoppelt ist:

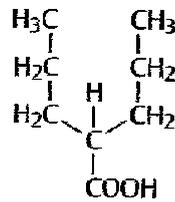
„Valproic acid acts through a distinct pathway that involves direct inhibition of histone deacetylase” (PHIEL et al., 2001).

Fast zeitgleich bewies die Forschungsgruppe von GÖTTLICHER et al.: “Valproic acid inhibits HDAC activity *in vitro* and *in vivo*, most probably by binding to the catalytic center and thereby blocking substrate access. Furthermore, VPA induces differentiation and/or apoptosis of carcinoma cells, transformed hematopoietic progenitor cells and leukemic blasts from AML patients” (GÖTTLICHER et al., 2001).

Diese Ergebnisse haben zu präklinischen und ersten klinischen Studien zur Therapie von AML und MDS mit VPA geführt (vgl. KUENDGEN und GATTERMANN, 2007; siehe Kap. 2.2.4 und 2.2.5).

## 2.2.2 Chemischer Aufbau und pharmakologische Eigenschaften

Valproinsäure (VPA, 2-propylpentanoic acid, Dipropyllessigsäure) ist eine kurzkettige, verzweigte Fettsäure (JOHANNESSEN, 2003; siehe Abb. 1).



Valproinsäure

**Abbildung 1:** Strukturformel von Valproinsäure; Quelle: LÜLLMANN, 1999

VPA hat ein geringes Verteilungsvolumen, da die Säure bei physiologischem pH-Wert einen hohen Ionisierungsgrad aufweist und daher weniger fettlöslich ist als andere Antikonvulsiva. Bei oraler Applikation ist ihre Bioverfügbarkeit beinahe 100 %. Die Plasmaprotein-Bindungskurve beträgt 80-95 %, die HWZ 9-18 Stunden. Interaktionen anderer Medikamente sind bei der Plasmaproteinbindung und der Verstoffwechslung von VPA zu verzeichnen (vgl. KUENDGEN und GATTERMANN, 2007).

Valproinsäure wurde im Jahre 1882 erstmals von BURTON synthetisiert (vgl. BURTON, 1982). Ihre antikonvulsive Eigenschaft wurde jedoch erst zufällig im Jahre 1962 von PIERRE EYMARD entdeckt (vgl. MEUNIER, 1963). Seitdem wird VPA zur Therapie von generalisierten und partiellen Krampfanfällen und seit einigen Jahren als Stimmungsstabilisator und bei der Therapie von Migräneanfällen und von neuropathischen Schmerzen eingesetzt (vgl. JOHANNESSEN, 2000). Die Wirkung von VPA scheint über verschiedene Mechanismen vermittelt zu werden. Die antikonvulsive Wirkung wird über einen Anstieg des Plasmaspiegels des inhibitorischen Neurotransmitters GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) durch Beeinflussung seiner Synthese und Freisetzung in bestimmten Hirnregionen vermittelt (LÖSCHER, 1999). Des Weiteren scheint VPA die Freisetzung der epileptogen wirkenden  $\gamma$ -Hydroxybutyrat-Säure zu reduzieren. Die hemmende Wirkung von VPA auf exzitatorische Neurotransmitter und erregbare Zellmembranen ist sowohl für den stimmungsstabilisierenden Effekt als auch für den erfolgreichen Einsatz von VPA in der Migräneprophylaxe verantwortlich (vgl. JOHANNESSEN, 2000).

VPA wird im Allgemeinen gut vertragen. Zu Beginn einer Behandlung treten gehäuft neurologische Symptome wie Sedierung, Benommenheit und Tremor sowie milde

gastrointestinale Beschwerden auf. Weitere unerwünschte Wirkungen sind sehr selten auftretende Leberparenchymnekrosen und akutes Leberversagen (ca. 1:15.000). Das akute Leberversagen betrifft vor allem Kinder unter zwei Jahren, die eine Polychemotherapie erhalten, und mehrfach behinderte Kinder und Jugendliche. Aufgrund der teratogenen Eigenschaft von VPA kann es in Schwangerschaften zu Neuralrohrdefekten und zu schweren Malformationen kommen (vgl. JAGER-ROMAN et al., 1986). In-vitro-Versuche haben erwiesen, dass der antikonvulsive und teratogene Effekt auf unterschiedlichen Eigenschaften von VPA beruhen (vgl. LÖSCHER, 1999).

Vor einigen Jahren haben in-vitro-Experimente eine antitumoröse Aktivität von VPA bewiesen. Das Medikament verändert Tumorwachstum durch unterschiedliche Zielstrukturen. Es greift in den Zellzyklus ein – mit dem Resultat einer Abnahme der Proliferation (vgl. MARTIN et al., 1991; BACON et al., 2002). Des Weiteren sind ein Effekt auf die Differenzierung (vgl. CINATL et al., 1996: Veränderung der zellulären Prozesse – Abnahme der N-myc Onkoprotein-Expression im Zellkern und Zunahme der Expression der Adhäsionsmoleküle in den Membranen – bei Neuroblastomzellen des Menschen ohne signifikanten Einfluss auf die Viabilität der Zellen), eine Verhinderung von Zelltod und Tumormetastasierung (vgl. WALMOD, 1998 und 1999) und eine Reduzierung der in-vitro-Angiogenese (vgl. CINATL, 2002) nachgewiesen.

VPA wird in der Hämatologie als ein HDAC-Inhibitor der ersten Generation angesehen. Das gut bekannte, günstige Nebenwirkungsprofil und das Wissen, dass VPA bereits in therapeutischen Konzentrationen vor allem ein HDAC-Inhibitor der Klasse I ist und differenzierungsinduzierend wirkt (vgl. Gurvich et al., 2004), machen VPA für die Forschung weiterhin sehr interessant.

### 2.2.3 VPA als HDAC-Inhibitor

Chromatin ist eine mit spezifischen Farbstoffen anfärbbare Substanz im Karyoplasma, die im Wesentlichen aus DNA, RNA und Kernproteinen (Histone und Nichthistone) besteht. Die Untereinheiten von Chromatin bestehen aus Nukleosomen. Nukleosomen sind sich wiederholende Einheiten, aus 165 Basen-Paaren langen DNA-Strängen bestehend, die sich um ein Octamer aus Core-Histonen (je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4) winden. Das Histon H1 bindet an die in ihrer Länge variablen DNA-Abschnitte zwischen zwei Nukleosomen und stabilisiert damit die Struktur (vgl. FELSENFELD, 2003).

Histone sind zusammen mit der DNA wesentliche Bestandteile des Chromatingerüsts und mitverantwortlich für die Regulation der Gentranskription, der DNA-Reparatur und der genetischen Stabilität (vgl. AKTORIES / UNGER, 2005). Die DNA, die um die Oberfläche des Oktamers gewunden ist, ist teilweise für regulierende Proteine zugänglich. DNA ist besser zugänglich, wenn sie sich von den Oktameren löst. Das Aminoende von Histonproteinen ragt aus den Nukleosomen hervor und ist so für Enzyme zugänglich, die chemische Histonmodifikationen bewirken. Dies führt zu entscheidenden Veränderungen im Chromatinkomplex, beispielsweise zu einer Lockerung der Nukleosomenstruktur und zu einer Entwindung der DNA (vgl. KUENDGEN und GATTERMANN, 2007).

Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs) spielen eine entscheidende Rolle bei der Gen-Regulation auf Chromatinebene. Histon-Acetylierung findet an den Lysinenden der Histone statt. Sie führt zur Neutralisation der positiven Ladung des Histons und verringert so die Bindungskraft zwischen den ursprünglich positiv geladenen Lysinenden und den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA. HDACs entfernen die Acetylgruppe, wodurch die positive Ladung der Lysinenden zunimmt und damit deren Affinität zur DNA ansteigt. HDAC-Inhibitoren verhindern die Deacetylierung, wodurch sich die eng gepackte DNA-Struktur lockert, der Zugang von Transkriptionsfaktoren erleichtert wird und die Gen-Transkription zunimmt (vgl. FELSENFELD, 2003).

Zusammenfassend: VPA ist ein HDAC-Inhibitor, der zu einer Hyperacetylierung der Histone führt, wodurch sich die DNA-Struktur lockert und die Gentranskription erleichtert wird. Dies kann günstige Auswirkungen auf Zelldifferenzierung, Proliferation und/oder Apoptose haben.

#### 2.2.4 VPA in vitro (präklinische Ergebnisse)

2001 entdeckten zwei von einander unabhängige Forschungsgruppen den Mechanismus der teratogenen und antitumorösen Eigenschaften von VPA (vgl. GÖTTLICHER et al., 2001; PHIEL et al., 2001). GÖTTLICHER et al. zeigten, dass VPA ein Histon-Deacetylase-Inhibitor ist, der HDAC-abhängige transkriptionale Hemmung rückgängig macht und zu einer Hyperacetylierung der Histone in vitro und vivo führt. Des Weiteren induziert VPA die Differenzierung von Karzinomzellen, von PML-RAR-transformierten hämatologischen Progenitor-Zellen und von leukämischen Blasten bei

AML-Patienten und verringert Tumorwachstum und Metastasierung in Tierexperimenten.

PHIEL et al. zeigten 2001, dass VPA durch HDAC-Inhibition die Wnt-abhängige Genexpression aktiviert und somit zu einer verstärkten Expression von  $\beta$ -catenin (Untereinheit von Cadherin, welches ein Bestandteil des Wnt-Signalweges ist) und zu einer Reaktivierung von Tcf/Lef-Genen führt, wodurch sich die teratogenen Effekte von VPA erklären lassen.

GURVICH et al. testeten VPA und Analoga auf HDAC-Inhibitionskapazität und zeigten, dass VPA und Analoga sowohl HDACs der Klasse I als auch der Klasse II in leukämischen Zelllinien inhibieren. Des Weiteren wurde belegt, dass VPA und Analoga über die Induzierung des Proteins p21 – ein zyklin-abhängiger Kinase-Inhibitor, der wesentlich für die Kontrolle des Zellzyklus ist – eine Differenzierung der hämatopoetischen PZ zur Folge hatten (vgl. GURVICH et al., 2004).

Histon-Acetylierung und -Deacetylierung ist für die Regulation der Genexpression essentiell. MARCHIO et al. zeigten 2005, dass VPA neben einer Hyperacetylierung der Histone H3 und H4 zu einer Abnahme des SMC- (structural maintenance of chromatin) Proteins und zu einer Abnahme der DNS-Methyltransferasen führte und dadurch eine Dekondensation von Chromatin entstand. Somit wird die DNS empfindlicher für interkalierende Substanzen.

Eine weitere Erkenntnis gewannen TANG et al., die eine MDR (multidrug resistance) AML-Zelllinie mit VPA behandelten. Bei MDR-AML konnte VPA die Proliferation von leukämischen Zellen inhibieren und die Apoptose fördern, auch wenn die Zellen p-gp (P-glykoprotein) und MDR-assoziierte Proteine exprimierten und somit eine erhöhte Resistenz aufwiesen.

TRUS et al. untersuchten 2005 die Wirkung von VPA + ATRA auf die AML-Zelllinie OCI/AML-2 mit der Fragestellung, ob VPA die ATRA-induzierten Veränderungen verstärken kann. Festgestellt wurde, dass VPA die Expression von 441 Genen verstärkte und von 315 Genen verminderte. Außerdem induzierte VPA eine verstärkte p21-Expression, was zu einem Zellzyklusarrest und einer daraus folgenden Zunahme der Apoptose führte. Unter ATRA-Monotherapie wurde diese Veränderung nicht beobachtet. Deswegen ziehen TRUS et al. den Schluss, dass VPA + ATRA eine vorteilhafte Therapie bei AML-Patienten sein kann.

DRESCHER et al. testeten 2005 den Effekt von VPA auf eine t (15; 17) -positive Zelllinie (akute Promyelozytenleukämie) im Vergleich zur Wirkung von VPA auf gesunde CD34-positive PZ. Beobachtet wurde eine verstärkte Acetylierung von Histonen (H4), die zu einer Inhibition der Proliferation und zum Wachstumsstillstand führte. Der Wachstumsstillstand wurde durch einen Arrest in der G1/G0-Phase bedingt, wahrscheinlich vermittelt durch eine verstärkte Expression des Proteins p21. DRESCHER et al. beobachteten eine Differenzierung der leukämischen Zelllinie, die durch VPA auch bei ATRA-resistenten Zellen stattfand. Bei CD34-positiven PZ aus gesundem KM hingegen wurden kein Wachstumsstillstand, keine vermehrte Expression von p21 und keine Differenzierungsinduktion festgestellt, sondern eine Zunahme der CD 34-positiven Fraktion.

Im Vergleich dazu beschrieben BUG et al. 2005, dass VPA die Proliferation und Selbsterneuerung von gesunden PZ fördert. Diese Beobachtung war an eine p21-Downregulation und an eine Aktivierung des Wnt-Signalweges gekoppelt. Des Weiteren untersuchten BUG et al. (2005) CD34-positive und CD38-negative (s.Abb. 3, S. 22) AML-PZ in Hinblick auf die Wirkung von VPA und stellten fest, dass VPA das Wachstum bei t(8; 21) – positiven AML-Zellen und die Differenzierung der leukämischen PZ zu Blasten inhibieren konnte und ein höherer Anteil von CD34-positiven und CD38-negativen PZ im Vergleich zu unbehandelten AML-PZ erzielt werden konnte.

DE FELICE et al. (2005) untersuchen die Wirkung von VPA auf gesunde CD34-positive PZ in Flüssigkulturen unter Zusatz von Zytokinen (Flt3L, Thrombopoietin, Stem Cell Factor, Interleukin 3). Die Proliferation der CD34-positiven PZ nahm zu, ohne dass die CD34-Positivität der Zellen stark abfiel. Dies spricht für einen Erhalt des Selbsterneuerungspotenzials der CD34-positiven PZ. Außerdem nahm die Genexpression von HOXB4 [ein Transkriptionsfaktorgen der hämatopoetischen SZ (HSZ)] und AC133 (ein Markergen für HSZ und Progenitorzellen), zu.

#### 2.4.5 VPA in vivo (klinische Ergebnisse)

KUENDGEN et al. veröffentlichten 2004 eine der ersten klinischen Studien zum Einsatz von VPA als Monotherapeutikum oder in Kombination mit ATRA (all-*trans* retinoic acid, Synergist mit VPA in der Differenzierungsinduktion von AML Blasten in vitro; vgl. GUEL et al., 2003) bei 23 Patienten mit MDS und sekundärer AML (aus MDS entstanden). VPA wurde in Serumkonzentrationen von 50-100 µg/ml eingesetzt. Acht Patienten

(= 44 %) sprachen gemäß den Kriterien der „Internationale Working Group“ (IWG) auf die Behandlung an.

Wurde VPA mit ATRA von Beginn an kombiniert gegeben, wurde kein Ansprechen beobachtet. Wurde ATRA nach anfänglichem VPA-Therapieversagen hinzugegeben, wurde in zwei von fünf Fällen ein Erfolg verzeichnet. Gemäß IPSS (International Prognostic Scoring System) zeigten drei Patienten mit einem niedrigem Risiko eine major-response. Im Gegensatz dazu zeigte nur einer der vier Hochrisikopatienten eine minor-response. Trotzdem konnte bei drei von neun Patienten, die eine erhöhte Blastenzahl aufwiesen, eine Reduktion der peripheren Blasten und der Knochenmarkblasten nachgewiesen werden. KUENDGEN et al. fassten zusammen, dass Patienten mit MDS von der Therapie mit VPA profitieren, dass das Ansprechen auf VPA als Monotherapie besser ist als eine gemeinsame Gabe mit ATRA vom Beginn der Therapie an und dass ATRA erst bei Nichtansprechen auf VPA hinzugegeben werden sollte.

Da bei drei von neun Patienten mit erhöhten Blastenzahlen eine Blastenreduktion erzielt werden konnte, studierten KUENDGEN et al. 2006 bei 58 Patienten mit AML den Einsatz von VPA in Monotherapie oder in Kombination mit ATRA. Es konnte nach IWG-Kriterien für AML in nur 5 % ein Ansprechen verzeichnet werden. Das Ansprechen war durch hämatologische Verbesserung und Stabilisierung gekennzeichnet und half, eine höhere Lebensqualität zu erhalten. KUENDGEN et al. schreiben, dass VPA bei 50 % der Patienten, die eine erhöhte Leukozytenzahl aufwiesen, eine ausreichende antiproliferative Wirkung hatte; dies im Gegensatz zu GUEL et al. 2003, die acht AML-Patienten mit VPA und ATRA behandelten und keine potente zytoreduktive Wirkung erkennen konnten.

Zu einem ähnlichen Ergebnis wie GUEL et al. (2003), kamen NERVI et al. (2004), die acht AML-Patienten mit VPA und ATRA therapierten und nur in einem Fall eine hämatologische Verbesserung verzeichneten.

KUENDGEN et al. (2006) fassen zusammen, dass VPA als Monotherapie bei AML-Patienten - trotz Verbesserung der Lebensqualität - nicht effektiv genug ist, auch wenn in-vitro-Daten bestätigt haben, dass VPA AML-Blasten zur Differenzierung induzieren kann (vgl. GÖTLICHER et al., 2001; vgl. GURVICH et al., 2004). KUENDGEN et al. schlagen vor, dass bei älteren Patienten, die für eine die Standard-Chemotherapie (siehe Kap. 2.1.7) nicht geeignet sind, VPA kombiniert mit Farnesyltransferaseinhibitoren (FTI, siehe Kap. 2.1.7) oder mit DNA-Methyltransferaseinhibitoren (Decitabine, 5'-

Azacytidine; vgl. GARCIA-MANERO et al, 2004; CAMERON et al, 1999) versucht werden könnte.

KUENDGEN et al. veröffentlichten 2005 die Ergebnisse der zweiten Phase der klinischen Studie von Patienten mit MDS und sAML/MDS, behandelt mit VPA als Monotherapie oder in Kombination mit ATRA. Von 75 Patienten mit MDS oder AML erhielten 66 Patienten eine VPA-Monotherapie und neun Patienten VPA + ATRA. Nach IWG-Kriterien für MDS sprachen 30 % der MDS- und 16 % der AML-Patienten auf VPA an. IWG-Erfolgs-Kriterien wurden bei insgesamt 24 % der Patienten erfüllt. Betrachtet man die MDS-Untergruppen, war die höchste Ansprechrate bei Low-risk-MDS (PRA, RCMD, PSA und RSCMD) 52 %, im Vergleich zu 6 % bei REAB I und II und 0% bei CMML (siehe WHO-Klassifikation / Tab. 3, Kap. 2.1.3) zu verzeichnen.

Außerdem war die Ansprechdauer bei Low-Risk-MDS-Patienten signifikant länger als bei allen anderen Gruppen. Zusammenfassend schreiben die Autoren, dass VPA vor allem bei Low-risk-MDS (nach FAB-Klassifikation RA und RARS) eingesetzt werden und ATRA nur nach einem partiellem VPA-Erfolg hinzugegeben werden sollte, um das Ansprechen auf die Therapie zu verlängern. Ein Therapiebeginn mit VPA + ATRA erhöht die Ansprechrate nicht.

BUG et al. veröffentlichten 2005 Resultate einer vierwöchigen Kombinationstherapie von VPA (Serumkonzentrationen von 41–155 mg/l) mit ATRA (45 mg/m<sup>2</sup>) bei 24 AML-Patienten und zwei MDS- (RAEB I und RAEB II) Patienten. Ein Ansprechen auf diese Kombinationstherapie wurde nur bei zwei von 19 (10 %) Patienten beobachtet. Diese zwei Patienten hatten als einzige Studienteilnehmer eine AML, die aus einem myeloproliferativen Syndrom (MPS) entstanden war. Die Anzahl der weißen Blutkörperchen stieg bei 58 % der Studienteilnehmer auf mehr als 10x10<sup>9</sup>/l an, sodass eine weitere zytoreduktive Therapie mit low-dose-Cytarabin (LD-AraC) oder Hydroxyurea (HU) eingeleitet werden musste. Diese Daten zeigen, dass VPA plus ATRA eine zu geringe antiproliferative Eigenschaft bei AML-Patienten und Hochrisiko-MDS-Patienten aufweist. Zusammenfassend schreiben BUG et al., wie KUENDGEN et al. 2006 und GARCIA-MANERO et al. 2006, dass AML-Patienten zusätzlich zu VPA und ATRA mit einem weiteren, stärker zytoreduktiv wirkenden Medikament behandelt werden sollten.

CIMINO et al. untersuchten in einer Pilot-Studie 2006 die Wirkung von VPA in Kombination mit ATRA auf acht therapierefraktäre- oder Hochrisiko-AML-Patienten, die nicht für eine intensive Chemotherapie in Frage kamen. Valproinsäure, die zu einer

Dekondensation von Chromatin führen kann (vgl. MARCHION et al., 2005) in Kombination mit ATRA, das wie VPA eine Differenzierung von leukämischen Blasen bewirken kann, wurde gut toleriert. Nach IWG-Kriterien für AML wurde formal kein Ansprechen, sondern nur eine gewisse Verbesserung des Blutbildes bei zwei Patienten beobachtet. Drei Patienten entwickelten eine Hyperleukozytose, die mit einer Abnahme der unreifen und einer Zunahme der reifen weißen Blutkörperchen verbunden war. Diese Differenzierungsinduktion des leukämischen Zellklons konnte mit der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) nachgewiesen werden. CIMINO et al. wiesen bei sieben von acht Patienten, bei denen ein VPA-Serumspiegel von  $\geq 50 \mu\text{g/ml}$  bestand, eine Hyperacetylierung der Histone (H3 und H4) bei mononukleären Zellen nach und beobachteten, dass der VPA-Effekt mit einer Differenzierungsinduktion vergesellschaftet war, die morphologisch, zytochemisch, immunophänotypisch und genetisch (vermehrte Genexpression) nachgewiesen werden konnte.

PILATRINO et al. zeigten 2005: VPA führt in Kombination mit ATRA zu einer Zunahme der Thrombozytenzahl bei MDS- und AML-Patienten. In die klinische Studie waren 13 AML-, fünf (RAEB II-klassifizierte) MDS- und zwei CMML-Patienten aufgenommen worden. Von 20 Patienten wurden nur 11 ausgewertet, da nur Patienten, die kontinuierlich über einen Zeitraum von zwei Monaten therapiert wurden, die Kriterien erfüllten. Von diesen 11 Patienten sprachen nach WHO-Kriterien sechs an. Sie wiesen einen über mehr als sechs Monate anhaltenden Anstieg der Thrombozytenzahlen auf und wurden transfusionsunabhängig. Eine Reduktion der Blastenzahl konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Bei zwei Patienten war ein starker Anstieg der Blasten in Korrelation mit dem Thrombozytenanstieg nach Beginn der VPA Therapie zu verzeichnen. Die Zugabe von ATRA nach dem Erreichen des angestrebten VPA-Serumspiegels von 45 –100  $\mu\text{g/ml}$  führte zu keiner Veränderung des Ansprechens.

PILATRINO et al. fassen zusammen, dass VPA zu einer Zunahme der Lebensqualität von älteren (RAEB-klassifizierten) MDS- und AML-Patienten führt, da eine vorübergehende Thrombozytentransfusionsunabhängigkeit erreicht wird. Es kam unter VPA + ATRA jedoch nicht zu einer Abnahme der Blastenzahlen.

RAFFOUX et al. untersuchten in einer Pilot-Studie 2005 bei 11 älteren Patienten mit de-novo-AML die Wirkung von VPA in Kombination mit ATRA. Beobachtet wurde ein Ansprechen des Knochenmarkes bei drei von 11 Patienten, von denen einer eine

komplette Remission aufwies. Bei weiteren zwei Patienten konnte eine Verbesserung des Blutbildes festgestellt werden.

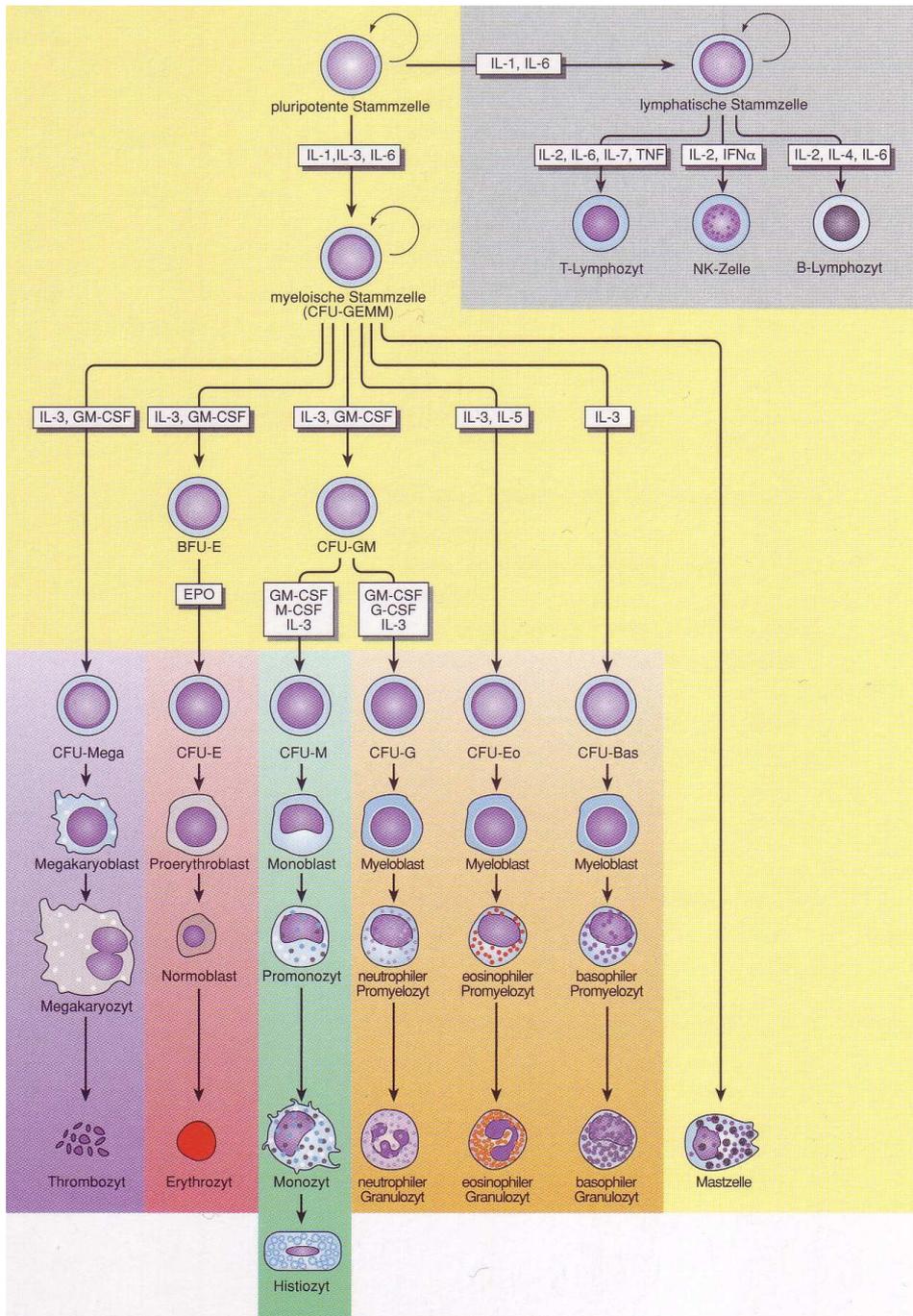
CRADDOCK et al. führten 2005 eine Phase I/II Studie mit VPA in Kombination mit ATRA bei 20 Hochrisiko-AML-Patienten durch. Vier Patienten zeigten eine Blutbildverbesserung, zwei Patienten eine partielle Remission, und ein Patient erreichte eine komplette Remission. Bei Erfolglosigkeit der Therapie wurde nach 28 Tagen Theophyllin zu VPA und ATRA hinzugegeben – ein Phosphodiesterase-Inhibitor, der endogenes cAMP stabilisieren und Blastenwachstumsstillstand und Differenzierung bei akuter Promyelozytenleukämie induzieren kann (vgl. GUILLEMIN et al., 2002). Es wurde eine Hyperacetylierung und –methylierung, die zu einer Expression von p15, p16 und p21 in Myeloblasten führte, festgestellt. Des Weiteren verzeichneten CRADDOCK et al. bei drei Patienten, von denen zwei eine hämatologische Verbesserung zeigten, eine TRIAL- (TNF-related apoptosis inducing ligand) Induktion. Außerdem wurde eine upregulation vor allem von HDAC11 dokumentiert.

