

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

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Rainer Haas

**Exisulind, das Sulfon-Derivat des nicht-steroidalen
Antirheumatikums Sulindac, induziert selektiv über
eine Aktivierung der c-jun NH₂-terminalen Kinase
JNK die Apoptose in sAML/MDS-Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Wolf Christian Prall

2006

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan
Referent: Prof. Dr. Norbert Gattermann
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger Krauspe

Meiner Familie

1.	Einleitung	
1.1	Myelodysplastische Syndrome (MDS) und sekundäre akute myeloische Leukämie (sAML)	8
1.2	Therapieoptionen bei Patienten mit <i>higher risk</i> MDS und sAML/MDS	11
1.3	Exisulind	14
1.4	Fragestellung der vorliegenden Dissertation	17
2.	Material und Methodik	
2.1	Material	18
2.1.1	Allgemeine Reagenzien, Materialien und Geräte	18
2.1.2	Zelllinien, Zellproben und Medien	21
2.1.3	Funktionelle Assays	23
2.1.4	Gesamt-RNA Isolation, cDNA-Synthese und Quantitative RT-PCR	23
2.1.5	Quantitative RT-PCR Primer	24
2.2	Methoden	24
2.2.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	24
2.2.2	Gewinnung CD34+ hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen	25
2.2.2.1	Gewinnung der mononukleären Zellen aus EDTA-Vollblut	25
2.2.2.2	Immunomagnetische Separation der CD34+ Fraktion aus mononukleären Zellen	25
2.2.3	Reinheitsbestimmung der eluierten CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellfraktion mittels FACS-Durchflußzytometrie	28

2.2.4	Behandlung der Zellen mit DMSO-gelöstem Exisulind oder nur mit DMSO	29
2.2.5	Colony-forming Unit Assay (CFU-Assay)	30
2.2.6	Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen mittels Hämatozytometrie	30
2.2.7	Bestimmung der Zellproliferation	31
2.2.8	Bestimmung der Apoptoserate	33
2.2.9	Zellzyklus-Analyse mittels Fluoreszenz-Durchflußzytometrie	34
2.2.10	SAPK/JNK Kinase Assay und Western Blot	35
2.2.10.1	Gewinnung des Gesamtproteins ganzer Zellen	36
2.2.10.2	Konzentrationsbestimmung des Gesamtproteins	37
2.2.10.3	SAPK/JNK Assay	37
2.2.10.4	Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine	38
2.2.10.5	Transfer der Proteine auf Nitrosezellulose-Membranen	38
2.2.10.6	Blocken des Transfers	39
2.2.10.7	Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern	39
2.2.10.8	Detektion der Antikörper-Reaktion	39
2.2.11	Gesamt-RNA Isolation, cDNA-Synthese und RT-PCR	40
2.2.11.1	Gesamt-RNA Isolation	40
2.2.11.2	Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA	41
2.2.11.3	cDNA-Synthese	41
2.2.11.4	Quantitative RT-PCR	42

3.	Ergebnisse	
3.1	Der Effekt von Exisulind auf das Koloniewachstum von KG-1, SKM-1, THP-1 und gesunden CD34+ Zellen	43
3.2	Der Effekt von Exisulind auf die Anzahl von KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen	46
3.3	Der Effekt von Exisulind auf die Proliferation von KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen	50
3.4.1	Der Effekt von Exisulind auf die Apoptose von KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen	54
3.4.2	Der Effekt von 400 μ M und 600 μ M Exisulind auf die Apoptose von KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen	57
3.5	Der Effekt von Exisulind auf den Zellzyklus von KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen	59
3.6	Der Effekt von Exisulind auf die Zellzahl, die Proliferation, die Apoptose und den Zellzyklus von gesunden CD34+ Zellen	62
3.7	Der Effekt von Exisulind auf die c-Jun NH ₂ -terminale Kinase Aktivität von KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen	67
3.8	Hemmbarkeit der Exisulind-vermittelten Apoptoseinduktion durch Zugabe eines JNK-Inhibitors	67
3.9	Der Effekt von Exisulind auf die GADD45 α , - β und - γ mRNA-Expression von KG-1 und SKM-1 Zellen	68
4.	Diskussion	70
5.	Zusammenfassung	80
6.	Appendix	81

7.	Literaturverzeichnis	88
8.	Abkürzungsverzeichnis	101
9.	Danksagungen	103
10.	Lebenslauf	104

1. Einleitung

1.1 Myelodysplastische Syndrome (MDS) und sekundäre akute myeloische Leukämie (sAML)

Die myelodysplastischen Syndrome (MDS) umfassen eine heterogene Gruppe klonaler Knochenmarkserkrankungen, deren Gemeinsamkeiten eine gestörte Proliferation und Reifung der hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen (HSZ) darstellen. Das Knochenmark ist zumeist normo- bis hyper-, selten hypozellulär und oft finden sich vermehrt myeloische Blasten. Die Knochenmarkzellen weisen eine Vielzahl von Dysplasien auf, wobei jede Zellreihe unterschiedlich stark betroffen sein kann (Heaney et al., 1999). Gelegentlich lässt sich eine abnorme, kortikalisnahe Lokalisation von unreifen Progenitorzellen (ALIP, *abnormal localization of immature progenitors*) beschreiben. Bei etwa der Hälfte der Patienten zeigt die zytogenetische Begutachtung der Knochenmarkzellen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einen abnormen Karyotyp (Greenberg et al., 1997). Trotz der in der Regel hohen Knochenmarkszellularität sind die betroffenen Patienten zytopen. Aus der Zytopenie resultiert die klinische Beschwerdesymptomatik. Anämie findet sich bei nahezu jedem Patienten (Germing et al., 2001) und bedingt körperliche Schwäche und Müdigkeit. Die Leukozytopenie begünstigt bakterielle, virale und mykotische Infektionen. Diese können ebenso letal sein wie die hämorrhagische Diathese, welche durch die Thrombozytopenie bedingt ist (Steensma et al., 2003).

Die MDS werden nach der 2001 eingeführten WHO-Klassifikation in Subgruppen unterteilt (Bennett, 2000). Dies geschieht aufgrund von zytomorphologischen Kriterien sowie medullärem und peripherem Blastenanteil (Tab. 1.1). Zusätzlich wurde bei der WHO-Klassifikation, im Gegensatz zu der bis dato gültigen FAB-Klassifikation (Bennett et al., 1982), der Karyotyp hinzugezogen. Dyplastische Veränderungen der Knochenmarkzellen können sich auf die Erythrozytopoiese beschränken (ohne multilineäre Dysplasie), oder auch bei der Granulozytopoiese und/oder Megakaryozytopoiese nachweisbar sein (mit multilineären Dysplasien). Solange der medulläre Blastenanteil unter fünf und der periphere Blastenanteil unter einem Prozent liegen, handelt es sich um eine refraktäre Anämie (RA) oder eine RA mit Ringsideroblasten (RARS). Übersteigen die Blastenanteile im Knochenmark oder im peripheren Blut diese Werte, so liegt eine refraktäre Anämie mit

Blastenüberschuß vor (RAEB-I, RAEB-II). Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass die WHO eine akute myeloische Leukämie schon ab einem Blastenanteil von 20 % und nicht, wie von der FAB vorgesehen, erst ab 30 % definiert. Da vorausgegangene Studien ein längeres Überleben für MDS-Patienten mit einer 5q- Karyotypanomalie gezeigt hatten (Giagounidis et al., 2000), stellt das 5q- Syndrom in der WHO-Klassifikation einen eigenen Subtyp dar.

Subtyp	Medullärer Blastenanteil	Peripherer Blastenanteil	Andere Kriterien
Refraktäre Anämie, RA ohne multilineäre Dysplasien, PRA mit multilineären Dysplasien, RCMD	< 5 % < 5 %	< 1 % < 1 %	
Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten, RARS ohne multilineäre Dysplasien, PSA mit multilineären Dysplasien, RSCMD	< 5 % < 5 %	< 1 % < 1 %	> 15 % Ringsideroblasten > 15 % Ringsideroblasten
Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss, RAEB Typ 1, RAEB-I Typ 2, RAEB-II	5 - 10 % 11 - 19 %	< 5 % < 20 %	
5q- Syndrom	< 20 %	< 20 %	
Myelodysplastisches Syndrom, nicht klassifizierbar			
(sekundäre) akute myeloische Leukämie, sAML	≥ 20 %		

Tabelle 1.1 WHO-Klassifikation des Myelodysplastischen Syndroms (ICD-10, 2001); die MDS werden nach der 2001 eingeführten WHO-Klassifikation in Subgruppen unterteilt. Dies geschieht aufgrund von medullärem und peripherem Blastenanteil, sowie zytomorphologischen und zytogenetischen Kriterien.

Das *International Prognostic Scoring System* (IPSS) stratifiziert MDS Patienten anhand der prognostischen Faktoren „prozentualer Blastenanteil im Knochenmark“, „Karyotyp“ und „Anzahl der zytopenen Blutzellreihen“ in *Low*, *Intermediate-1 (Int-1)*, *Intermediate-2 (Int-2)* und *High-risk* Kategorien (Tab. 1.2). Dieses System bietet die Möglichkeit, das mediane Überleben und die Wahrscheinlichkeit des Übergangs in eine sekundäre akute myeloische Leukämie abzuschätzen.

Prognostische Größe	Punktwert				
	0	0,5	1	1,5	2
Knochenmarkblasten (%)	< 5	5 bis 10	-	11 bis 20	21 bis 30
Karyotyp ^a	Gut	Intermediär	Schlecht	-	-
Zytopenien ^b	0 bis 1	2 bis 3	-	-	-

Risikokategorie	Summe der Punktwerte
Low	0
Intermediate-1	0.5 bis 1
Intermediate-2	1.5 bis 2
High	≥ 2.5

Tabelle 1.2 International Prognostic Scoring System (IPSS) für MDS: ^a Gut: normaler Karyotyp, nur -Y, nur del(5q), nur del(20); Schlecht: komplexer Karyotyp (≥ 3 Aberrationen), oder Chromosom 7 Aberrationen; Intermediär: andere Aberrationen. ^b Absolute neutrophile Granulozyten < 1.800/μl; Hämoglobin < 10g/dl; Thrombozyten < 100.000/μl. Tabelle nach Greenberg et al., 1997.

So haben *Low risk* MDS-Patienten bei supportiver Behandlung ein medianes Überleben von etwa 5,7 Jahren, und im Mittel entwickelt ein Viertel dieser Patienten nach etwa 9,4 Jahren eine sekundäre akute myeloische Leukämie. *High risk* MDS-Patienten haben dagegen nur ein medianes Überleben von etwa 0,4 Jahren, und ein Viertel der Patienten entwickelt nach nur etwa 0,2 Jahren eine sAML (Tab. 1.3) (Greenberg et al., 1997). Vereinfacht werden MDS-Patienten für prognostische Zwecke als *lower risk* (IPSS *Low* und *Int-1*) und *higher risk* (IPSS *Int-2* und *High*) charakterisiert.

	Low	Int-1	Int-2	High
Medianes Überleben (Jahre)				
Total	5,7	3,5	1,2	0,4
Alter der Patienten (Jahre)				
≤ 60	11,8	5,2	1,8	0,3
> 60	4,8	2,7	1,1	0,5
≤ 70	9	4,4	1,3	0,4
> 70	3,9	2,4	1,2	0,4
25 % sAML-Evolution (Jahre)				
Total	9,4	3,3	1,1	0,2
Alter der Patienten (Jahre)				
≤ 60	> 9,4 (NR)	6,9	0,7	0,2
> 60	9,4	2,7	1,3	0,2
≤ 70	> 9,4 (NR)	5,5	1	0,2
> 70	> 5,8 (NR)	2,2	1,4	0,4

Tabelle 1.3 Altersabhängiges medianes Überleben und sAML-Entwicklung von MDS-Patienten; Grundlage der Daten sind MDS-Patienten, die lediglich unterstützende Therapie (s.u.) erhielten. Aufschlüsselung entsprechend der *International Prognostic Scoring System* Untergruppen. Tabelle nach Greenberg et al., 1997. NR: Median nicht erreicht

Die Pathogenese der MDS ist unklar. Bekannt ist, dass bei 40 bis 45 % der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eine oder mehrere Chromosomenaberrationen der Zellen des Knochenmarks vorliegen (Greenberg et al., 1997; Morel et al., 1993; Toyama et al., 1993). Die häufigste chromosomale Aberration ist der so genannte komplexe Karyotyp, definiert als das Vorliegen von mehr als zwei verschiedenen zytogenetischen Aberrationen. Zwar ist das Vorliegen von aberranten Karyotypen von prognostischem Wert, aber die pathophysiologische Relevanz ist unklar. In Abhängigkeit vom MDS-Subtyp finden sich bei bis zu 20 % der Patienten Punktmutationen in den N-ras und K-ras Onkogenen (Lubbert et al., 1990). Des Weiteren sind Mutationen des FMS-Protoonkogens und p53-Mutationen beschrieben worden (Padua et al., 1998; Misawa et al., 1997; Hirai et al., 2002), aber auch deren Rolle für die Pathogenese der MDS ist unverstanden. Es wurden epigenetische Phänomene im Sinne einer pathologischen Hypermethylierung einzelner Gen-Loci, wie beispielsweise von p15 und p16 beschrieben und die damit verbundenen Dysregulationen von Zellzyklus und Apoptose (Uchida et al., 1997; Hasegawa et al., 2005). Zur pathologisch veränderten Apoptose bei den MDS liegen die meisten Untersuchungen vor. Die höchsten Apoptoseraten finden sich in Knochenmarkzellen von Patienten mit refraktären Anämien. Patienten mit Blastenüberschuß zeigen bereits eine deutlich geringere Apoptoserate im Knochenmark. Patienten mit sekundären akuten myeloischen Leukämien nach MDS zeigen die niedrigsten Apoptoseraten (Kanter-Lewensohn et al., 1996). Daher kann geschlossen werden, dass das Versagen apoptotischer Signalvermittlungen unmittelbar mit der Leukämogenese bei MDS-Patienten im Zusammenhang steht.

1.2 Therapieoptionen bei Patienten mit *higher risk* MDS und sAML/MDS

Lower risk MDS-Patienten mit stabilem Krankheitsbild bedürfen oft nur klinischer Beobachtung und supportiver Therapie. Zu diesen supportiven Maßnahmen zählen antibiotische Therapie, Transfusionen von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten sowie eventuelle Applikation von Erythropoetin (EPO) oder Granulozytenkolonie-Stimulierungsfaktor (G-CSF) (Germing et al., 2001;

Hellstrom-Lindberg et al., 2003). *Higher risk* Patienten dagegen haben auf Grund höherer Blutungs- und Infektneigung sowie eines höheren Risikos einer AML-Transformation eine signifikant höhere Morbidität und Mortalität sowie ein signifikant verkürztes medianes Überleben (Tab. 1.3). Diese Patienten bedürfen einer intensivierten medizinischen Behandlung. Das Ziel der Behandlung von Patienten mit *higher risk* MDS ist die Heilung oder die komplette Remission. Mit intensivierter Chemotherapie bestehend aus Cytarabin und einem Anthrazyklin werden komplette Remissionsraten von über 50 % erreicht (de Witte et al., 2001). Auch wenn Patienten vereinzelt so in eine lang anhaltende komplette Remission mit polyklonaler Hämatopoiese gebracht werden können (Aivado et al., 2000), liegt das mediane Überleben von *higher risk* MDS-Patienten nach intensiver Chemotherapie lediglich zwischen 8,8 und 10,4 Monaten (Fukumoto et al., 2005). Hingegen sind für hämatopoietische Blutstammzell-Transplantationen (HSCT) erkrankungsfreie Überlebensraten von 25 bis 40 % nach über drei Jahren beschrieben (de Witte et al., 2000). Das mediane Erkrankungsalter der Patienten mit MDS liegt bei etwa 70 Jahren. In diesem fortgeschrittenen Alter leiden die Patienten häufig unter Komorbidität und reduziertem Allgemeinzustand. Nach den MDS-Behandlungsrichtlinien des amerikanischen *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) orientiert sich eine Empfehlung zur intensiven Chemotherapie und HSCT an der IPSS-Kategorie, am Alter und am Allgemeinzustand. Daher verbietet sich in den meisten Fällen eine intensive Chemotherapie oder HSCT (Oosterveld et al., 2000).

All denjenigen Patienten, welche für intensive Therapien nicht in Frage kommen, werden palliative Behandlungskonzepte empfohlen. Zu diesen Optionen gehören hypomethylierende und immunomodulatorische Medikamente sowie Arsentrioxid, Farnesyltransferase-Inhibitoren und niedrig dosierte Zytostatika. Hypomethylierende Medikamente wie 5'-Azacytidin und 5-Aza-2'-Deoxycytidin stellen derzeit wohl die Therapie der Wahl bei *higher risk* MDS-Patienten dar (Fukumoto et al., 2005). Die bei MDS beobachteten aberranten Hypermethylierungen von Differenzierungs-, Apoptose- und Zellzyklusgenen sollen mit diesen Wirkstoffen aufgehoben werden (Leone et al., 2002; Lubbert et al., 2001). Auch wenn dieser Ansatz nicht kurativ ist, so verdoppelt er doch die Zeit bis zur AML-Transformation und das mediane Überleben (Silverman et al., 2002).

Die anderen genannten Substanzen wie immunomodulatorische Medikamente, Arsentrioxid und Farnesyltransferase-Inhibitoren haben bislang nur bedingten Nutzen in der Therapie der *higher risk* MDS gezeigt (Fukumoto et al., 2005). Dennoch werden deren Potenziale weiter untersucht. Klinische Studien zur Behandlung der Patienten mit gesteigertem medullären Blastenanteil untersuchten niedrig dosiertes Cytarabin versus rein supportive Maßnahmen. Sie konnten aber keinen Vorteil für diese dosisreduzierten Chemotherapieprotokolle bezüglich des Gesamtüberlebens oder der Häufigkeit der AML-Progression zeigen (Miller et al., 1992). Zwei andere kleine Studien zeigten eine komplette Remission mit niedrig dosiertem Melphalan bei etwa einem Drittel der behandelten MDS-Patienten (Omoto et al., 1996; Denzlinger et al., 2000). Randomisierte prospektive Studien dazu wurden allerdings noch nicht veröffentlicht.

Die Behandlung von Patienten mit *higher risk* MDS stellt weiterhin eine große Herausforderung dar, hauptsächlich wegen der schlechten Prognose und des fortgeschrittenen Alters der Patienten. Für einen Großteil jener Patienten fehlt derzeit eine gut verträgliche und möglichst oral verfügbare Therapieoption mit zufriedenstellenden Behandlungserfolgen.

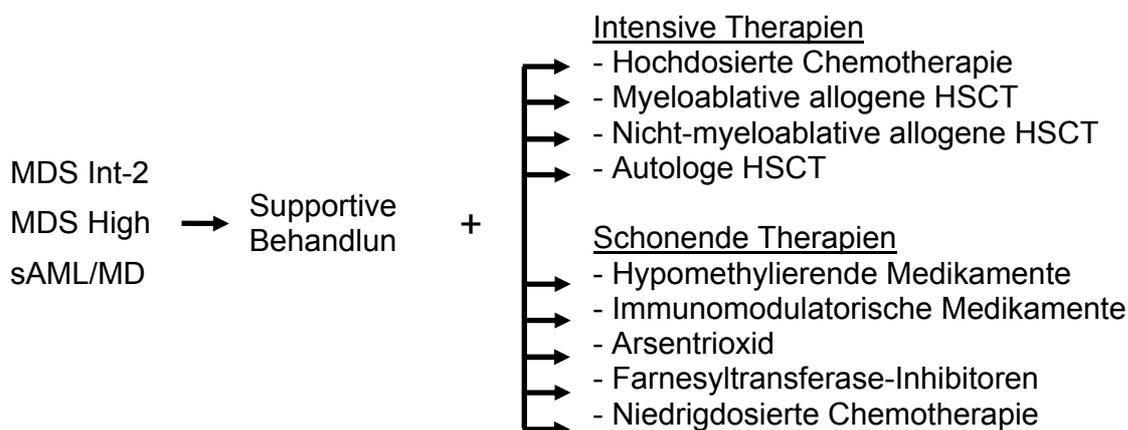


Abb. 1.4 Therapieoptionen bei *higher risk* MDS und sAML/MD HSCT: hämatopoietische Stammzell-Transplantation; nach Fukumoto et al., 2005

1.3 Exisulind

Exisulind ist das Sulfon-Derivat des nicht-steroidalen Antirheumatikums (NSAR) Sulindac (Sulfoxid) und wird als Einzelsubstanz der neuen Gruppe von selektiven apoptotischen antineoplastischen Medikamenten (SAANDs) zugeordnet (Griffiths 2000; Haanen 2001; Kim et al., 2004).

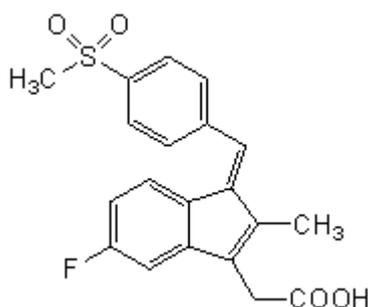


Abb. 1.5 **Exisulind** (syn.: Sulindac Sulfon; FGN-1): $C_{20}H_{17}FO_4S$; (Z)-5-Fluoro-2-methyl-1-[p(methylsulfonyl)-benzylidene]indene-3-acetic-Acid gehört zu einer neuen Gruppe von selektiven apoptotischen antineoplastischen Medikamenten (SAANDs) und wurde initial von Cell Pathways für die chemopräventive Therapie von kolorektalen Karzinomen entwickelt.

Exisulind wurde initial von Cell Pathways für die Therapie der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) entwickelt. Präklinische Studien zeigten, dass Exisulind die Bildung von Polypen verhindern und das Wachstum von kolorektalen Karzinomen hemmen konnte (Mahmoud et al., 1998). Klinische Studien der Phase I zeigten, dass die zweimal tägliche, orale Gabe von bis zu 250 mg Exisulind gut vertragen wird (van Stolk et al., 2000). Nebenwirkungen kamen selten vor und äußerten sich dann in Cholezystitis, Pankreatitis, leichtgradigen, reversiblen Transaminasen-Anstiegen, Asthenie, Verdauungsstörungen und Nausea sowie Abdominal-, Rücken- und Kopfschmerzen (Witta et al., 2004). Exisulind hemmt weder die Prostaglandin-Synthese noch die Cyclo-Oxygenasen I und II (COX I/II) (Thompson et al., 1995; Vogt et al., 2001). Daher kommt es bei dauerhafter Einnahme nur sehr selten zu dyspeptischen Ulzera und zu keiner Thrombozytenaggregationshemmung. Die Auswertungen der Phase II und III Studien zur Therapie der FAP mit Exisulind zeigten signifikante Reduktionen der Polypen-Entstehungsraten (Stoner et al., 1999). Auch bei der Prävention von präkanzerösen sporadischen Kolonpolypen zeigte sich eine signifikante Regression durch die

Therapie mit Exisulind (Arber et al., 2005). Weitere präklinische Studien zeigten, dass Exisulind auch das Wachstum von Mamma-, Prostata- und Bronchialkarzinomen hemmen konnte (Han et al., 1998; Narayanan et al., 2004; Whitehead et al., 2003). In anschließenden klinischen Studien wurden Standardtherapien unterschiedlicher solider Tumoren um Exisulind oder eine Plazebo-Kontrolle ergänzt (Tab. 1.6.). Exisulind hemmte den Wiederanstieg des prostataspezifischen Antigens (PSA) bei Patienten mit progredientem Adenokarzinom der Prostata (Goluboff et al., 2001). Die zytostatische Therapie (Docetaxol) des hormonrefraktären Prostatakarzinoms um Exisulind zu erweitern verbesserte das Ansprechen jedoch nicht (Ryan et al., 2001). Die Auswertung der Studien zur Therapie der metastasierten kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome (SCLC und NSCLC) sowie des metastasierten Mamma-Karzinoms stehen größtenteils noch aus. Laufende Studien zur Evaluierung von Exisulind in der Therapie hämatologischer Neoplasien gibt es nicht.

Studiename	Neoplasie	Studienphase	Studientherapie
NCT00026468 ¹	FAP	Phase II/III	± Exisulind
²	SAP	Phase III	± Exisulind
NCT00166426 ¹	Prostata-Karzinom	Phase II	Resektion (OP) ± Exisulind (adjuvant) Resektion (OP) ± Exisulind (neoadjuvant)
NCT00166478 ¹	Prostata-Karzinom	Phase II	Resektion (OP) ± Exisulind (neoadjuvant)
NCT00078910 ¹	Prostata-Karzinom	Phase II	(neoadjuvant)
NCT00052845 ¹	Prostata-Karzinom	Phase II	Docetaxel + Estramustine ± Exisulind
EX 1001/1004 ³	Prostata-Karzinom	Phase II	Doxetaxel ± Exisulind
NCT00036322 ¹	NSCLC	Phase II	Doxetaxel ± Exisulind
NCT00072618 ¹	NSCLC	Phase I/II	Doxetaxel ± Exisulind
NCT00085826 ¹	NSCLC	Phase III	Doxetaxel ± Exisulind
NCT00036010 ¹	NSCLC	Phase II	Doxetaxel ± Exisulind
EX 2002/2006 ³	NSCLC	Phase I/II	Paclitaxel + Carboplatin ± Exisulind
NCT00041314 ¹	NSCLC	Phase II	Gemcitabine + Carboplatin ± Exisulind
EX 2004 ³	NSCLC	Phase I/II	Vinorelbine ± Exisulind
EX 2005 ³	NSCLC	Phase I/II	Gemcitabine ± Exisulind
NCT00041054 ¹	SCLC	Phase II	Etoposid + Carboplatin ± Exisulind
NCT00037609 ¹	Mamma-Karzinom	Phase I/II	Capecitabine ± Exisulind

Tab. 1.6 Klinische Exisulind-Studien Quellen: ¹) U. S. National Institutes of Health, U.S. National Library of Medicine, www.clinicaltrials.gov; ²) Arber et al., 2005; ³) Exisulind: Aptosyn, FGN 1, Prevatac, sulindac sulfone. Drugs R D. 2004; 5(4): 220-6. Review.

Die Firma Cell Pathways wurde im Juni 2003 in die Firma OSI Pharmaceuticals integriert. Weder Cell Pathways noch OSI Pharmaceuticals war es bis dato gelungen, von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) eine Medikamentenzulassung für Exisulind zu bekommen. Exisulind hat weder in den USA, noch in irgendeinem anderen Land eine Medikamentenzulassung seitens der verantwortlichen Behörden erhalten. OSI Pharmaceuticals hat kürzlich eine Weiterentwicklung des Exisulind vorgestellt: OSI 461 (Galmarini, 2004).

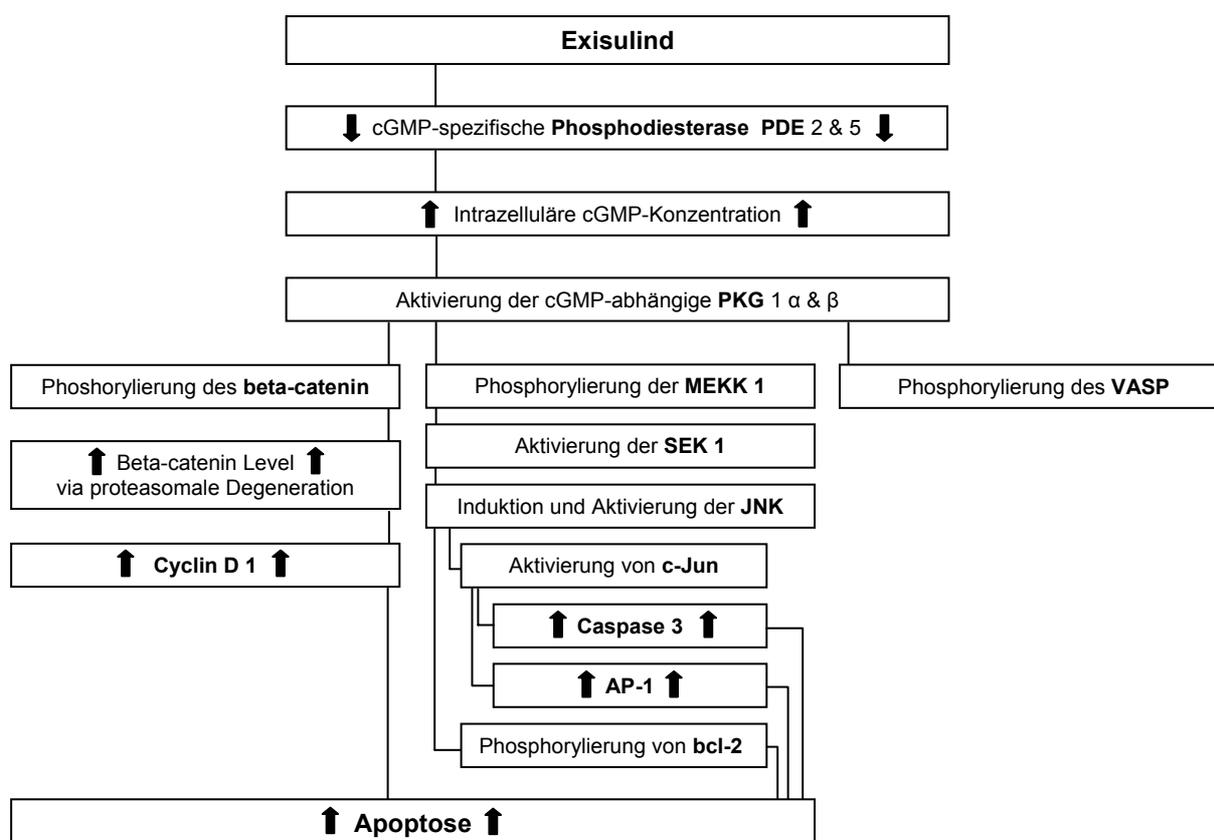


Abb. 1.7 Exisulind-Signalkaskade cGMP zyklisches Guanosin-Monophosphat, PKG Proteinkinase G, MEKK 1 mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase 1, SEK 1 Streß-aktivierten Protein Kinase 1, JNK c-Jun NH2-terminale Kinasen, AP-1 Aktivator Protein 1, VASP Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein

Exisulind inhibiert die zyklischen GMP-spezifischen Phosphodiesterasen (cGMP-PDE) 2 und 5, welche in unterschiedlichen präkanzerösen und kanzerösen Zellen überexprimiert werden (Haanen, 2001; Pusztai et al., 2003). Diese beiden Phosphodiesterasen kontrollieren über Hydrolyse den intrazellulären cGMP-Spiegel. Als Folge der cGMP-PDE-Inhibierung steigt die intrazelluläre cGMP-Konzentration an, was wiederum die Proteinkinase G (PKG) aktiviert (Soh et al., 2000). Die

aktivierte PKG phosphoryliert eine Reihe von Proteinen, darunter auch die mitogen-aktivierte Protein (MAP) Kinase Kinase 1 (MEKK-1). Die MEKK-1 wird durch die Phosphorylierung aktiviert, was zu einer Aktivierung der Streß-aktivierten Protein Kinase 1 (SEK-1) und anschließend der c-Jun NH2-terminalen Kinasen (JNK) führt (Soh et al., 2001). JNK bindet an das c-Jun-Protein, wodurch dieses aktiviert wird und über die Caspase 3 und das Aktivator Protein 1 (AP-1) die Apoptose der Zelle induziert (Rice et al., 2003). Die aktivierte JNK phosphoryliert zudem das bcl-2-Protein, welches dadurch in seiner antiapoptotischen Aktivität gehemmt wird (Maundrell et al., 1997; Yamamoto et al., 1999). Neben der JNK-vermittelten Apoptose-Induktion phosphoryliert die aktivierte PKG auch beta-catenin. Dadurch sinkt über proteasomale Degeneration der beta-catenin-Spiegel und als Folge dessen die Cyclin D 1 Expression. Diese Veränderung führt ebenfalls zur Apoptose-Induktion (Li et al., 2002). Die Apoptose-Induktion erfolgt ohne COX I oder II-Inhibition, eine p53-Involvierung oder einen Zellzyklus-Arrest (Lim et al., 1999; Shureiqi et al., 2000; Lim et al., 2003). Exisulind zeigte zudem nur einen minimalen pro-apoptotischen Effekt auf gesunde Zellen (Goluboff, 2001).

1.4 Fragestellung der vorliegenden Dissertation

Es sollte untersucht werden, ob Exisulind, welches schon bei unterschiedlichen soliden Krebsentitäten einen Apoptose-induzierenden Effekt gezeigt hat, auch die klonalen Zellen der akuten myeloischen Leukämie zur Apoptose veranlassen kann. Weiter sollte untersucht werden, ob Exisulind auch gesunde hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen beeinflusst. Die Experimente sollten somit helfen, die Frage zu beantworten, ob Exisulind möglicherweise als gut verträgliches orales Medikament die Leukämiebehandlung unterstützen kann. Im Falle einer in-vitro Apoptoseinduktion sollte versucht werden, den zellulären Wirkmechanismus des Exisulind weiter zu entschlüsseln.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Reagenzien, Materialien und Geräte

0,25 % Trypsin mit 1 mM EDTA	Gibco BRL, Rockville, MD, USA	# 25200-056
96-Loch RT-PCR-Platten	MJ Research Inc., Waltham, MA, USA	# MLP-9651
AlphaEase FluorChem™ Imaging System	Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA	# n/a
Accu-Jet Pipettierhilfe	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	# D 3492
Advantage 2 PCR Kit	Clontech, Palo Alto, CA, USA	# K 1910-1
Agerose	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	# A 5939
Aqua dest.	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	# A 2387
BD FACScan™ Flow Cytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland	# n/a
BD CellQuest Software	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland	# 342182
Bio-Rad Protein-Assay Kit II	Bio Rad, Hercules, CA, USA	# 500-0002
Brutschrank	HERAcell 150, Heraeus, Newtown, CT, USA	# 51022872
CoulterCounter®	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland	# n/a
DNA Polymerase-Mix	New England BioLabs, Beverly, MA, USA	# M 0267S
dNTP-Mix	Promega, Madison, WI, USA	# U 1515
DTT	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	# 78152
ECL Advanced Detection Kit	Amersham Bioscience, Freiberg, Deutschland	#RPN 2135
EDTA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	# E 7889
ELISA-Lesegerät Viktor 2	Perkin-Elmer, Mailand, Italien	# 1420
Eppendorf MasterCycler®	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland	# 5332 000.014
Eppendorf Tubes, 1.500 µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland	# 5404 003.234
Eppendorf Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland	# 5407 000.317
Ethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	# R 8382

Ethidium Bromid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	# E 8751
FACScan Cell Sorter	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA	# 342107
Falcontubes, 50ml	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	# L 7654
Fetales Rinderserum	GIBCO BRL, Rockville, MD, USA	# 15561-020
Fettfreies Milchpulver	Bio Rad, Hercules, CA, USA	# 170-6404
H₂O, PCR-Grade	Bio Whittaker, Rockland, ME, USA	# 16-001Y
HERAcell 150 Inkubationsschrank	Heraeus, Newton, CT, USA	# 51022872
Inkubationsflaschen, 250 ml	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	# C 4980
JNK Inhibitor: JNK II SP 600125	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland	# 420119
Loading Dye, Bromophenol Blue	Bio Rad, Hercules, CA, USA	# 161-0404
Lymphoprep	AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Norwegen	# 1114545
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	#130-042-303
MACS[®] CD34 Progenitor Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	#130-046-701
MACS[®] CD34-FITC	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	#130-081-001
MACS[®] Mouse IgG2a-FITC	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	#130-091-837
MACS[®] Pre-Separation Filter	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	#130-041-407
MACS[®] Separation Columns LS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	#130-042-401
MACS[®] Separation Columns MS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	#130-042-201
MidiMACS Separation Unit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	#130-042-302
Aufsichtsmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland	# n/a
MiniMACS Separation Unit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	#130-042-102

MJ Research DNA Engine Opticon Continuous Fluorescence Detection System	MJ Research Inc., Waltham, MA, USA	# CFD-3200
NaCl, 0,9%, RNase und DNase frei	Ambion, Austin, TA, USA	# 9760
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	# W 302600
Neubauer Hämozytometer	Abalm Medizinbedarf, Dilsberg, Deutschland	# BRA 717806
Nitrozellulosemembran	Bio Rad, Hercules, CA, USA	# 162-0212EDU
PBS-Puffer (Phosphat gepuffertes NaCl)	Gibco BRL, Rockville, MD, USA	# 10010-015
Petrischale, 6 Loch	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	# C 6548
Petrischalen, 5 cm	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	# C 6532
Photometer DU 600	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA	# n/a
Propidium-Jodid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	# P 4170
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	# P 2714-1BTL
Protein Standard high range	Bio Rad, Hercules, CA, USA	# 161-0303
Protein Standard low range	Bio Rad, Hercules, CA, USA	# 161-0304
Puffer M	PBS pH 7,2 (Gibco) 0,5 % Humanes Serum Albumin (Gibco) 2 mM EDTA (Sigma-Aldrich)	# 10010-015 # 15561-020 # R 8382
QIAquick PCR-Reinigungs-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	# 28104
Ready Gel Tris-HCL Gel 10 %	Bio Rad, Hercules, CA, USA	# 161-1101
Reaktions-Puffer-A	Promega, Madison, WI, USA	# M 1665
RNase A	Worthington Bio., Lakewood, NJ, USA	# LS 005649
SDS-PAGE Ready Gel Tris-HCl Gel 10%	Bio Rad, Hercules, CA, USA	# 161-1101
SDS, Sodium Dodecyl Sulphat	Promega, Madison, WI, USA	# H 5113
SYBR Green II	FMC Bioproducts, Philadelphia, PA, USA	# S 7586
Taq DNA Polymerase	Promega, Madison, WI, USA	# M 1868
Tris-HCL	New England BioLabs, Beverly, MA, USA	# 77-86-1
Trypan Blau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	# 93595-50ml