## **2.3 Stammzellen (SZ)**

Grundsätzlich wird zwischen embryonalen und adulten Stammzellen unterschieden. Embryonale Stammzellen haben die Fähigkeit, sich in alle Gewebearten des menschlichen Organismus zu differenzieren und werden als totipotent bezeichnet, wohingegen adulte Stammzellen (der Haut / der Schleimhaut / des Knochenmarks) in ihrer Entwicklungsmöglichkeit eingeschränkt sind.

Hämatopoetische Stammzellen sind multipotente, adulte Stammzellen, die bereits ein eingeschränktes Differenzierungspotential besitzen (z.B. Selbsterneuerung und Differenzierung der Blutbildung beim Menschen; Vgl. HAAS und KRONENWETT, 2005). Es sind wenig differenzierte Zellen mit einer niedrigen Proliferationsrate, die ihren Bestand während der ganzen Lebensspanne des Individuums dadurch erhalten können, dass ein Teil ihrer Tochterzellen die Eigenschaften der Stammzellen mit hoher Proliferationskapazität behält (Selbstreproduktion, vgl. hämatopoetisches Nischenkonzept, HAAS und KRONENWETT, 2005), während andere in den Differenzierungsprozess eintreten, der schließlich zur Bildung spezialisierter, nicht mehr teilungsfähiger Funktionszellen führt.

Im Rahmen der Differenzierung bilden sich aus der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle lymphatische und myeloische Stammzellen. Die lymphatischen Stammzellen differenzieren zu T- und B-Lymphozyten und die myeloischen Stammzellen zu Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Thrombozyten (RENZ-POLSTER, 2001; siehe Abb. 2, S. 21).



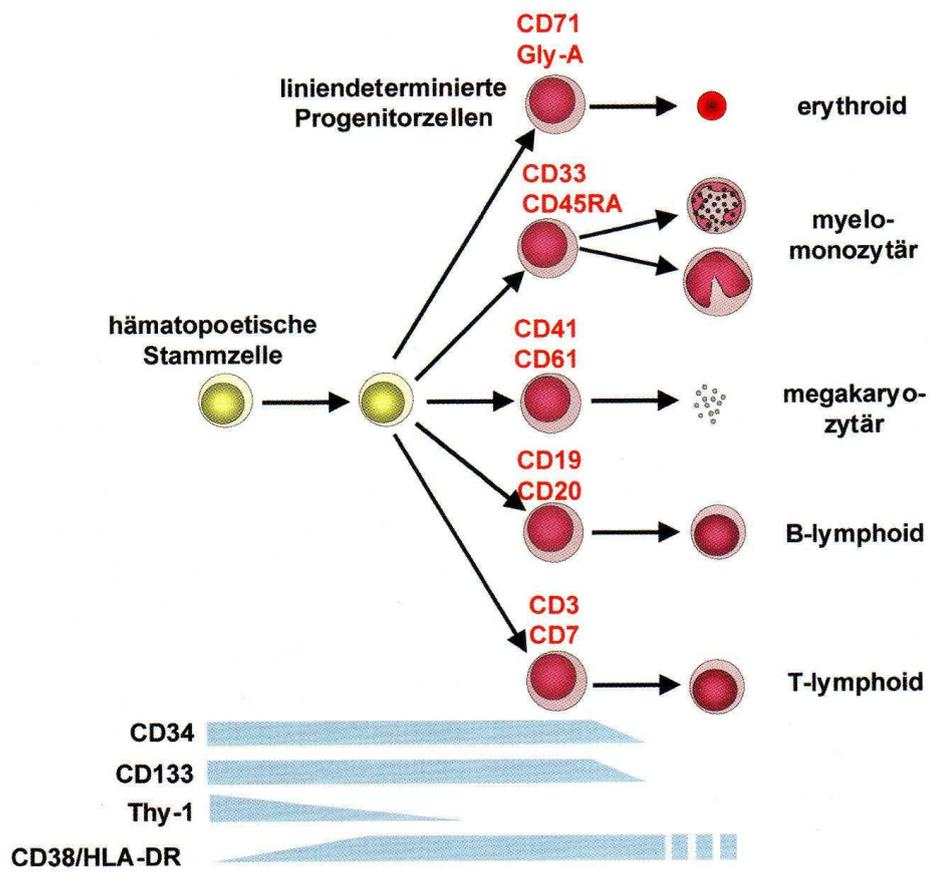
**Abbildung 2:** Differenzierung der pluripotenten Stammzelle; Quelle: BÖCKER et al., 2004

### 2.3.1 CD34 - positive Stamm- und Progenitorzellen

1984 wurde das stammzellassozierte Oberflächenantigen CD34 (CD = cluster of differentiation) durch CURT CIVIN erstmals beschrieben. Aufgrund der Entdeckung des stammzellassozierten Oberflächenantigens CD34 war es einerseits möglich, mit der Durchflusszytometrie hämatopoetische Vorläuferzellen immunologisch darzustellen (siehe Kap. 3.2.2) und andererseits immunmagnetisch durch Verwendung von mit Eisenpartikeln gekoppelten Antikörpern (siehe Kap. 3.2.1) CD34-positive Zellen zu isolieren (vgl. HAAS und KRONENWETT, 2005).

Von besonderer Bedeutung für Stammzelltherapien ist die Charakterisierung der primitiven, omnipotenten hämatopoetischen Stammzellen, die nach einer myeloablativen Hochdosistherapie beim Empfänger für die Regeneration einer lebenslang funktionstüchtigen Hämatopoese zu sorgen haben. Diese frühe omnipotente Stammzelle ist in der Population der CD34-positiven Zellen zu finden, die CD38 bzw. HLA-DR nur schwach oder überhaupt nicht exprimieren (vgl. HAAS und KRONENWETT, 2005; siehe Abb. 3, S.23).

Da bei MDS ein wichtiger Pathomechanismus die Apoptose von hämatopoetischen Vorläuferzellen ist (vgl. GATTERMANN, 2000; GERMING et al., 2004), wurde im Rahmen dieser Arbeit mit CD34-positiven Progenitorzellen von MDS Patienten gearbeitet, um deren Apoptose- und Proliferationsverhalten mit und ohne VPA zu beobachten.



**Abbildung 3:** Cluster of differentiation; Quelle: HAAS und KRONENWETT, 2005

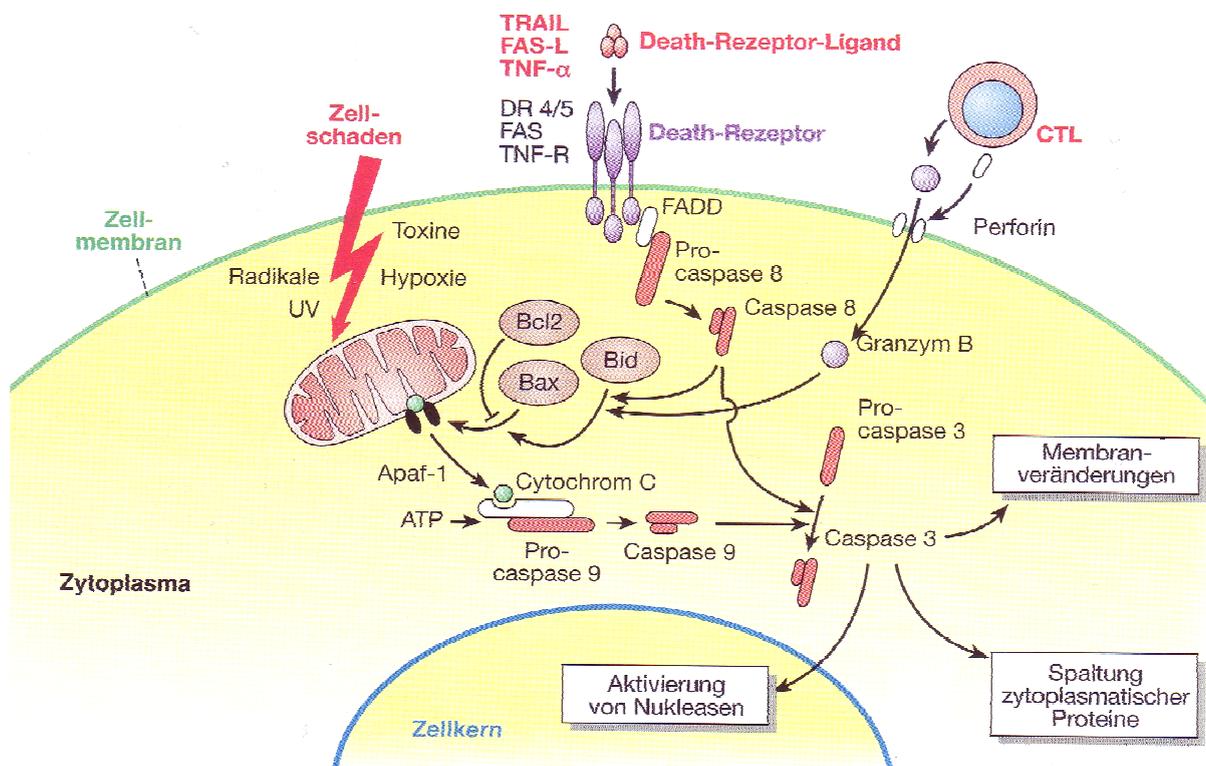
## 2.4 Apoptose

Der Zelltod ist das irreversible Endstadium der Zellschädigung als Folge hypoxischer, toxischer, physikalischer, immunologischer oder mikrobieller Ursachen. Im Rahmen der Embryonalentwicklung und des normalen Gewebeumsatzes ist der Zelltod durch Apoptose ein physiologischer Vorgang. Der Zelltod äußert sich einerseits in Form der Apoptose und andererseits in Form der Nekrose (vgl. BÖCKER et al., 2004).

Unter Apoptose wird die genetisch programmierte Elimination von Zellen verstanden, die im Gegensatz zur Nekrose durch die betroffene Zelle selbst gesteuert wird. Einerseits ist die Apoptose die natürliche Form der Zellmauserung, die das Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung und Zellelimination ermöglicht, andererseits spielt sie bei einer Vielzahl von pathologischen Situationen eine Rolle, wie bei der Elimination infizierter Zellen, bei Autoimmunerkrankungen, degenerativen Erkrankungen, ischämischer Gewebeschädigung und insbesondere bei der Karzinogenese, bei der die Hemmung der Apoptose zu einer Zunahme der Zellzahl führt (vgl. BÖCKER et al., 2004).

## 2.4.1 Zur Apoptose führende Mechanismen

Apoptose kann durch eine Reihe von Zellschädigungen sowie durch spezifische Signale ausgelöst werden (siehe Abb. 4). Zellschädigungen wie Hypoxie, Radikale, Toxine, Chemotherapeutika und Bestrahlung können durch Induktion Cytochrom C aus den Mitochondrien freisetzen. Spezifische Signale wie FAS-Liganden, TRAIL oder Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) können an ihre korrespondierenden „Death“-Rezeptoren (DR4/5, FAS, TNF-  $\alpha$ ) an der Zellmembran binden und dadurch in der Zelle über die Caspase-Kaskade und über Bid zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien führen. Die Cytochrom-C-Freisetzung hängt von dem Verhältnis der in der Zelle vorhandenen apoptosehemmenden Faktoren (Bcl-2-Proteine) und apoptosefördernden Faktoren (Bax-Proteine) ab.



**Abbildung 4:** Mechanismen der Apoptose; Quelle: BÖCKER et al., 2004

Cytochrom C ist ein Kofaktor für Caspasen, die als inaktive Vorstufen (Procaspasen) in der Zelle vorhanden sind. Die aktivierten Caspasen führen das apoptotische Programm aus, indem sie eine Reihe von Zellproteinen und die DNA an charakteristischen Stellen spalten. In der Folge kommt es zu einem Einströmen von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle, wodurch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Enzyme aktiviert werden und eine Quervernetzung von Proteinen bewirken (vgl. BÖCKER et al., 2004).

## 2.4.2 Apoptose bei MDS

Eine gesteigerte Apoptoserate im Knochenmark von Patienten mit MDS ist die Hauptursache der ineffektiven Hämatopoese, welche charakteristisch für myelodysplastische Syndrome ist.

Signale, die die Apoptose induzieren, können sowohl auf intrinsischen Defekten – aufgrund des klonalen Vorläuferzelldefektes – als auch auf extrinsischen Stimuli beruhen (siehe Abb. 4, S. 25). Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle als Regulatoren und Effektoren der Apoptose (vgl. GREENBERG, YOUNG, GATTERMANN, 2002). Im Knochenmark von Patienten mit MDS sind ultrastrukturelle Veränderungen – wie zum Beispiel eine pathologische Eisen-Akkumulation in Mitochondrien von Erythroblasten – aufgefallen (vgl. GATTERMANN, 2000). Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass eine Dysfunktion von Mitochondrien zur Pathophysiologie des MDS beitragen könnte (vgl. GREENBERG, YOUNG, GATTERMANN, 2002).

Apoptose kann durch spezifische Inhibitoren der Atmungskette des Mitochondriums induziert werden (WOLVETANG et al., 1994). Möglicherweise können auch Mutationen der mitochondrialen DNA in den Knochenmark-Stammzellen eine ähnliche Wirkung haben (vgl. GATTERMANN, 2002).

MDS-Untergruppen wie RA, RARS und RAEB I zeichnen sich dadurch aus, dass sie einen geringen medullären Blastenanteil (<10 %) und eine erhöhte Apoptoserate aufweisen (vgl. PARKER, 1998; BERGER, 2001). In fortgeschrittenen MDS-Stadien wie RAEB-T (nach FAB-Klassifikation, siehe Kap. 2.1.3) beträgt der medulläre Blastenanteil >20 %. Die Apoptoserate ist hier deutlich niedriger (vgl. PARKER, 1998; BERGER, 2001). Wahrscheinlich erleichtert die genomische Instabilität der kranken Zellen die Entstehung von chromosomalen Schäden, die zum Verlust der Apoptosefähigkeit führen (vgl. GREENBERG, YOUNG, GATTERMANN, 2002).

## 2.5 Fragestellungen

Im Rahmen der vorliegenden experimentellen Arbeit sollte versucht werden, folgende Fragen zu beantworten:

- Wie wirkt VPA auf das Apoptose- und Proliferationsverhalten von MDS KM-PZ, die im Flüssigmedium mit 100 µl/ml VPA behandelt wurden?
- Beeinflusst VPA die Apoptose- und Proliferationsrate von KM-PZ von RARS- und RAEB-Patienten unterschiedlich?
- Wie verhalten sich Apoptose und Proliferation gesunder KM-PZ in vitro mit und ohne Zusatz von VPA?
- Wie ist die Apoptose- und Proliferationsrate mit und ohne Zusatz von VPA bei gesunden Leukapheresat-KM-PZ, die unter Einfluss von G-CSF aus dem KM mobilisiert wurden?
- Wie reagieren leukämische-KM-PZ von Patienten mit AML auf VPA-Behandlung in vitro?

### 3 MATERIALIEN UND METHODEN

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien aufgelistet und erklärt. Im Methodenteil werden Versuchsabläufe erläutert.

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Reagenzien, Materialien und Geräte

1,5 ml Reaktionsröhrchen	Eppendorf (Hamburg)
2 ml Reaktionsröhrchen	Eppendorf (Hamburg)
50 ml Röhrchen	BD Falcon (Franklin Lakes, USA)
12-Loch Platten	MJ Research Inc., Waltham, MA, USA
96-Loch Platten	MJ Research Inc., Waltham, MA, USA
Brutschrank, 37°C, 5 % CO <sub>2</sub> mit 95 % rel. Luftfeuchtigkeit	HERAcell, 150, Heraeus, CT, USA
BSA, Bovines Serum-Albumin	Merck (Darmstadt)
CD34 FITC gekoppelter-AK (8G12)	Becton Dickinson, GmbH Heidelberg
CD34 Progenitor Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, CA, USA
Cell Death Detection ELISApus	Roche, Mannheim, D
CellTiter 96 <sup>®</sup> Aqueous One Solution	
Cell Proliferation Assay	Promega, Madison WI, USA
Coulter MD II Series Analyzer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
EDTA	Sigma-Aldrich, München, D
Eppendorf Master Cycler <sup>®</sup>	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
Eppendorf Zentrifuge	5417R Eppendorf, Wesseling-Berzdorf,
FACSCalibur, Durchflusszytometer mit Software CellQuest <sup>™</sup>	
FACS-Röhrchen, 5ml	BD, GmbH, Heidelberg
FBS, fetale bovine serum	SARSTEDT AG, Nümbrecht
Humanalbumin 20% (50ml)	Fötale Kälberserum, PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Human CD34 MicroBead Kit	ZLB Behring GmbH, Marburg
Human Interleukin-3 (IL3)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Human Interleukin-6 (IL6)	BioSource Deutschland GmbH, Solingen
Human Stem Cell Factor (SCF)	BioSource Deutschland GmbH, Solingen
L-Glutamin (200 mM)	BioSource Deutschland GmbH, Solingen
LS/MS Separation Columns	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Lymphoprep <sup>™</sup> (500 ml)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MACS Puffer	PROGEN Biotechnik, GmbH, Heidelberg
	PBS (Dulbeccos)
	+0,5% humanes Serumalbumin (Aventis Behring)
	+0.2 mM EDTA (Sigma-Aldrich)
MidiMACS Separation Unit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mikroskop	Zeiss, Göttingen, D
Maus-Ak	Maus IgG1/2a BD Biosciences
Natriumvalproat (Orfiril <sup>®</sup> )	100mg/ml Injektionslösung; Desitin Arzneimittel GMBH, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Abalm Medizinbedarf, Dilsberg, D.
PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)	Dulbeccos PBS, PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Penicillin und Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Photometer DU600	Photometer Wallac Victor 2, Perkin-Elmer, Milano, I.
RPML-1640 Medium	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
SCF (Recombinant Human stem Cell StemSpan <sup>™</sup> )	BioSource Deutschland GmbH, Solingen
Trypanblau	Serum-Free Expansion Medium (SFEM)
Vibrationsrüttler	Sigma-Aldrich, München, D.
Zentrifuge	Viktor Recker, Berlin, D.
	Heraeus, Newtown, USA

### 3.1.2 Medium

Das verwendete Flüssigmedium setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:  
StemSpan™ Serum-Free Expansion Medium (SFEM), Flüssigmedium, bestehend aus:

Bovines Serumalbumin

Rh Insulin (Recombinant Human Insulin)

Humanes Transferrin

2-Mercaptoethanol

L-Glutamine

Iscove's MDM

In 10 ml Flüssigmedium SFEM wurde hinzugefügt:

Penicillin/Streptomycin: 100 µl

IL-3: 10 µl "IL-3 improves the ex vivo expansion of umbilical cord blood (UCB) stem and progenitor cells without impairing their engraftment potential" (ROBMANITH, 2001).

IL-6: 5 µl "IL-6/sIL-6R, SCF, FL can synergize for enhancing the ex vivo expansion of human CB derived CD34 (+) cells" (FENG, 2004).

SCF: 25 µl "The combination of early acting cytokines like stem cell factor (SCF) and/or lineage specific growth factors such as IL-3, IL-6 and IL-11 allows a wider HSCs amplification" (DE FELICE, 2005).

Der Zusatz dieser Wachstumsfaktoren stimuliert gesundes KM als auch an MDS erkranktes KM, wie ASANO et al. entdeckten: „We demonstrated that MDS marrow hematopoietic progenitor cells reactive to GM-CSF or EPO were additionally stimulated with early-acting hematopoietic growth factors including IL-6, IL-3 and SCF in a fashion similar to those of normal individuals"(ASANO et al., 1994).

### 3.1.3 Valproinsäure im Flüssigmedium

Orfiril®; 100mg/ml Injektionslösung; Wirkstoff: Natriumvalproat; MM = 144,21 g/mol

Die PZ wurden im Doppelansatz im Flüssigmedium SFEM mit Zusatz von VPA (siehe Kap. 3.1.2) in vitro angesetzt. Der Kontrollansatz enthielt kein VPA, wohingegen der Ansatz mit VPA eine Konzentration haben sollte, die mit den in vivo erreichbaren Konzentrationen vergleichbar sein sollte (100 µg VPA/ml). Um eine Konzentration von 100 µg VPA/ml Medium zu erreichen, wurden 0,8 µl Natriumvalproat (100mg/ml Injektionslösung) pro ml Medium hinzugefügt.

Um für PZ optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen, sollte ein Milliliter Medium ca. 100.000 Zellen enthalten. Da ein Ansatz über vier Tage kultiviert wurde und genug Medium mit Nährstoffen enthalten musste, wurden in zwei ml Medium 200.000 – 300.000 CD34-positive Stammzellen angesetzt. Es wurden je Knochenmarksprobe zwei Ansätze mit 0,8 µl VPA pro ml Medium und zwei Ansätze ohne VPA angelegt. Während der Bebrütung der Zellen wurde bis zum Tag 4 weder frisches Medium noch erneut VPA hinzugegeben. Dass das Medium ausreichend Nährstoffe für die Zellen beinhaltete, war durch einen pH-Indikator (Farbumschlag bei Übersäuerung) gewährleistet.

### 3.1.4 Progenitorzellgewinnung

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete PZ wurden durch Knochenmarkpunktion (gesundes KM, MDS-KM, AML-KM) und Leukapherese (PBSC von gesunden Spendern) gewonnen.

#### 3.1.4.1 Knochenmarkpunktion

In dieser experimentellen Dissertationsarbeit wurden Progenitorzellen, die durch eine Knochenmarkpunktion gewonnen wurden, untersucht. Punktiert wurden gesunde Spender und an MDS oder AML erkrankte Patienten.

Zur Punktion werden folgende Materialien benötigt: Hautdesinfektionsmittel, Skalpell, 1%ige Scandicainlösung (Wirkstoff: Mepivacain, um Haut, Subkutangewebe, Stichkanal und Periost zu anästhesieren), Punktionsnadel, 20 ml-Spritze mit 2 ml Citrat für Ausstrichpräparate und CD34-positive Zellgewinnung, zwei 10 ml-Spritzen mit je 2500 IE Heparin für Zytogenetik und Immunphänotypisierung, 1 Petrischale und 10 Objektträger, um Knochenmarkausstriche anzufertigen.

### 3.1.4.2 Leukapherese

Für die Versuche wurden mit G-CSF mobilisierte periphere Blutstammzellen/Progenitorzellen (PBSC, siehe Kap. 2.3) eingesetzt, welche durch Leukapherese von gesunden Spendern gewonnen wurden.

Die Zellgewinnung erfolgte durch eine so genannte Leukapherese. Bei diesem Verfahren wird ein extrakorporaler Kreislauf geschlossen, bei dem zwischen 50 ml und 75 ml Blut des Spenders pro Minute durch einen Separator geleitet werden. Das Kernstück des Gerätes ist eine Zentrifugationskammer, in der Zellen mit hoher Dichte, zu denen Stammzellen zählen, eine innere Kreisbahn beschreiben, aus der sie abgelenkt und in einen Sammelbeutel geleitet werden. Alle übrigen Blutbestandteile fließen aus der Rotationskammer wieder über den rückläufigen Schenkel des Katheters in die Vene des Patienten zurück (vgl. HAAS und KRONENWETT, 2005).

Die Sammlung der PBSC kann entweder zur autologen oder zur allogenen Stammzelltransplantation dienen.

Hämatopoetische Stammzellen (HSC) kommen bei einem gesunden Menschen (ohne Stimulation durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren) mit einer Frequenz von 1: 20.000 Leukozyten im peripheren Blut vor. Für therapeutische Zwecke, wie eine allogene oder autologe Transplantation, lassen sich die HSC durch Gabe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie z.B. G-CSF aus dem KM ins Blut mobilisieren. Zur Gewinnung peripherer Blutstammzellen für eine allogene Transplantation wird gesunden Spendern täglich G-CSF subkutan in einer Dosis zwischen 300 µg und 480 µg über einen Zeitraum von vier bis fünf Tagen verabreicht (vgl. HAAS und KRONENWETT, 2005). Der Einsatz von G-CSF führt zu einer Steigerung der Anzahl zirkulierender multipotenter Progenitorzellen um den Faktor 10 (vgl. BERGER et al., 2002).