Tubes, 35 ml	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	# C 6478
Tubes, 4 ml	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	# C 6433
Tween 20	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	# E 28320
Verschlusskappen (96-Loch Platten)	MJ Research Inc., Waltham, MA, USA	# TCS-0803
Vibrationsrüttler	Viktor Recker, Berlin, Deutschland	# n/a
Westen Blot Transfer-Kammer	Bio Rad, Hercules, CA, USA	# 170-3930EDU
Western Blot Elektrophorese-Modul	Bio Rad, Hercules, CA, USA	# 165-3302EDU
Western Blot Filterpapier (2 mm)	Bio Rad, Hercules, CA, US	# 170-3932EDU
Western-Blot-Transfer-Apparatur	Bio Rad, Hercules, CA, USA	# 170-3930EDU
Western Blot Wattelage	Bio Rad, Hercules, CA, USA	170-3933EDU
Zellyse-Puffer	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	# 9803
Zentrifuge	Hereaus, Newton, CT, USA	# 564736473

2.1.2 Zelllinien, Zellproben und Medien

Die Zelllinien wurden kommerziell erworben. Bei den Zelllinien KG-1 und SKM-1 handelt es sich um immortalisierte klonale Blasten zweier Patienten mit sekundären akuten myeloischen Leukämien, welche aus myelodysplastischen Syndromen hervorgegangen waren (sAML/MDS). Referenzen zur KG-1 Zelllinie wurden unter anderem veröffentlicht von Koeffler et al., 1978 und 1980 sowie Penrose et al., 1996. Referenzen zur SKM-1 Zelllinie publizierten Nakagawa et al., 1991, Kawaguchi et al., 1992 und Hosokawa et al., 1993. Bei der Zelllinie THP-1 handelt es sich um immortalisierte Zellen eines Patienten mit einer de-novo AML. Referenzen zur THP-1 Zelllinie wurden von Tsuchiya et al., 1980 und 1982 sowie Ollivier et al., 1996 und Hambleton et al., 1996 publiziert. Die initial als gesunde Kontrolle verwendeten CD34+ hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen gesunder Knochenmarkspender wurden wie angegeben kommerziell erworben. Im Weiteren wurden auch CD34+ hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen aus peripherem

Blut von gesunden Spendern verwendet. Bei diesen Spendern handelt es sich um freiwilligen Probanden, die über das Wesen der Studie, die weitere Verwendung des gewonnenen Materials zu wissenschaftlichen Zwecken und die möglichen, wenn auch geringen Risiken einer peripheren Blutentnahme aufgeklärt wurden. Die Probanden gaben hierzu ihr schriftliches Einverständnis. Ihnen wurden dann etwa 50 ml EDTA-Blut abgenommen. Aus dem gewonnenen Vollblut wurden anschließend die CD34+ hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen mittels immunomagnetischer Separation isoliert. Im Folgenden sind alle verwendeten Zellen und deren spezifische Wachstumsmedien aufgeführt:

Name:	KG-1	
Ursprung:	sAML aus MDS-Zelllinie, homo sapiens	
Anbieter:	ATCC, Katalog-Nr.: CCL-246	
Referenz:	Koeffler et al., 1978 und 1980; Penrose et al., 1996	
Medium:	IMDM	ATCC, Katalog-Nr.: 12440046
Zusätze:	20% Fetales Rinderserum	GIBCO, Katalog-Nr.: 16000044

Name:	SKM-1	
Ursprung:	sAML aus MDS-Zelllinie, homo sapiens	
Anbieter:	HSRRB, Katalog-Nr.: JCRB 0118	
Referenz:	Nakagawa et al., 1991; Kawaguchi et al., 1992; Hosokawa et al., 1993	
Medium:	RPMI 1640	Sigma Aldrich, Katalog-Nr.: R 8758
Zusätze:	15% Fetales Rinderserum	GIBCO, Katalog-Nr.: 16000044

Name:	THP-1	
Ursprung:	de novo AML-Zelllinie, homo sapiens	
Anbieter:	ATCC, Katalog-Nr.: TIB-202	
Referenz:	Tsuchiya et al., 1980 und 1982; Ollivier et al., 1996; Hambleton et al., 1996	
Medium:	RPMI 1640	Sigma Aldrich, Katalog-Nr.: R 8758
Zusätze:	10 % Fetales Rinderserum	GIBCO, Katalog-Nr.: 16000044
	0.05 mM 2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Katalog-Nr.: M 6250

Name:	CD34+ Knochenmark-Zellen	
Ursprung:	Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzelle, KM, homo sapiens	
Anbieter:	Cambrex, Rutherford, NJ, USA, Katalog-Nr.: PO2M-101B	
Referenz:	Warren et al., 1995; Massa et al., 2005	
Medium:	RPMI 1640	Sigma Aldrich, Katalog-Nr.: R 8758
Zusätze:	10% Fetales Rinderserum	GIBCO, Katalog-Nr.: 16000044

Name:	CD34+ Zellen gesunder Probanden	
Ursprung:	Hämatopoitische Stamm- und Progenitorzelle, PB, homo sapiens	
Anbieter:	Probanden	
Referenz:	Petzer et al., 1996; Lansdorp et al., 1992	
Medium:	StemSpan™ SFEM	Stemcell, Katalog-Nr.: 09650
Zusätze:	StemSpan™ CC100 (1:100)	Stemcell, Katalog-Nr.: 02690

Weitere Zusätze:

50 U/ml Penicillin	GIBCO	Katalog-Nr.: 15070 BLK
50 µg/ml Streptomycin	GIBCO	Katalog-Nr.: 15070 BLK
Exisulind	Sigma-Aldrich	Katalog-Nr.: S 1438-5MG
DMSO	Sigma-Aldrich	Katalog-Nr.: D 5879

Angaben zu Herstellern und Anbietern:

ATCC, American Type Culture Collection	Manassas, VA, USA
GIBCO	Rockville, MD, USA
HSRRB, Health Science Research Resource Bank	Osaka, Japan
Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
Stemcell Technologies Inc.	Vancouver, BC, USA

2.1.3 Funktionelle Assays

MethoCult™ GF⁺ H4435 medium	Stemcell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada	# 04435
CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Madison, WI, USA	# G 3582
Cell Death Detection ELISA^{PLUS} Kit	Roche, Indianapolis, IN, USA	# 1774425
SAPK/JNK Assay Kit	Cell Signaling, Beverly, MA, USA	# 420119

2.1.4 Gesamt-RNA Isolation und cDNA-Synthese und Quantitative RT-PCR

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	# 74106
QIAshredder Säulen	Qiagen, Hilden, Deutschland	# 79654
Eppendorf UVette®	Eppendorf, Wesseling-	# 0030 106.300

Photometer Cuvetten 160 St.	Berzdorf, Deutschland	
SYBR-Green	FMC Bioproducts, Philadelphia, PA, USA	# S 7586
Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads	Amersham Biosciences, Freiberg, Deutschland	# 27-9264-01

2.1.5 Quantitative RT-PCR Primer

hGADD45α	sense 5'-GCCTGTGAGTGAGTGCAGAA-3'
	antisense 5'-ATCTCTGTCGTCGTCCTCGT-3'
hGADD45β	sense 5'-GGGGGATTTTGCAATCTTCT-3'
	antisense 5'-ACGGTGAGGCGATCCTGA-3'
hGADD45γ	sense 5'-CTGCATGAGTTGCTGCTGTC-3'
	antisense 5'-TTCGAAATGAGGATGCAGTG -3'
hGAPDH	sense 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'
	antisense 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3'
hGAPDH-Plasmid	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Luiz Serbini, Boston, MA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden in ihren spezifischen Medien in HERAcell™ Inkubationsschränken bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Petrischalen und Kulturflaschen mit Gas-permeablen Verschlüssen gewährleisteten den Gasaustausch. Für die Versuche wurden nur Zellen verwendet, die sich in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die Zelllinien und Zellen wurden in ihren jeweiligen Wachstumsmedien mit den angegebenen Konzentrationen DMSO-gelösten Exisulind oder DMSO für jeweils definierte Zeiten inkubiert. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Ansätze in Sechslochplatten mit 1,5 x 10⁵ Zellen in 2 ml Medium angefertigt. Bei den Ansätzen der Methylcellulose Assays wurde pro Sechslochplatte eine Kammer mit 2 ml Aqua dest. gefüllt, um das Austrocknen der Methylzellulose zu verhindern.

2.2.2 Gewinnung CD34+ hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen

2.2.2.1 Gewinnung mononukleärer Zellen aus EDTA-Vollblut

Die Separation der CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen aus EDTA-Vollblut erfordert zunächst die Trennung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMNC) von den restlichen Blutbestandteilen. Nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation (Referenzen: Bøyum 1968, Harris and Ukayiofo 1969, Thorsby and Bratlie 1970, Ting and Morris 1971) wurde zu je 20 ml EDTA-Vollblut 15 ml PBS-Puffer hinzugegeben und diese Suspension dann vorsichtig mit einer accu-jet® Pipettierhilfe in 50 ml Falcontubes auf 15 ml Lymphoprep™ aufgetragen. Die Falcontubes wurden für 30 Minuten (min.) bei 1.500 U/min. zentrifugiert (alle Zentrifugationsschritte in 2.2.2 erfolgten in einer Hereaus Zentrifuge, # 564736473 und bei Raumtemperatur). Nach dem Zentrifugationsschritt befinden sich die mononukleären Zellen in der Interphase zwischen Lymphoprep™ und Blutserum, während Thrombozyten, Erythrozyten und Zelltrümmer auf den Boden des Falcontubes zentrifugiert werden. Diese Interphase wurde abpipettiert und zweimal mit 50 ml PBS-Puffer für 10 min. und bei 1.500 U/min. zentrifugiert. Abschließend wurde das Zellpellet in 500 µl PBS-Puffer resuspendiert. Aus der Zellsuspension wurden 35 µl abpipettiert und daraus die Zellkonzentration mit Hilfe des CoulterCounter® ermittelt. Der Rest der Zellsuspension wurden bis 25 ml mit Puffer M aufgefüllt, 5 min. bei 1.500 U/min. zentrifugiert und das so gewonnene Zellpellet in 2 ml MACS®-Puffer resuspendiert. Um die Proben von Zellklumpen zu befreien, wurden die Zellsuspensionen durch 30 µm Nylon-Filtermembranen (MACS® Pre-Separation Filter) pipettiert und erneut zentrifugiert (5 min. bei 1.500 U/min.).

2.2.2.2 Immunomagnetische Separation der CD34+ Fraktion aus mononukleären Zellen

Das CD34 Antigen (CD: „cluster of differentiation“, „Zelloberflächen-Antigene“) ist ein einzelkettiges, transmembranöses Glykoprotein, welches physiologischerweise auf menschlichen hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen des Knochenmarks

und peripheren Blutes exprimiert wird. Zudem befindet es sich auch auf klonalen Zellen der myelodysplastischen Syndrome und der akuten myeloischen Leukämien. Das Antigen fehlt dagegen auf ausdifferenzierten hämatologischen Zellen wie peripheren Blutlymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten.

Das Prinzip der immuno-magnetischen Zellseparation der CD34+ Stamm- und Progenitorzellfraktion funktioniert wie folgt: Monoklonale Hapten-konjugierte IgG-Antikörper der Maus (Hapten-Antibody) binden an das CD34-Antigen und werden ihrerseits von kolloidalen super-paramagnetischen Partikeln (Anti-Hapten MicroBeads) gebunden. Humane Immunglobuline G gegen den F_C -Rezeptor der mononukleären Zellen (F_C R-Blocking Reagent; alle drei Reagenzien sind Bestandteil des MACS[®] CD34 Progenitor Cell Isolation Kit) verhindern unspezifische Bindungen dieser Partikel. Die Zellsuspension läuft durch MACS[®]-Säulen, welche in magnetischen MACS[®]-Separations-Einheiten stecken. Die magnetisch markierten CD34+ Stamm- und Progenitorzellen verbleiben in den Säulen, während die restlichen mononukleären Zellen durch wiederholtes Waschen der Säulen herausgespült werden. Abschließend werden die MACS[®]-Säulen aus dem magnetischen Feld entfernt und die CD34+ Stamm- und Progenitorzellen eluiert. Publiziert wurde die Methode unter anderem von de Wynter et al., Nicol et al., Thiele et al. (alle 1995) und Yin et al. 1997.

Nachdem wie unter 2.2.2 beschrieben die mononukleären Zellen von den restlichen Blutbestandteilen separiert worden waren, wurden das mononukleäre Zellpellet pro 10^8 Zellen in 300 μ l Puffer M, 100 μ l F_C R-Blocking Reagent und 100 μ l Hapten-Antibody resuspendiert und die Probe für 15 min. auf Eis inkubiert. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation (5 min. bei 1.500 U/min.) dieser Zellsuspension. Das Zellpellet wurde pro 10^8 Zellen in 400 μ l Puffer M und 100 μ l Anti-Hapten Microbeats resuspendiert und erneut für 15 min. auf Eis inkubiert. Es folgten eine Zentrifugation für 5 min. bei 1.500 U/min. und eine Resuspendierung des Pellets in 500 μ l Puffer M. Die MACS[®]-Säulen wurden in die Magneten gesetzt. Im Falle von 10^7 oder weniger mononukleären Zellen wurden die Mini-MACS[®] (MS) Säulen mit 500 μ l Puffer M equilibriert, bei mehr als 10^7 mononukleären Zellen wurden die Midi-MACS[®] (LS) Säulen mit 3.000 μ l Puffer M equilibriert. Die markierten Proben wurden auf die Säulen aufgetragen und anschließend wurden die Säulen drei Mal mit 500 μ l (MS-

Säulen) beziehungsweise 3.000 μl (LS-Säulen) Puffer M gewaschen. Der Durchlauf entsprach der ersten CD34- Zellfraktion und wurde verworfen. Die Säulen mitsamt der darin gebundenen CD34+ Stamm- und Progenitorzellfraktion wurden aus ihren magnetischen Feldern entfernt und mit 1.000 μl (MS) beziehungsweise 5.000 μl (LS) Puffer M in kleine Falcon-Tubes ausgepresst. Nun wurden, wie bereits oben beschrieben, neue Säulen equilibriert und die Proben erneut aufgetragen. Es folgten drei, bereits oben beschriebene Waschschriffe und abschließend das finale Eluieren der CD34+ Stamm- und Progenitorzellfraktion mit 500 μl (MS) beziehungsweise 2.500 μl (LS) Puffer M. Aus 35 μl Aliquots wurden mit dem CoulterCounter[®] anschließend die Konzentration und Gesamtzahl von separierten CD34+ Stamm- und Progenitorzellen bestimmt.

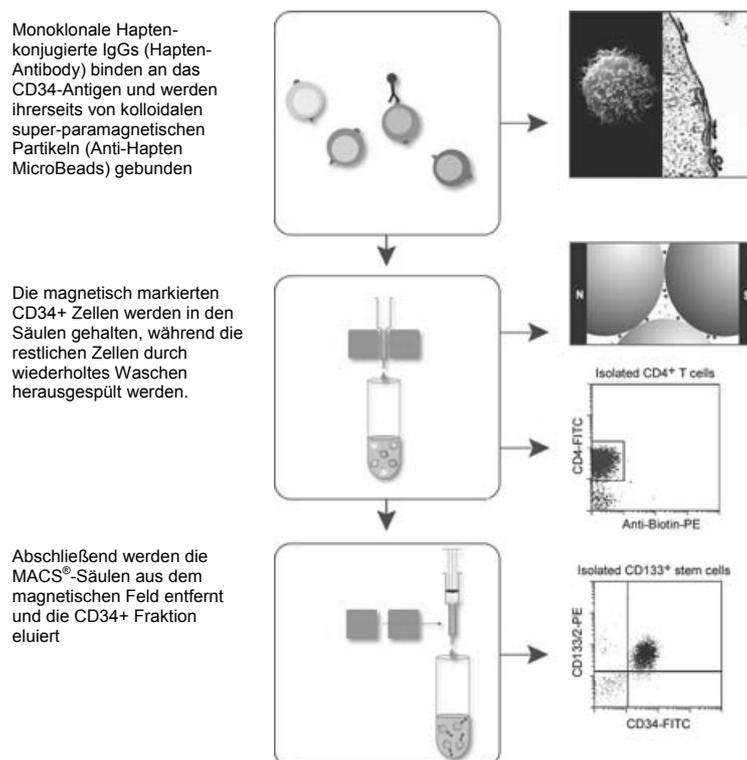


Abb. 2.1 Prinzip der immuno-magnetische Zellseparation Beschrieben wurde diese Methode unter anderem von de Wynter et al., Nicol et al. und Thiele et al. (alle 1995) sowie Yin et al. 1997.

2.2.3 Reinheitsbestimmung der eluierten CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellfraktion mittels FACS-Durchflußzytometrie

FACS-Durchflußzytometrie ist das Messen der Fluoreszenz von einzelnen Zellen. Ursprünglich aus der Immunologie-Forschung hervorgegangen, wird diese Methode heute weit darüber hinaus verwendet, da praktisch jeder zellulärer Parameter, der sich in Fluoreszenzintensität ausdrücken lässt, mit ihr erfasst werden kann. Das Messgerät besteht aus einem Flüssigkeitssystem, einem Laserlicht-Generator und einem optischen System mit den Komponenten Messstrahl-Aufbereitung, Messkammer und Emissionsstrahl-Bearbeitung. Letztere umfasst 5 optische Detektoren und eine elektronische Nachbearbeitung inklusive Analog-Digital-Wandler. Die Zellen werden durch ein Drucksystem ins Flüssigkeitssystem eingeschleust, hydrodynamisch fokussiert, in einer Kolonne durch die Messkammer geschleust und in den Abfall geleitet. Die engste Stelle in der Messkammer hat einen Durchmesser von 120 µm. Dort werden die Zellen mit monochromatischem Laserlicht angeleuchtet und das Streulicht wird durch eine Photodiode und vier Photomultiplier registriert. Das detektierte Vorwärtsstreulicht quantifiziert die Größe der gemessenen Zelle. Das detektierte Seitwärtsstreulicht dagegen quantifiziert ihre Granularität. Zusätzlich wird das emittierte Fluoreszenzlicht in drei Messbereichen (entsprechend den Farben gelbgrün, orange und rot) gemessen. Die Messwerte werden digitalisiert und einem von 1024 (bzw. wahlweise 256) Messkanälen zugeordnet.