## 3.2 Methoden

### 3.2.1.1 Isolierung CD34 - positiver hämatopoetischer Progenitorzellen aus Knochenmark (KM) - Punktaten

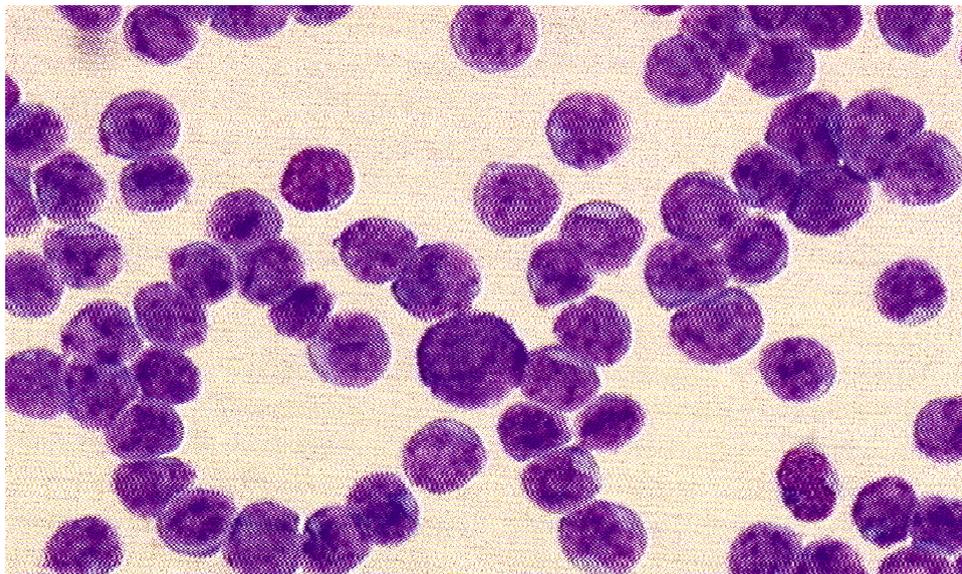
Um MNCs (mononuclear cells) aus der Knochenmarkprobe zu gewinnen, wurden 20 ml mit Heparin versetztes Knochenmark mit PBS (phosphat buffert serum) auf das zweifache Volumen verdünnt, in zwei falcon-tubes auf je 15 ml Lymphoprep aufgeschichtet und eine Dichtegradientenzentrifugation (35 Minuten bei 1600 rpm) durchgeführt: Lymphoprep ist ein Medium der Dichte 1,077 g/ml. Es hat eine geringere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten und eine größere als Lymphozyten und Monozyten. Durch Zentrifugation entsteht eine nicht immer deutlich zu erkennende Interphase zwischen Serum und Lymphoprep, die die MNCs (Lymphozyten und Monozyten) enthält. Diese weiße Schicht wurde vorsichtig mit einer Pipette entnommen und in ein neues falcon-tube überführt, welches anschließend mit PBS-Puffer aufgefüllt und bei 1500 rpm und Raumtemperatur 10 Minuten zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet noch einmal mit PBS resuspendiert und 10 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Pellet in 400 µl MACS-Puffer resuspendiert und die Zellzahl mit dem Coulter MD II Series Analyzer (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) berechnet.

Um hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen mit dem Differenzierungsantigen CD34 aus den MNCs herauszufiltern, wurde das CD34 Progenitor Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, CA, USA; No. 130-046-701) verwendet. Dessen Prinzip beruht auf der Bindung eines hapten-konjugierten, monoklonalen Antikörpers an CD34-positiven Zellen, an welchen wiederum ein mit MACS MicroBeads (Eisenpartikel) beladener Anti-Hapten-Antikörper bindet. Diese mit magnetischen Eisenpartikeln gekennzeichneten Zellen werden in MiniMACS-Trennsäulen, welche einem magnetischen Feld ausgesetzt sind, angereichert.

Um die CD34-positiven Zellen magnetisch zu markieren, wurden die zuvor angereicherten MNCs 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die mononukleären Zellen wurden pro  $10^8$  Zellen in 300 µl MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden pro  $10^8$  Zellen je 100 µl blocking solution und 100 µl Hapten-AK (monoklonale AK) hinzugefügt, gevortext und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Hiernach wurde das 10-fache Volumen MACS-Puffer hinzugegeben und 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 400 µl pro  $10^8$  Zellen resuspendiert und mit 100 µl Anti-Hapten MicroBeads (magnetisch konjugiertem CD34 AK) pro  $10^8$

Zellen vermengt. Folgend wurde erneut gevortext und 15 Minuten auf Eis inkubiert, das 10-fache Volumen MACS-Puffer hinzugefügt und 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet pro  $10^8$  Zellen in 500  $\mu$ l MACS Puffer resuspendiert.

Die MACS-Säulen wurden gespült, indem 500  $\mu$ l MACS-Puffer als Leerlauf auf die Säulen aufgetragen wurden. Anschließend wurde die Zellsuspension (die mit MicroBeads markierten CD34-positiven und nicht markierten CD34-negativen PZ) aufgetragen. Die CD34-negativen hämatopoetischen Vorläuferzellen, die nicht mit CD34-magnetischen AK markiert wurden, fließen durch die Säule durch – der Durchfluss enthält CD34-negative Zellen. Dreimal wurde mit MACS-Puffer gespült. Demnach wurde die Trennsäule dem magnetischen Feld entzogen, auf ein neues Auffanggefäß gesetzt und mit 1 ml MACS-Puffer gespült. Um eine höhere Reinheit der CD34-positiven Zellen zu erreichen, wurde der Säulendurchlauf ein zweites Mal wiederholt und anschließend die Konzentration CD34-positiver Zellen mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe Kap. 3.2.4).



**Abbildung 5:** Morphologie von CD34-positiven Zellen. Die Zellen wurden immunmagnetisch aus dem peripheren Blut angereichert. Quelle: HAAS/KRONENWETT, 2005.

### 3.2.1.2 Isolierung CD34 - positiver PZ aus einem Leukapheresat

Die PBSC wurden durch Leukapherese (siehe Kap. 3.1.4.2) gewonnen. Aus den PBSC wurden CD34-positive PZ isoliert. Die Gewinnung von CD34-positiven PZ aus PBSC erfolgte wie die in Kapitel 3.2.1 erläuterte Isolierung CD34-positiver PZ aus KM.

### 3.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (flow cytometry) ist eine computerunterstützte Technik zur Erfassung, Quantifizierung und Sortierung von Einzelzellen, Chromosomen oder anderen zellulären Strukturen anhand verschiedener physikalischer und fluoreszenzassoziierter Parameter. Es werden je nach Fragestellung ganze Zellen oder Zellbestandteile mittels fluoreszierender Farbstoffe oder immunhistochemischer Methoden markiert und in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl an einem gebündelten Laserstrahl vorbeigeführt. Aufgrund der Farbe und der Intensität des reflektierten Lichts oder anhand physikalischer Parameter wie Größe und Struktur werden die Zellen oder Zellbestandteile registriert, ausgezählt und sortiert (vgl. BÖCKER et al., 2004).

Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) der Zellen gewonnen (vgl. FACS-lab Uni Mainz, 2006).

Jede Zellart streut entsprechend ihrer Größe, der Struktur ihrer Zellmembran und der Art ihrer intrazellulären Bestandteile das auftreffende Licht in spezifischer Weise. Der größte Anteil des Lichtes wird vorwärts gestreut, wobei das Vorwärtsstreulicht (forward light scatter, FSC) nach Ausblendung des ungebrochenen Zentralstrahles ein Maß für die Größe der Zelle darstellt.

Ein weiterer Teil des Lichtes wird im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreut und als Seitwärtsstreulicht (sideward light scatter, SSC) bezeichnet. Das Maß der Seitwärtsstreuung ist von der Granularität der Zelle abhängig (vgl. LINDENAU, 1996).

Um CD34-positive Zellen zu erkennen, wurde im Rahmen dieser Arbeit Fluoresceinisothiocyanat [FITC]-gekoppelte „mouse anti-human CD34“ Antikörper verwendet. Als

Isotyp-Kontrollen wurden Fluoresceinisothiocyanat [FITC]-gekoppelter mouse Immunoglobulin-G AK verwendet (vgl. DE FELICE, 2005). Die Antikörper wurden mit einer Konzentration von 10 µl auf  $1 \times 10^5$  Zellen in 50 µl PBS eingesetzt. Die FACS-Analyse wurde angewendet, um die Reinheit der Zellpopulation zu bestimmen, mit der die in den nachfolgenden Abschnitten beschriebenen Versuche durchgeführt wurden (siehe Kap. 3.2.3 - 3.2.6).

### 3.2.3 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die CD34-positiven Zellen wurden im Flüssigmedium (siehe Kap. 3.1.2) im Brutschrank (HERAcell 150, Heraeus, Newtown, CT, USA) bei einer Temperatur von 37°C, einem CO<sub>2</sub>-Anteil von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Der Gasaustausch war durch das Verwenden von Petrischalen mit gaspermeablen Verschlüssen gegeben.

### 3.2.4 Bestimmung vitaler und toter Zellen mittels Zytometrie

Die Neubauer-Zählkammer (Abalm Medizinbedarf, Dilsberg, D.) diente zur Bestimmung der Anzahl vitaler und toter Zellen. Trypanblau (0,5 % in physiologischer Kochsalzlösung, Sigma-Aldrich, München, D.) wurde als Farbstofflösung verwendet, um die Zellviabilität zu beurteilen. Während geschädigte Zellen die Fähigkeit der Exklusion von Trypanblau verloren haben, so dass der blaue Farbstoff in die Zelle eindringen kann, erscheinen vitale Zellen unter dem Mikroskop ungefärbt.

Die zu zählende Zellsuspension wurde in einem Verdünnungsverhältnis 1:4 bis 1:10 (je nach Zellkonzentration) in Trypanblau aufgenommen, mehrmalig resuspendiert, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Suspension zu erreichen, und in die Zählkammer pipettiert. Vitale und tote Zellen wurden in den vier Quadranten, welche wiederum sechzehn Kammerquadranten enthalten, bei einhundert- bis einhundertsechzigfacher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Zeiss, Göttingen, D) gezählt. Der Mittelwert der Zählung wurde errechnet und mit dem Verdünnungsfaktor und Kammerfaktor multipliziert.

Neubauer Zählkammer; Formel:  $V/4 \times 5 \times 10^4 = \text{Anzahl vitaler Zellen} / \text{ml}$

(V = Anzahl vitaler Zellen; 4 = Anzahl der sechzehner Quadranten, 5 = Verdünnungsfaktor;  $10^4$  = Kammerfaktor)

Mit der Neubauer-Zählkammer wurde am Untersuchungstag 0, 1 und 4 die Anzahl vitaler und toter Zellen bestimmt. Die Daten wurden im Vergleich zur gemessenen Apoptoserate und Proliferationsrate erhoben.

### 3.2.5 Bestimmung der Apoptoserate

Um die Apoptoserate der Zellen zu messen, wurde das Cell Death Detection ELISA<sup>plus</sup>-Kit (Roche, Mannheim, D.) eingesetzt. Der Assay basiert auf dem Prinzip eines quantitativen Sandwich-Enzym-Immuno-Assays mit monoklonalen Antikörpern gegen DNA-Fragmente und Kern-Histone.

Nachdem die Zellen 24 Stunden bzw. 96 Stunden mit und ohne VPA im Medium inkubiert waren, wurden aus jedem Ansatz  $10^4$  Zellen für den Assay eingesetzt. Zur Untersuchung der Apoptose wurden die Zellen pelletiert (Zentrifugation mit 200 xg für 10 Minuten), der Überstand wurde verworfen, und anschließend wurden 200 µl Lyse-Puffer (im Kit enthalten, „Lysis buffer“) zu dem Pellet hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zelllyse wurden 20 µl des Überstandes pipettiert und auf eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Hinzu wurden 80 µl des Immunoreagenz (Anti-Histon-Biotin und Anti-DNA-POD Antikörper im 1:1 Verhältnis) gegeben und darauf folgend für zwei Stunden auf einem Rüttler (300 rpm) bei Zimmertemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Lösung entfernt und die Mikrotiterplatte dreimal mit Inkubationspuffer (im Kit enthalten, „Incubation buffer“) gewaschen. Danach wurden 100 µl des ATBS-Substrates (im Kit enthalten) in jedes Well der Mikrotiterplatte pipettiert und der Ansatz für 15 Minuten auf einem Rüttler (300 rpm) bei Raumtemperatur inkubiert. Das ATBS wird von den gebundenen Antikörpern, deren Menge von der Anzahl apoptotischer Zellen abhängt, in einer Farbreaktion umgesetzt, die bei 405 nm in einem Photometer gemessen und quantifiziert werden kann. Als Positivkontrolle diente der im Kit enthaltene DNA-Histon-Komplex, als Negativkontrolle der Lyse-Puffer.

Die Apoptoserate wurde am Untersuchungstag 1 und 4 bestimmt.

### 3.2.6 Bestimmung der Zellproliferation

Es wurde das CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Cell Proliferation Assay Kit (Promega, Madison, WI, USA) angewendet. Der Assay beinhaltet ein Tetrazolium-haltiges Substratgemisch [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sufophenyl)- 2H-tetrazolium, MTS) und phenazine ethosulfate, PES], welches von proliferierenden, viablen Zellen zu einem farbigen Formazan-Produkt reduziert wird. Die Umwandlung wird durch NADH/NADPH-abhängige Dehydrogenase-Enzyme aktiver Zellen katalysiert (vgl. BERRIDGE und TAN, 1993). Der Farbumschlag kann anschließend bei 490 nm Wellenlänge quantifiziert werden. Die Menge des entstandenen Formazan-Produktes ist direkt proportional zur Anzahl proliferierender, viabler Zellen.

Zur Durchführung dieses Experimentes wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension auf Mikrotiterplatten verteilt. 20 µl der MTS-Lösung wurden hinzugegeben, und anschließend wurde das Gemisch bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit für vier Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Intensität des Farbumschlages im Photometer (Photometer Wallac Victor 2, Perkin-Elmer, Milano, I.) gemessen.

Die Zellproliferation wurde am Untersuchungstag 1 und 4 bestimmt.

### 3.2.7 Statistik

Die Auswertung der Daten wurde mit dem Statistik-Programm SPSS (Statistical Package for Social Science, Version 15.0, deutsch, HHU-Düsseldorf) durchgeführt. Nichtparametrische Tests kamen für die Analyse der Ergebnisse nicht in Frage, da die Zahl der untersuchten Proben hierfür zu klein war.

#### 3.2.7.1 Normalverteilung

Nach Logarithmierung wurde graphisch geprüft, ob die Daten annähernd normalverteilt sind. Die Originalwerte wurden in den natürlichen dekadischen Logarithmus transformiert. Da keine gravierenden Abweichungen von der Normalverteilung bestanden, wurde in den folgenden Berechnungen mit Mittelwerten (MW der Doppelansätze a und b; MW der Doppelansätze c und d) gearbeitet.

#### 3.2.7.2 Apoptose- und Proliferationsrate

Analysiert wurde der relative Anstieg der Apoptose- und Proliferationsrate bei den einzelnen Diagnosegruppen (MDS, Leukapheresat, gesundes KM, AML) unter Zusatz von

VPA:

$LgDiffA = (lgAcd - lgAab) / 2 =$  relativer logarithmischer Anstieg der Apoptose mit VPA;  
cd = Ansätze mit VPA; ab= Ansätze ohne VPA; A = Apoptoserate; Lg = natürlicher dekadischer Logarithmus

$LgDiffP = (lgPcd - lgPab) / 2 =$  relativer logarithmischer Anstieg der Proliferation mit VPA

Zur übersichtlicheren Darstellung der Werte wurden die Daten delogarithmiert, um anschließend mit der explorativen Datenanalyse ausgewertet zu werden.

### 3.2.7.3 Signifkanz

Angewendet wurde die univariate Varianzanalyse ANOVA (ANalysis Of VAriance). Hierbei untersucht man den Einfluss einer unabhängigen Variablen (in diesem Fall VPA) mit k verschiedenen Ausprägungen auf eine abhängige Variable (in diesem Fall Apoptose- und Proliferationsrate), welche die Messwerte enthält.

Es wurden zwei Tests durchgeführt:

Es wurde getestet, ob generell bei allen Proben ein signifikanter Unterschied bezüglich der Apoptose- und Proliferationsrate mit und ohne VPA besteht (VPA gemittelt über die Diagnosegruppen). Des Weiteren wurde untersucht, ob innerhalb einer Diagnosegruppe ein signifikanter Unterschied besteht (mit VPA vs. ohne VPA bezogen auf die Apoptose- und Proliferationsrate).

Zusätzlich wurde mit der Meßwiederholung (Allgemeines Lineares Modell) untersucht, ob zwischen Tag 1 und Tag 4 bezüglich der Apoptose und der Proliferation ein signifikanter Unterschied besteht.

## **4 ERGEBNISSE**

In diesem Kapitel werden die Daten der Apoptose- und Proliferationsrate von CD34-positiven Progenitorzellen unter Wirkung von VPA im Vergleich zur Apoptose- und Proliferationsrate der CD34-positiven Progenitorzellen ohne Zusatz von VPA analysiert. Die PZ wurden von Patienten mit MDS, von gesunden Spendern (Leukapheresat und gesundes KM) und von Patienten mit AML gewonnen.

### **4.1 Normalverteilung**

Nachfolgend werden die in den natürlichen dekadischen Logarithmus transformierten Daten auf Normalverteilung analysiert. Die Daten wurden logarithmiert, da sie somit näher an der Normalverteilung, entlang einer Geraden, liegen. Es wurden die Diagnosegruppen MDS, Leukapheresat, gesundes KM und AML bezüglich der Apoptose und Proliferation auf Normalverteilung geprüft.

Dargestellt wurden die Daten in einem Q-Q-Plot, bei dem die erwartete Quantile gegen die beobachtete Quantile aufgetragen wird. Bei einer Normalverteilung liegen die Punkte annähernd auf einer Geraden.

## 4.1.1 Normalverteilung der Apoptoserate

Q-Q-Diagramme Normalverteilung Tag 1; N = 19 (9 MDS, 3 Apheresate, 5 gesundes KM, 2 AML)

Q-Q-Diagramm Normalverteilung Apoptose Tag 1 ohne VPA

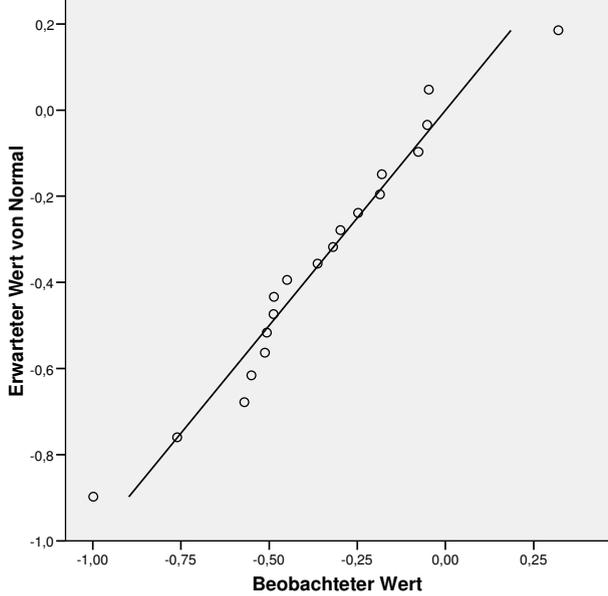


Abb. 6

Q-Q-Diagramm Normalverteilung Apoptose Tag 1 mit VPA

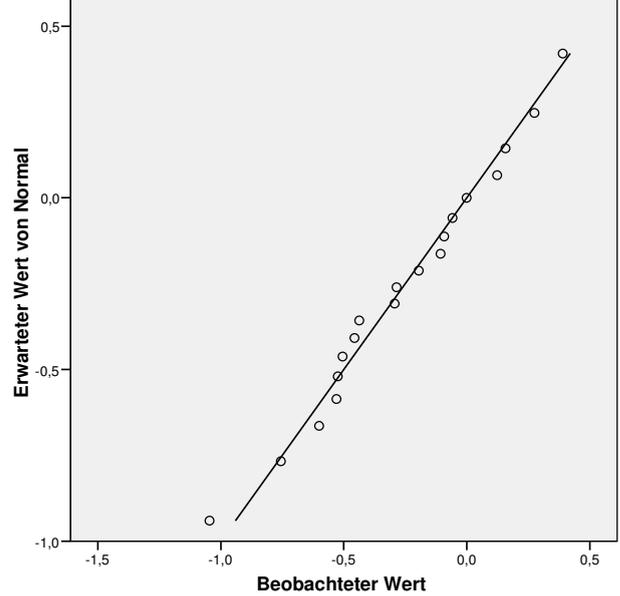


Abb. 7

Q-Q-Diagramme Normalverteilung Tag 4; N = 18 (9 MDS, 3 Apheresate, 4 gesundes KM, 2 AML)

Q-Q-Diagramm Normalverteilung Apoptose Tag 4 ohne VPA

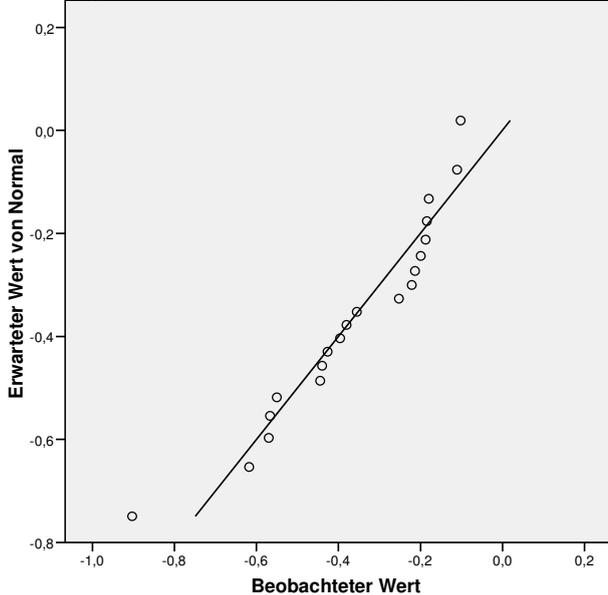


Abb. 8

Q-Q-Diagramm von Normalverteilung Apoptose Tag 4 mit VPA

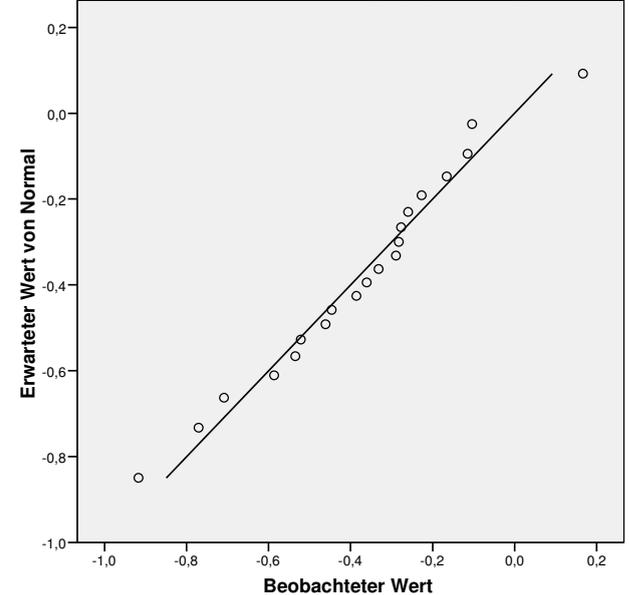


Abb. 9

Erklärung der Abbildungen: Die Normalverteilung zeigt eine gute Anpassung an die Gerade.

## 4.1.2 Normalverteilung der Proliferationsrate

Q-Q-Diagramme Normalverteilung Tag 1; N = 18 (9 MDS, 3 Apheresate, 4 gesundes KM, 1 AML)

Q-Q-Diagramm Normalverteilung Proliferation Tag 1 ohne VPA

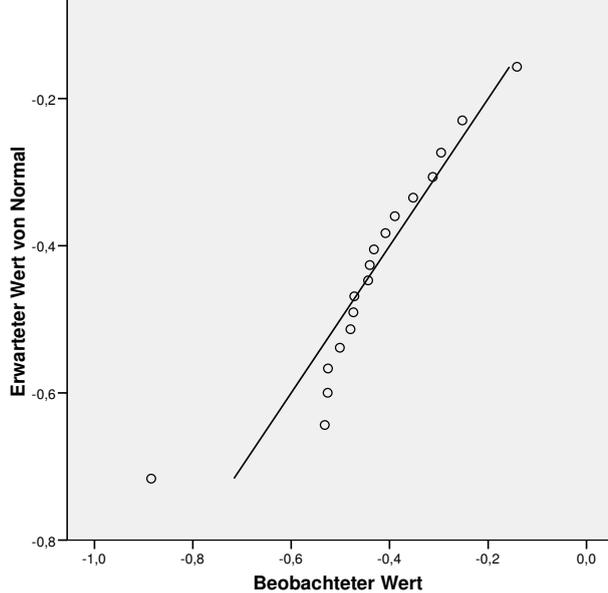


Abb. 10

Q-Q-Diagramm Normalverteilung Proliferation Tag 1 mit VPA

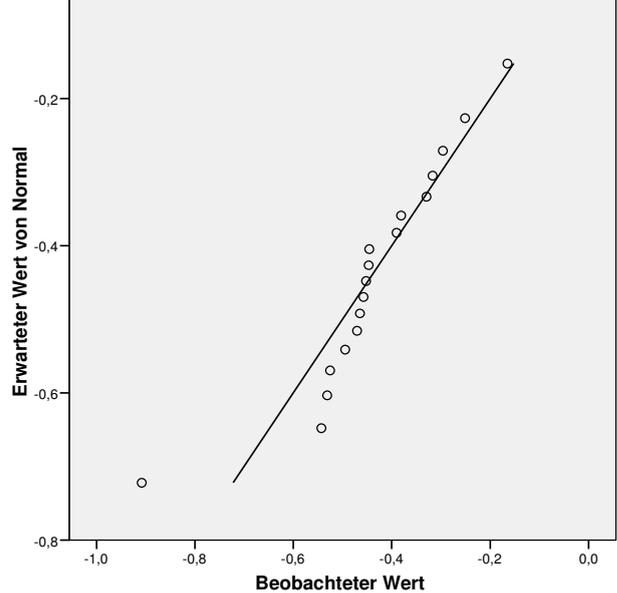


Abb. 11

Q-Q-Diagramme Normalverteilung Tag 4; N = 20 (9 MDS, 3 Apheresate, 4 gesundes KM, 3 AML)

Q-Q-Diagramm Normalverteilung Proliferation Tag 4 ohne VPA

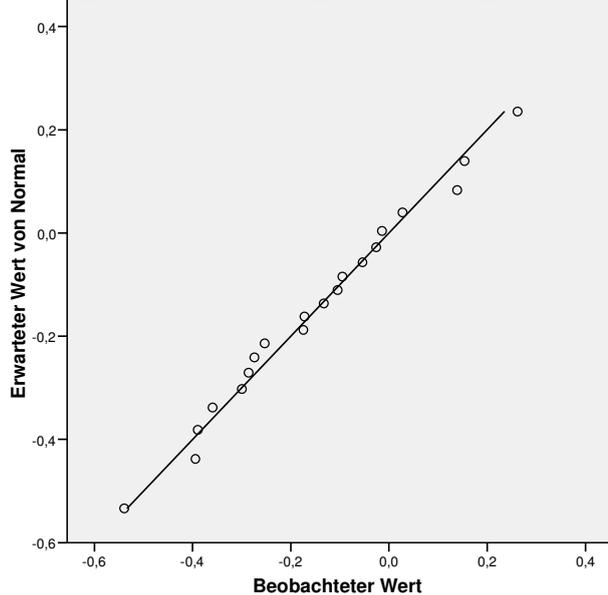


Abb. 12

Q-Q-Diagramm Normalverteilung Proliferation Tag 4 mit VPA

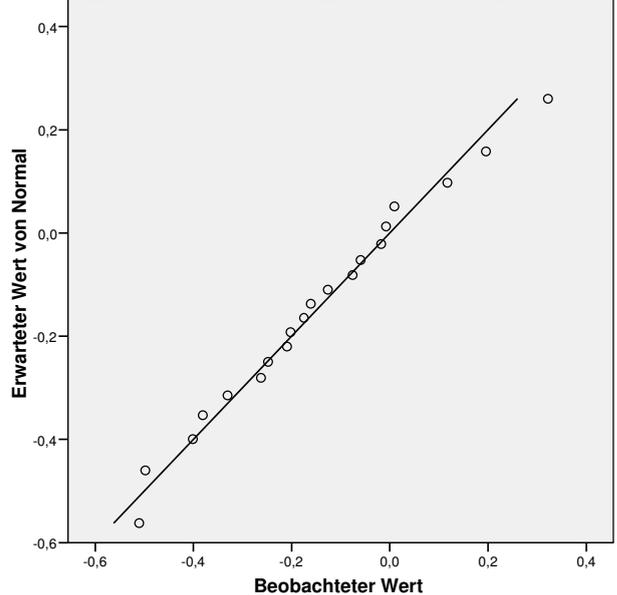


Abb. 13

Erklärung der Abbildungen: Die Normalverteilung zeigt eine gute Anpassung an die Gerade.