Zur Reinheitsbestimmung der eluierten CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellfraktion aus 2.2.3 mittels FACS-Durchflußzytometrie wurden aus jedem Eluat zwei Aliquots mit je 10^5 Zellen entnommen. Nach einer kurzen Zentrifugation (5 min. bei 1.500 U/min.) wurden die Zellpellets in 100 µl Puffer M resuspendiert. Einer Probe wurden fluoreszierende Antikörper gegen das CD34-Antigen (10 µl MACS CD34-FITC Antikörper) zugegeben, während die andere Probe als Negativkontrolle mit fluoreszierenden Antikörpern gegen ein Immunglobulin der Maus (10 µl MACS Mouse IgG2a-FITC Antikörper) versetzt wurde. Die Proben wurden gut mit der Pipette gemischt und für 10 min. bei 6 °C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden den Proben 500 µl PBS-Puffer zugegeben und die Suspension für 5 min. bei 1.500 U/min. zentrifugiert. Die Zellpellets wurde in 100 µl PBS-Puffer resuspendiert, mittels

eines BD FACScan™ Flow Cytometers analysiert und mit Hilfe der BD CellQuest Software ausgewertet.

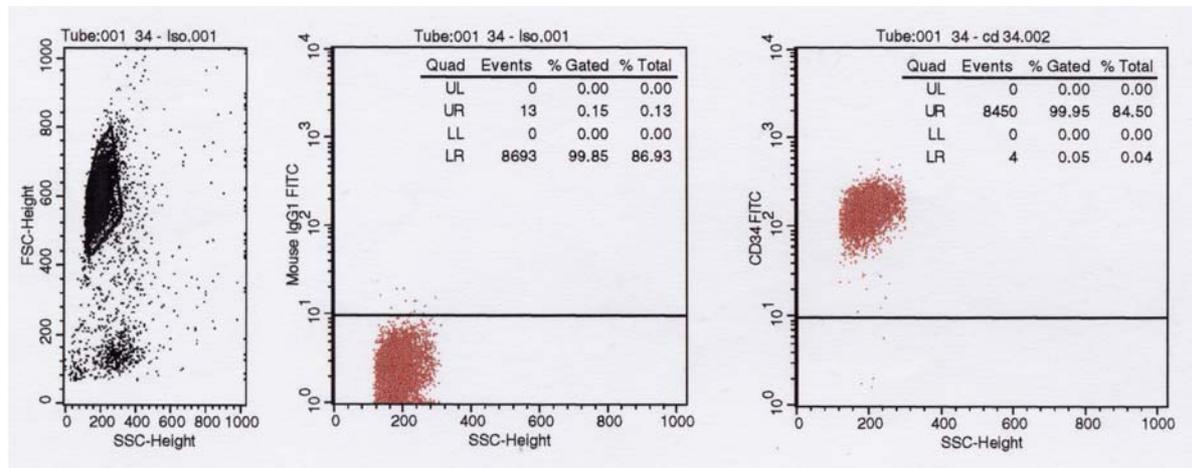


Abb. 2.2.3 Reinheitsbestimmung der eluierten CD34+ hämatopoietischn Stamm- und Progenitorzellfraktion mittels FACS-Durchflußzytometrie Aus jedem CD34+ Eluat aus 2.2.2 wurden 10⁵ Zellen jeweils mit MACS CD34-FITC Antikörper und mit MACS Mouse IgG2a-FITC Antikörper inkubiert, anschließend mittels BD FACScan™ Flow Cytometers analysiert und mit Hilfe der BD CellQuest Software ausgewertet

2.2.4 Behandlung der Zellen mit DMSO-gelöstem Exisulind oder nur mit DMSO

Jeweils 25 mg Exisulind wurden in 1.000 µl reinem DMSO gelöst, was eine 67 mM Stammlösung ergab. Die Wachstumsmedien wurden mit unterschiedlichen Volumina dieser Stammlösung bis zu einer Endkonzentration von 25 µM beziehungsweise 100 µM Exisulind versetzt. Diese beiden Endkonzentrationen wurden ausgewählt, da die Arbeiten von van Stolk et al., 2000 und Ray et al., 1995 gezeigt hatten, dass in klinischen Phase 1 Studien die gut tolerierte, orale Administration von 250 mg Exisulind zweimal täglich zu Exisulind-Plasmakonzentration von 25 µM bis 40 µM geführt und 100 µM nicht überstiegen hatte. Für die Negativkontrollen wurde den Medien entsprechende Menge DMSO beigegeben, um DMSO-Effekte auszuschließen. Die unterschiedlichen Negativ-Kontrollen heißen im Folgenden *DMSO 25* beziehungsweise *DMSO 100*. Diese beiden Negativ-Kontrollen berücksichtigen die Tatsache, dass den mit 25 µM und 100 µM Exisulind behandelten Ansätzen unterschiedliche Volumina DMSO zugesetzt wurden. Die Zellen wurden in ihren jeweiligen Wachstumsmedien mit in DMSO gelöstem Exisulind beziehungsweise nur mit DMSO für die ausgewiesenen Zeiten inkubiert.

2.2.5 Colony-forming Unit Assay (CFU-Assay)

Um Veränderungen des Proliferations- und Differenzierungspotentials der Zellen durch die Exisulind-Behandlung zu untersuchen, wurden jeweils zehntausend Zellen in 1 ml MethoCult™ GF⁺ H4435 Methylzellulose-Medium gegeben (Referenzen: Bernstein et al. 1991, Eaves et al. 1995). Die sonst frei flottierenden KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen sowie die CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen bleiben in der Methylzellulose ortsständig, teilen sich und bilden Zellhaufen sowie Kolonien aus. Diese können dann nach Anzahl, Größe und Beschaffenheit analysiert werden. Das Medium enthielt Exisulind mit einer Konzentration von 100 µM oder DMSO-100 als Negativkontrolle. Aufgrund der hohen Viskosität des Mediums wurden die Zellen durch mehrfaches Mischen mit der Pipette (definiert als 10-maliges Aufnehmen und Ablassen bei einem Pipettiervolumen von 1.000 µl) verteilt. Die Ansätze wurden für 11 Tage inkubiert. Im Anschluß daran wurden sämtliche in der Petrischale gewachsenen Zellkolonien unter dem Aufsichtmikroskop analysiert, deskriptiv erfasst und ein vorher definierter, repräsentativer Bereich mittels Photomikrographie (Zeiss Aufsichtmikroskop, 45fache Vergrößerung) dokumentiert. Die Experimente wurden in biologischen Dreifach-Ansätzen durchgeführt. Die hier präsentierten Photomikrographien stellen repräsentative Ergebnisse der Dreifach-Ansätze dar.

2.2.6 Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen mittels Hämatozytometrie

KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen wurden in ihrem spezifischen Medien mit 25 µM, 100 µM oder der entsprechenden DMSO-Kontrolle für ein, zwei, vier und sieben Tage behandelt, während die CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen mit eben diesen Konzentrationen für sieben Tage inkubiert wurden. Die Ansätze von 2 ml enthielten initial 1×10^5 Zellen. Danach wurde die Anzahl vitaler Zellen mit Hilfe eines Neubauer-Hämatozytometers bestimmt. Als Farbstofflösung diente Trypanblau, welches die Beurteilung der Zellviabilität erlaubt. Dazu wurden 5 µl Zellsuspension mit 5 µl Trypanblau (0.5 %iges Trypanblau in physiologischer Kochsalzlösung) vermischt. Vitale Zellen schließen den Farbstoff aus und erscheinen unter dem Mikroskop ungefärbt, während tote Zellen die Fähigkeit der

Trypanblauexklusion durch Zellmembranschädigung verloren haben und blau erscheinen. Die gefärbte Zellsuspension wurde mit einer Pipette in den dafür vorgesehenen Bereich am Rande des Deckglases pipettiert. Aufgrund der Kapillarkräfte verteilt sich die Zellsuspension standardisiert in der Neubauer-Zählkammer. Die lebenden Zellen in allen vier Kammerquadranten wurden bei einhundert- bis einhundertsechzigfacher Vergrößerung unter dem Aufsichtsmikroskop gezählt. Der Mittelwert der vier Quadranten wurde mit dem Verdünnungsfaktor zwei und dem Kammerfaktor 10^4 multipliziert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte und Standardabweichung dreier von einander unabhängiger Experimente.

2.2.7 Bestimmung der Zellproliferation

Zur Quantifizierung der lebensfähigen und proliferierenden Zellen wurde der CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay verwendet. Der Assay verwendet ein Tetrazolium-basiertes Substratgemisch [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium, MTS (Owen Substanz) und Phenazin-Ethosulfat (PES)], welches von proliferierenden Zellen zu einem farbigen Formazan-Produkt reduziert wird (Abb. 2.2.7.1). Diese Umwandlung ist NADH/NADPH-abhängig, wobei NADH/NADPH von Dehydrogenase-Enzymen aktiver Zellen produziert wird. Der Farbumschlag kann dann bei 490 nm Wellenlänge im Photometer quantifiziert werden (Abb. 2.2.7.2). Die Menge des entstandenen Formazan-Produktes ist direkt proportional zur Anzahl der proliferierenden Zellen (Abb. 2.2.7.2). Das Prinzip und die Validität dieser Methode wurde mehrfach beschrieben (Mosmann et al., 1983 ; Barltrop et al., 1991 ; Cory et al., 1991 ; Riss et al., 1992 und Berridge et al., 1993).

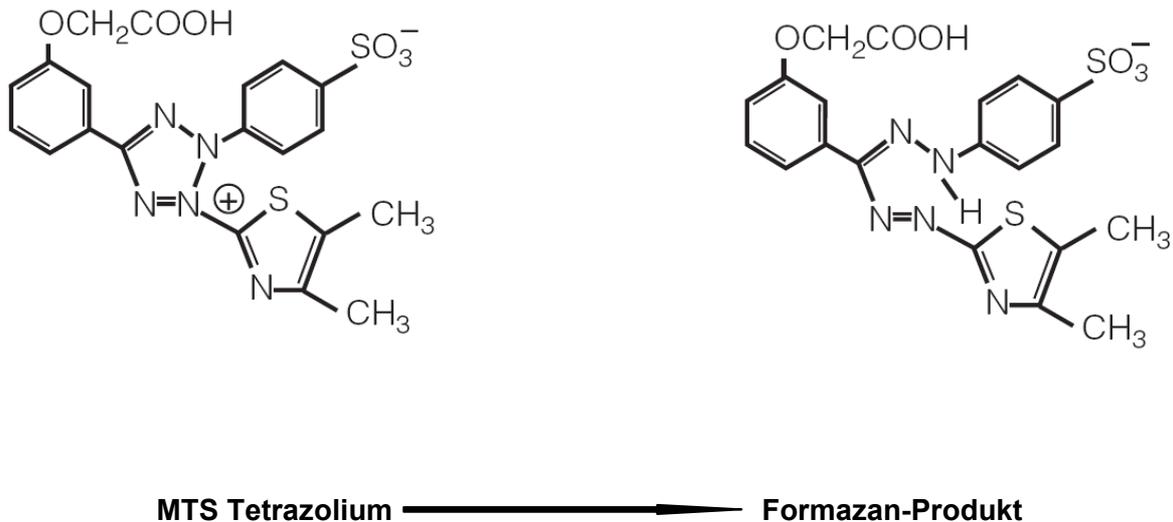


Abb. 2.2.7.1 Strukturformeln des MTS Tetrazoliums und seines farbigen Formazan-Produktes. Die Reduktion des MTS Tetrazoliums zu seinem farbigen Formazan-Produkt ist NADH/NADPH-abhängig. NADH/NADPH wird über Dehydrogenase-Enzyme proliferierender Zellen produziert. Die Anzahl der lebensfähigen und proliferierenden Zellen in einem Ansatz ist direkt proportional zu der Menge des entstandenen, farbigen Formazan-Produktes, welches über die Extinktion bei 490 nm gemessen wird. Quelle: Promega TB24

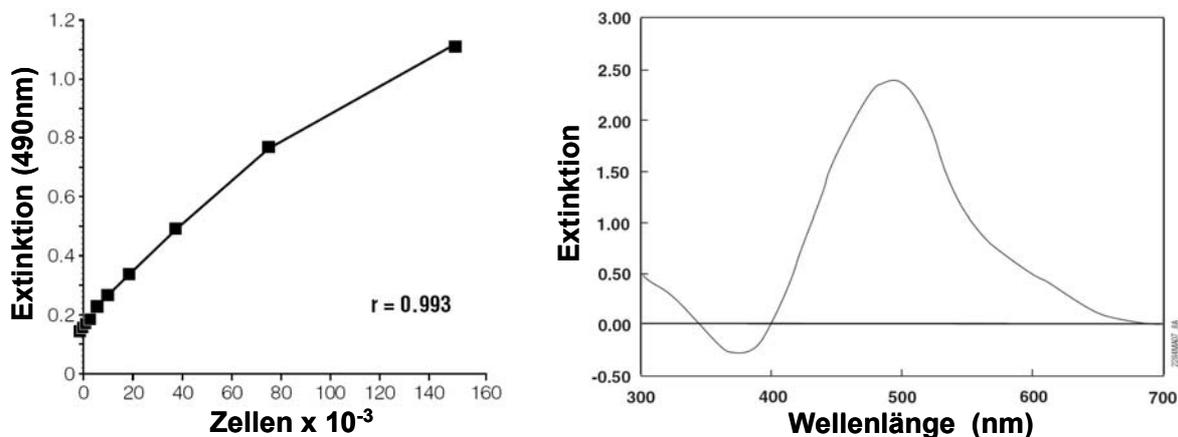


Abb. 2.2.7.2 Korrelationskoeffizient von Zellzahl und Extinktion (links); Extinktionsspektrum von MTS/Formazan (rechts). Der Korrelationskoeffizient von 0,993 zeigt die lineare Abhängigkeit der Extinktion (490 nm) von der Anzahl der Zellen eines Ansatzes. Das Extinktionsspektrum des Formazanproduktes zeigt das Extinktionsmaximum bei einer Wellenlänge von 490 nm. Quelle: Promega TB245

Zur Durchführungen der Proliferationsanalysen wurden 100 μ l einer jeden Zellsuspension auf 96-Lochplatten verteilt. Dann wurden 20 μ l der MTS Lösung hinzugegeben und das Gemisch in Abhängigkeit von der Intensität des Farbumschlages für ein bis vier Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Farbumschlag mit dem

Photometer DU 600 quantifiziert. Um die basale Extinktion durch das jeweilige Medium auszugleichen, wurden als Leerkontrolle 100 µl des Mediums mit 20 µM MTS-Substrat versetzt. Dieser durch das Medium bedingte Basalwert („Blank“) wurde dann von den Werten der eigentlichen Ansätze („OD“) subtrahiert und ergab so einen normalisierten Endwert („OD_{korrigiert}“). Die Experimente wurden in drei biologisch voneinander unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Zur Auswertung wurden deren Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

2.2.8 Bestimmung der Apoptoserate

Eukaryote Zellen können nach morphologischen und biochemischen Kriterien auf zwei Arten den Tod finden: durch Apoptose oder Nekrose. Die Nekrose ist charakterisiert durch eine Zunahme der Permeabilität der Zellmembran, gefolgt von einem gesteigerten Wassereinstrom in die Zelle, die anschwillt und innerhalb weniger Minuten platzt. Bei der Apoptose, welche auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird, kommt es erst zu Ausstülpungen der Zellmembran (Zeiosis), Kondensation des Zytoplasmas und zu einer Aktivierung verschiedener endogener Endonukleasen und Proteasen. Es kommt vor der Zerstörung der Zellmembran bereits zu einer Degradation der Kern-DNA, welche normalerweise an die Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 gebunden ist.

Um die Apoptose der Zellen messen zu können, wurde der Cell Death Detection ELISA^{plus} Kit eingesetzt. Der Assay basiert auf dem Prinzip eines sogenannten quantitativen *sandwich-enzyme-immunoassay* mit monoklonalen Antikörpern gegen DNA-Fragmente und Histone. Nachdem die Zellen behandelt worden waren, wurden jeweils 10⁴ dieser Zellen gewonnen und für den Assay eingesetzt. Zur Untersuchung der Apoptose wurden die Zellen pelletiert (Zentrifugation mit 200 x g für 10 min.), der Überstand verworfen und anschließend das Pellet in 200 µl Lysis-Puffer lysiert. Das Gemisch wurde dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zell-Lyse wurden 20 µl des Überstandes pipettiert und auf die Streptavidin-beschichteten 96-Lochplatten gegeben. Es wurden anschließend 80 µl des Immunoreagens (im Kit enthalten, Anti-Histon-Biotin und Anti-DNA-POD Antikörper im 1:1 Mischungsverhältnis) hinzugegeben und für zwei Stunden auf einem Schüttler (300

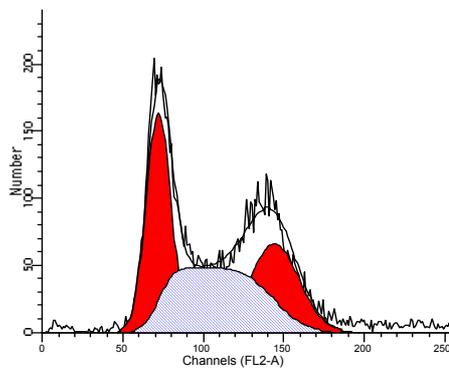
U/min.) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung entfernt und die 96-Lochplatte wurde drei Mal mit dem *Incubation*-Buffer gewaschen. Nun wurden 100 µl der ATBS Lösung (im Kit enthalten) in die einzelnen Kammern der 96-Lochplatte pipettiert und das Ganze für 15 Minuten auf einem Schüttler (200 U/min.) bei Raumtemperatur inkubiert. Das ATBS wird von den gebundenen Antikörpern, deren Menge von der Anzahl apoptotischer Zellen abhängt, in einer Farbreaktion umgesetzt, die bei 490 nm photometrisch gemessen und quantifiziert werden kann. Als Positiv-Kontrolle dienten jeweils die im Kit enthaltenen DNA-Histon Komplexe. Als Leerkontrolle diente der Lysis-Buffer allein.

2.2.9 Zellzyklus-Analyse mittels Fluoreszenz-Durchflußzytometrie

Fluoreszenz-Durchflußzytometrie ist das Messen der Fluoreszenz von Einzelzellen, wie es dem Grundsatz nach bereits unter 2.2.3 beschrieben wurde. In der Zellzyklus-Analyse mittels Fluoreszenz-Durchflußzytometrie wird über eine Propidium-Jodid-Färbung die DNA der Zellen angefärbt. Mithilfe der Information über DNA-Gehalt einer Zelle, Zellgröße und Zellgranularität wird eine Zelle einer Zellzyklus-Phase zugeordnet. Insgesamt wird ermittelt, zu welchen Teilen sich eine Gesamtpopulation in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befindet.

Für die hier durchgeführte Zellzyklus-Analyse wurden die KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen für vier und sieben Tage mit 25 µM oder 100 µM Exisulind beziehungsweise DMSO als Kontrolle in ihren spezifischen Wachstumsmedien behandelt. Nach der Inkubation wurden die Zellen zwei Mal mit 50 ml PBS-Puffer gewaschen und das Zellpellet anschließend auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml PBS-Puffer verdünnt. Dann wurde zwei Mal mit 4 °C kaltem PBS-Puffer plus 2 %-igem fetalen Rinderserum (FBS) gewaschen und in 70 %-igem Ethanol für 60 Minuten bei 4 °C fixiert. Hiernach wurden die Zellen zwei Mal mit PBS-Puffer gewaschen und durch Zugabe von 1 ml Propidium-Jodid Färbelösung (50 µg/ml Propidium-Jodid, 3,8 mM Natriumtrisphosphate in PBS-Puffer und 50 µl RNase A) für drei Stunden bei 4 °C gefärbt. Es wurden jeweils 10^4 Zellen mittels eines BD FACScan™ Flow Cytometer analysiert und mit Hilfe der BD CellQuest Software ausgewertet. Alle Experimente

wurden insgesamt drei Mal unabhängig von einander durchgeführt. Die hier präsentierten Werte sind Mittelwerte und deren Standardabweichungen.