## 4.2 Apoptose

Nachfolgend sind alle untersuchten Diagnosekategorien (MDS, Leukapheresat, gesundes KM, AML) in Bezug auf Apoptose und Proliferation mit der Variablen VPA aufgeführt. Dargestellt wird die relative Änderung der Apoptoserate zwischen den Ansätzen mit VPA und ohne VPA an den Tagen 1 und 4. Zur nicht linearen Aufführung der Daten wurden die Werte delogarithmiert.

Prozentuale Darstellung des Anstieges der Apoptoserate durch VPA

$$= (\text{Mittelwert (MW) der Apoptose mit VPA} - \text{MW der Apoptose ohne VPA}) / 2$$

Erklärung: Ist MW > 1, Apoptosezunahme durch VPA

Ist MW = 1, ist die Apoptoserate mit und ohne VPA gleich groß

Ist MW < 1, Apoptoseabnahme durch VPA

### Verarbeitete Fälle

	Fälle					
	Eingeschlossen		*Ausgeschlossen		Insgesamt	
	N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
Apoptose Tag 1	19	82,6%	4	17,4%	23	100,0%
Apoptose Tag 4	20	87,0%	3	13,0%	23	100,0%

\*Ausgeschlossen wurden Ansätze mit zu geringer Zellzahl (< 100 000 Zellen / ml Medium)

### Vergleich der Mittelwerte der Apoptosezunahme an Tag 1 und Tag 4:

Diagnosegruppen		Apoptosezunahme durch VPA	
		am Tag 1	am Tag 4
MDS	Mittelwert	1,0463	1,0371
	N	9	9
	Standardabweichung	,09771	,19982
Leukapheresat	Mittelwert	1,1381	,8453
	N	3	4
	Standardabweichung	,05338	,12604
gesundes KM	Mittelwert	1,2973	1,0777
	N	5	4
	Standardabweichung	,39483	,16506
AML	Mittelwert	1,1156	,9770
	N	2	3
	Standardabweichung	,21141	,04607
Insgesamt	Mittelwert	1,1342	,9978
	N	19	20
	Standardabweichung	,23016	,17574

Erklärung: Bei allen Diagnosegruppen ist am Tag 1 durch VPA eine Zunahme der Apoptoserate zu verzeichnen (da  $MW > 1$ ). Am Tag 4 nimmt die Apoptose im Vergleich zu Tag 1 ab. Bei MDS und gesundem KM ist am Tag 4 durch Zusatz von VPA mehr Apoptose als im Kontrollansatz ohne VPA zu beobachten (da  $MW > 1$ ). Bei Leukapheresat- und AML-PZ ist eine Abnahme der Apoptose durch VPA zu verzeichnen ( $MW < 1$ ).

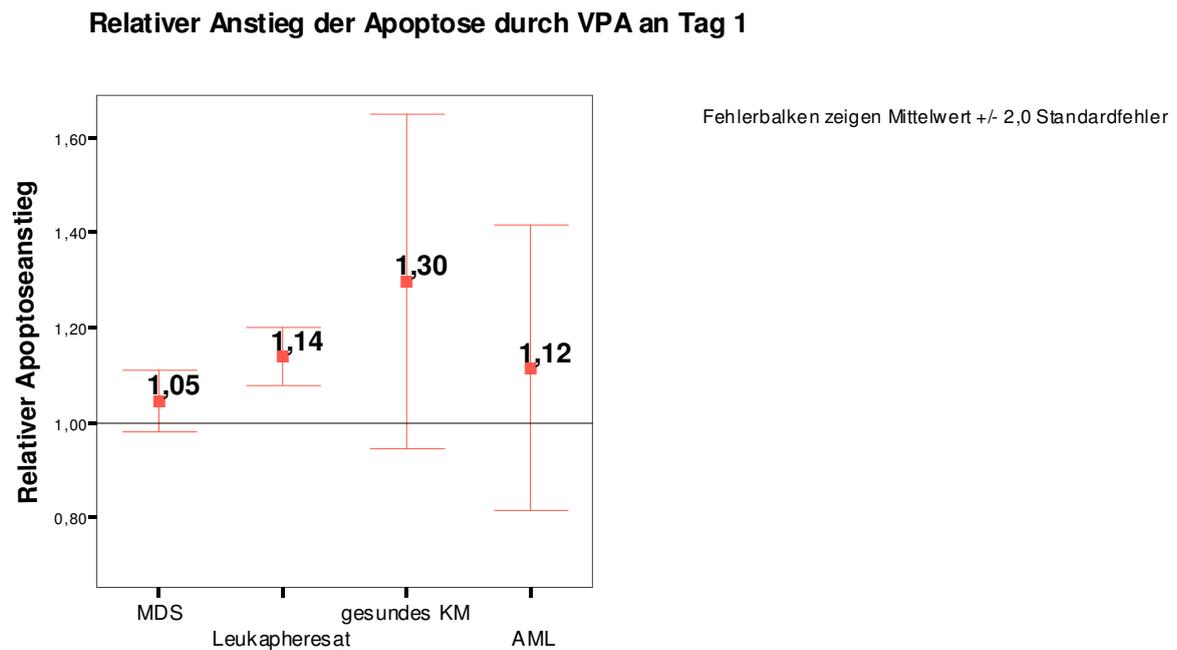


Abb. 14

Erklärung der Abbildung: Mit VPA ist am Tag 1 die Apoptoserate bei allen Diagnosegruppen größer als ohne Zusatz von VPA (da  $MW > 1$ ). Im Vergleich zu den Ansätzen ohne VPA nimmt die Apoptoserate durch VPA bei MDS um 5 %, bei Leukapheresat um 14 %, bei gesundem KM um 30 % und bei AML um 12 % zu.

### Relativer Anstieg der Apoptose durch VPA an Tag 4

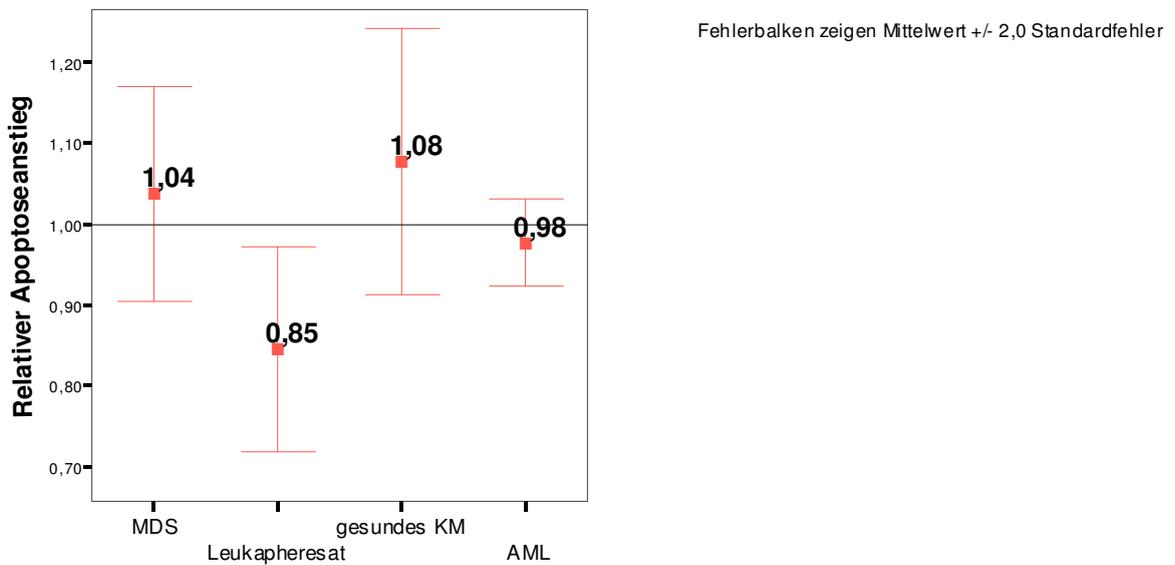


Abb. 15

Erklärung der Abbildung: Im Vergleich zu Tag 1 ist an Tag 4 bei allen Diagnosegruppen die Apoptoserate gesunken. Jedoch ist die Apoptoserate bei MDS (+4 %) und gesundem KM (+8 %) mit VPA höher als ohne Zusatz von VPA. Bei Leukapheresat-PZ (-15 %) und AML-PZ (-2 %) nimmt die Apoptose durch Zusatz von VPA ab. Die einzelnen Diagnosegruppen werden in den Kapiteln 4.4 bis 4.8 detailliert besprochen.

### 4.3 Proliferation

Darstellung des relativen Anstieges der Proliferationsrate durch VPA bei den Diagnosegruppen MDS, Leukapheresat, gesundes KM und AML an Tag 1 und Tag 4.

Verarbeitete Fälle

	Fälle					
	Eingeschlossen		*Ausgeschlossen		Insgesamt	
	N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
Proliferation Tag 1	18	78,3%	5	21,7%	23	100,0%
Proliferation Tag 4	20	87,0%	3	13,0%	23	100,0%

\*Ausgeschlossen wurden Ansätze mit zu geringer Zellzahl (< 100 000 Zellen / ml Medium)

Vergleich der Mittelwerte der Proliferationszunahme an Tag 1 und Tag 4:

Diagnosegruppen		Proliferationszunahme durch VPA	
		am Tag 1	am Tag 4
MDS	Mittelwert	1,0034	,9904
	N	9	9
	Standardabweichung	,01869	,10153
Leukapheresat	Mittelwert	,9920	1,0405
	N	3	4
	Standardabweichung	,00444	,01715
gesundes KM	Mittelwert	,9971	,9411
	N	5	4
	Standardabweichung	,02007	,05104
AML	Mittelwert	,9991	1,0609
	N	1	3
	Standardabweichung	.	,02373
Insgesamt	Mittelwert	,9995	1,0012
	N	18	20
	Standardabweichung	,01677	,08099

Erklärung: Bei Leukapheresat- und AML-PZ proliferieren am Tag 1 die Ansätze ohne und mit VPA etwa gleich gut (MW  $\approx$  1). Am Tag 4 nimmt die Proliferationsrate bei Leukapheresat- (+4 %) und AML-PZ (+6 %) durch VPA zu, wohingegen bei MDS (-1 %) und gesundem KM (-6 %) eine Abnahme der Proliferationsrate durch VPA zu sehen ist (MW < 1).

### Relativer Anstieg der Proliferation durch VPA an Tag 1

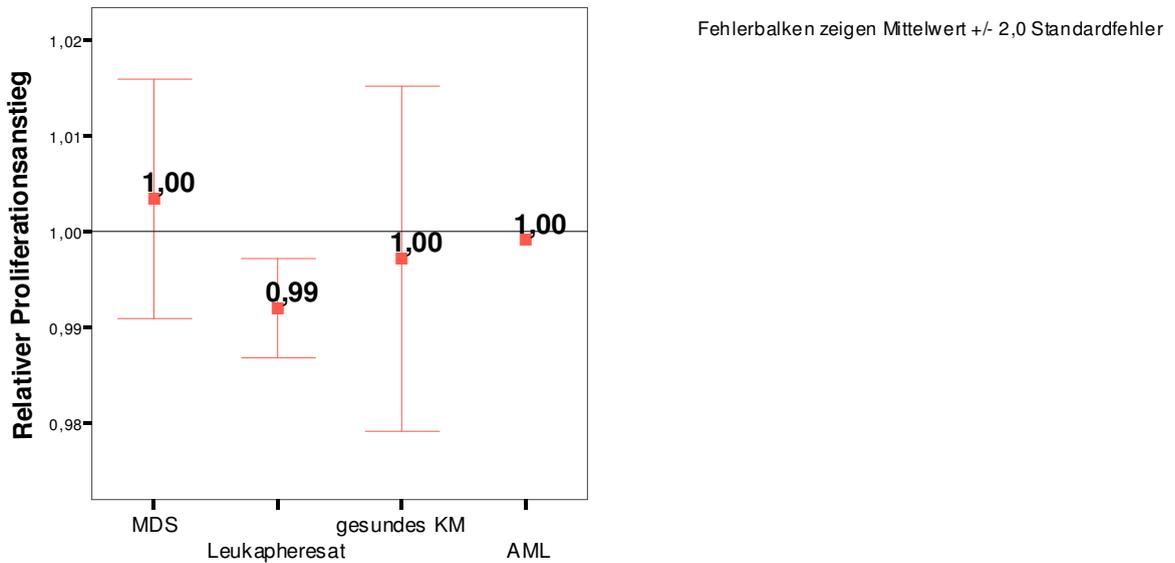


Abb. 16

Erklärung der Abbildung: Dargestellt ist der relative Anstieg der Proliferationsrate durch VPA. Am Tag 1 befinden sich bei allen Diagnosegruppen die Mittelwerte um den Wert 1, was bedeutet, dass noch kein Unterschied in der Proliferation zwischen den Ansätzen mit und ohne VPA besteht.

### Relativer Anstieg der Proliferationsrate durch an Tag 4

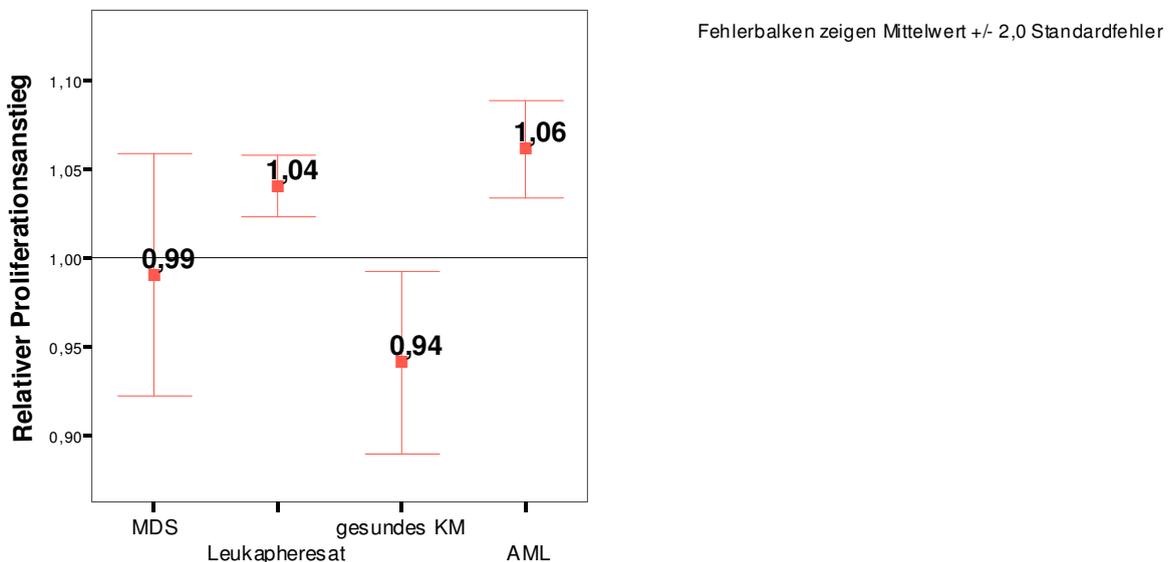


Abb. 17

Erklärung der Abbildung: Im Vergleich zum Tag 1 nehmen bei MDS-PZ (-1 %) sowie bei gesundem KM (-6 %) die Proliferationsraten unter Zusatz von VPA ab; Leukapheresat (+4 %) und AML-PZ (+6 %) weisen an Tag 4 im Vergleich zu Tag 1 eine Zunahme der Proliferationsraten auf.

## 4.4 Signifikanz der Apoptose und Proliferation

In diesem Kapitel wird erläutert, ob zwischen den Kulturansätzen 'mit VPA' und 'ohne VPA' signifikante Unterschiede bezüglich der Apoptose und Proliferation bestehen und ob ein signifikanter Unterschied bezüglich des Zeitfaktors (Tag 1 versus Tag 4) in der Apoptose- und Proliferationsrate vorliegt.

### 4.4.1 Variable = VPA, Konstanter Faktor = Apoptose und Proliferation

Mit der univariaten Varianzanalyse ANOVA wurde untersucht, ob der Zusatz von VPA bezogen auf die Apoptose- und Proliferationsrate der CD34-positiven Stamm- und Progenitorzellen einen signifikanten Unterschied in den Kulturansätzen an Tag 1 (Z.n. 24 Stunden Kultivierung der CD34-positiven Zellen) und Tag 4 (Z.n. 96 Stunden Kultivierung der CD34-positiven Zellen) hervorruft.

Apoptoserate Tag 1 (über alle Diagnosegruppen gemittelt):	p = 0,012
Apoptoserate Tag 4:	p = 0,467
Proliferationsrate Tag 1	p = 0,706
Proliferationsrate Tag 4	p = 0,770

Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Apoptoseraten an Tag 1 ( $p=0,012$ ) bezüglich VPA.

Die anderen untersuchten Kriterien weisen keine Signifikanz auf ( $p > 0,05$ ).

### 4.4.2 Variable = Tag, Konstanter Faktor = Apoptose und Proliferation

Weiter wurde – wie im Kapitel 3.2.7.3 erläutert – untersucht, ob generell bezüglich der Apoptose- und Proliferationsrate an Tag 1 im Vergleich zu Tag 4 (Zeitfaktor) ein signifikanter Unterschied besteht.

Apoptoserate	Tag 1 vs. Tag 4:	p = 0,009
Proliferationsrate	Tag 1 vs. Tag 4:	p = 0,770

Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Apoptoserate an Tag 1 und Tag 4, was bedeutet, dass VPA bezogen auf die Zeit eine bewiesene Wirkung hervorruft.

Bezüglich der Proliferationsrate ist zwischen Tag 1 und Tag 4 kein signifikanter Unterschied fest zu stellen.

Ob signifikante Unterschiede innerhalb der einzelnen Diagnosegruppen bestehen, wird in den Kapiteln 4.5 bis 4.9 besprochen.

## 4.5 MDS

Es wurden CD34-positive Stammzellen von 10 MDS Patienten (5 RCMD, 1 RSCMD, 2 RAEB I, 2 RAEB II; Klassifikation siehe Kap. 2.2.3) vor Therapiebeginn untersucht. Die MDS Patienten wurden im Folgenden zu 6 Niedrig-Risiko (5 RCMD, 1 RSCMD) und 3 Hoch-Risiko Patienten (2 RAEB I, 1 RAEB II) zusammengefasst. Ein Patient entfiel aufgrund zu geringer Zellanreicherung. Die CD34-positiven Progenitorzellen wurden mittels Knochenmarkpunktion gewonnen (siehe Kap. 3.1.4.1). An Tag 0 erfolgten die Aufarbeitung des KM (siehe Kap. 3.2.1) und die FACS-Analyse (siehe Kap. 3.2.2), am Tag 1 und Tag 4 wurden die Apoptose- (siehe Kap. 3.2.5) und Proliferationsraten (siehe Kap. 3.2.6) bestimmt. Die CD34-positiven Progenitorzellen wurden im Medium mit VPA (100 µg/ml Medium) und ohne VPA im Doppelansatz über 4 Tage kultiviert.

### 4.5.1 FACS MDS

Explorative Datenanalyse: Darstellung der Reinheit der Zellpopulation (CD34-positive Progenitorzellen von MDS Patienten) mittels FACS-Analyse.

Die FACS-Analyse (siehe Kap. 3.2.2) wurde angewendet, um die Reinheit der Zellpopulation zu bestimmen, nachdem die KM-Probe mit dem CD34 Progenitor Cell Isolation Kit (siehe Kap. 3.2.1) aufgereinigt wurde.

**Univariate Statistiken**

		FACS Reinheit CD 34+	FACS Kontrolle Mouse IgG 1
Statistik	Verarbeitete Fälle N =	5	5
	Mittelwert	98,8980	99,0960
	95 % Konfidenzintervall des Mittelwerts		
	Untergrenze	97,0904	97,7058
	Obergrenze	100,7056	100,4862
	Median	99,5500	99,3700
	Standardabweichung	1,45581	1,11966
	Minimum	96,39	97,24
	Maximum	99,89	99,97

Erklärung: Die gewonnene Zellpopulation weist eine Reinheit von 98,8980 im Mittelwert auf. Die Zellen tragen zu 98,9 % das Oberflächenantigen CD34. Die Kontroll-Gruppe (Mouse IgG 1) erfasst zu 99 % die richtig negativen Zellen.

*Fazit:* Es wird bestätigt, dass nahezu ausschließlich CD34-positive Zellen kultiviert wurden.

## 4.5.2 Apoptose- und Proliferationsrate bei MDS-PZ

Explorative Datenanalyse: Analysiert wird der relative Anstieg der Apoptose- und Proliferationsrate bei MDS-PZ unter Zusatz von VPA.

### Deskriptive Statistik

		MDS				
		Apoptose Tag 1	Apoptose Tag 4	Proliferation Tag 1	Proliferation Tag 4	
	Verarbeitete Fälle	9	9	9	9	
Statistik	Mittelwert	1,0463	1,0371	1,0034	,9904	
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	,9712	,8835	,9891	,9124
		Obergrenze	1,1215	1,1907	1,0178	1,0685
	Median	1,0054	,9839	1,0015	1,0057	
	Standardabweichung	,09771	,19982	,01869	,10153	
	Minimum	,95	,88	,97	,82	
	Maximum	1,22	1,50	1,03	1,18	

### Relativer Anstieg der Apoptose und Proliferation mit VPA bei MDS

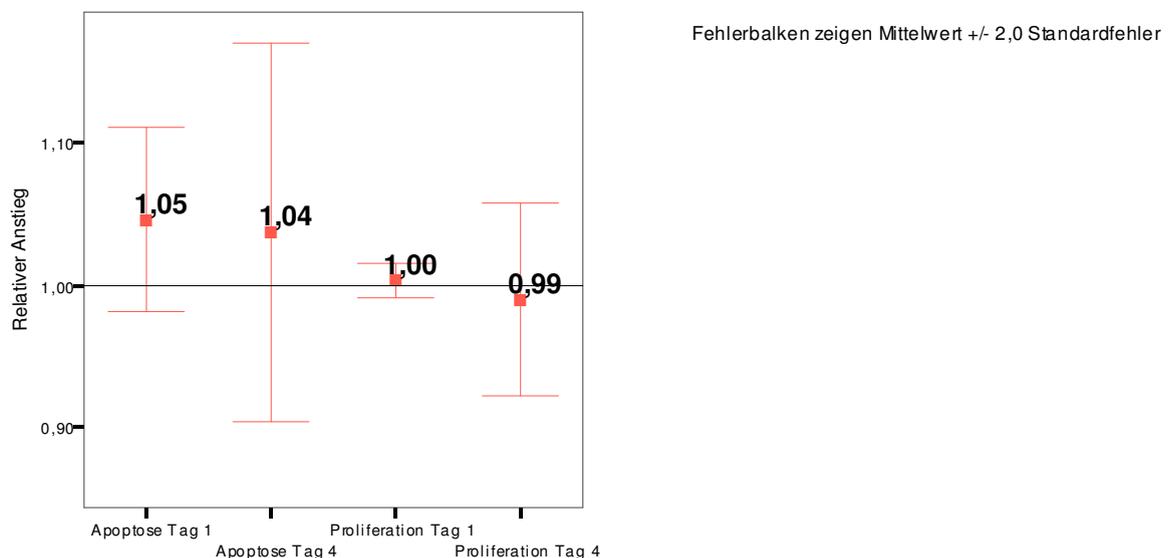


Abb. 18

Erklärung der Abbildung: Darstellung der Mittelwerte des relativen Anstieges der Apoptose und Proliferation bei MDS-PZ durch VPA am Tag 1 und Tag 4. Am Untersuchungstag 1 ist die Apoptose mit VPA um 5 % größer als im Ansatz ohne VPA. Die Proliferation ist mit und ohne VPA in etwa gleich groß (MW ≈ 1). Am Tag 4 ist die Apoptoserate mit VPA immer noch um 4 % größer als ohne VPA, die Proliferationsrate

nimmt um 1 % im Vergleich zum Ansatz ohne VPA ab. Das bedeutet, dass VPA die Apoptose bei MDS-PZ fördert und die Proliferation hemmt. Die Überprüfung der Signifikanz zeigt dass an Tag 1 ( $p = 0,049$ ) durch VPA die Apoptoserate signifikant zunimmt. Die Apoptose an Tag 4 ( $p = 0,123$ ) und die Proliferationsrate an Tag 1 ( $p = 0,542$ ) und an Tag 4 ( $p = 0,209$ ) zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Ansätzen 'mit VPA' und 'ohne VPA' (Variable = VPA, siehe Kap. 4.4.1).