KG-1 Zellen, DMSO, 4 d

G1 Phase	44.805 %
S Phase	24.555 %
G2 Phase	30.6 %

Abb. 2.2.9 FACS-durchflußzytometrische Zellzyklusanalyse KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen wurden für vier und sieben Tage mit 25 μ M und 100 μ M Exisulind oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen inkubiert und anschließend durchflußzytometrisch nach ihrem DNA-Gehalt sortiert und analysiert. Dabei wurden die prozentuale Verteilung der Zellen auf die unterschiedlichen Zellzyklusphasen G1, S und G2 erfasst. Hier eine Darstellung am Beispiel der KG-1 Zellen, welche für vier Tage mit DMSO inkubiert worden waren.

2.2.10 SAPK/JNK Assay und Western Blot

Die c-Jun-NH₂-terminalen Kinase (JNK) oder auch Streß-aktivierte Proteinkinase (SAPK) können durch eine Reihe von Stimuli aktiviert werden. Zu ihren Aktivatoren gehören UV- und γ -Strahlen, inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren sowie genotoxische Substanzen. Die aktivierten JNK/SAPK-Proteine binden an die N-terminale Transaktivierungsdomäne des c-Jun-Proteins und phosphorylieren die Serin-Reste der Positionen 63 und 73 (Ser63 und Ser73) (Soh et al., 2001). Als Folge dieser Phosphorylierung wird eine erhöhte Transkriptionsaktivität von Genen wie der Caspase 3 und des Aktivator Protein 1 (AP-1) beobachtet und so die Apoptose der Zelle induziert (Rice et al., 2003).

Um die Aktivität der c-Jun-NH₂-terminalen Kinase (JNK) in Abhängigkeit von der Exisulind-Exposition zu untersuchen, wurde das SAPK/JNK Assay Kit verwendet. Dieses Kit verwendet ein Agarose-Bead-markiertes N-terminales c-Jun Fusionsprotein, welches die c-Jun-NH₂-terminalen Kinasen aus der Gesamtproteinfraktion bindet. Durch Zentrifugation und Waschschriffe wird dieser

Komplex von der Gesamtproteinfraktion getrennt und die Phosphorylierungsreaktion der c-Jun-NH₂-terminalen Kinase durch die Zugabe von ATP initiiert. Anschließend wird die Aktivität der c-Jun-NH₂-terminalen Kinase mittels eines Western Blot mit einem Antikörper gegen das am Serin-Rest 63 (Ser36) phosphorylierte c-Jun Fusionsprotein quantifiziert.



Abb. 2.2.10.1 SAPK/JNK Assay Die aktivierten JNK/SAPK-Proteine binden an die N-terminale Transaktivierungsdomäne des c-Jun-Proteins (Agarose-Bead-gekoppelt) und phosphorylieren in Anwesenheit von ATP die Serin-Reste der Positionen 63 und 73 (Ser63 und Ser73)

2.2.10.1 Gewinnung des Gesamtproteins ganzer Zellen

KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen wurden für sieben Tage mit 25 μ M und 100 μ M Exisulind oder der entsprechenden DMSO-Kontrolle inkubiert. Anschließend wurde aus den Zellen das Gesamtprotein wie folgt extrahiert: Die Zellen wurden mit 4 °C kaltem PBS-Puffer gewaschen und das Zellpellet in 150 μ l Lyse-Puffer (110 μ l 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2,5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM β -Glycerophosphat, 1 mM Na₃VO₄, 1 μ g/ml Leupeptin plus 40 μ l Protease-Inhibitor) lysiert. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und für 10 Minuten bei 4 °C mit 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand enthielt nun die Gesamtproteinfraktion. Er wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und das Pellet verworfen.

2.2.10.2 Konzentrationsbestimmung des Gesamtproteins

Die Konzentration des Gesamtproteins wurde mittels Bradford-Assay bestimmt. Zur Durchführung des Assays wurden 160 µl steriles Wasser, 2 µl Probe und 40 µl der Bradford-Assay Lösung vermischt. Der entstehende Farbumschlag ist proportional zur Menge des Proteins. Die photometrische Messung dieses Farbumschlages erfolgte bei 590 nm. Mit Hilfe einer Standardkurve von Proteinen bekannter Konzentration (BSA 0,5 µg/µl) konnten die unbekannt Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt werden. Als Leerkontrolle diente der Ansatz ohne Zugabe von Proteinen.

2.2.10.3 SAPK/JNK Assay

Zur Durchführung des SAKK/JNK Assay Kits wurden nun 250 µg des Gesamtproteins verwendet. Die im Gesamtprotein enthaltenen c-Jun Kinasen wurden zunächst mit 2 µg c-Jun Fusion Beads immunpräzipitiert. Die Ansätze wurden für 12 Stunden bei 4 °C auf einem Rüttler inkubiert. Während dieser Zeit band die Kinase über einen Antigen-Antikörper Komplex an die Agarose Beads, so dass anschließend die anderen Proteine durch Waschen der Ansätze entfernt werden konnten. Gewaschen wurden die Bead-Komplexe einmal mit Lysis-Buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM β-Glycerophosphat, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml Leupeptin) und zwei Mal mit Kinase-Puffer (25 mM Tris (pH 7.5), 5 mM β-glycerolphosphate, 2 mM DTT, 0.11 mM Na₃VO₄, und 10 mM MgCl₂). Zwischen jedem Waschschrift wurde bei 4 °C mit maximaler Geschwindigkeit für 30 Sekunden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die Durchführung der eigentlichen Kinase-Reaktion, der Phosphorylierung des c-Jun-Transfusionsproteins, wurden die Beads in 50 µl Kinase-Buffer mit 200 µM ATP gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Durch Zugabe von 25 µl 3x SDS-Puffer wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurde mit dem Reaktionsprodukt ein Western Blot durchgeführt.

2.2.10.4 Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine

Bevor ein Protein spezifisch mit einem Western Blot nachgewiesen werden kann, muss das Gesamtprotein elektrophoretisch nach Molekulargewichten in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Zu 30 µl Proteinextrakt (50 µg Protein je Probe wurden mit dem Lyse-Puffer auf ein Volumen von 30 µl justiert) wurden 10 µl Loading Dye (Bromophenol Blue) hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Nach Abkühlung wurde das Gemisch in die Gel-Taschen gegeben. Die Elektrophorese erfolgte dann mit einem Western Blot Electrophoresis Module bei 110 V für 60 Minuten. Als Laufpuffer diente 1 x Tris-Glycerin-SDS-Puffer (250 mM Tris/HCl, pH 6,8, 2 M Glycin, 1% SDS, pH 8,3). Das Molekulargewicht der Proteine wird durch Vergleich ihrer Wanderungstrecken mit denen von Standardproteinen ermittelt.

2.2.10.5 Transfer der Proteine auf Nitrozellulose-Membranen

Um den immunologischen Nachweis der in dem Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine zu ermöglichen, muss zunächst deren Transfer auf eine 0,2 µm Nitrozellulose-Membran erfolgen, die die Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen fixiert. Dies erfolgte bei 4 °C nach dem *Semidry*-Verfahren in einer Western-Blot-Transfer-Apparatur für 1 Stunde bei 110 V (entspricht in etwa 1 mA/cm² Membran) in 1 x Transfer-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 192 mM Glycin, 20 % Methanol). Der Aufbau erfolgt nach dem *Sandwich*-Prinzip, beginnend bei der Anode der Kammer mit einer Wattelage, zwei Lagen Filterpapier (2 mm), der Nitrozellulose-Membran, dem Polyacrylamidgel, zwei Lagen Filterpapier, einer Wattelage und der Kathode. Sowohl die Watte als auch das Filterpapier wurden zuvor mit 1 x Transfer-Puffer equilibriert. Die Nitrozellulose-Membran wurde für mindestens zwei Minuten in Methanol eingelegt.

2.2.10.6 Blocken des Transfers

Nach erfolgreichem Transfer wurde die Transfermembran zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit Blockpuffer (5% fettfreies Milchpulver in 100 ml destilliertem Wasser) inkubiert. Diese Absättigung diente zur Reduktion des Hintergrundes bei der Detektion spezifischer Proteine durch Antikörper.

2.2.10.7 Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern

Die Membran wurde mit dem primären Antikörper gegen das phosphorylierte c-Jun-Transfusionsprotein in einer Verdünnung von 1:1.000 in 10 ml 2 % BSA bei 4 °C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit Wasch-Puffer (1 x PBS-Puffer plus 2 ml Tween20) für jeweils 5 Minuten gewaschen. Der sekundäre Antikörper, ein HRP-konjugierter *anti-rabbit* Antikörper, wurde in einer Konzentration von 1:2.000 in 10 ml Blockpuffer auf die Membran gegeben und für 60 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut für jeweils 5 Minuten mit dem Wasch-Puffer gewaschen.

2.2.10.8 Detektion der Antikörper-Reaktion

Die Detektion der Antikörperreaktion beruht auf dem Prinzip der Chemilumineszenz, da der sekundäre Antikörper mit „*Horse Radish Peroxidase*“ (HRP) gekoppelt ist. Durch Zugabe eines Substrates erfolgt die enzymatische Umsetzung von Luminol und Wasserstoffperoxid, wobei die Oxidation des Luminols eine Lichtemission bewirkt. Dazu wurde die Membran eine Minute in ECL Lösung inkubiert, in Haushaltsfolie eingeschlagen und schliesslich mit dem AlphaEase FluorChem™ Imaging System sichtbar gemacht und digital aufgezeichnet.

2.2.11 Gesamt-RNA Isolation, cDNA-Synthese und RT-PCR

Um differentielle Gen-Expressionsniveaus zu detektieren wurden Real-Time-PCRs (RT-PCR) durchgeführt. Bei der herkömmlichen „Polymerase Chain Reaction“ (PCR) sind zu Beginn der Amplifikation Primer und Enzyme im Überfluss vorhanden. Die Amplifikation läuft zu Beginn exponentiell ab. Der Punkt, an dem die Amplifikation von der exponentiellen Phase in die lineare und schliesslich in die Plateau-Phase übergeht, ist sehr variabel, sogar bei Wiederholungsexperimenten identischer Ansätze. Ursächlich scheint hierfür eine Renaturierung der PCR-Produkte mit zusätzlichem Primer-Verbrauch zu sein (Zugabe von weiterem Enzym oder Substrat hat keinen Effekt auf die PCR Kinetik). Um genaue quantitative Aussagen machen zu können, dürfen nur die Daten verwendet werden, die während der exponentiellen Phase der Amplifikation erhoben werden, ist doch nur diese Phase der Amplifikation reproduzierbar. Bei der Real-time-PCR (RT-PCR) ist es möglich, quantitative Daten für jede Probe nach jedem einzelnen Zyklus zu erheben. Der Fluoreszenz-Farbstoff „SYBR-Green“ bindet an Doppelstrang-DNA. Mit zunehmender Akkumulation des PCR-Produktes nimmt auch dessen Fluoreszenz zu. Eine Standard Kurve, bei der DNA bekannter Konzentration eingesetzt wird (hGAPDH-Plasmid), kann zur Bestimmung unbekannter DNA-Konzentrationen herangezogen werden.

2.2.11.1 Gesamt-RNA Isolation

Die zur RT-PCR Analyse verwendete RNA wurde von den zu untersuchenden Zellen immer aus neuen Versuchsansätzen gewonnen. KG-1 und SKM-1 Zellen wurden für 24 Stunden mit 100 μ M Exisulind oder DMSO 100 inkubiert, anschließend mit 4 °C kaltem PBS-Puffer gewaschen und mit 600 μ l RLT-Puffer (enthält 1% β -Mercaptoethanol) lysiert. Zum Aufreinigen der Gesamt-RNA wurde das RNeasy Mini Kit verwendet. Als erster Reinigungsschritt wurden jeweils 600 μ l der Zell-Lysate auf QIAshredder-Säulen pipettiert und zwei Minuten mit 10.000 U/min. zentrifugiert. Als nächstes wurden 600 μ l 70 %-iges Ethanol zu dem Überstand hinzugegeben. Die Probe wurde sukzessive auf eine RNeasy Säule aufgetragen und jeweils 15 Sekunden mit 10.000 U/min. zentrifugiert. Die Überstände wurden jeweils verworfen. Dann wurde die Säule einmal mit 700 μ l RW1-Puffer und zweimal mit 500 μ l RPE-

Puffer gewaschen. Zentrifugiert wurde bei den ersten beiden Waschrissen für 15 Sekunden mit 10.000 U/min. und beim dritten für zwei Minuten mit 13.000 U/min.. In einem weiteren Zentrifugationsschritt für eine Minute bei 13.000 U/min. wurde die QIAshredde-Säule von Flüssigkeitsresten befreit. 50 µl DEPC-Wasser wurden zum eluieren auf die Säule pipettiert. Mit dem letzten Zentrifugationsschritt von einer Minute bei 10.000 U/min. wurde die RNA in einem 1,5 ml Eppendorf Tube aufgefangen.

2.2.11.2 Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA

Die Konzentration der Gesamt-RNA erfolgte photometrisch (Photometer: DU 600). Dazu wurde die Extinktion der Proben in Eppendorf UVette® Photometer-Cuvetten bei 260 nm Wellenlänge gemessen. Eine Extinction von eins entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Die RNA-Konzentration der Proben war zumeist so hoch, dass die Proben zunächst 1:25 mit 10 mM Tris-Cl (pH 7,5) verdünnt werden mussten. 96 µl Tris-Puffer wurden 4 µl Probe zugegeben. Der Verdünnungsfaktor wurde bei der Konzentrationsbestimmung berücksichtigt. Zur Qualitätskontrolle diente der photometrische Quotient bei der Absorption von 260 nm und 280 nm ($A_{260} : A_{280}$). Dieser Quotient korreliert mit der Reinheit der RNA beziehungsweise mit der Protein-Dekontamination und liegt idealerweise zwischen 1.6 und 2.0 (Wilfinger et al., 1997). Es wurden nur RNA Proben weiterverarbeitet, die innerhalb dieses Bereiches lagen. Als weitere Kontrolle der RNA-Aufreinigung beziehungsweise der DNA-Kontamination wurden die Proben in neutralen Agarosegelen (1% Agarose in 1 x TAE-Puffer mit Ethidiumbromid zur Anfärbung der Nukleinsäuren) aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE (40 mM Tris/HCl, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, pH 7,8) verwendet. Es wurde 1 µg RNA pro Probe auf das Gel aufgetragen.

2.2.11.3 cDNA-Synthese

Im Weiteren wurde die gewonnene RNA in cDNA umgeschrieben. Zur cDNA-Synthese wurden die Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads verwendet. Die Beads enthalten bereits alle nötigen Puffer, Oligos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP),

RNase/DNase-freies BSA und die Reverse Transkriptase (M-MuLV). Zwei μg RNA wurden bis zu einem Zielvolumen von 32 μl ein entsprechendes Volumen DEPC-Wasser hinzugegeben. Die Proben wurden dann für 10 Minuten bei 65 °C denaturiert, anschließend kurz gemischt und auf Eis gestellt. Das gesamte Volumen wurde dann auf die Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads gegeben und zunächst eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem sich die Beads in den Proben gelöst hatten, wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Dem fertigen Produkt wurden 33 μl DEPC-Wasser hinzugegeben.

2.2.11.4 Quantitative RT-PCR

Die Ansätze für die RT-PCR setzte sich aus 2,5 μl Reaktions-Puffer A (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9,0 at 25 °C) und 1 % Triton X-100), 2 μl MgCl_2 , 0,5 μl dNTP, 1,25 μl SYBR Green II, 0,2 μl Taq DNA Polymerase und je 0,25 μl sense- und antisense-Primer, sowie 2 μl cDNA zusammen. Die Amplifikation erfolgte auf einem „MJ Research DNA Engine Opticon Continuous Fluorescence Detection System“. Es wurde wie folgt amplifiziert: Denaturierung für drei Minuten bei 95 °C, dann Inkubation für 30 Sekunden bei 95 °C, 30 Sekunden bei 52 °C, eine Minute bei 72 °C und fünf Sekunden bei 79 °C, dann wurde das Fluoreszenzsignal gelesen und die Schritte wurden, bis auf den ersten, insgesamt vierzigmal wiederholt. Dann wurde fünf Minuten bei 72 °C inkubiert und schliesslich eine Schmelzkurve im Bereich von 40 °C bis 96 °C erstellt. Detektiert wurde das Fluoreszenzsignal hierbei alle 0,5 °C bei einer Verweildauer von fünf Sekunden. Nach erfolgreicher Amplifikation wurden die PCR-Produkte auf 10 °C gekühlt. Von jeder Probe wurde neben dem zu untersuchenden Gen eine RT-PCR des Gens der humanen GAPDH durchgeführt. Anhand der Expression dieses so genannten *housekeeping*-Gens (es wird in unterschiedlichen eukaryonten Zellen nahezu immer in gleichem Maße exprimiert) konnten dann die Expressionsniveaus der untersuchten Gene in den einzelnen Proben miteinander verglichen werden. Die quantitativen Daten für die einzelnen Proben wurden mit den Statistikfunktionen von Microsoft Excel bearbeitet.

3. Ergebnisse

3.1 Der Effekt von Exisulind auf das Koloniewachstum von KG-1, SKM-1, THP-1 und gesunden CD34+ Zellen

Um den möglichen Einfluß von Exisulind auf das Wachstums- und Kolonieausbildungsverhalten der leukämischen Zelllinien und der gesunden CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen zu beurteilen, wurden zunächst colony-forming unit assays (CFU-Assays) durchgeführt. Die sonst frei flottierenden Zellen bleiben in der Methylzellulose ortsständig, teilen sich und bilden Kolonien. Diese können dann nach Anzahl, Größe und Morphologie analysiert werden.

Nach vier Tagen Inkubation der Zellen mit 100 µM Exisulind wurde beobachtet, dass KG-1 und SKM-1 Zellen weder Kolonien noch Zellhaufen (engl.: cluster) ausgebildet hatten, während sich in den DMSO-Kontrollen bereits Zellhaufen zeigten. Nach 11 Tagen der Inkubation mit 100 µM Exisulind waren in den Kulturen der KG-1 und SKM-1 Zellen nur vereinzelte und kleine Zellhaufen gewachsen, während in den entsprechenden DMSO-Kontrollen zahlreiche große Kolonien und Zellhaufen gewachsen waren. Dieser Effekt wurde jeweils in drei voneinander unabhängigen Ansätzen beobachtet und in vordefinierten, repräsentativen Bereichen der Petri-Schalen mittels Photomikrographie (Aufsichtsmikroskop, 45fache Vergrößerung) dokumentiert (Abb. 3.1.1 und 3.1.2).

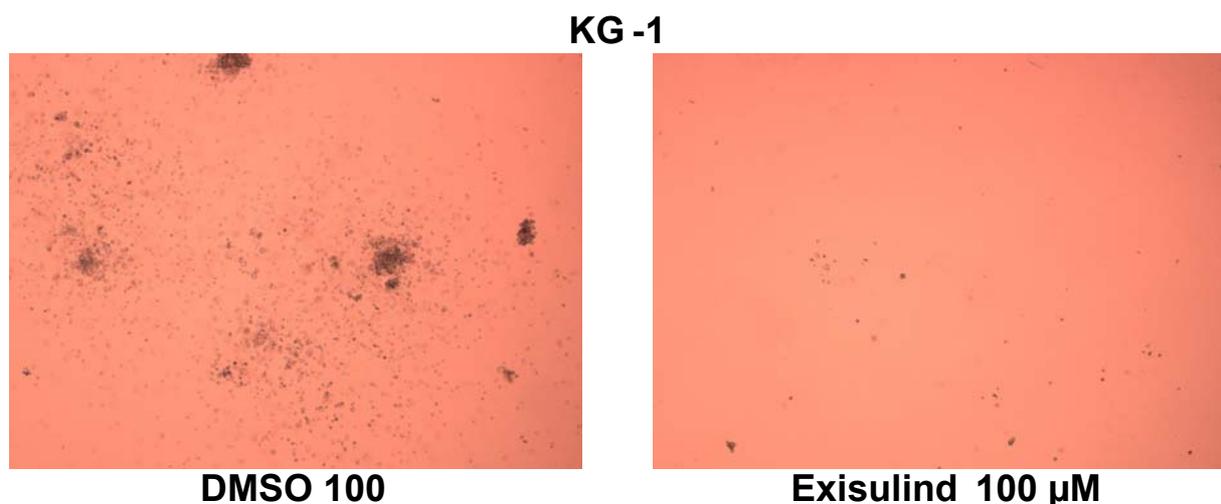


Abb. 3.1.1 CFU-Assay der KG-1 Zellen Zellen der sAML/MDS Zelllinie KG-1 wurden für 11 Tage in Methylzellulose (CFU-Assay) entweder mit DMSO oder mit 100 µM Exisulind inkubiert. Anschließend erfolgte die Dokumentation von vordefinierten, repräsentativen Bereichen mittels Photomikrographie (Aufsichtsmikroskop, 45fache Vergrößerung). In der DMSO-Kontrolle sind zahlreiche große Kolonien und Cluster gewachsen, während sich in den Exisulind-Ansätzen nur vereinzelte und spärliche Cluster ausgebildet haben.

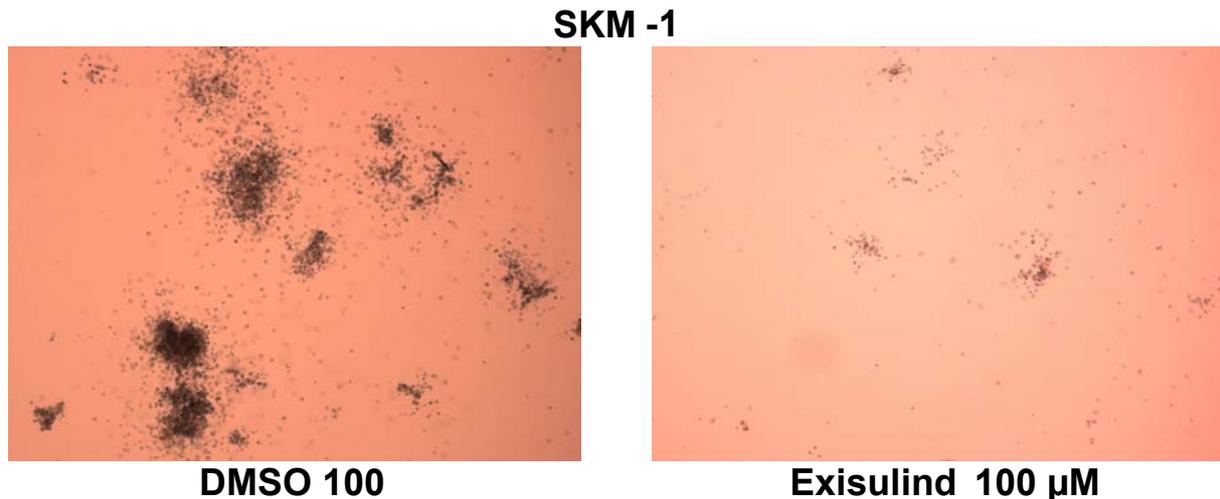


Abb. 3.1.2 CFU-Assay der SKM-1 Zellen Zellen der sAML/MDS Zelllinie SKM-1 wurden für 11 Tage in Methylzellulose (CFU-Assay) entweder mit DMSO oder mit 100 µM Exisulind inkubiert. Anschließend erfolgte die Dokumentation von vordefinierten, repräsentativen Bereichen mittels Photomikrographie (Aufsichtsmikroskop, 45fache Vergrößerung). In der DMSO-Kontrolle sind zahlreiche große Kolonien und Cluster gewachsen, während sich in den Exisulind-Ansätzen nur vereinzelt und spärliche Cluster ausgebildet haben.

Die THP-1 Zellen und die gesunden CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen hatten nach vier Tagen der Inkubation in den Exisulind-behandelten Ansätzen und in den DMSO-Kontrollen gleichermaßen Zellhaufen ausgebildet. Auch nach 11 Tagen zeigten THP-1 und gesunde CD34+ hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen keine Exisulind-abhängigen Veränderungen in ihrer Koloniebildung. Hier fanden sich sowohl in den Exisulind-behandelten als auch in den DMSO-Kontrollen etwa gleich viele Kolonien und Zellhaufen (engl.: *cluster*). Ein verändertes Koloniewachstumsverhalten durch die Behandlung der Zellen mit 100 µM Exisulind konnte hier nicht beobachtet werden. Dieser Effekt wurde jeweils in drei voneinander unabhängigen Ansätzen beobachtet und in vordefinierten, repräsentativen Bereichen der Petrischalen mittels Photomikrographie (Aufsichtsmikroskop, 45fache Vergrößerung) dokumentiert (Abb. 3.1.3 und 3.1.4).

THP -1

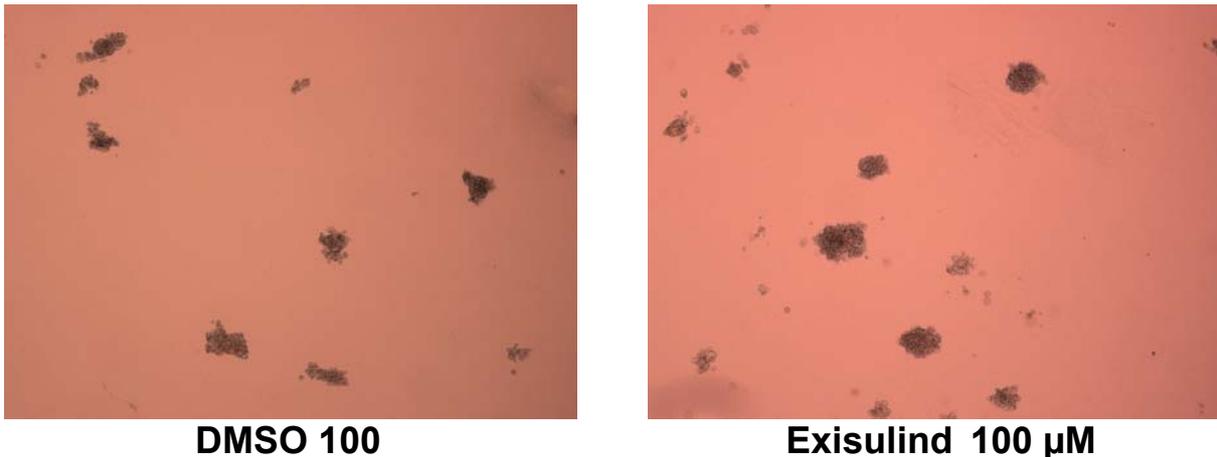


Abb. 3.1.3 CFU-Assay der THP-1 Zellen Zellen der de novo AML Zelllinie THP-1 wurden für 11 Tage in Methylzellulose (CFU-Assay) entweder mit DMSO oder 100 µM Exisulind inkubiert. Anschließend erfolgte die Dokumentation von vordefinierten, repräsentativen Bereichen mittels Photomikrographie (Aufsichtsmikroskop, 45fache Vergrößerung). Ein verändertes Koloniewachstumsverhalten durch die Behandlung der Zellen mit 100 µM Exisulind konnte nicht beobachtet werden.

Gesunde CD34+ Zellen (Knochenmark)

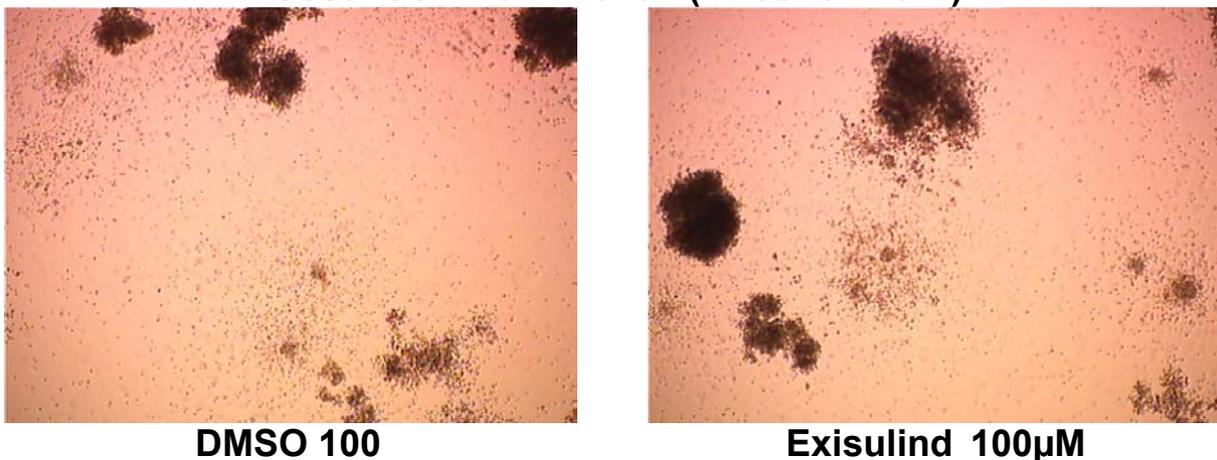


Abb. 3.1.4 CFU-Assay der CD 34+ Zellen CD34+ hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender wurden für 11 Tage in Methylzellulose (CFU-Assay) entweder mit DMSO oder mit 100 µM Exisulind inkubiert. Anschließend erfolgte die Dokumentation von vordefinierten, repräsentativen Bereichen mittels Photomikrographie (Aufsichtsmikroskop, 45fache Vergrößerung). Ein verändertes Koloniewachstumsverhalten durch die Behandlung der Zellen mit 100 µM Exisulind konnte nicht beobachtet werden.

Somit konnte durch die Exposition mit 100 µM Exisulind bei den sAML/MDS Zelllinien KG-1 und den SKM-1 ein reduziertes Koloniewachstum im CFU-Methylzellulose Assay gezeigt werden. Die de-novo-AML-Zelllinie THP-1 und die CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender wurden durch Exisulind in ihrem Koloniewachstumsverhalten dagegen nicht beeinflusst. Exisulind schein somit selektiv die Anzahl und Größe der Kolonien der sAML/MDS Zelllinien

KG-1 und SKM-1 zu reduzieren. Folgende Faktoren sind als mögliche Ursache zu diskutieren: Eine inhibierte Proliferation der KG-1 und SKM-1 Zellen durch Exisulind, ein Apoptose-induzierender Effekt des Exisulind auf KG-1 und SKM-1 Zellen und/oder ein Zellzyklusarrest der KG-1 und SKM-1 Zellen durch Exisulind. Im Weiteren wurde deshalb der mögliche Einfluß von Exisulind auf Zellzahl, Proliferation, Apoptose und Zellzyklus genauer analysiert.

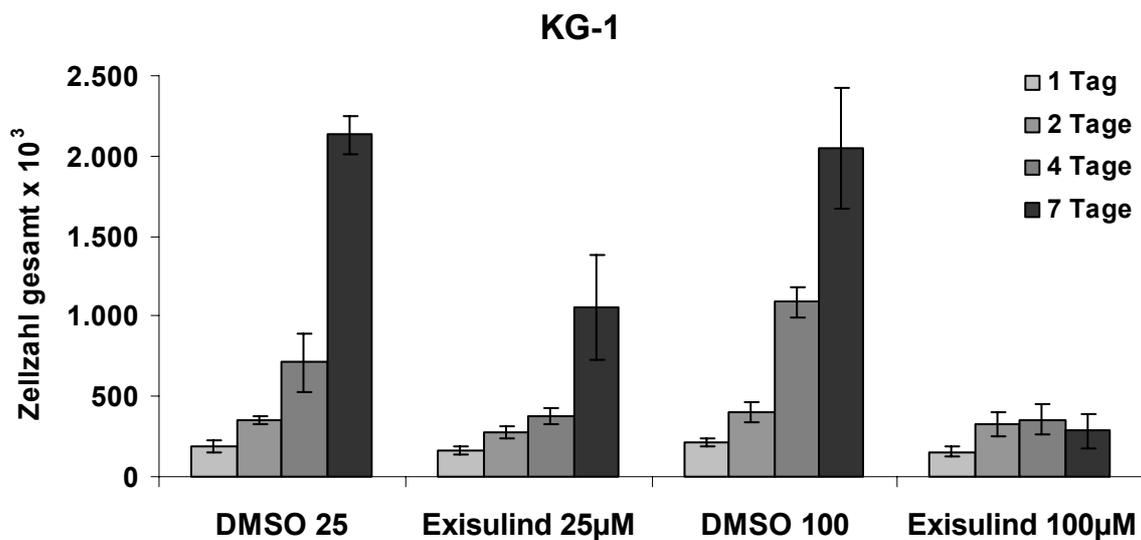
3.2 Der Effekt von Exisulind auf die Anzahl von KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen

Die Zellen wurden in ihren spezifischen Wachstumsmedien mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen Exisulind (25 μM und 100 μM) oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen und für vier unterschiedliche Zeitintervalle (ein Tag, zwei, vier und sieben Tage) inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellzahlen in den Ansätzen mittels hämozytometrischer Analyse ermittelt. Alle Angaben zu den Zellzahlen stellen Durchschnittswerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten dar. Die kompletten Ergebnisse der hämozytometrischen Analysen finden sich im Appendix unter 6.1.1 bis 6.1.3.

KG-1 Die hämozytometrische Analyse zeigte, dass die Anzahl der KG-1 Zellen in der DMSO 25-Kontrolle von $1,9 \times 10^5$ an Tag eins, $3,52$ und $7,15 \times 10^5$ an den Tagen zwei und vier, auf $2,13 \times 10^6$ an Tag sieben anwächst. Durch den Zusatz von 25 μM Exisulind nahm die Zellzahl deutlich langsamer zu. Hier wurden an den Tagen eins, zwei und vier entsprechend $1,68$, $2,76$ und $3,72 \times 10^5$ Zellen gezählt. An Tag sieben wurden durchschnittlich $1,06 \times 10^6$ Zellen gezählt. Damit erreichen die Exisulind-behandelten KG-1 Zellen nach vier Tagen nur 52 % und nach sieben Tagen nur 49,7 % der jeweiligen Kontroll-Ansätze (Abb. 3.2.1).

Vergleicht man die DMSO 100-Kontrollen mit den Ansätzen, die mit 100 μM Exisulind behandelt wurden, so wird dieser Effekt noch deutlicher. Hier wurden an den Tagen eins und zwei $2,12$ und $4,04 \times 10^5$ Zellen in den DMSO 100-Kontrollen sowie $1,55$ und $3,22 \times 10^5$ Zellen in den mit 100 μM Exisulind behandelten Ansätzen gezählt. An Tag vier wurden in den DMSO-100 Kontrollen $1,09 \times 10^6$ Zellen gezählt, während es

nur $3,55 \times 10^5$ Zellen in den $100 \mu\text{M}$ Exisulind-Ansätzen waren. An Tag sieben befanden sich in den DMSO-100 Kontrollen durchschnittlich $2,05 \times 10^6$ Zellen, dagegen aber nur $2,83 \times 10^5$ Zellen in den mit $100 \mu\text{M}$ Exisulind behandelten Ansätzen. Durch die Behandlung der KG-1 Zellen mit $100 \mu\text{M}$ Exisulind werden somit nur 32,6 % bzw. 13,8 % der vergleichbaren Kontrollen nach vier bzw. sieben Tagen erreicht (Abb. 3.2.1).



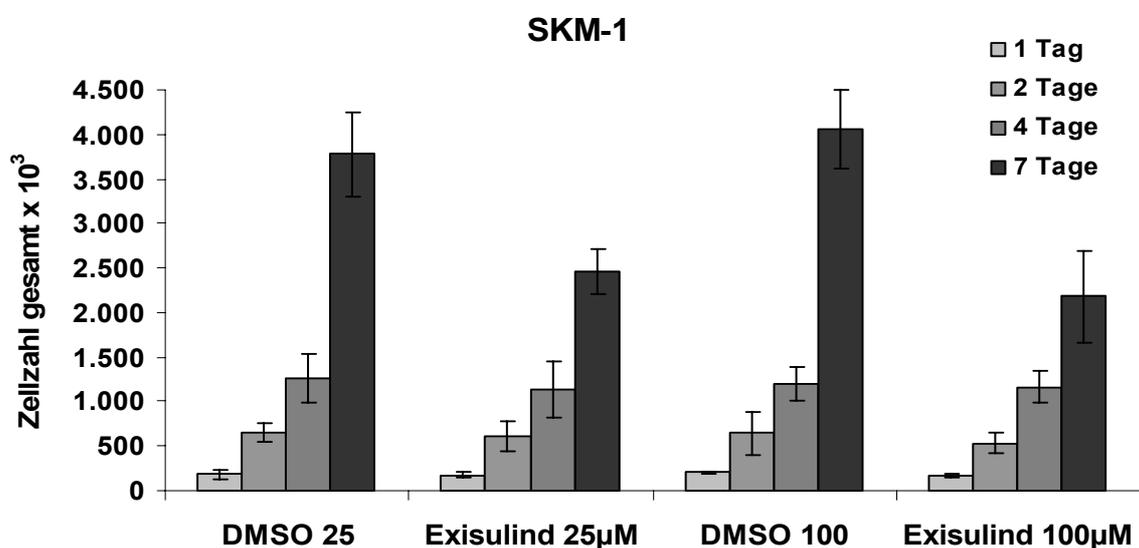
KG-1	DMSO 25		Exisulind 25µM		Exisulind 25µM / DMSO 25
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
1 Tag	190.000	37.749	168.333	25.166	0,886
2 Tage	351.667	23.629	276.667	36.856	0,787
4 Tage	715.000	181.865	371.667	50.083	0,520
7 Tage	2.130.000	115.326	1.058.333	325.359	0,497

KG-1	DMSO 100		Exisulind 100µM		Exisulind 100µM / DMSO 100
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
1 Tag	211.667	22.546	155.000	30.414	0,732
2 Tage	405.000	63.836	321.667	74.889	0,794
4 Tage	1.090.000	95.394	355.000	95.394	0,326
7 Tage	2.046.667	380.832	283.333	105.040	0,138

Abb. 3.2.1 Zytometrische Analyse der KG-1 Zellen mittels Neubauer-Zählkammer $1,5 \times 10^5$ KG-1 Zellen wurden in 2 ml IMDM-Medium mit 20 % FBS mit den angegebenen Konzentrationen Exisulind oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen für 24 und 48 Stunden, sowie für vier und sieben Tage inkubiert. Anschließend wurden mit der Neubauer-Zählkammer die Zellkonzentrationen pro ml Medium ermittelt. Bei den in den Graphen dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten.