*Fazit:* VPA in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  Medium wirkt bei MDS-PZ nicht ausreichend apoptoseinduzierend / proliferationshemmend, um ein durchgehend signifikantes Ergebnis erzielen zu können.

### 4.5.3 Vergleich Hoch-Risiko MDS mit Niedrig-Risiko MDS

In dieser Arbeit wurden die Subtypen RARS (zu Gruppe der Niedrig-Risiko MDS gehörend, kurz NR-MDS) und RAEB (zur Gruppe der Hoch-Risiko MDS gehörend, kurz HR-MDS) untersucht. Da bei NR-MDS Zeichen der Dyserythropoese in Knochenmark und Blut nachweisbar und der medulläre und periphere Blastenanteil normal sind, wäre eine Hemmung der Apoptose durch VPA wünschenswert. Bei HR-MDS steigt der Blastenanteil bis 20 % im Knochenmark und bis 5 % im Blut. Durch eine verstärkte Apoptoserate könnte der Blastenanteil mit VPA gesenkt werden. „A large body of evidence has shown that apoptosis is excessive in early stages of MDS and declines in advanced stages or in leukemic transformation of MDS” (YOSHIDA, 2002). Die Proliferationsrate sollte möglichst nicht unterdrückt werden, da gesteigerte Apoptose zum Ausgleich auch viel Neubildung erfordert.

In den folgenden zwei Kapiteln werden Apoptose- und Proliferationsrate von CD34-positiven PZ, die aus dem KM von NR- und HR-klassifizierten MDS-Patienten gewonnen wurden, gegenübergestellt.

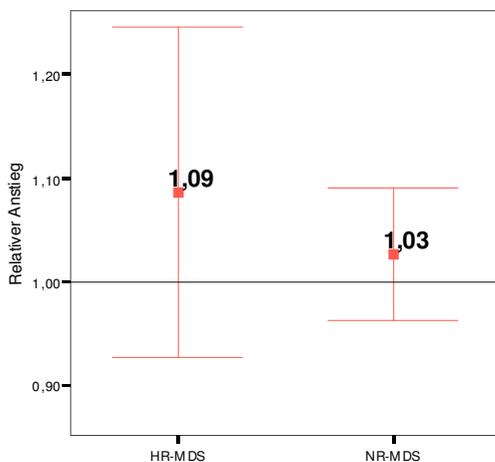
### 4.5.3.1 Apoptose

Vergleich der Apoptoserate zwischen HR-MDS und NR-MDS. Dargestellt wird der relative prozentuale Anstieg der Apoptose durch VPA (siehe Kap. 3.2.7.2).

**Deskriptive Statistik**

		Apoptose				
		HR-MDS		NR-MDS		
		Tag 1	Tag 4	Tag 1	Tag 4	
Statistik	Mittelwert	1,0862	1,1326	1,0264	,9893	
	95 % Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	,7421	,3419	,9440	,8602
		Obergrenze	1,4304	1,9234	1,1088	1,1184
	Median	1,0884	,9839	,9928	,9490	
	Standardabweichung	,13855	,31832	,07853	,12301	
	Minimum	,95	,92	,95	,88	
	Maximum	1,22	1,50	1,16	1,20	

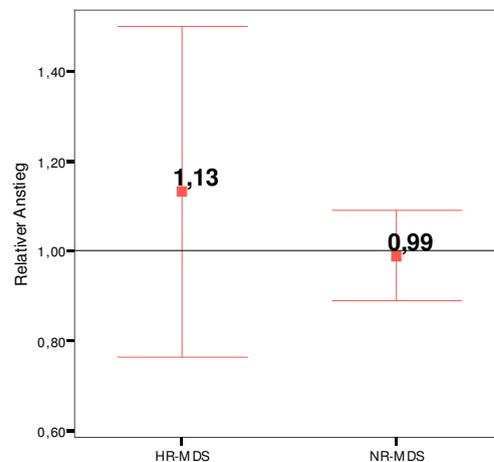
**Apoptose HR-MDS im Vergleich zu NR-MDS an Tag 1**



Fehlerbalken zeigen Mittelwert +/- 2,0 Standardfehler

Abb. 19.

**Apoptose HR-MDS im Vergleich zu NR-MDS an Tag 4**



Fehlerbalken zeigen Mittelwert +/- 2,0 Standardfehler

Abb. 20

Erklärung der Abbildungen: Am Tag 1 ist bei HR-MDS durch VPA 9 % mehr Apoptose als ohne VPA zu sehen und am Tag 4 13 % mehr Apoptose im Vergleich zu ohne Zusatz von VPA (MW = 1,13). Im Vergleich zu NR-MDS-PZ (Abnahme der Apoptoserate am Tag 4 durch VPA um 1 %) ist die Apoptoserate am Tag 4 bei HR-MDS um 14 % größer als bei NR-MDS.

Signifikanzprüfung: Zwischen Tag 1 und Tag 4 besteht kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,903$ ) in der Zunahme der Apoptoserate durch VPA (VPA = Variable).

HR- und NR-MDS unterscheiden sich in den Apoptoseraten an Tag 1 ( $p = 0,170$ ) und an Tag 4 ( $p = 0,522$ ) nicht signifikant.

*Fazit:* VPA fördert die Apoptose bei HR-MDS und hemmt sie bei NR-MDS. Der Unterschied ist nicht signifikant. Dies kann daran liegen, dass zu wenig Proben vorliegen (6 NR-MDS und 3 HR-MDS) und die VPA-Konzentration (100  $\mu\text{g/ml}$ ) zu niedrig eingesetzt wurde. Die VPA-Konzentration wurde so gewählt, da sie der in vivo im allgemein erreichbaren Konzentration entspricht.

#### 4.5.3.2 Proliferation

Vergleich der Proliferationsrate von HR-MDS und NR-MDS. Dargestellt wird der relative Anstieg der Proliferation durch VPA (siehe Kap. 3.2.7.2).

**Deskriptive Statistik**

Statistik		Proliferation			
		HR-MDS		NR-MDS	
		Tag 1	Tag 4	Tag 1	Tag 4
Mittelwert		1,0050	,8992	1,0026	1,0361
95 % Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	,9431	,6583	,9842	,9602
	Obergrenze	1,0669	1,1400	1,0210	1,1120
Median		1,0001	,8755	1,0043	1,0163
Standardabweichung		,02492	,09694	,01755	,07234
Minimum		,98	,82	,97	,98
Maximum		1,03	1,01	1,03	1,18

**Proliferation HR-MDS im Vergleich zu NR-MDS an Tag 1**

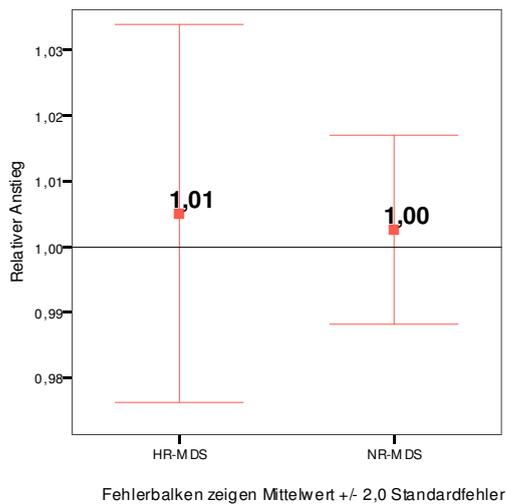


Abb. 21

**Proliferation HR-MDS im Vergleich zu NR-MDS an Tag 4**

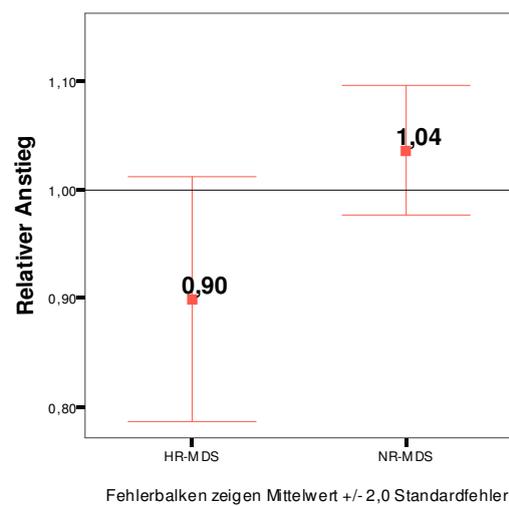


Abb. 22

Erklärung der Abbildungen: Am Tag 4 nimmt die Proliferation von HR-MDS-PZ um 10 % (MW = 0,89) im Vergleich zum Kontrollansatz ohne VPA ab. Bei NR-MDS-PZ ist bis zum Untersuchungstag 4 eine geringe Veränderung der Proliferation zu verzeichnen: Zunahme der Proliferationsrate mit VPA um 4 %.

*Fazit:* VPA hemmt die Proliferation bei HR-MDS-PZ (-10 %) und fördert die Proliferation (+4 %) bei NR-MDS-PZ.

Signifikanzprüfung: Zwischen Tag 1 und Tag 4 besteht kein signifikanter Unterschied in der Proliferationsrate ( $p = 0,255$ ).

HR- und NR-MDS unterscheiden sich in der Proliferationsrate (Tag 1  $p = 0,618$ ; Tag 4  $p = 0,219$ ) bezogen auf die Variable VPA nicht signifikant.

## 4.6 Leukapheresat

Untersuchung der mit Leukapherese (siehe Kap. 3.1.4.2) aus gesundem KM gewonnenen CD34-positiven PZ:

Die PBSC (siehe Kap. 3.1.4.2) wurden aus dem Blut von vier Spendern angereichert. An Tag 0 erfolgte die Aufarbeitung des Leukapheresats (siehe Kap. 3.2.1.2) und die FACS-Analyse (siehe Kap. 3.2.2), an Tag 1 und Tag 4 wurden die Apoptose- (siehe Kap. 3.2.5) und Proliferationsraten (siehe Kap. 3.2.6) bestimmt. Die CD34-positiven PZ wurden im Medium mit VPA (100 µg/ml Medium) und ohne VPA im Doppelansatz über vier Tage kultiviert.

### 4.6.1 FACS Analyse Leukapheresat

Darstellung der Reinheit der Zielzellpopulation (CD34-positive Leukapheresat-PZ aus gesundem KM) mittels FACS-Analyse.

Univariate Statistiken

		FACS Reinheit CD34+	FACS Kontrolle Mouse IgG1
Statistik	Verarbeitete Fälle N =	4	4
	Mittelwert	97,1925	99,5250
	95 % Konfidenzintervall des Mittelwerts		
	Untergrenze	90,5238	99,1599
	Obergrenze	103,8612	99,8901
	Median	99,1000	99,5600
	Standardabweichung	4,19091	,22942
	Minimum	90,93	99,22
	Maximum	99,64	99,76

Erklärung der Tabelle: Da eine Normalverteilung vorliegt (siehe Kap. 4.1), werden die Mittelwerte berücksichtigt. Die Zielzellen verwenden zu 97,2 % das Oberflächenantigen CD34.

*Fazit:* Es wird bestätigt, dass fast ausschließlich CD34-positive Zellen kultiviert wurden.

## 4.6.2 Apoptose- und Proliferationsrate bei Leukapherese-PZ

Explorative Datenanalyse: Analysiert wird der relative Anstieg der Apoptose- und Proliferationsrate bei Leukapherese-PZ unter Zusatz von VPA (siehe Kap. 3.2.7.2).

**Deskriptive Statistik**

		Untersuchungstag				
		1		4		
		Apoptose	Proliferation	Apoptose	Proliferation	
	Verarbeitete Fälle	3	3	4	4	
Statistik	Mittelwert	1,2972	,9840	,7264	1,0829	
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	,9930	,9621	,3747	1,0265
		Obergrenze	1,6014	1,0059	1,0781	1,1394
	Median	1,2670	,9883	,6766	1,0952	
	Standardabweichung	,12246	,00880	,22105	,03546	
	Minimum	1,19	,97	,52	1,03	
	Maximum	1,43	,99	1,03	1,11	

Erklärung: Werden die Mittelwerte am Tag 4 verglichen, sieht man eine deutliche Abnahme der Apoptose (-28 %) und eine Zunahme der Proliferation (+8 %) durch VPA im Vergleich zum Ansatz ohne VPA.

*Fazit:* VPA hemmt die Apoptose und fördert die Proliferation bei Leukapheresat-PZ.

Signifikanzprüfung: Es besteht bezüglich der Apoptose- und Proliferationsrate zwischen Tag 1 und Tag 4 ein signifikanter Unterschied:

Apoptoserate Tag 1 vs. Tag 4:  $p = 0,019$

Proliferationsrate Tag 1 vs. Tag 4:  $p = 0,005$

### Relativer Anstieg der Apoptose mit VPA bei Leukapherese-PZ

### Relativer Anstieg der Proliferation mit VPA bei Leukapherese-PZ

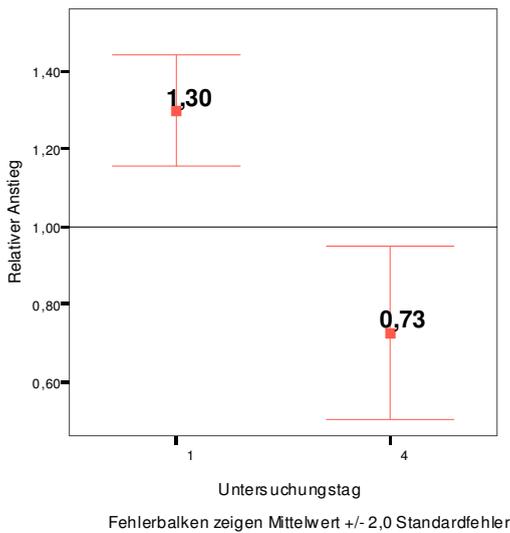


Abb. 23

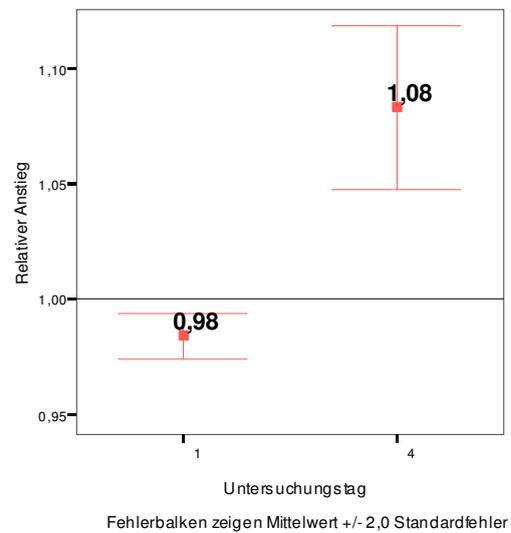


Abb. 24

Erklärung der Abbildung: Darstellung des relativen Anstieges der Apoptose und Proliferation bei Leukapheresat-PZ durch VPA am Tag 1 und am Tag 4. Am Untersuchungstag 4 nimmt die Apoptose unter VPA ab und die Proliferation zu (vergleiche Mittelwerte). Überprüft man die Signifikanz dieser Aussage, so ist, wenn VPA die Variable ist und die Apoptose- und Proliferationsrate die konstanten Faktoren sind, die Signifikanz wie folgt:

Apoptose Tag 1:	$p = 0,041$
Apoptose Tag 4:	$p = 0,094$
Proliferation Tag 1:	$p = 0,089$
Proliferation Tag 4:	$p = 0,017$

Demnach ist am Tag 1 ein signifikanter Unterschied in der Zunahme der Apoptose durch VPA (MW=1,30) im Vergleich zu 'ohne VPA' zu bemerken (+30%). Am Tag 4 der Proliferation ist durch VPA eine signifikante Zunahme der Proliferationsrate (+8%) zu verzeichnen.

Vermutlich ist an Tag 4 die Apoptoserate mit VPA im Vergleich zum Ansatz ohne VPA nicht signifikant, da der Standardfehler zu groß ist.

## 4.7 Gesundes Knochenmark (KM)

Untersuchung von CD34-positiven PZ, die durch Beckenkammpunktion aus gesundem KM von drei freiwilligen Spendern und von drei Patienten, die zwecks Ausschlussdiagnose punktiert wurden, gewonnen wurden:

An Tag 0 erfolgten die Aufarbeitung des KM (siehe Kap. 3.2.1.1) und die FACS-Analyse (siehe Kap. 3.2.2), am Tag 1 und Tag 4 wurden die Apoptose- (siehe Kap. 3.2.5) und Proliferationsraten (siehe Kap. 3.2.6) bestimmt. Die CD34-positiven PZ wurden im Medium mit VPA (100 µg/ml Medium) und ohne VPA im Doppelansatz über vier Tage kultiviert.

### 4.7.1 FACS-Analyse gesundes KM

Explorative Datenanalyse: Darstellung der Reinheit der Zielzellpopulation (CD34-positive PZ aus gesundem KM) mittels FACS-Analyse.

Univariate Statistiken

		FACS Reinheit CD34+	FACS Kontrolle Mouse IgG1	
Statistik	Verarbeitete Fälle	2	2	
	Mittelwert	95,7800	99,6850	
	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	45,5905	96,8261
		Obergrenze	145,9695	102,5439
	Median	95,7800	99,6850	
	Standardabweichung	5,58614	,31820	
	Minimum	91,83	99,46	
	Maximum	99,73	99,91	

Erklärung: Die Zellen, die aus gesundem KM gewonnen wurden, tragen zu 95,78 % das Oberflächenantigen CD34.

*Fazit:* Damit wird bestätigt, dass fast ausschließlich CD34-positive Zellen kultiviert wurden.

## 4.7.2 Apoptose- und Proliferationsrate von gesunden KM-PZ

Explorative Datenanalyse: Analysiert wird der relative Anstieg der Apoptose- und Proliferationsrate bei gesunden KM-PZ unter Zusatz von VPA (siehe Kap. 3.2.7.2).

### Deskriptive Statistik

Statistik		Untersuchungstag			
		1		4	
		Apoptose	Proliferation	Apoptose	Proliferation
Verarbeitete Fälle	5	5	4	4	
Mittelwert	1,8077	,9945	1,1819	,8877	
95 % Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	,3112	,9448	,6380	,7334
	Obergrenze	3,3041	1,0441	1,7258	1,0420
Median	1,2427	1,0026	1,2289	,8737	
Standardabweichung	1,20518	,03999	,34183	,09695	
Minimum	1,03	,95	,72	,79	
Maximum	3,92	1,04	1,55	1,02	

### Relativer Anstieg der Apoptose mit VPA bei gesunden KM-PZ      Relativer Anstieg der Proliferation mit VPA bei gesunden KM-PZ

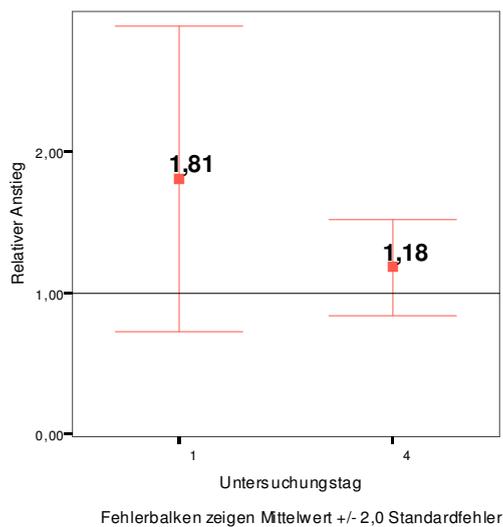


Abb. 25

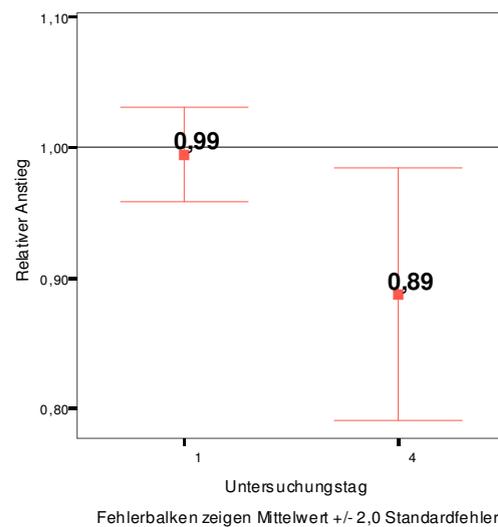


Abb. 26

Erklärung der Abbildung: Durch Zugabe von VPA zu gesunden KM-PZ nimmt die Apoptoserate zu (81 % mehr Apoptose mit VPA am Tag 1 und 18 % mehr Apoptose mit VPA am Tag 4) und die Proliferationsrate ab (1 % weniger Proliferation mit VPA am Tag 1 und 11 % weniger Proliferation mit VPA am Tag 4).

*Fazit:* VPA fördert die Apoptose und hemmt die Proliferation von gesunden KM-Progenitorzellen in vitro.

Wird die Signifikanz bezüglich der Variablen VPA und den Konstanten Apoptose und Proliferation untersucht, so ergibt sich kein signifikantes Ergebnis ( $p > 0,05$ ):

Apoptose Tag 1:  $p = 0,129$

Apoptose Tag 4:  $p = 0,478$

Proliferation Tag 1:  $p = 0,749$

Proliferation Tag 4:  $p = 0,105$

Wird die Signifikanz bezüglich der Variablen Tag (Zeitfaktor) und des konstanten Faktors Apoptose und Proliferation untersucht, konnte ein signifikantes Ergebnis bezüglich der Abnahme der Proliferation unter VPA erzielt werden:

Apoptose:  $p = 0,097$

Proliferation:  $p = 0,040$

## 4.8 Leukapheresat im Vergleich zu gesundem KM

Die PBSC, die durch Leukapherese gewonnen wurden, stammten von gesunden Spendern, die vor der Leukapherese mit Wachstumsfaktoren (G-CSF) über einen Zeitraum von vier bis fünf Tagen behandelt wurden (siehe Kap. 3.1.4.2). Dieser Faktor unterscheidet die PZ, die durch Leukapherese angereichert wurden, von den PZ, die durch KM-Punktion gewonnen wurden. Die Auswirkung von G-CSF im Hinblick auf die Apoptose- und die Proliferationsrate im Zusammenhang von VPA soll hier untersucht werden.

### 4.8.1 Vergleich der Apoptoseraten

Verglichen werden die Apoptoseraten von Apheresat-PZ, die von gesunden Spendern mittels G-CSF aus dem KM mobilisiert wurden, mit KM-PZ die durch Punktion aus gesundem KM gewonnen wurden.

Deskriptive Statistik

		Apoptoserate			
		Apheresat-PZ		KM-PZ	
		Tag 1	Tag 4	Tag 1	Tag 4
Statistik	Verarbeitete Fälle	3	3	4	4
	Mittelwert	1,1381	,7883	1,3488	1,0777
	95 % Konfidenzintervall des Mittelwerts				
	Untergrenze	1,0055	,6244	,6550	,8151
	Obergrenze	1,2707	,9522	2,0427	1,3403
	Median	1,1256	,7912	1,2004	1,1085
	Standardabweichung	,05338	,06597	,43604	,16506
	Minimum	1,09	,72	1,01	,85
	Maximum	1,20	,85	1,98	1,24

Erklärung der Tabelle: Generell ist vom Tag 1 bis zum Tag 4 eine Abnahme der Apoptoserate zu sehen. An Tag 4 ist bei Apheresat-PZ durch VPA eine Abnahme der Apoptoserate (-22 %) festzustellen im Vergleich zu den KM-PZ, die durch Zusatz von VPA eine Zunahme der Apoptoserate (+7 %) aufweisen.

*Fazit:* VPA führt bei beiden Diagnosegruppen an Tag 1 zunächst zu einer Zunahme der Apoptose, an Tag 4 dann zu einer Reduktion der Apoptose im Vergleich zu Tag 1. Bei Apheresat-PZ beträgt die Apoptoserate an Tag 4 mit VPA sogar 22% weniger als ohne Zusatz von VPA. VPA hemmt die Apoptose bei gesunden Apheresat-PZ stärker als bei KM-PZ, die ohne G-CSF aus dem Knochenmark mobilisiert wurden. Demnach wirken Wachstumsfaktoren in Kombination mit VPA additiv im Sinne der Apoptosehemmung.

**Relativer Anstieg der Apoptose mit VPA bei Apheresat und ges. KM Tag 1**

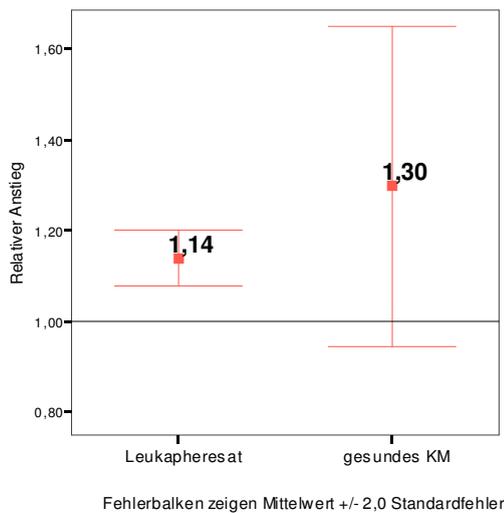


Abb. 27

**Relativer Anstieg der Apoptose mit VPA bei Apheresat und ges. KM Tag 4**

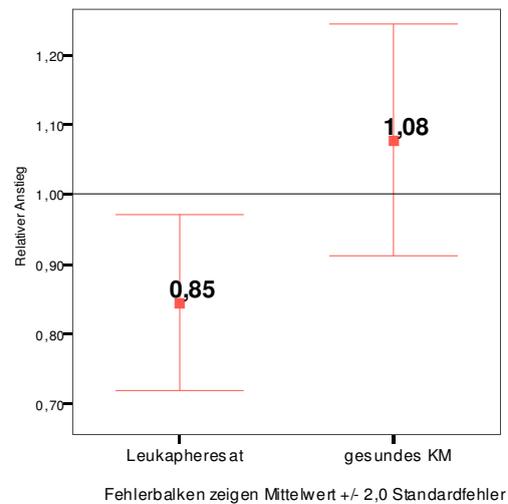


Abb. 28

Erklärung der Abbildungen: Am Tag 1 ist bei Apheresat-PZ (+14 %) und KM-PZ (+30 %) mit VPA mehr Apoptose als ohne VPA zu beobachten (MW > 1). Am Tag 4 nimmt die Apoptoserate bei beiden Diagnosegruppen ab und ist mit VPA bei Apheresat-PZ um 15 % geringer als in den Ansätzen ohne VPA und bei KM-PZ an Tag 4 im Vergleich zu Tag 1 um 22% gesunken, jedoch mit VPA um 8% höher als in den Ansätzen ohne VPA.

Es konnte bezüglich der Variablen VPA und der Konstanten Apoptose keine Signifikanz festgestellt werden.

Apoptose Tag 1:  $p = 0,068$   
 Apoptose Tag 4:  $p = 0,348$

Zwischen Tag 1 und Tag 4 besteht bezüglich der Apoptose ein signifikanter Unterschied:

Apoptose:  $p = 0,023$

VPA bezogen auf den Zeitfaktor hat eine bewiesene Wirkung. VPA verändert die Apoptose innerhalb der 4 Tage signifikant im Vergleich zum Ansatz ohne VPA.

## 4.8.2 Vergleich der Proliferationsraten

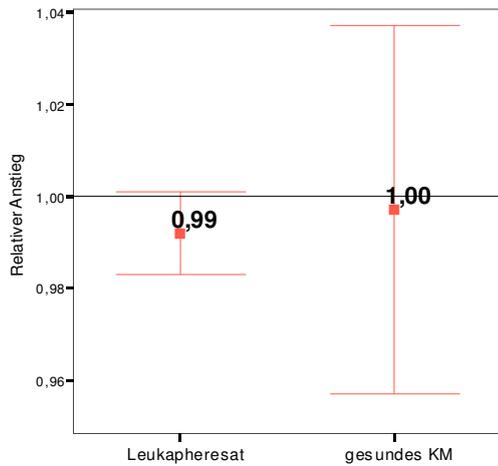
Verglichen werden die Proliferationsraten von Leukapheresat-PZ mit PZ aus gesundem KM. Der konstante Term ist VPA.

### Deskriptive Statistik

		Proliferation			
		Apheresat		gesundes KM	
		Tag 1	Tag 4	Tag 1	Tag 4
Statistik	Verarbeitete Fälle	3	3	4	4
	Mittelwert	,9920	1,0397	1,0013	,9411
95 % Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	,9809	,9877	,9688	,8599
	Obergrenze	1,0030	1,0916	1,0338	1,0224
	Median	,9941	1,0499	1,0056	,9346
	Standardabweichung	,00444	,02090	,02044	,05104
	Minimum	,99	1,02	,97	,89
	Maximum	,99	1,05	1,02	1,01

Erklärung: Werden die Mittelwerte verglichen, sieht man eine Zunahme der Proliferation bei Leukapheresat-PZ am Tag 4 (+4 %) und eine Abnahme der Proliferation bei gesundem KM (-6 %).

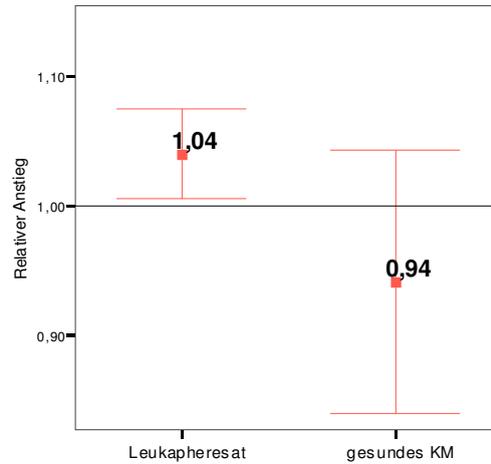
**Zunahme der Proliferation durch VPA an Tag 1 bei Leukapheresat und gesundem KM**



Fehlerbalken zeigen Mittelwert +/- 2,0 Standardabweichungen

Abb. 29

**Zunahme der Proliferation durch VPA an Tag 4 bei Leukapheresat und gesundem KM**



Fehlerbalken zeigen Mittelwert +/- 2,0 Standardabweichungen

Abb. 30

Erklärung der Abbildung: Die Leukapheresat-PZ zeigen eine Zunahme der Proliferation im Gegensatz zu KM-PZ, die durch VPA eine Abnahme der Proliferationsrate aufweisen.

*Fazit:* VPA fördert die Proliferation bei Leukapheresat-PZ und hemmt die Proliferation bei gesunden KM-PZ.

Signifikanzprüfung: Zwischen Leukapheresat-PZ und gesunden KM-PZ besteht kein signifikanter Unterschied in der Proliferation:

Proliferation Tag 1:  $p = 0,394$

Proliferation Tag 4:  $p = 0,462$

Vergleicht man Tag 1 mit Tag 4 unterscheiden sich die Proliferationsraten von Leukapheresat-PZ im Vergleich zu gesunden KM-PZ signifikant:

Proliferation Tag 1 vs. Tag 4:  $p = 0,026$

Es besteht ein signifikanter Unterschied in der Proliferation zwischen den Ansätzen VPA mit G-CSF (Leukapheresat-PZ) und den Ansätzen VPA ohne Wachstumsfaktor (gesunde KM-PZ durch Punktion gewonnen).

## 4.9 Akute myeloische Leukämie (AML)

Untersuchung von CD34-positiven Zellen von drei AML-Patienten (zwei primäre AML und eine sekundäre AML) vor Therapiebeginn:

Die Zellen wurden mittels Knochenmarkpunktion (siehe Kap. 3.1.4.1) gewonnen. Am Tag 0 erfolgte die Aufarbeitung des KM (siehe Kap. 3.2.1) und die FACS Analyse (siehe Kap. 3.2.2), am Tag 1 und am Tag 4 wurden die Apoptose- (siehe Kap. 3.2.5) und Proliferationsraten (siehe Kap. 3.2.6) bestimmt. Die Zellen wurden im Medium mit VPA (100 µg/ml Medium) und ohne VPA im Doppelansatz für die Dauer von vier Tagen kultiviert.

### 4.9.1 FACS-Analyse AML

Darstellung der Reinheit der Ziel-Zellpopulation (CD34-positive Zellen von AML-Patienten) mittels FACS-Analyse.

Univariate Statistiken

		FACS Reinheit CD 34+	FACS Kontrolle Mouse IgG1	
Statistik	Verarbeitete Fälle	3	3	
	Mittelwert	99,2500	99,27333	
	95 % Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	97,9271	97,97721
		Obergrenze	100,5729	100,56946
	Median	99,3100	99,37000	
	Standardabweichung	,53254	,521760	
	Minimum	98,69	98,710	
	Maximum	99,75	99,740	

Erklärung: Die Zielzellen tragen zu 99,25 % (Mittelwert) das Oberflächenantigen CD34.

#### 4.9.2 Apoptose- und Proliferationsrate bei AML-PZ

Explorative Datenanalyse: Analysiert wird der relative Anstieg der Apoptose- und Proliferationsrate bei AML-PZ durch Zusatz von VPA (siehe Kap. 3.2.7.2).

##### Deskriptive Statistik

		Untersuchungstag	
		4	
		Apoptose	Proliferation
Statistik	Verarbeitete Fälle	3	3
	Mittelwert	,9770	1,0609
	95 % Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	,8626
		Obergrenze	1,0915
	Median	,9569	1,0721
	Standardabweichung	,04607	,02373
	Minimum	,94	1,03
	Maximum	1,03	1,08

Anmerkung: Der Untersuchungstag 1 wurde aufgrund zu geringer Daten weggelassen.

Erklärung: Es ist eine Abnahme der Apoptose um 3 % und eine Zunahme der Proliferation um 6 % der AML-PZ unter VPA zu verzeichnen.

### Relativer Anstieg der Apoptose und Proliferation mit VPA bei AML-PZ an Tag 1

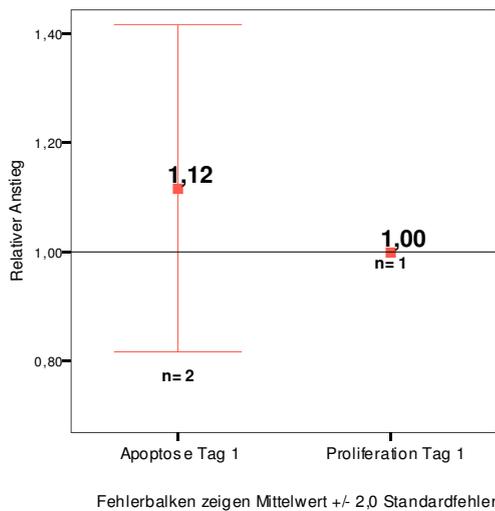


Abb. 31

### Relativer Anstieg der Apoptose und Proliferation mit VPA bei AML-PZ an Tag 4

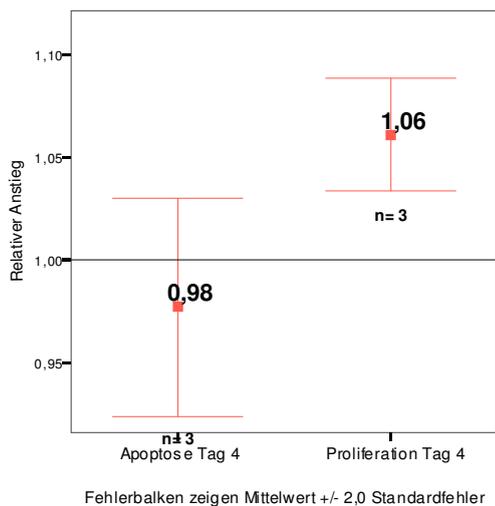


Abb. 32

Erklärung der Abbildungen: Am Tag 4 ist eine Abnahme der Apoptose (-2 %) und eine Zunahme der Proliferation (+6 %) mit VPA zu sehen.

*Fazit:* VPA wirkt auf AML-PZ nicht zytoreduktiv. Die Apoptose kann nicht gehemmt werden und die Proliferation nimmt zu.

Signifikanzprüfung:

VPA bezogen auf Apoptose und Proliferation (VPA = Variable):

Apoptose Tag 4:  $p = 0,467$

Proliferation Tag 4:  $p = 0,045$

Die Proliferation ist an Tag 4 mit VPA signifikant höher als ohne Zusatz von VPA.

VPA bezogen auf Apoptose und Proliferation (Tag = Variable, Zeitfaktor):

Apoptose Tag 1 vs. Tag 4:

$p = 0,643$

Die Apoptose verändert sich mit VPA über 4 Tage nicht signifikant.

Die Proliferationsanalyse ist wegen zu geringer Daten (Tag 1:  $n=1$ ) nicht möglich.

## 5 DISKUSSION

VPA ist ein Differenzierungs- und Apoptose-Induktor, der unter anderem die Ausdifferenzierung von Karzinomzellen, von PML-RAR-transformierten hämatopoetischen Progenitorzellen und von leukämischen Blasten bei AML fördert (vgl. GÖTTLICHER et al., 2001). In dieser experimentellen Doktorarbeit wurde gezeigt, dass die Apoptoserate von CD34-positiven MDS-Progenitorzellen mit VPA im Kulturansatz zunimmt (5% mehr Apoptose an Tag 1,  $p=0,049$ , und 4% mehr Apoptose an Tag 4,  $p=0,123$ ). Wird zwischen HR-MDS-PZ (Progenitorzellen von Patienten mit Hochrisiko-MDS) und NR-MDS-PZ (Progenitorzellen von Patienten mit Niedrigrisiko-MDS) differenziert, so ist bei HR-MDS-PZ mit VPA am Tag 4 eine Zunahme der Apoptoserate (+13 %) zu beobachten, im Vergleich zu NR-MDS-PZ, die am Tag 4 durch VPA eine Verringerung der Apoptoserate (-1 %) zeigten ( $p = 0,522$ ). Die Proliferationsrate nahm bei HR-MDS-PZ am Tag 4 durch VPA um 10% ab ( $p = 0,255$ ).

Die Zunahme der Apoptoserate bei HR-MDS-PZ unter VPA ist wünschenswert, das Ergebnis korreliert jedoch nicht mit den Resultaten klinischer Studien bei denen Patienten mit HR-MDS nur eine geringe Ansprechrate auf VPA zeigten (vgl. KUENDGEN et al., 2004). Die Erfolgchance einer VPA-Behandlung wird geringer, je höher der Blastenanteil im KM ist (vgl. KUENDGEN et al., 2005/2006; BUG et al., 2005; GARCIA-MANERO et al. 2006). Dies passt besser zu den in-vitro-Daten dieser Arbeit, die bei AML-PZ keine Zunahme der Apoptoserate durch VPA erkennen ließen. Da bei unseren Experimenten durch Zusatz von VPA keine signifikante Veränderung der Apoptose- und Proliferationsrate erzielt werden konnte, ist VPA als Monotherapie bei MDS-PZ vermutlich nicht ausreichend differenzierungs-/ apoptoseinduzierend. Ein konträres Ergebnis erzielten CHEN et al. 2007, die allerdings keine primären humanen Tumorzellen (MDS-Zellen aus dem Knochenmark von Patienten) verwendeten, sondern die MDS Zelllinie MUTZ-1 mit VPA Konzentrationen von 1, 2 und 4 mmol/l kultivierten. CHEN et. al. beobachteten eine signifikante Zunahme der Apoptose und Abnahme der Proliferation der MUTZ-1 Zellen. Die Veränderungen waren von der VPA Konzentration abhängig und gingen mit einer p-21 Hochregulierung einher.

In der eigenen experimentellen Arbeit wurde eine VPA-Konzentration (100 µg/ml, bzw. 0,7 mmol/l) eingesetzt, die den in vivo im allgemeinen erreichbaren VPA-Konzentrationen entspricht. Wie ACHARYA und BUSSEL (2000) analysierten, nimmt die klinische VPA-Toxizität mit Steigerung der eingesetzten Konzentration zu. Eine Korrelation zwischen VPA-Serumspiegel, Histonacetylierung und klinischem Erfolg

konnten SIITONEN et al. (2007) in ihrer klinischen Studie mit 19 MDS/CMML Patienten, die mit VPA in Kombination mit 13-cis Retinsäure und 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> therapiert wurden, nicht bestätigen. Jedoch führte aufgrund unerwünschter Nebenwirkungen diese Kombinationstherapie bei 8 von 19 Patienten zu einem frühzeitigen Abbruch. Nur 3 Patienten waren Responder. Dieses Ergebnis verdeutlicht die Schwierigkeit von Kombinationstherapien bei MDS-Patienten. Im Gegensatz dazu zeigten YANG et al., (2005) und GARCIA-MANERO et al., (2006) vielversprechende in-vitro-Daten und klinische Ergebnisse bei HR-MDS und AML mit einer Kombinationstherapie aus VPA und Decitabine. Es besteht die Hoffnung, die Ansprechrate durch diese Kombinationstherapie zu verbessern (vgl GARCIA-MANERO et al.).

DE FELICE et al. konnten 2005 zeigen, dass VPA in Flüssigkulturen mit gesunden CD34-positiven PZ, die aus Nabelschnurblut, peripherem Blut und KM gewonnen wurden, die expansionsfördernde Wirkung verschiedener Zytokine, wie Flt3L, Thrombopoietin, SCF und IL-3 (FMS3), steigert. Durch den Zusatz von VPA und Zytokinen in die Flüssigkulturansätze von CD34-positiven PZ konnten im Vergleich zum Kontrollansatz, der nur Zytokine (FMS3) enthielt, nach siebentägiger Kultivierung vermehrt PZ nachgewiesen werden, die CD34-positiv, CD90-positiv und CD38-negativ waren. Dem entspricht unsere Beobachtung, dass der Zusatz von VPA die Apoptose von gesunden CD34-positiven PZ hemmte (Abnahme der Apoptose um 27%,  $p = 0,019$ ) und die Proliferation dieser Zellen förderte (Zunahme um 8%,  $p = 0,005$ ).

Des weiteren beobachteten DE FELICE et al. (2005), dass sich in den Ansätzen VPA + FMS3 mehr gesunde CD34-positiv PZ in der G<sub>0</sub>- G<sub>1</sub>-Phase befanden, die Apoptose abnahm und die Proliferation geringer wurde. Demnach verlangsamte VPA in Kombination mit FMS3 den Zellzyklus. Es verringerte sich die absolute Zellzahl in den Ansätzen VPA + FMS3 im Gegensatz zu den Ansätzen VPA ohne Zusatz von FMS3, jedoch nahm der Anteil CD34-positiver und CD90-positiver Zellen zu und das Selbsterneuerungspotential der HSC stieg. Unser Ergebnis, dass VPA die Proliferation CD34-positiver Leukapheresat-PZ fördert ( $p = 0,005$ ), die mit G-CSF aus dem KM mobilisiert wurden, kann nicht direkt mit den Ergebnissen von DE FELICE et al. verglichen werden, da in deren Zytokin-Cocktail kein G-CSF enthalten war. Es wäre interessant, in weiterführenden Experimenten zu analysieren, ob G-CSF in Kombination mit VPA den Zellzyklus verlangsamt und in welcher Zyklusphase sich die Zellen befinden.

REZACOVA et al. untersuchten 2006 den Effekt von VPA und antiapoptotischen Zytokinen auf humane Leukämiezelllinien (HL-60: human promyelocytic leukemia und MOLT-4: human T-lymphocyte leukemia) im Hinblick auf Differenzierung und Apoptoseinduktion. Bei den Leukämiezelllinien HL-60 und MOLT-4 wurden durch Zusatz von 2-4 mmol/l VPA ins Medium ein verminderter prozentualer Anteil in der S-Phase befindlicher Zellen, eine Differenzierungsinduktion, eine Proliferationshemmung und eine erhöhte Apoptoserate festgestellt. Leukämiezelllinien, die mit VPA und Zusatz von IL-3, SCF und G-CSF kultiviert wurden, wiesen nach 14-tägiger Inkubation mit dem clonogenic survival assay EC(50) eine höhere Überlebensrate auf als Leukämiezelllinien, die nur mit VPA ohne Zusatz von antiapoptotischen Zytokinen kultiviert wurden.

Obwohl zwei Leukämiezelllinien und keine gesunden HSC untersucht wurden, wird durch REZACOVAS Ergebnisse unsere Beobachtung untermauert, dass VPA die Proliferation CD34-positiver PZ fördert, die mit G-CSF aus dem KM mobilisiert und durch Leukapherese gewonnen wurden. Kulturmedien mit Zusatz von VPA und G-CSF haben offenbar eine proliferationsfördernde Wirkung.

Die angeführten klinischen Studien und in-vitro-Daten führen zu der Schlussfolgerung, dass VPA den pharmakologischen Effekt von G-CSF verstärkt und eine Abnahme der Apoptose ( $p = 0,019$ ) und eine Zunahme der Proliferation ( $p = 0,005$ ) von gesunden KM-PZ bewirkt.

Betrachtet man nun das Ergebnis der vorliegenden experimentellen Arbeit bezüglich der Apoptose- und Proliferationsveränderung von gesunden KM-PZ durch den Einfluss von VPA ohne Zusatz von Zytokinen – nämlich dass VPA die Apoptose von gesunden KM-PZ fördert (+ 18 % an Tag 4;  $p > 0,05$ ) und die Proliferation hemmt (- 11 % an Tag 4; signifikante Abnahme der Proliferation über die Dauer von vier Tagen:  $p=0,040$ ) – widersprechen diese Ergebnisse und die von DE FELICE et. al. den in-vitro-Daten von BUG et al., 2005.

BUG und ihre Arbeitsgruppe zeigten 2005, dass VPA nicht differenzierungsinduzierend wirkt, sondern einen proliferationsfördernden Effekt auf CD34-positive HSC hat, zur Selbsterneuerung von gesunden hämatopoetischen Stammzellen (KM-SZ und Nabelschnurblut, kultiviert mit IL-3) führt (Zunahme der CD34-positiven absoluten Zellzahl) und einen beschleunigten Zellzyklus durch Downregulierung von p21 bewirkt. Ein weiterer Effekt war die Aktivierung des Wnt-pathway und die Induktion von HoxB4,

ein Zielgenes des Wnt-Signalweges, das die Erneuerung der hämatopoetischen Stammzellen stimuliert.

Diese Befunde werden gestützt durch eine Veröffentlichung von YOUNG JC et al. (2004): "Inhibitors of histone deacetylases promote hematopoietic stem cell self-renewal". Die Autoren untersuchten die HDAC-Inhibitoren Trichostatin A, Trapoxin und Chlamydocin. Die durch Leukapherese gewonnenen HSC wurden mit Zusatz von Zytokinen und HDAC-Inhibitoren kultiviert. HSC, die mit Zusatz von HDAC-Inhibitoren kultiviert wurden, zeigten eine geringere Ausdifferenzierung als die Kontrollansätze ohne HDAC-Inhibitoren. Die Anzahl der Thy-1 exprimierenden HSC (siehe Kap. 2.3.1/Abb. 3) stieg auf das Siebenfache im Vergleich zu den Kulturen ohne HDAC-Inhibitoren an.

VPA kann demnach sowohl das Selbsterneuerungspotential von gesunden HSC erhalten und deren Differenzierung verlangsamen (vgl. DE FELICE et al., BUG et al.) als auch die Differenzierung von malignen Progenitorzellen induzieren (vgl. GÖTTLICHER et al., 2001).

Acharya und Bussel (2000) zeigten, dass VPA allerdings in vivo auch eine direkte Knochenmarksuppression hervorrufen kann (bei Dosen > 100 µg/ml), die zu peripheren Zytopenien mit Beeinträchtigung mehrerer Zelllinien oder zur Pure Red Cell Aplasia (PRCA) führten. In dieser Arbeit wurde in vitro die Konzentration von 100 µg/ml VPA gewählt, die auch in vivo erreichbar ist. Wenn VPA in höherer Konzentration intermittierend eingesetzt wird (vgl. Soriano et al. 2007), kann eine stärkere Apoptoseaktivität hervorgerufen werden und damit eventuell ein besseres Ansprechen bei HR-MDS/AML erzielt werden, wobei die Nebenwirkungen wie Knochenmarkdepression mit der VPA-Konzentration korrelieren.

Thrombozytopenie (vgl. BARR et al. 1982, GESUNDHEIT et al. 2002, KO et al. 2001, CONLEY et al. 2001, MAY et al. 1993, GARNICK et al. 1990, DELGADO et al. 1994, VERROTTI et al. 1999 und GIDAL et al. 1994) oder Pure Red Cell Aplasia (vgl. KAWAUCHI et al. 1989, ANZAI et al. 1994 und FARKAS et al. 2000) wurden bei einigen Kindern während einer antiepileptischen Monotherapie mit VPA beobachtet. FARKAS et al. fanden bei einem vier Jahre alten Kind eine makrozytäre Anämie und im KM eine isolierte Erythroblastopenie. Alle drei Autoren (KAWAUCHI et al. 1989, ANZAI et al. 1994 und FARKAS et al. 2000) berichteten über eine rasche Besserung des Blutbildes nach Absetzen von VPA.

KO et al. (2001) untersuchten retrospektiv (1991 – 1999) 96 an Epilepsie erkrankte Kinder, die VPA als Monotherapeutikum oder in Kombination mit anderen

antiepileptischen Medikamenten über einen Zeitraum von 12 Tagen bis zu acht Jahren eingenommen hatten. Patienten mit einer täglichen VPA-Dosis von  $> 40 \text{ mg/kg KG}$  hatten ein signifikant höheres Risiko, eine Thrombozytopenie zu entwickeln. Von 96 Kindern nahmen 44 (45,8 %) eine tägliche Dosis VPA  $> 40 \text{ mg/kg KG}$  ein, und ein Drittel ( $^{15}/_{44}$ ) entwickelte eine Thrombozytopenie ( $<150 \text{ Thrombozyten} \times 10^9/\text{l Blut}$ ).

Die Thrombozytenzahlen korrelierten negativ mit dem VPA-Serum-Spiegel, nach Reduktion von VPA stieg die Thrombozytenzahl im allgemeinen an. Hämatologische Nebenwirkungen bei einer VPA-Therapie mit neurologischer Indikation wurden regelmässig beobachtet, sobald der VPA-Serum-Spiegel  $100 \mu\text{g/ml}$  überschritt (vgl. ACHARYA und BUSSEL, 2000). Wie ACHARYA und BUSSEL 2000 schrieben, ist eine Abnahme der Plättchenzahl die häufigste hämatologische Nebenwirkung von VPA. Die Pathophysiologie der durch VPA induzierten Thrombozytopenie ist jedoch noch weitgehend unklar (vgl. COVANIS, 1982; VON VOSS, 1978; MORRIS, 1981; BARR, 1982). Die von ACHARYA und BUSSEL 2000 beschriebene Knochenmarksuppression, die in zahlreichen klinischen Studien nachgewiesen wurde, spiegelt sich in den in-vitro-Ergebnissen dieser Dissertation wider: Zunahme der Apoptose (+ 18 % am Tag 4) und Abnahme der Proliferation (- 11 % am Tag 4) bei gesunden CD34-positiven PZ.

Jedoch sollte aufgrund widersprüchlicher Aussagen in Bezug auf VPA und gesunde KM-PZ (vgl. die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit BUG et al., 2005; DE FELICE et al., 2005) der Einfluss von VPA auf gesunde CD34-positive PZ in weiteren in-vitro-Versuchen eingehender untersucht werden.

Werden die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der Wirkung von VPA auf AML-PZ betrachtet – Abnahme der Apoptose (- 2 % am Tag 4;  $p = 0,467$ ) und Zunahme der Proliferation (+ 6 % am Tag 4;  $p = 0,045$ ) – so steht dies im Einklang mit mehreren klinischen Studien, die zeigten, dass VPA als Monotherapie bei AML-Patienten nicht ausreichend zytoreduktiv wirkt.

KUENDGEN et al. berichteten 2006, dass VPA als Monotherapie oder in Kombination mit ATRA bei 58 AML-Patienten in nur 5 % nach IWG-Kriterien zu einem Ansprechen führte und fassten zusammen, dass VPA als Monotherapie bei AML-Patienten nicht effektiv ist. GUEL et al. (2003) und NERVI et al. (2004) kamen ebenso zu der Erkenntnis, dass VPA in der Therapie von AML-Patienten nicht ausreichend antiproliferativ wirkt.