SKM-1 Bei den SKM-1 Zellen wurden in der DMSO 25-Kontrolle nach einem Tag bzw. zwei Tagen 1,82 beziehungsweise $6,62 \times 10^5$ Zellen gezählt. In den 25 μM Exisulind-Ansätzen befanden sich nach der gleichen Inkubationszeit 1,75 beziehungsweise $6,03 \times 10^5$ Zellen. Nach vier und sieben Tagen wurden in den DMSO 25-Kontrollen 1,26 beziehungsweise $3,78 \times 10^6$ Zellen gezählt, während sich in den mit 25 μM Exisulind behandelten Ansätzen entsprechend 1,14 beziehungsweise $2,47 \times 10^6$ Zellen befanden. In den ersten vier Tagen deutet sich hier eine zu vernachlässigende Reduktion der Zellzahlen durch die Behandlung mit 25 μM Exisulind an. Erst nach sieben Tagen kann man einen signifikanten Effekt verzeichnen. Hier ist die Anzahl der SKM-1 Zellen durch die Behandlung mit 25 μM Exisulind auf 65,3% der entsprechenden DMSO-Kontrolle reduziert (Abb. 3.2.2).

Nach 24 und 48 Stunden stehen den DMSO 100-Kontrollen mit 2,07 und $6,42 \times 10^5$ Zellen entsprechend 1,68 und $5,28 \times 10^5$ Zellen in den 100 μM Exisulind-Ansätzen gegenüber. An den Tagen vier und sieben sind es durchschnittlich 1,19 und $4,06 \times 10^6$ Zellen in den DMSO 100-Kontrollen und entsprechend 1,16 und $2,18 \times 10^6$ in den mit 100 μM Exisulind behandelten Ansätzen. Damit erreicht die absolute Zellzahl in den 100 μM Exisulind-Ansätzen nach sieben Tagen gerade 53,7% der entsprechenden DMSO-Kontrollen. An den Tagen eins, zwei und vier lässt sich dagegen keine Exisulind-bedingte Reduktion der Zellzahlen feststellen (Abb. 3.2.2).



SKM-1	DMSO 25		Exisulind 25µM		Exisulind 25µM / DMSO 25
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
1 Tag	181.667	57.518	175.000	27.839	0,963
2 Tage	661.667	104.921	603.333	168.622	0,912
4 Tage	1.255.000	275.273	1.135.000	309.960	0,904
7 Tage	3.780.000	472.864	2.466.667	249.466	0,653

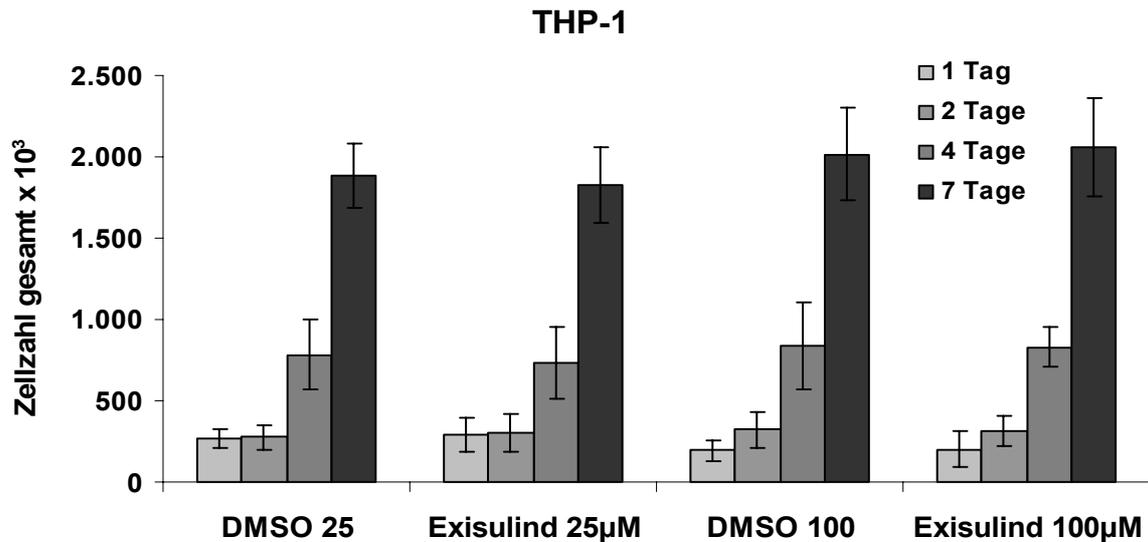
SKM-1	DMSO 100		Exisulind 100µM		Exisulind 100µM / DMSO 100
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
1 Tag	206.667	12.583	168.333	16.073	0,815
2 Tage	641.667	247.605	528.333	117.934	0,823
4 Tage	1.193.333	191.398	1.161.667	180.578	0,973
7 Tage	4.060.000	441.362	2.181.667	510.400	0,537

Abb. 3.2.2 Zytometrische Analyse der SKM-1 Zellen mittels Neubauer-Zählkammer $1,5 \times 10^5$ SKM-1 Zellen wurden in 2 ml RPMI 1640-Medium mit 15 % FBS mit den angegebenen Konzentrationen Exisulind oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen für 24 und 48 Stunden, sowie für vier und sieben Tage inkubiert. Anschließend wurden mit der Neubauer-Zählkammer die Zellkonzentrationen pro ml Medium ermittelt. Bei den in den Graphen dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten.

THP-1 Bei den THP-1 Zellen wurden an den Tagen eins, zwei und vier in den DMSO 25-Kontrollen entsprechend durchschnittlich $2,7$, $2,75$ und $7,83 \times 10^5$ Zellen gezählt. Damit vergleichbar waren auch die Zellzahlen in den $25 \mu\text{M}$ Exisulind-Ansätzen, nämlich durchschnittlich $2,88$, $3,0$ und $7,35 \times 10^5$ Zellen entsprechend an den Tagen eins, zwei und vier. Selbst nach sieben Tagen war hier kein signifikanter Unterschied festzustellen. In den DMSO 25-Kontrollen wurden durchschnittlich $1,88$ und in den mit $25 \mu\text{M}$ Exisulind behandelten Ansätzen $1,83 \times 10^6$ Zellen gezählt.

In den DMSO 100-Kontrollen wurden an den Tagen eins, zwei und vier entsprechend durchschnittlich $1,93$, $3,22$ und $8,37 \times 10^5$ Zellen gezählt, während sich in den jeweiligen $100 \mu\text{M}$ Exisulind-Ansätzen durchschnittlich $2,03$, $3,13$ und $8,28 \times 10^5$ Zellen fanden. Auch hier war nach sieben Tagen kein Unterschied zwischen Kontrolle und Behandlung festzustellen. Es wurden $2,02 \times 10^6$ Zellen in den DMSO-Kontrollen und $2,06 \times 10^6$ Zellen in den Exisulind-behandelten Ansätzen gezählt.

Somit wurde die Anzahl der THP-1 Zellen von keiner der beiden Exisulind-Konzentrationen und zu keinem der ausgewerteten Zeitpunkte durch die Behandlung beeinflusst (Abb. 3.2.3).



THP-1	DMSO 25		Exisulind 25µM		Exisulind 25µM / DMSO 25
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
1 Tag	270.000	57.663	288.333	103.239	1,068
2 Tage	275.000	75.498	300.000	113.578	1,091
4 Tage	783.333	212.211	735.000	221.190	0,938
7 Tage	1.883.333	203.060	1.828.333	233.684	0,971

THP-1	DMSO 100		Exisulind 100µM		Exisulind 100µM / DMSO 100
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
1 Tag	193.333	66.583	203.333	114.710	1,052
2 Tage	321.667	114.273	313.333	92.916	0,974
4 Tage	836.667	267.270	828.333	122.916	0,990
7 Tage	2.015.000	286.313	2.061.667	301.924	1,023

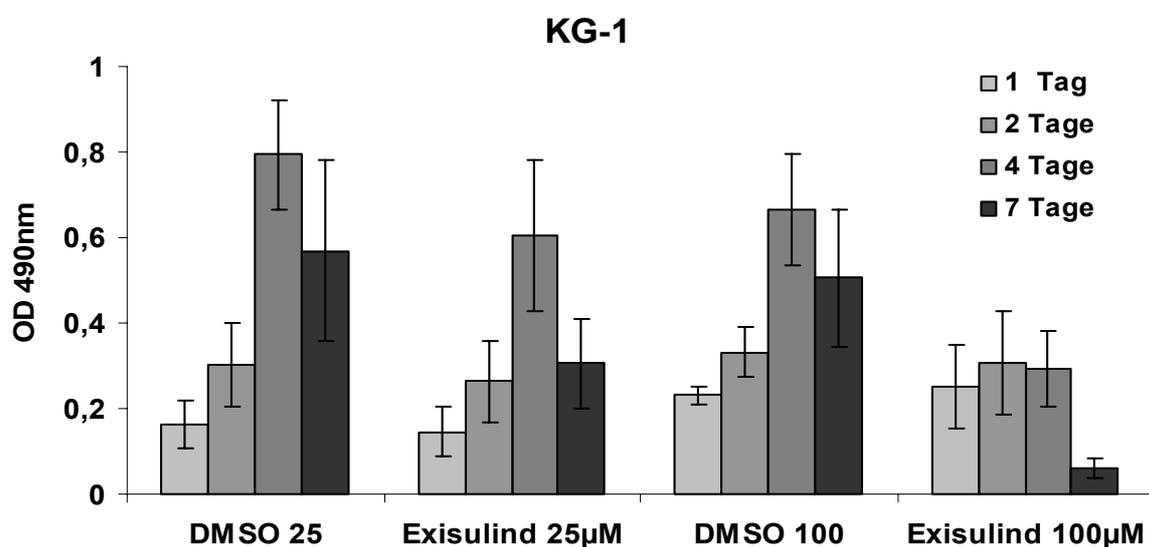
Abb. 3.2.3 Zytometrische Analyse der THP-1 Zellen mittels Neubauer-Zählkammer $1,5 \times 10^5$ THP-1 Zellen wurden in 2 ml RPMI 1640-Medium mit 10% FBS und 0.05 mM 2-Mercaptoethanol mit den angegebenen Konzentrationen Exisulind oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen für 24 und 48 Stunden, sowie für vier und sieben Tage inkubiert. Anschließend wurden mittels Neubauer-Zählkammer die Zellkonzentrationen pro ml Medium ermittelt. Bei den in den Graphen dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten.

3.3 Der Effekt von Exisulind auf die Proliferation von KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen

Mit Hilfe eines Proliferationsassays, beschrieben in 2.2.5, wurde der Einfluss von Exisulind auf die Proliferationsrate der KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen untersucht. Die Zellen wurden erneut mit 25 µM und 100 µM Exisulind oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen behandelt. Die ausgewerteten Inkubationszeiten waren 24 und 48 Stunden sowie vier und sieben Tage. Alle Angaben zur Proliferation stellen

Durchschnittswerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten dar. Die kompletten Ergebnisse der Proliferationsassays finden sich im Appendix unter 6.2.1 bis 6.2.3.

KG-1 Die Auswertung der Proliferations-Assays zeigte für die KG-1 Zellen in den ersten zwei Tagen keine Exisulind-bedingten Unterschiede. Allerdings war die Extinktion in den mit 25 μM Exisulind behandelten Ansätzen nach vier und nach sieben Tagen auf 76,1 % und 53,6 % der entsprechenden DMSO 25-Kontrollen reduziert. In den Ansätzen mit 100 μM Exisulind war der Effekt noch deutlicher. Hier war nach vier und sieben Tagen die Extinktion auf 43,8 % und 12,1 % der Kontrollwerte reduziert.

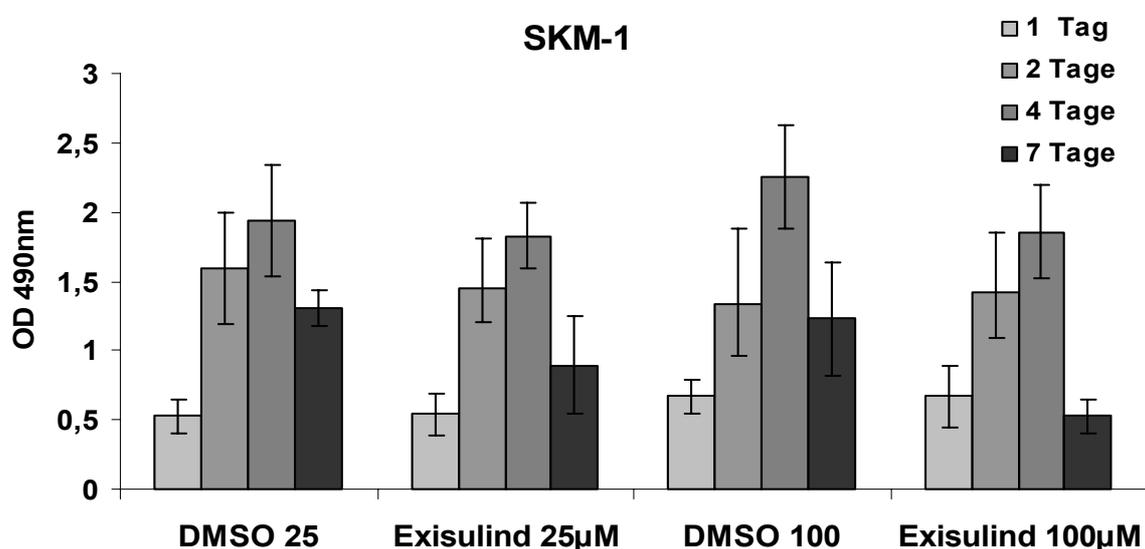


KG-1	DMSO 25		Exisulind 25 μM		Exisulind 25 μM / DMSO 25
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
1 Tag	0,162	0,057	0,146	0,057	0,901
2 Tage	0,302	0,098	0,263	0,096	0,871
4 Tage	0,794	0,128	0,604	0,175	0,761
7 Tage	0,570	0,211	0,306	0,106	0,536

KG-1	DMSO 100		Exisulind 100 μM		Exisulind 100 μM / DMSO 100
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
1 Tag	0,231	0,021	0,251	0,099	1,090
2 Tage	0,332	0,058	0,308	0,120	0,929
4 Tage	0,666	0,131	0,292	0,088	0,438
7 Tage	0,506	0,160	0,061	0,023	0,121

Abb. 3.3.1 Proliferations Assay von KG-1 Zellen 1,5 x 10⁵ KG-1 Zellen wurden in 2 ml IMDM-Medium mit 20 % FBS mit den angegebenen Konzentrationen Exisulind oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen für 24 und 48 Stunden, sowie für vier und sieben Tage inkubiert. Anschließend wurden Proliferations-Assays durchgeführt und die Extinction eines Proliferations-spezifischen Farbumschlages photometrisch quantifiziert. Bei den in den Graphen dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten.

SKM-1 Zu den ersten drei Zeitpunkten nach Inkubation der SKM-1 Zellen mit 25 μM Exisulind gab es keine medikamenteninduzierten Proliferationsunterschiede im Vergleich zu den entsprechenden DMSO-25 Kontroll-Ansätzen. Erst nach sieben Tagen zeigte sich bei dieser Konzentration ein Rückgang der Proliferationsaktivität auf 68,3 % des entsprechenden Kontrollwertes. Steigerte man die Konzentration des Exisulindes auf 100 μM , so konnte auch hier nach ein und zwei Tagen keine Proliferationsänderung im Vergleich zu den entsprechenden DMSO-100 Kontroll-Ansätzen beobachtet werden. Nach vier und sieben Tagen sank die Proliferationsaktivität der SKM-1 Zellen dann durch die Behandlung mit 100 μM Exisulind auf 82,7 % beziehungsweise 42,6 % der entsprechenden DMSO-Kontrollen.

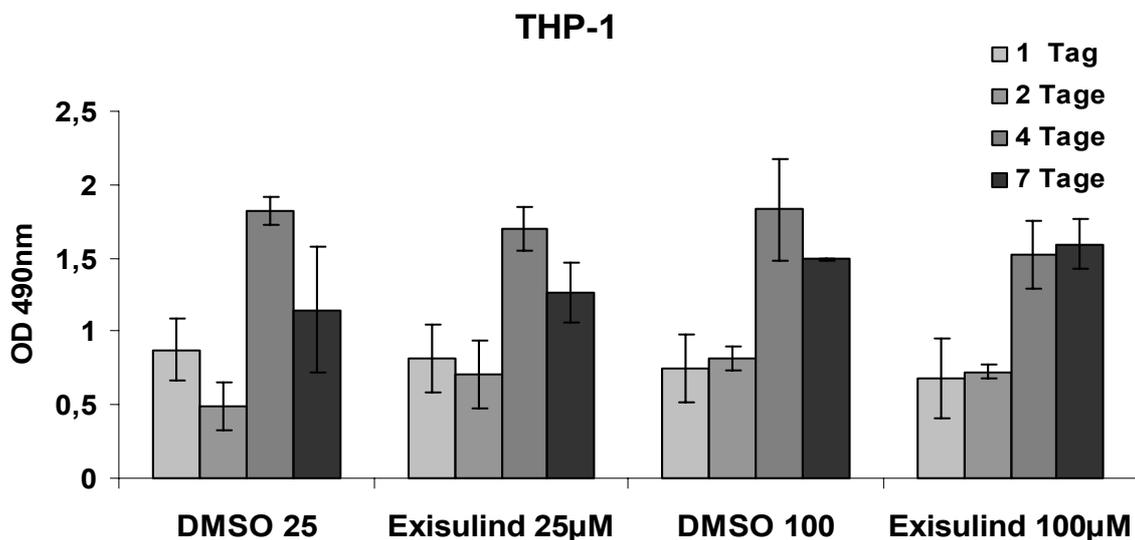


SKM-1	DMSO 25		Exisulind 25 μM		Exisulind 25 μM / DMSO 25
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
1 Tag	0,526	0,121	0,540	0,147	1,027
2 Tage	1,597	0,399	1,446	0,361	0,906
4 Tage	1,937	0,400	1,826	0,236	0,943
7 Tage	1,312	0,130	0,897	0,347	0,683

KG-1	DMSO 100		Exisulind 100 μM		Exisulind 100 μM / DMSO 100
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
1 Tag	0,669	0,123	0,669	0,217	0,999
2 Tage	1,340	0,547	1,425	0,422	1,063
4 Tage	2,249	0,373	1,859	0,335	0,827
7 Tage	1,231	0,410	0,525	0,119	0,426

Abb. 3.3.2 Proliferations Assay von SKM-1 Zellen 1,5 x 10⁵ SKM-1 Zellen wurden in 2 ml RPMI 1640-Medium mit 15 % FBS mit den angegebenen Konzentrationen Exisulind oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen für 24 und 48 Stunden, sowie für vier und sieben Tage inkubiert. Anschließend wurden Proliferations-Assays durchgeführt und die Extinction eines Proliferations-spezifischen Farbumschlages photometrisch quantifiziert. Bei den in den Graphen dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten.