Wie PILATRINO et al. 2005 zeigten, konnte bei AML-, HR-MDS- und CMML-Patienten keine signifikante Reduktion der Blasten durch VPA in Kombination mit ATRA beobachtet werden. Bei zwei Patienten war sogar ein starker Anstieg der peripheren

Blasten in Korrelation mit dem Thrombozytenanstieg nach Beginn der VPA Therapie zu verzeichnen.

BUG et al. veröffentlichten 2005 die Ergebnisse einer klinischen Studie zur vierwöchigen Kombinationstherapie von VPA mit ATRA bei 24 AML-Patienten und 2 MDS- (RAEB I und RAEB II) Patienten und mussten feststellen, dass bei diesen Patientengruppen selbst eine Kombinationstherapie von VPA und ATRA nicht ausreichend zytoreduktiv wirkte.

2006 untersuchten CIMINO et al. in einer Pilot-Studie die Wirkung von VPA in Kombination mit ATRA bei therapierefraktären AML-Patienten und konnten nach IWG-Kriterien für AML kein Ansprechen beobachten. Verschiedene Autoren (vgl. GÖTLICHER et al. 2001 und GURVICH et al. 2004) betonten jedoch die HDAC-Inhibitionskapazität von VPA und die damit verbundene Apoptoseinduktion bei AML. Andere Autoren wie CAI et al. 2006 beobachteten bei einem Teil der AML-Blasten VPA-Empfindlichkeit, bei einem anderen Teil wiederum nicht. Da die AML-Stichprobe in unserer Arbeit sehr klein war, konnte nicht näher geprüft werden, ob bestimmte Subgruppen besser als andere ansprechen.

Die in klinischen Studien festgestellte, nicht ausreichend zytoreduktive Wirkung von VPA bei AML-Blasten ist konkordant mit den eigenen in-vitro-Daten hinsichtlich der Apoptose: AML-KM-PZ zeigten am Tag 4 unter Zusatz von VPA eine geringere Apoptoserate (-2 %,  $p = 0,467$ ) als ohne Zusatz von VPA. Die Proliferationsrate nahm mit VPA sogar zu (+ 6 % am Tag 4;  $p = 0,045$ ). VPA ist bei AML-KM-PZ somit leider nicht apoptosefördernd und nicht proliferationshemmend.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

### Über die Auswirkungen von Valproinsäure auf Apoptose und Proliferation CD34 -positiver MDS-Progenitorzellen in vitro

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind eine heterogene Gruppe erworbener Knochenmarkserkrankungen, die durch Reifungs- und Funktionsdefekte hämatopoetischer Zellen, ineffektive Hämatopoese und möglichen Übergang in akute Leukämie gekennzeichnet sind.

Ein wichtiger Pathomechanismus ist die Apoptose von hämatopoetischen Progenitorzellen als Folge eines klonalen Stammzelldefektes. Außer der allogenen Stammzelltransplantation gibt es bis dato keine kurative Behandlung. Deshalb werden Medikamente benötigt, die zu einer Verbesserung der Knochenmarksfunktion führen. VPA, ein spezifischer und potenter Histon-Deacetylase-1-Inhibitor, wird seit mehr als zwei Jahrzehnten erfolgreich und ohne schwerwiegende Nebenwirkungen in der Therapie von generalisierten und partiellen Krampfanfällen, als Stimmungsstabilisator und bei Migräne eingesetzt. In therapeutischen Konzentrationen induziert VPA in vitro außerdem die Differenzierung und / oder Apoptose von Karzinomzellen, von PML-RAR-transformierten hämatopoetischen Progenitorzellen und von leukämischen Blasten von AML-Patienten und hat einen Einfluss auf Genregulationsmechanismen. In ersten klinischen Studien wurde belegt, dass VPA vor allem bei Niedrigrisiko-MDS (NR-MDS) eine hohe Ansprechrate zeigt.

Basierend auf in-vitro-Versuchen zu VPA mit gesunden Knochenmark-Progenitorzellen (KM-PZ), AML-PZ und leukämischen Zelllinien ist diese experimentelle Arbeit im Kontext klinischer Studien mit MDS- und AML-Patienten entstanden. Ziel war es, die Änderung des Apoptose- und Proliferationsverhaltens CD34-positiver KM-PZ bei MDS-Patienten unter dem Einfluss von VPA zu untersuchen. Im Vergleich dazu wurden gesunde KM-PZ (gewonnen durch Leukapherese und Punktion) sowie AML-PZ bezüglich Apoptose- und Proliferationsveränderungen durch VPA analysiert.

Außerdem sollten mögliche Unterschiede zwischen Hochrisiko- (HR-) und NR-MDS detektiert werden. Schließlich wurde analysiert, der Wachstumsfaktor G-CSF bei gesunden PZ die Wirkung von VPA verändert.

Von 23 Individuen (10 Patienten mit MDS, 6 Probanden mit gesundem KM, 4 Leukapheresate von gesunden PZ-Spendern, 3 Patienten mit AML) wurde das Zellmaterial mit dem MACS CD34 Progenitor Cell Isolation Kit aufbereitet. Die CD34-positiven Pro-

genitorzellen wurden im Doppelansatz mit ca. 100.000 Zellen/ml Medium angesetzt, dem 100 µg VPA/ml Medium hinzugefügt wurde. Am Tag 1 und am Tag 4 wurde mittels Cell Death Detection ELISA<sup>plus</sup>-Kit die Apoptoserate durch Nachweis von Histon-assoziierten DNA-Fragmenten in Form von Mono- und Oligonukleosomen bestimmt. Mit dem CellTiter96<sup>®</sup>-Kit wurde die Proliferationsrate der Zellen bestimmt, indem vitale Zellen Tetrazolium zu einem farbigen Formazan-Produkt reduzierten, das anschließend photometrisch quantitativ gemessen wurde.

Mit der univariaten Varianzanalyse ANOVA wurde untersucht, ob VPA einen signifikanten Unterschied in der Apoptose- und Proliferationsrate bewirkte. An Tag 1 ergab sich eine signifikante Zunahme der Apoptose durch VPA, gemittelt über alle Diagnosegruppen ( $p = 0,012$ ). Wird der Tag als Variable und die Apoptose und Proliferation als konstanter Faktor berücksichtigt (Allgemeines Lineares Modell, Meßwiederholung), bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Apoptoserate an Tag 1 und Tag 4: VPA rief bezogen auf den Zeitfaktor (96 Stunden) eine bewiesene Wirkung hervor ( $p = 0,009$ ).

Valproinsäure führte zu einer Zunahme der Apoptoserate bei MDS- (+4%) und normalen KM-PZ (+8%) und zu einer Abnahme der Apoptoserate bei AML- (-2%) und Leukapheresat-PZ (-15%). Die Proliferationsrate verhielt sich spiegelbildlich dazu: bei MDS-PZ nahm sie um 1% und bei gesunden KM-PZ um 6% ab, wohingegen sie bei AML-PZ um 6% und Leukapheresat-PZ um 4% unter dem Einfluss von VPA zunahm.

Beleuchtet man die einzelnen Diagnosegruppen, können folgende Aussagen formuliert werden:

- Bei HR-MDS-PZ förderte VPA die Apoptose (+ 13 %,  $p = 0,903$ ) und hemmte die Proliferation (- 10 %,  $p = 0,255$ ). NR-MDS-PZ zeigten eine Abnahme der Apoptose (-1 %) und eine Zunahme der Proliferation (+4 %) im Vergleich zu den Ansätzen ohne VPA ( $p > 0,05$ ).
- VPA verstärkte den Wachstumsfaktor G-CSF: Durch G-CSF mobilisierte PZ aus gesundem KM (Leukapheresat) wiesen anfänglich (nach 24 Stunden) eine signifikante Zunahme der Apoptose auf ( $p = 0,041$ ), die nach 96 Stunden (Tag 4) durch VPA in eine Abnahme der Apoptose (- 27 %) überging ( $p = 0,094$ ). An Tag 4 war eine signifikante Zunahme der Proliferationsrate (+8 %,  $p = 0,017$ ) durch VPA zu verzeichnen. VPA hatte eine signifikante Wirkung auf Apoptose ( $p = 0,019$ ) und Proliferation ( $p = 0,005$ ) von Leukapheresat-PZ bezogen auf den Zeitfaktor (96 Stunden).

- Betrachtet man gesunde KM-PZ, die ohne G-CSF Stimulation durch Punktion aus dem KM gewonnen wurden, so bewirkte VPA hier das Gegenteil: Zunahme der Apoptose (18 % mehr Apoptose durch VPA im Vergleich zu den Ansätzen ohne VPA am Tag 4,  $p=0,478$ ) und Abnahme der Proliferation (-11 % am Tag 4,  $p=0,105$ ) von gesunden CD34-positiven KM-PZ in vitro. VPA verringerte über die Dauer von vier Tagen (Zeitfaktor) signifikant die Proliferationsrate ( $p=0,040$ ) von gesunden CD34-Progenitorzellen.
- Wird die Apoptose und Proliferation von Leukapheresat- und KM-PZ, die durch Punktion gewonnen wurden, verglichen, ergab sich bezogen auf die Apoptose ( $p=0,023$ ) und Proliferation ( $p=0,026$ ) über die Dauer von vier Tagen ein signifikanter Unterschied zwischen den Ansätzen mit und ohne VPA. Dies bedeutet, dass die Wirkung des Wachstumsfaktors G-CSF, der zur Gewinnung von Leukapherese-PZ eingesetzt wird, durch VPA verstärkt wurde und sich die Apoptose und Proliferation von gesunden CD34-positiven Progenitorzellen zu Gunsten der Zellvermehrung veränderte.
- VPA förderte die Proliferation von AML-PZ in vitro (Zunahme der Proliferationsrate unter VPA um 6 %,  $p = 0,045$ ) und hemmte die Apoptose (-3 %,  $p = 0,467$ ) und ist demnach als Monotherapeutikum in vitro nicht zytoreduktiv / proliferationshemmend bei AML-Blasten.

Klinische Studien mit VPA zeigten ein recht gutes Ansprechen bei NR-MDS. Diese Ergebnisse korrelieren mit den in-vitro-Daten dieser Arbeit: NR-klassifizierte MDS-PZ wiesen unter VPA eine höhere Apoptoserate auf als bei den Ansätzen ohne VPA. Dies könnte mit einer Differenzierungsinduktion der NR-MDS-PZ zusammenhängen. AML-PZ hingegen zeigten unter VPA-Einfluss eine geringere Apoptose- und eine höhere Proliferationsrate. Verschiedene klinische Studien haben bei AML-Patienten unter VPA-Therapie einen Blastenanstieg und eine ungenügende Ansprechrate bei Kombinationstherapie mit ATRA beobachtet. Es gibt jedoch erste in vitro und in vivo Daten zur Kombinationsbehandlung von VPA mit DNA-Methyltransferaseinhibitoren wie 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine), die vielversprechend für die zukünftige Behandlung von HR-MDS und AML-Patienten sind.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- ACHARYA, SUCHITRA M.D.; BUSSEL, JAMES B. M.D. Hematologic Toxicity of Sodium Valproate. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 2000; 22: 62-65
- AGUAYO A. et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000; 96: 2240-2245
- AKTORIES, K., UNGER, C., Mittel zur Behandlung von Tumoren: Tumorchemotherapie, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Urban & Fischer, München/Jena, 2005; 924
- ANDERSON JE. et al. Phase II study of busulfan (BU) and total body irradiation (TBI) as a novel preparative regimen in allogeneic marrow transplantation (BMT) for advanced myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 1999; 23: 214
- ANZAI K., KITAJIMA H., KUBO M. [A case of pure red cell aplasia associated with sodium valproate therapy] *Rinsho Ketsueki* 1994; 35: 286-290.
- ARNOLD R. et al. Unrelated bone marrow transplantation in patients with myelodysplastic syndromes and secondary acute leukemia: an EBMT survey. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 1213
- ASANO H., HOTTA T., ICHIHARA M., MURATE T., KOBAYASHI M., SAITO H. Growth analysis of marrow CD34-positive hematopoietic progenitor cells in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1994; 8:833-838
- AUL C., et al. Increasing incidence of MDS: Real or fictitious? *Leuk Res* 1998; 22: 93-100
- AUL C, et al. Myelodysplastische Syndrome. Epidemiologische und äthiologische Aspekte. *Dtsch Med Wochenschr* 1992; 117:1223-1231
- AUL C, et al. Primary Myelodysplastic Syndromes: Ananalysis of Prognostic Factors in 235 Patients and Proposals for an Improved Scoring System. *Leukemia* 1992; 6: 52-59
- AUL C., et al. Remission rates, survival and prognostic factors in 90 patients with advanced MDS treated with intensiv chemotherapy. *Haematol Blood Transfus* 1997; 38: 918-922
- AUL C., GIAGOUNIDIS A., GERMING U. Myelodysplastische Syndrome, Innere Medizin, Urban & Fischer, München/Jena 2004; 687-695
- BARR RD., COPELAND SA, STOCKWELL ML, MORRIS N, KELTON JC (1982) Valproic acid and immune thrombocytopenia. *Barr RD, Copeland SA, Stockwell ML, Morris N, Kelton JC; Arch Dis Child* 1982; 57:681-684
- BARRETT J., SAUNTHARARAJAH Y., MOLLDREM J. Myelodysplastic syndrome and aplastic anemia: Distinct entities or diseases linked by a common pathophysiology? *Semin Hematol* 2000; 37: 15-29
- BEGEMANN H., RASTETTER J., 4.Auflage, 1993; 31-33, 588-597
- BENNETT JM, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982; 51: 189-199
- BENNETT JM. et al. The chronic myeloid leukemias: guidelines for distinguishing chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukaemia group. *Br. J Haematol* 1994; 87: 746
- BENNETT JM. World Health Organization classification of the acute leucemias and myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol* 2000; 72: 131-133
- BERAN M. et al. Topotecan an Cytarabin is an active combination regimen in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Clin Oncol* 1999; 17: 2819
- BERGER G., HUNAUULT-BERGER M., RACHIERU P. et al. Increased apoptosis in mononucleated cells but not CD34+ cells in blastic forms of myelodysplastic syndromes. *Hematology J.* 2001; 2:87-96
- BERGER P., ENGELHARDT R., MERTELSMANN R. Knochenmarkpunktion/-biopsie, Das Rote Buch, Hämatologie und Internistische Onkologie, ecomed, Landsberg/Lech, 2. Auflage: 2002; 306-307, 315-317, 371, 811-813
- BERRIDGE M.V. and TAN A.S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 1993; 303: 474-482

- BÖCKER W., DENK H., HEITZ U. Pahtologie, Urban & Fischer, München/Jena, 2004; 18-19, 66-68, 189-191, 507
- BRAUN J., DORMANN A. Knochenmarkpunktion und –biopsie, Klinikleitfaden Innere Medizin, Urban & Fischer, München/Jena, 10.Auflage: 2006; 52-53
- BUG G., GUL H., SCHWARZ K., PFEIFER H., KAMPMANN M., ZHENG X., BEISSERT T., BOEHRER S., HOELZER D., OTTMANN OG., RUTHARDT M. Valproic acid stimulates proliferation and self-renewal of hematopoietic stem cells; *Cancer Res.* 2005; 65: 2537-2541
- BUG G., ZHENG X., SCHOCH C. et al. (2005) Inhibitory and Proliferation-Inducing Effects of Valproic Acid on Leukemic Stem Cells from Different Acute Myeloid Leukemias. *Blood*; 2005, 106: 1375
- BUG G., RITTER M., WASSMANN B. et al. Clinical Trial of Valproic Acid and All-Trans Retinoic Acid in Patients with Poor-Risk Acute Myeloid Leukemia. *Cancer* 2005; 104: 2717-2725
- BURTON BS. On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetoacetate. *Am Chem J.* 1882; 3:385-395
- CAI D, WANG Y, OTTMANN OG, BARTH PJ, NEUBAUER A, BURCHERT A. FLT3-ITD-, but not BCR/ABL-transformed cells require concurrent Akt/mTor blockage to undergo apoptosis after histone deacetylase inhibitor treatment. *Blood* 2006;107: 2094-2097
- CAMERON EE., BACHMAN KE., MYOHANEN S. et al. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the reexpression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 1999; 21:103–107
- CARLI PM. et al. Update of epidemiological characteristics of myelodysplastic syndromes in a well-defined French Population between 1980 and 1995. *Leuk Res* 1999; 23: 159
- CHEN BA, ZHAO HH, GAO C, SHAO ZY, XIA GH, DOHNER K. Effects of sodium valproate on proliferation and apoptosis of human myelodysplastic syndromes cell line MUTZ-1. *Ai Zheng* 2007; 26:1323-1329
- CINATL J. Jr, CINATL J., DRIEVER PH., KOTCHETKOV R., POUCKOVA P., KORNHUBER B., SCHWABE D. Sodium valproate inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells. *Anticancer Drugs* 1997; 8:958-963
- CINATL J. Jr, CINATL J., SCHOLZ M., DRIEVER PH., HENRICH D., KABICKOVA H., VOGEL JU., DOERR HW., KORNHUBER B. Antitumor activity of sodium valproate in cultures of human neuroblastoma cells. *Anticancer Drugs* 1996; 7:766- 773
- CINATL J. Jr, KOTCHETKOV R., BLAHETA R., DRIEVER PH., VOGEL JU., CiNatl J. Induction of differentiation and suppression of malignant phenotype of human neuroblastoma BE(2)-C cells by valproic acid: enhancement by combination with interferon-alpha. *Int J Oncol.* 2002; 20: 97-106
- CIVIN CI. et al. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* 1984; 133:157-165
- CONLEY EL., COLEY KC., POLLOCK BG., DAPOS SV., MAXWELL R., BRANCH RA., MAY RB. Prevalence and risk of thrombocytopenia with valproic acid: experience at a psychiatric teaching hospital. *Pharmacotherapy* 2001; 21: 1325-1330
- COVANIS A., GUPTA AK., JEAUVONS PM. Sodium valproate: monotherapy and polytherapy. *Epilepsia* 1982; 23:693-720
- DE FELICE L., TATARELLI C., MASCOLO MG., Gregorj C., AGOSTINI F., FIORINI R., GELmetti V., PASCALE S., PADULA F., PETRUCCI MT., ARCESE W., NERVI C. Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid Enhances the Cytokine-Induced Expansion of Human Hematopoietic Stem Cells; *Cancer Research* 2005; 65: 1505-1513
- DE WITTE T. et al. Insensitive chemohearpie for poor prognosis myelodysplastic syndromes (MDS) and secondary acute myeloid leukemia (sAML) following MDS of more than 6 months duration. A pilot study by the Leukemia Cooperative Group of the European Organisation for Research and Treatment in cancer (EORTC-LCD) *Leukemia* 1995, 9: 1805-1811
- DE WITTE T. et al. For the Chronic and Acute Leukemia Working Parties of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Autologous bone marrow transplantation for patients with myelodysplastic syndrome (MDS) or acute myeloid leukemia following MDS. *Blood* 1997; 90: 3853-3859

- DELGADO MR., RIELA AR., MILLS J., BROWNE R., ROACH ES. Thrombocytopenia secondary to high valproate levels in children with epilepsy; *J Child Neurol.* 1994; 9: 311-314
- DENZLINGER C. et al. Low-dose melphalan induces favourable responses in elderly patients with high-risk myelodysplastic syndromes or secondary leukemia. *Br J Haematol.* 2000; 108: 93-95
- DRESCHER B., GOERLICH K., Reile D. et al. Valproic Acid Induces Cell Cycle Arrest and Differentiation of t(15; 17) Positive Leukemic Cells Independent from ATRA Sensitivity and has no Effect on CD34pos Cells. *Blood* 2005; 106: 2834
- FACCHETTI F., PREVIDI S., BALLARINI M., MINUCCI S., PEREGO P., LA Porta CA. (2004) Modulation of pro- and anti-apoptotic factors in human melanoma cells exposed to histone deacetylase inhibitors. *Apoptosis* 2004; 9:573-82.
- Facs-lab, Uni Mainz, (2006) <http://www.facs-lab.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>
- FARKAS V., Szabo M., RENYI I., KOHLHEB O., BENNINGER C. Temporary pure red-cell aplasia during valproate monotherapy: clinical observations and spectral electroencephalographic aspects; *J Child Neurol.* 2000 ; 15: 485-487
- FELSENFELD G., GROUNDINE M. Controlling the double helix. *Nature* 2003; 421: 448-453
- FENG JF., ZHUANG M., ZHU LJ., SHENG ZL., ZHU YQ., Li CP. [Effect of IL-6/sIL-6R on ex vivo expansion of human cord blood derived CD34+ cells]; *Ai Zheng* 2004; 23: 715-718
- GANICK DJ., SUNDER T., FINLEY JL. Department of Pediatrics Division of Hematology, East Carolina University School of Medicine, Greenville, North Carolina; *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1990; 12: 80-85
- GARCIA-MANERO G., KANTARJIAN H., ISSA J-P. et al. Results of a phase I/II study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) and valproic acid (VPA) in patients with leukaemia. *Blood* 2004; 104: 263
- GARCIA-MANERO G., KANTARJIAN H., ISSA J-P. et al. Results of a phase I/II study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) and valproic acid (VPA) in patients with leukaemia. *Blood* 2006; 108: 3271-3279
- GATTERMANN N. From sideroblastic anemia to the role of mitochondrial DNA mutations in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 2000; 24:141-151
- GERMING U. et al. Klinik, Morphologie und Prognose chronischer myelomonozytärer Leukämien. *Med Klein* 1999; 94: 467-472
- Germing U., Strupp C., Kündgen A., Giagounidis A., Gattermann N. und Haas R.; *MDS; Diagnostik und Therapie, tägl. Prax.* Hans Marseille Verlag GmbH München 2004; 45: 265-278
- GEROK W., HUBER Chr., MEINERT Th., ZEIDLER H. *Die Innere Medizin, Schattauer, 2000: 119, 129-135*
- GESUNDHEIT B., KIRBY M., LAU W., KOREN G., ABDELHALEEM M., KO CH. Thrombocytopenia and megakaryocyte dysplasia: an adverse effect of valproic acid treatment. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2002; 24:589-590
- GIDAL B., SPENCER N., MALY M., PITTERLE M., WILLIAMS E., COLLINS M., JONES J. Valproate-mediated disturbances of hemostasis: relationship to dose and plasma concentration. *Neurology* 1994; 44: 1418-1422
- GÖTTLICHER M., MINUCCI S., ZHU P., KRAMER OH., SCHIMPF A., GIAVARA S., SLEEMAN JP., LO COCO F., NERVI C., PELICCI PG., HEINZEL T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J;* 2001; 20: 6969-6978
- GREENBERG P., COX C., LEBEAU MM. et al. International scoring system for evaluation prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89: 2079-2088
- GREENBERG PL., Young NS., GATTERMANN N. Myelodysplastic syndromes. In: *Hematology: The American Society of Hematology Education Program Book.* Washington, DC: The American Society of Hematology 2002:136-161
- GUEL H., WASSERMANN B., ROMANSKI A. et al. Effect of the histone deacetylase inhibitor valproic acid in combination with all-trans retinoic acid on normal and malignant hematopoiesis. *Blood* 2003;102:2313
- GUILLEMIN MC., RAFFOUX E., VITOUX D. In Vivo Activation of cAMP Signaling Induces Growth Arrest and Differentiation in Acute Promyelocytic Leukemia. *J. Exp. Med.* 2002; 11: 1373-1380

- GURVICH N., Tsygankova OM., Meinkoth JL., Klein PS. Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer Res.* 2004; 64: 1079-1086
- HAAS R., Kronenwett R. Fragen und Antworten zur hämatopoetischen Stammzelle, Deutscher Ärzte-Verlag 2005; 3-4, 7, 13, 15, 20, 22-23
- HAASE D. et al. Cytogenetic findings in 179 patients with myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 1995; 70: 171-187
- HARRIS NL. et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3835-3849
- HELLSTROM-Lindberg E. et al. Treatment of anaemia in myelodysplastic syndromes with granulocyte colony-stimulating factor plus erythropoietin: results from a randomized phase II study and long-term follow-up of 71 patients. *Blood* 1998; 92: 68-75
- JAGER-ROMAN E. et al. Fetal growth, major malformations, and minor anomalies in infants born to women receiving valproic acid. *J Pediatr.* 1986; 108: 997-1004
- JOHANNESSEN C. Mechanisms of action of valproate: a commentary. *Neurochem Int.* 2000; 37:103–110
- JOHANNESSEN CU., Johannessen SI. Valproate: past, present, and future. *CNS Drug Rev* 2003;9:199–216
- JONASOVA A. et al. A therapy in hypoplastic MDS patients and refractory anaemias without hypoplastic bone marrow. *Br J Haematol.* 1998; 100: 304-309
- JUNEJA HS. et al. Low-dose ARA-C consistently induces hematologic responses in the clinical 5q-syndrome. *Am J Hematol.* 1994; 46: 338-342
- KAWAUCHI K., MIYANO T., Ikeda Y., TATEOKA N., KASAI M., SATO Y., YOKOYAMA M. A report of a case with pure red cell aplasia induced by sodium valproate. *Acta Paediatr Jpn.* 1989; 31: 615-619
- KIESLICH M., SCHWABE D., CINATL J. Jr, DRIEVER PH. Increase of fetal hemoglobin synthesis indicating differentiation induction in children receiving valproic acid; *Pediatr Hematol Oncol.* 2003; 20: 15-22
- KISHI T., FUJITA N., KAWAGUCHI H., Ishimae M., WATANABE K., TANAKA T. Bone marrow suppression induced by high dose valproic acid. *Arch Dis Child.* 1994; 71: 153-155
- KO CH., KONG CK., TSE PW. Valproic acid and thrombocytopenia: cross-sectional study. *Hong Kong Med J.* 2001; 7: 15-21
- KUENDGEN A., STRUPP C., AIVADO M., BERNHARDT A., HILDEBRANDT B., HAAS R., GERMING U. and GATTERMANN N. Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. *Blood* 2004; 104: 1266-1269
- KUENDGEN A., SCHMID M., KNIPP S. et al. Valproic acid achieves high response rates in patients with low-risk myelodysplastic syndromes [abstract]. *Blood.* 2005; 106: 233
- KuEndgen A, SCHMID M, SCHLENK R, KNIPP S, HILDEBRANDT B, STEIDL C, GERMING U, HAAS R, DOHNER H, GATTERMANN N. The Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor Valproic Acid as Monotherapy or in Combination with All-Trans Retinoic Acid in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Cancer* 2006; 106: 112-119
- KUENDGEN A. und GATTERMANN N. Valproic Acid for the Treatment of Myeloid Malignancies [review]. *Caner* 2007; 110: 943-954
- LINDENAU S. (1996) Institut für Transfusionsmedizin HU-Berlin, Dissertationsarbeit, Durchflusszytometrie. <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/medizin/lindenau-sabine/HTML/Gesamt-Durchflu.html>
- LÖSCHER W. Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Prog Neurobiol.* 1999; 58: 31-59
- LÜLLMANN H., MOHR K. Antiepileptika, Pharmakologie und Toxikologie, Georg Thieme Verlag 1999: 305
- MARCHION DC., BICAKU E., DAUD AI., SULLIVAN DM., MUNSTER PN. Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res.* 2005; 65: 3815–3822
- MEUNIER H., CARRAZ G., MEUNIER Y., EYMARD P., AIMARD M. Propriétés pharmacodynamiques de l'acide n-dipropylacétique. *Thérapie* 1963; 18:435-438
- MINNING H. et al. Secondary MDS: morphological findings, cytogenetics and clinical course in 55 patients. *Haematol Blood Transfus* 1997; 38: 923-927

- MOLLDREM J.J., CAPLES M., MAVROUDIS D. et al. Antithymocyte globulin for patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 1997; 99: 699-705
- MOLLDREM J.J. et al. Antithymocyte globulin for treatment of the bone marrow failure associated with myelodysplastic syndromes: *Ann Intern Med.* 2002; 137: 156-163
- MORRIS N., BARR RD., PAI KRM. et al. Valproic acid and thrombocytopenia. *Can Med Assoc J* 1981; 125: 63-64
- NAIR R., NAIR CN., ADVANI SH. All-trans retinoic acid with low dose cytosine arabinoside in the treatment of myelodysplastic syndrome. *Leukemia & Lymphoma* 1998, 29: 187-192
- NERVI C., LO COCO F., PELICCI PG. Valproic acid plus retinoic acid induce differentiation in chemotherapy resistant acute myeloid leucemia patients [abstract]. *Blood* 2004; 104: 1805
- NISSE C. et al. Exposure to occupational and environmental factors in myelodysplastic syndromes. Preliminary results of a case-control study. *Leukemia* 1995; 9: 693
- OMOTO E. et al. Low-dose melphalan for treatment of high-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia*; 1996; 10: 609-614
- PARKER JE., FISHLOCK KL., MIJOVIC J., CZEPULKOWSKI B., PAGLIUCA A., MUFTI GJ. 'Low-risk' myelodysplastic syndrome is associated with excessive apoptosis and an increased ratio of pro-versus anti-apoptotic bcl-2-related proteins. *Br J Haematol.* 1998; 103:1075-1082
- PEDERSEN- BJERGAARD J., DAUGAARD G., HANSEN SW. Increased risk of myelodysplasia and leukemia after etoposide, cisplatin, and bleomycin for germ-cell tumors. *Lancet* 1991; 338: 359
- PFEILSTÖCKER M. et al. Cross-validation of prognostic scores in myelodysplastic syndromes on 386 patients from a single institution confirms importance of cytogenetics. *Br J Haematol* 1999; 106: 455
- PHIEL CJ., ZHANG F., HUANG EY., GUENTHER MG., LAZAR MA., KLEIN PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer and teratogen. *J Biol Chem.* 2001; 276: 36734-36741
- PILATRINO C., CILLONI D., MESSA E. et al. Increase in platelet count in older, poor-risk patients with acute myeloid leukaemia or myelodysplastic syndrome treated with valproic acid and all-trans retinoic acid. *Cancer* 2005; 104: 101-109
- PSCHYREMBEL, *Klinisches Wörterbuch*, Walter de Gruyter 2004; 260. Auflage, Pschyrembel auf CD-Rom
- RADLUND A. et al. Incidence of myelodysplastic syndromes in a Swedish population. *Eur J Haematol* 1995; 54: 153
- RE D., WOLF J., TESCH H. *Grundlagen der Hämatologie*, Innere Medizin, Urban & Fischer 2004: 668-669
- RENZ-POLSTER H, BRAUN J, *Basislehrbuch Innere Medizin* 2001: 245
- REZACOVA M., VAVROVA J., VOKURKOVA D., ZASKODOVA D. Effect of valproic acid and antiapoptotic cytokines on differentiation and apoptosis induction of human leukemia cells. *Gen Physiol Biophys.* 2006; 25: 65-79
- ROßMANITH T., SCHRÖDER B., BUG G., MÜLLER P., KLENNER T., KNAUS R., HOELZER D., OTTMANN OG. (2001) Interleukin 3 Improves the Ex Vivo Expansion of Primitive Human Cord Blood Progenitor Cells and Maintains the Engraftment Potential of SCID Repopulating Cells; *Stem Cell* 2001; 19:313-320
- RUNDE V. et al. Bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as first-line treatment in patients with myelodysplastic syndromes: early transplantation is associated with improved outcome. *Bone Marrow Transpl.* 1998; 21: 255
- SHAH AJ., SMOGORZEWSKA EM., HANNUM C., CROOKS GM. Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34+. *Blood* 1996; 87:3563-3570
- SILVERMANN LR., DEMAKOS EP., METERSON B. A randomized trial of subcutaneous azacytidine (AZA C) in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the Cancer and Leukemia Group B (CAL-GB) [abstract]. *Proc AM Soc Clin Oncol.* 1998; 17: 14
- SIITONEN T et al. for the Finnish Leukemia Group. Valproic acid combined with 13-cis retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the treatment of patients with myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2007; 92: 1119-1122.
- SORIANO AO, YANG H, FADERL S, ESTROV Z, GILES F, RAVANDI F, CORTES J, WIERDA WG, OUZOUNIAN S, QUEZADA A, PIERCE S, ESTEY EH, ISSA JP, KANTARJIAN HM, GARCIA-MANERO

- G. Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 2007; 110: 2302-2308
- TANG R., FAUSSAT AM., MAJDAK P., PERROT JY., CHAOUI D., LEGRAND O., MARIE JP. Valproic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in acute myeloid leukaemia cells expressing P-gp and MRP1. *Leukemia* 2004; 18: 1246–1251
  - TEHRANCHI R., FADEEL B., FORSBLOM A-M., CHRISTENSSON B., SAMUELSSON J., ZHIVOTOVSKY B., HELLSTROM-LINDBERG E. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits spontaneous cytochrome c release and mitochondria-dependent apoptosis of myelodysplastic syndrome hematopoietic progenitors. *Blood* 2003; 101: 1080-1086
  - TITTLE TV., SCHAUMANN BA., RAINEY JE., TAYLOR K. Segregation of the growth slowing effects of valproic acid from phenytoin and carbamazepine on lymphoid tumor cells. *Life Sci.* 1992; 50: 79-83
  - TRUS MR., YANG L., SUAREZ SAIZ F., BORDELEAU L., JURISICA I., MINDEN MD. The histone deacetylase inhibitor valproic acid alters sensitivity towards all trans retinoid acid in acute myeloblastic leukemia cells. *Leukemia* 2005; 19: 1161–1168
  - VERROTTI A., GRECO R., MATERA V., ALTOBELLI E., MORGESE G., CHIARELLI F. Platelet count and function in children receiving sodium valproate. *Pediatr Neurol.* 1999; 21: 611-614
  - VOSS von H., SCHULTE-BERBUHL R., GOBEL U. Side effects of sodium valproate (sodium di-N-propylacetate) on malonyldialdehyde production and other platelet function tests. *Minerva Pediatr.* 1978; 30:1397-1404
  - WALMOD PS., FOLEY A., BEREZIN A., ELLERBECK U., NAU H., BOCK E., BEREZIN V. Cell motility is inhibited by the antiepileptic compound, valproic acid and its teratogenic analogues. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1998; 40: 220-237
  - WALMOD PS., SKLADCHIKOVA G., KAWA A., BEREZIN V., BOCK E. Antiepileptic teratogen valproic acid (VPA) modulates organisation and dynamics of the actin cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1999; 42: 241-255
  - WERLING U., SIEHLER S., LITFIN M., NAU H., GOTTLICHER M. Induction of differentiation in F9 cells and activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta by valproic acid and its teratogenic derivatives. *Mol Pharmacol.* 2001; 59: 1269-1276
  - WIJERMANS PW. et al. Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. *J Clin Oncol.* 2000; 18: 956-962
  - WILLMAN CL. et al. Achievements in understanding and treatment of myelodysplastic syndromes. American Society of Hematology, Washington. *Hematology* 2000. p.110-132
  - WOLVETANG EJ., JOHNSON KL., KRAUER K., RALPH S., LINNANE AW. Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis. *FEBS Lett.* 1994; 339:40-44
  - YANG H., HOSHINO K., CANALLI AA. et al. Preclinical studies of the combination of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) and the histone deacetylase inhibitor (HDI) valproic acid (VPA) in leucemic cell systems [abstract]. *Blood.* 2003; 102: 622
  - YOSHIDA Y. The Role of Apoptosis in the Myelodysplastic Syndromes, Takeda General Hospital, Kyoto, Japan. Erschienen in BENNET, JM. *The Myelodysplastic Syndromes: Pathobiology and Clinical Management*; Informa Health Care 2002 : 177-201
  - Yang H, Hoshino K, Sanchez-Gonzalez B, Kantarjian H, Garcia-Manero G. Antileukemia activity of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid. *Leuk Res.* 2005; 29: 739-748
  - YOUNG JC., Wu S., Hansteen G, Du C, Sambucetti L, Remiszewski S, O'Farrell AM, Hill B, Lavau C. Inhibitors of histone deacetylases promote hematopoietic stem cell self-renewal. *Cytotherapy* 2004; 6: 328-336

## 8

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
ALG	Antilymphozytenglobulin
AML	Akute myeloische Leukämie
ABTS	Farbstoff ABTS (2,2-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid])
ATG	Antithrombozytenglobulin
ATRA	(engl.) all-trans retinoid acid; all-trans-Retinsäure
Auer-Stäbchen	John A., Pharmak., St. Louis, 1875-1948): (engl.)auer rods; stäbchenförmige, bei Pappenheim-Färbung rotviolette intrazelluläre Strukturen, die aus den Inhaltsstoffen azurophiler Granula gebildet werden
CD34-positive SZ	CD34-positive Stammzellen
CD	cluster of differentiation
CMML	Chronische myelomonozytäre Leukämie
CO <sub>2</sub>	chem. Formel für Kohlendioxid
CR	(engl.) complete response
CRp	(engl.) complete response except for platelet count
DAC	5-aza-2'-deoxycytidine, Decitabine
De-novo-MDS	neu entstandenes MDS (nicht sekundär)
DNA	(engl.) deoxyribonucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Abk. für ethylene diamine tetraacetic acid; Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
EPO	Erythropoetin
EVK	Evangelisches Krankenhaus
f.	femininum
FAB-Group	(engl.) french-american-british-group
FAB-Klassifikation	French-American-British-classification
FACS	(engl.) fluorescence-activated cell sorter
FAS	Ein transmembranöses Glykoprotein, das apoptotische Signale vermittelt (Untergruppe von TNF-R)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Flt-3 Ligand
FLT3	(engl.) fms-like tyrosine kinase-3 (FLT3) gene
Flt3L	Flt-3 ligand (Shah AJ, Smogorzewska EM, Hannum C, Crooks GM. Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34+. Blood 1996; 87: 3563–3570)
FSC	(engl.) forward light scatter
FTI	Farnesyltransferase Inhibitor
FTS3	Flt3L + thrombopoietin + SCF + IL-3
G <sub>0</sub> -Zellphase	Ruhephase: Ausgereifte (ausdifferenzierte), nicht mehr teilungsfähige Zellen, die eine bestimmte Aufgabe innerhalb des Organismus wahrnehmen, verbleiben in der G <sub>1</sub> -Phase, die dann als G <sub>0</sub> -Phase bezeichnet wird.
G <sub>1</sub> -Zellphase	G <sub>1</sub> -Phase (für engl. gap, Lücke, Abstand), postmitotische Phase oder Präsynthesephase
G-CSF	(engl.) granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	(engl.) granulocyte monocyte colony stimulating factor
HATs	Histon-Acetyltransferasen

HDAC	(engl.) histone deacetylase
HDAC-Inhibitor	Histon-Deacetylase-Inhibitor
HHU	Heinrich-Heine-Universität
HL-60	(engl.) human promyelocytic leukemia cells; humane Leukämiezelllinie
HLA	(engl.) human leucocyte antigen
HR-MDS	Hochrisiko-MDS
HSC	(engl.) hematopoietic stem cell
Human CB	(engl.) human cord blood; humanes Nabelschnurblut
HWZ	Halbwertszeit
IL-11	Interleukin-11
IL-3	Interleukin 3
IL-6	Interleukin-6
IPSS	(engl.) international prognosting scoring system
IWG	(engl.) international working group
KG	Körpergewicht
KM	Knochenmark
KM-Punktat	Knochenmarkpunktat
KM-SZ	Knochenmarkstammzelle
LDH	Laktatdehydrogenase
M1	AML: myeloblastär ohne Differenzierung
M2	myeloblastär mit Differenzierung
M3	promyelozytär
M4	myelomonozytär
M5a	monozytär ohne Differenzierung
M5b	monozytär mit Differenzierung
M6	Erythroleukämie
M7	megakaryoblastär
MACS	(engl.) magnetic cell separation
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
mg/m <sup>2</sup> /d	Milligramm pro Quadratmeter Körperoberfläche pro Tag
MM	Molare Masse
MNC	(engl.) mononuclear cell
MNCs	(engl.) mononuclear cells; Mononukleäre Zellen
MOLT-4	(engl.) human T-lymphocyte leukemia; humane Leukämiezelllinie
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
MTS	3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sufophenyl)-2H-tetrazolium
MW	Mittelwert
MWab	Mittelwert der Ansätze a und b
MWcd	Mittelwert der Ansätze c und d
NADH	Nicotinamidadenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenin-Dinukleotidphosphat
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NR-MDS	Niedrigrisiko-MDS
p21	p21 ist ein negativ regulierendes Protein des Zellteilungszyklus
PBS	(engl.) phosphate buffered serum; Phosphat-gepuffertes NaCl
PBSC	(engl.) peripheral blood stem cells; periphere Blutstammzellen

PES	Phenazine Ethosulfate
PML-RAR	(engl.) retinoic acid receptor fusion proteins resulting from chromosomal translocations which can interact with components of the corepressor complex (vgl. Göttlicher et al., 2001)
PRA	(engl.) pure refractory anemia (Refraktäre Anämie ohne multilineäre Dysplasien)
PRCA	(engl.) pure red cell aplasia
PSA	(engl.) pure sideroblastic anemia (ohne multilineäre Dysplasien)
PZ	Progenitorzellen
RA	Refraktäre Anämie
RAEB	(engl.) refractory anemia with excess of blasts
RAEB I	(engl.) refractory anemia with excess of blasts (5-10 % medullärer Blastenteil)
RAEB II	(engl.) refractory anemia with excess of blasts (11-19 % medullärer Blastenteil)
RAEB-T	RAEB in Transformation zur AML
RAR	(engl.) retinoic acid receptor
RARS	(engl.) refractory anemia with ringed sideroblasts
RCMD	(engl.) refractory cytopenia with multilineage dysplasia
Rh Insulin	(engl.) recombinant human insulin
Rpm	(engl.) rounds per minute
RSCMD	(engl.) refractory sideroblastic cytopenia with multilineage dysplasia
s.c.	(lat.) subcutan
sAML	sekundäre AML
sAML/MDS	sekundäre AML aus MDS entstanden
SCF	(engl.) stem cell factor; Stammzellefaktor
SFEM	(engl.) serum-free expansion medium
S-Phase	Synthesephase: Reduplikation der DNA, Produktion der Histone
SPSS	(engl.) statistical package for social science
SSC	(engl.) sideward light scatter
Syndr.	Syndrome
SZ	Stammzellen
Thy-1	Das humane Thy-1, ein membrangebundenes Glykoprotein, wird auf der Oberfläche von Fibroblasten, Nervenzellen, aktivierten mikrovaskulären Endothelzellen und auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRIAL	(engl.) tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TSA	Trichostatin A (HDAC-Inhibitor)
UCB	(engl.) umbilical cord blood
VPA	(engl.) valproic acid, Valproinsäure
WHO	(engl.) world health organization
Wnt-faktor	Kombination aus Wg. (wingless) and Int. (integration); "The Int-1 gene and the wingless gene were found to be homologous, with a common evolutionary origin evidenced by similar amino acid sequences of their encoded proteins"

(Quelle: wikipedia). Der Wnt-Signalweg beschreibt eine Abfolge von Mechanismen bei Bindung von Wnt-Proteinen an die Zelloberfläche.  
Zustand nach

Z.n.

## 9 ABILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1, S. 11: Strukturformel von Valproinsäure; Quelle: LÜLLMANN H., MOHR K., Antiepileptika, Pharmakologie und Toxikologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York, 1999: 305
- Abb. 2, S. 21: Differenzierung der pluripotenten Stammzelle; Quelle: BÖCKER W., DENK H., HEITZ U., Pathologie, Urban & Fischer, München/Jena, 2004: 507
- Abb. 3, S. 23: Cluster of differentiation; Quelle: HAAS R., KRONENWETT R., Fragen und Antworten zur hämatopoetischen Stammzelle, Deutscher Ärzte-Verlag, 2005 :15
- Abb. 4, S. 25: Mechanismen der Apoptose; Quelle: BÖCKER W., DENK H., HEITZ U., Pathologie, Urban & Fischer, 2004: 68
- Abb. 5, S. 33: Morphologie von CD 34-positiven Zellen. Die Zellen wurden immunmagnetisch aus dem peripheren Blut angereichert. Quelle: HAAS R., KRONENWETT R., Fragen und Antworten zur hämatopoetischen Stammzelle, Deutscher Ärzte-Verlag, 2005: 14
- Abb. 6, S. 40: QQ-Diagramm Normalverteilung Apoptose Tag 1 ohne VPA
- Abb. 7, S. 40: QQ-Diagramm Normalverteilung Apoptose Tag 1 mit VPA
- Abb. 8, S. 40: QQ-Diagramm Normalverteilung Apoptose Tag 4 ohne VPA
- Abb. 9, S. 40: QQ-Diagramm Normalverteilung Apoptose Tag 4 VPA
- Abb. 10, S. 41: QQ-Diagramm Normalverteilung Proliferation Tag 1 ohne VPA
- Abb. 11, S. 41: QQ-Diagramm Normalverteilung Proliferation Tag 1 mit VPA
- Abb. 12, S. 41: QQ-Diagramm Normalverteilung Proliferation Tag 4 ohne VPA
- Abb. 13, S. 41: QQ-Diagramm Normalverteilung Proliferation Tag 4 mit VPA
- Abb. 14, S.43: Relativer Anstieg der Apoptose durch VPA an Tag 1
- Abb. 15, S.44: Relativer Anstieg der Apoptose durch VPA an Tag 4
- Abb. 16, S.46: Relativer Anstieg der Proliferation durch VPA an Tag 1
- Abb. 17, S.46: Relativer Anstieg der Proliferation durch VPA an Tag 4
- Abb. 18, S.49: Relativer Anstieg der Apoptose und Proliferation mit VPA bei MDS
- Abb. 19, S.51: Apoptose von HR-MDS im Vergleich zu NR-MDS an Tag 1
- Abb. 20, S.51: Apoptose von HR-MDS im Vergleich zu NR-MDS an Tag 4
- Abb. 21, S.53: Proliferation von HR-MDS im Vergleich zu NR-MDS an Tag1
- Abb. 22, S.53: Proliferation von HR-MDS im Vergleich zu NR-MDS an Tag4
- Abb. 23, S.56: Relativer Anstieg der Apoptose mit VPA bei Leukapherese-PZ
- Abb. 24, S.56: Relativer Anstieg der Proliferation mit VPA bei Leukapherese-PZ
- Abb. 25, S.58: Relativer Anstieg der Apoptose mit VPA bei gesunden KM-PZ
- Abb. 26, S.58: Relativer Anstieg der Proliferation mit VPA bei gesunden KM-PZ
- Abb. 27, S.61: Relativer Anstieg der Apoptose mit VPA bei Leukapheresat und gesundem KM Tag 1
- Abb. 28, S.61: Relativer Anstieg der Apoptose mit VPA bei Leukapheresat und gesundem KM Tag 4
- Abb. 29, S.63: Relativer Anstieg der Proliferation mit VPA bei Leukapheresat und gesundem KM Tag 1
- Abb. 30, S.63: Relativer Anstieg der Apoptose mit VPA bei Leukapheresat und gesundem KM Tag 4
- Abb. 31, S.66: Relativer Anstieg der Apoptose und Proliferation mit VPA bei AML-PZ an Tag 1
- Abb. 32, S.66: Relativer Anstieg der Apoptose und Proliferation mit VPA bei AML-PZ an Tag 4

## 10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Einteilung der myelodysplastischen Syndrome nach auslösenden Ursachen.  
Quelle: AUL et al., 2004.

Tabelle 2: FAB-Klassifikation myelodysplastischer Syndrome , Quelle: GERMING et al., 2004

Tabelle 3: WHO-Klassifikation myelodysplastischer Syndrome, Quelle: GERMING et al., 2004

Tabelle 4: Internationaler Risikoscore (IPSS) zur Prognoseabschätzung bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom, Quelle: GERMING et al., 2004

Tabelle 5: Düsseldorf-Score zur Prognoseabschätzung bei myelodysplastischem Syndrom, Quelle: GERMING et al., 2004

## 11 DANK

Herrn Professor Dr. RAINER HAAS, dem Direktor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie der Universität Düsseldorf, gilt mein Dank dafür, dass er mir die Durchführung meiner Dissertationsarbeit in seiner Abteilung ermöglichte.

Herrn Professor Dr. NORBERT GATTERMANN, meinem Doktorvater, danke ich für die Überlassung dieses Themas und seine hilfreichen Ratschläge.

Frau Dr. ANDREA KÜNDGEN, meiner wissenschaftlichen Betreuerin, danke ich für die Unterstützung bei der wissenschaftlichen Recherche und die bereitwillige Diskussion aller schwierigen Aspekte meiner Arbeit.

Frau BÄRBEL JUNGE danke ich für die freundliche Einweisung in die Laborarbeit und für das Vermitteln von praktischen Fertigkeiten, für ihre vielfältigen Hilfestellungen und für ihre Anregungen zum Weiterarbeiten.

Ein Dankeschön auch an Herrn Dr. rer. nat. MICHAEL WULFERT für seine Antworten auf viele meiner technischen Fragen.

**Julia Anna Maria Herold**

Geboren am 02.12.1977 in Bonn; ledig

- Berufliche Weiterbildung**
- 04/2008 Beginn der Facharztausbildung bei Prof. Dr. P. Mallmann in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität zu Köln
- Studium**
- WS '97 – SS '98 Musikwissenschaften Universität Köln  
 WS '99 – SS 2000 Studium Generale Universität Hamburg
- 10/2001 – 12/2007 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
 Studium der Humanmedizin, Examensnote: 2,0  
 Dissertationsarbeit bei Prof. Dr. N. Gattermann (Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie)  
 Thema: Über die Auswirkungen von Valproinsäure auf Apoptose und Proliferation CD34-positiver MDS-Progenitorzellen in vitro
- 03/2005 – 03/2007 Private Universität Witten-Herdecke  
 Ausbildung in Chinesischer Medizin (Akupunktur)
- Medizinische Praktika**
- 10/2000 – 04/2001 Malteser Krankenhaus, Bonn  
 Krankenpflegepraktikum: Geriatrie
- 02/2004 – 04/2004 Charité Campus Virchow-Klinikum, Berlin  
 – Famulatur: pädiatrische Endokrinologie und Allgemeine Poliklinik  
 – Famulatur Pädiatrie: Erste Hilfe und Aufnahmestation
- 08/2004 Evangelisches Krankenhaus, Düsseldorf  
 Famulatur: Unfallchirurgie
- 09/2004 Università degli Studi di Sassari, Italien  
 Famulatur: Clinica Urologica, via Deutscher Famulanten-Austausch
- 08/2005 Franziskus Hospital, Bielefeld  
 Gynäkologiepraktikum: einwöchig / Tag- und Nachtdienst
- 03/2006 Dr. OTMAR PERKMANN, Brixen, Italien  
 Hausarztpraktikum
- 08/2006 – 12/2006 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
 1. PJ-Tertial: Innere Medizin
- 12/2006 – 04/2007 Università cattolica del Sacro Cuore  
 Policlinico Agostino Gemelli, Rom, Italien  
 2. PJ-Tertial: Gynäkologie und Geburtshilfe

04/07 – 07/07 Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Frankreich  
3. PJ-Tertial: Chirurgie

### **Schulbildung**

1978 – 1983 Belgien, Brüssel: Besuch eines französischen Kindergartens  
1984 – 1988 Gemeinschaftsgrundschule, Swisttal-Buschhoven  
1988 – 1990 Hardtberg Gymnasium, Bonn (bilingual: französisch/deutsch)  
1990 – 1997 Gymnasium der Deutschen Schule Rom  
Abschluss: italienische und deutsche allgemeine Hochschulreife

### **Auslandsaufenthalte vor dem Studium**

1994, '95, '96 Nord Irland, Omagh: Camphill Village Clanabogan  
Betreuung geistig behinderter Menschen (Rudolf-Steiner-  
Einrichtung)  
12/1999 – 04/2000 Indien, Kerala: Volontariat in einer Missionsstation  
08/2001 Frankreich, Toulouse: Sprachkurs Französisch

### **Weitere Tätigkeiten**

10/1997 – 01/1998 Bühnen der Stadt Köln  
Regieospitantz  
1998 – 1999 Stage School of Music Dance and Drama, Hamburg  
04/2001 – 08/2001 Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD), Bonn  
Arbeit im Empfang  
10/2001 – 01/2007 Düsseldorf, Evangelisches Krankenhaus  
– einjährige Aushilfstätigkeit im pflegerischen Bereich  
– vierjährige wöchentliche Arbeit im Blutabnahmedienst

### **Sprachkenntnisse**

Deutsch: Muttersprache  
Italienisch: fließend in Wort und Schrift  
Französisch: gut in Wort und Schrift  
Englisch: gut in Wort und Schrift  
Latein: Schulkenntnisse

Swisttal, den 14.04.2009