THP-1 Die Proliferationsassays der THP-1 Zellen zeigten zu keinem der vier Zeitpunkte und in keiner der beiden Exisulind-Konzentrationen eine medikamentabhängige Änderung der Proliferationsaktivität.



THP-1	DMSO 25		Exisulind 25µM		Exisulind 25µM / DMSO 25
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
1 Tag	0,871	0,210	0,815	0,230	0,936
2 Tage	0,485	0,165	0,713	0,231	1,470
4 Tage	1,821	0,097	1,698	0,150	0,933
7 Tage	1,144	0,430	1,263	0,200	1,104

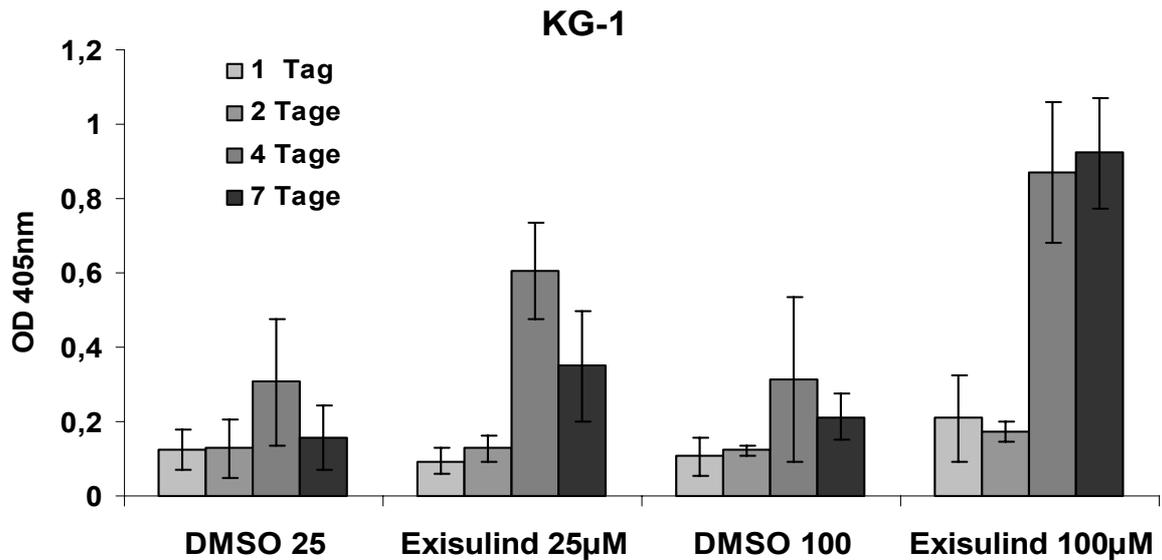
THP-1	DMSO 100		Exisulind 100µM		Exisulind 100µM / DMSO 100
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
1 Tag	0,742	0,230	0,682	0,270	0,920
2 Tage	0,816	0,079	0,724	0,051	0,887
4 Tage	1,828	0,341	1,522	0,231	0,833
7 Tage	1,488	0,001	1,593	0,169	1,070

Abb. 3.3.3 Proliferations Assay von THP-1 Zellen $1,5 \times 10^5$ THP-1 Zellen wurden in 2 ml RPMI 1640-Medium mit 10 % FBS und 0.05 mM 2-Mercaptoethanol mit den angegebenen Konzentrationen Exisulind oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen für 24 und 48 Stunden, sowie für vier und sieben Tage inkubiert. Anschließend wurden Proliferations-Assays durchgeführt und die Extinction eines Proliferations-spezifischen Farbumschlages photometrisch quantifiziert. Bei den in den Graphen dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten.

3.4.1 Der Effekt von Exisulind auf die Apoptose von KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Exisulind bei den sAML/MDS Zelllinien KG-1 und SKM-1 die Anzahl der vitalen Zellen reduziert und die Proliferation der Zellen senkt, wurde im Folgenden versucht, die Ursache hierfür herauszufinden. Eine Toxizitäts-vermittelte Zellnekrose konnte als eine der Möglichkeiten ausgeschlossen werden, da die Exisulind-behandelten Zellen zu keinem Zeitpunkt Nekrosezeichen im Licht-Mikroskop gezeigt hatten. Zudem hatte Exisulind keinen Effekt auf THP-1 Zellen gehabt. Daher wurden erneut KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen mit 25 μM und 100 μM Exisulind oder entsprechenden DMSO-Kontrollen für 24 und 48 Stunden sowie vier und sieben Tagen behandelt. Zur Messung der Apoptose wurden anschließend, wie unter 2.2.8 beschrieben, die DNA-Fragmente und freigesetzten Histone apoptotischer Zellen bestimmt. Alle Werteangaben zu den Apoptose-Assays stellen Durchschnittswerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten dar. Die kompletten Ergebnisse der Apoptose-Assays finden sich im Appendix unter 6.3.1 bis 6.3.3.

KG-1 Die Auswertung der Apoptose-Assays zeigte für die KG-1 Zellen, die mit 25 μM Exisulind inkubiert worden waren, dass die Apoptose-Aktivität nach vier Tagen durchschnittlich um den Faktor 1,98 und nach sieben Tagen durchschnittlich um den Faktor 2,24 erhöht war. In den 100 μM Exisulind Ansätzen war nach allen vier Zeitpunkten eine erhöhte Apoptose-Rate nachzuweisen und zwar eine 1,97-fache Erhöhung nach einem Tag, eine 1,43-fache Erhöhung nach zwei Tagen, eine 2,77-fache Erhöhung nach vier und eine 4,32-fache Erhöhung nach sieben Tagen (Abb. 3.4.1).

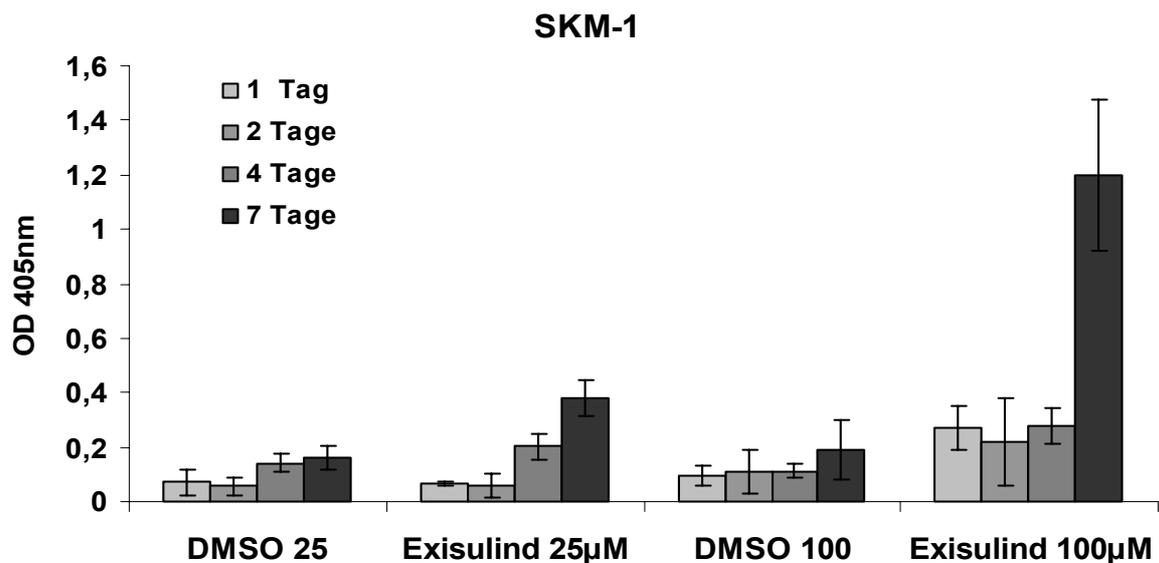


KG-1	DMSO 25		Exisulind 25µM		Exisulind 25µM / DMSO 25
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
1 Tag	0,124	0,056	0,093	0,034	0,750
2 Tage	0,128	0,080	0,128	0,036	1,003
4 Tage	0,306	0,172	0,607	0,130	1,980
7 Tage	0,156	0,085	0,349	0,147	2,240

KG-1	DMSO 100		Exisulind 100µM		Exisulind 100µM / DMSO 100
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
1 Tag	0,107	0,050	0,210	0,117	1,972
2 Tage	0,122	0,016	0,174	0,029	1,427
4 Tage	0,314	0,220	0,869	0,189	2,772
7 Tage	0,213	0,060	0,922	0,150	4,323

Abb. 3.4.1 Apoptose-ELISA der KG-1 Zellen $1,5 \times 10^5$ THP-1 Zellen wurden in 2 ml IMDM-Medium mit 20 % FBS mit den angegebenen Konzentrationen Exisulind oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen für 24 und 48 Stunden, sowie für vier und sieben Tage inkubiert. Zur Messung der Apoptose wurden anschließend, wie unter 2.2.6 beschrieben, die DNA-Fragmente und freigesetzten Histone apoptotischer Zellen bestimmt. Bei den in den Graphen dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten.

SKM-1 Auch bei den SKM-1 Zellen konnte eine Apoptoseinduktion durch Exisulind beobachtet werden. So war in den 25 µM Exisulind-Ansätzen die Apoptose nach vier und sieben Tagen durchschnittlich um den Faktor *1,44* und *2,31* im Vergleich mit den entsprechenden DMSO-25 Kontrollen erhöht. Durch die Inkubation der Zellen mit der höheren Konzentration Exisulind (100 µM) konnte dieser Effekt noch gesteigert werden. Hier wurde zu allen vier Zeitpunkten eine gesteigerte Apoptose-Rate nachgewiesen und zwar durchschnittlich um die Faktoren *2,86*, *2,0*, *2,49* und *6,3* nach ein, zwei, vier und sieben Tagen im Vergleich mit den entsprechenden DMSO Kontrollen (Abb. 3.4.2).

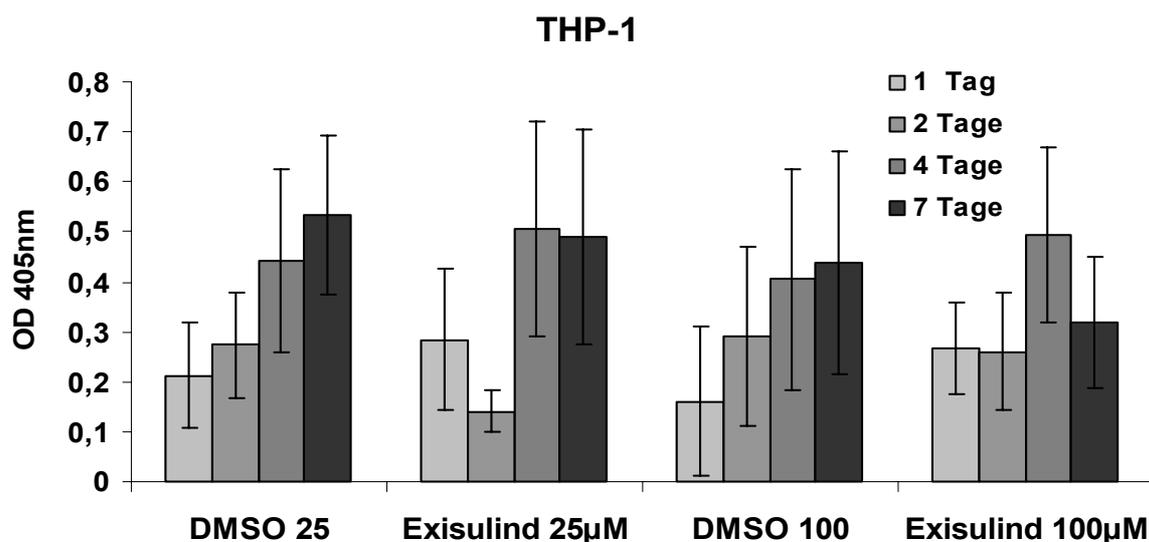


SKM-1	DMSO 25		Exisulind 25µM		Exisulind 25µM / DMSO 25
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
1 Tag	0,070	0,046	0,065	0,011	0,933
2 Tage	0,055	0,036	0,057	0,042	1,036
4 Tage	0,141	0,031	0,203	0,047	1,437
7 Tage	0,164	0,044	0,380	0,068	2,319

SKM-1	DMSO 100		Exisulind 100µM		Exisulind 100µM / DMSO 100
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
1 Tag	0,094	0,037	0,269	0,080	2,862
2 Tage	0,110	0,081	0,219	0,164	1,997
4 Tage	0,112	0,024	0,280	0,065	2,493
7 Tage	0,190	0,107	1,198	0,280	6,307

Abb. 3.4.2 Apoptose-ELISA der SKM-1 Zellen $1,5 \times 10^5$ THP-1 Zellen wurden in 2 ml RPMI 1640-Medium mit 10 % FBS mit den angegebenen Konzentrationen Exisulind oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen für 24 und 48 Stunden, sowie für vier und sieben Tage inkubiert. Zur Messung der Apoptose wurden anschließend, wie unter 2.2.6 beschrieben, die DNA-Fragmente und freigesetzten Histone apoptotischer Zellen bestimmt. Bei den in den Graphen dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten.

THP-1 Bei den THP-1 Zellen konnten weder mit 25 µM noch mit 100 µM Exisulind ein Effekt auf die Apoptose-Rate nachgewiesen werden. In beiden Konzentrationen oszillierten die Werte zu den vier untersuchten Zeitpunkten bei vergleichsweise hohen Standardabweichungen um den Faktor 1 (Abb. 3.4.3).



THP-1	DMSO 25		Exisulind 25µM		Exisulind 25µM / DMSO 25
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
1 Tag	0,211	0,106	0,284	0,140	1,344
2 Tage	0,273	0,107	0,141	0,041	0,516
4 Tage	0,443	0,183	0,504	0,215	1,139
7 Tage	0,535	0,160	0,490	0,217	0,916

THP-1	DMSO 100		Exisulind 100µM		Exisulind 100µM / DMSO 100
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
1 Tag	0,161	0,149	0,268	0,092	1,668
2 Tage	0,289	0,178	0,259	0,117	0,896
4 Tage	0,404	0,220	0,493	0,174	1,220
7 Tage	0,439	0,223	0,318	0,132	0,724

Abb. 3.4.3 Apoptose-ELISA der THP-1 Zellen $1,5 \times 10^5$ THP-1 Zellen wurden in 2 ml RPMI 1640-Medium mit 10 % FBS und 0.05 mM 2-Mercaptoethanol mit den angegebenen Konzentrationen Exisulind oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen für 24 und 48 Stunden, sowie für vier und sieben Tage inkubiert. Zur Messung der Apoptose wurden anschließend, wie unter 2.2.6 beschrieben, die DNA-Fragmente und freigesetzten Histone apoptotischer Zellen bestimmt. Bei den in den Graphen dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten.

3.4.2 Der Effekt von 400 µM und 600 µM Exisulind auf die Apoptose von KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen

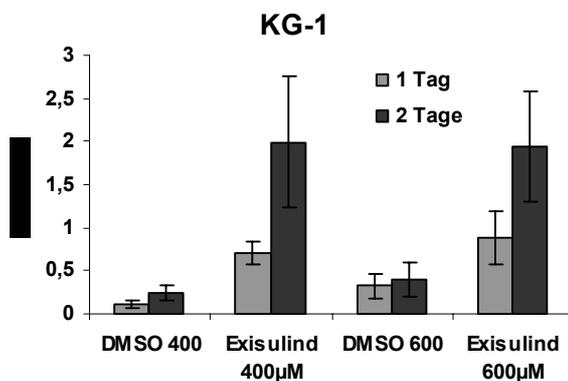
Die Arbeiten von Ray et al. (1995) und van Stolk et al. (2000) hatten beschrieben, dass bei oraler Gabe von Exisulind im menschlichen Organismus eine Plasmakonzentration von 100 µM nicht überschritten wird. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit lediglich die Wirkung der pharmakologisch erreichbaren Exisulind-Konzentrationen 25 µM und 100 µM genauer untersucht. Allerdings gab es in den letzten Jahren viele präklinische Arbeiten, in denen Exisulind-Konzentrationen

zwischen 100 μM und 1.000 μM auf ihre pro-apoptotische Wirkung in malignen Zellen hin untersucht worden waren (Lim et al., 1999; Whitehead et al., 2003; Deguchi et al., 2004). Um zu erfassen, wie sich die Apoptose-Induktion mit steigenden Exisulind-Konzentrationen in den hier untersuchten Leukämie-Zelllinien verhält, wurden im Folgenden die Effekte von 400 μM und 600 μM Exisulind auf die Apoptose der KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen analysiert.

Die KG-1 Zellen zeigten eine Exisulind-vermittelte Apoptose-Induktion nach ein und zwei Tagen um den Faktor 2,42 beziehungsweise 8,44 bei 400 μM sowie um den Faktor 2,11 beziehungsweise 3,34 bei 600 μM (Abb.: 3.4.4). Bei den SKM-1 Zellen stieg die Apoptose-Rate nach den gleichen Inkubationszeiten um den Faktor 2,13 beziehungsweise 6,05 bei 400 μM und um den Faktor 9,21 beziehungsweise 9,95 bei 600 μM Exisulind (Abb.: 3.4.4). Entgegen den Beobachtungen unter 3.4.1, wo die de-novo AML Zelllinie THP-1 auf die physiologisch erreichbaren Exisulind-Konzentrationen 25 μM und 100 μM keine Apoptose-Induktion gezeigt hatte, waren bei der Inkubation mit 400 μM und 600 μM Exisulind sehr ausgeprägte Anstiege der Apoptose-Raten zu messen. Hier wurden nach einem und zwei Tagen die Apoptose um den Faktor 5,36 beziehungsweise 9,54 bei 400 μM und um den Faktor 8,40 beziehungsweise 10,14 bei 600 μM induziert (Abb.: 3.4.4).

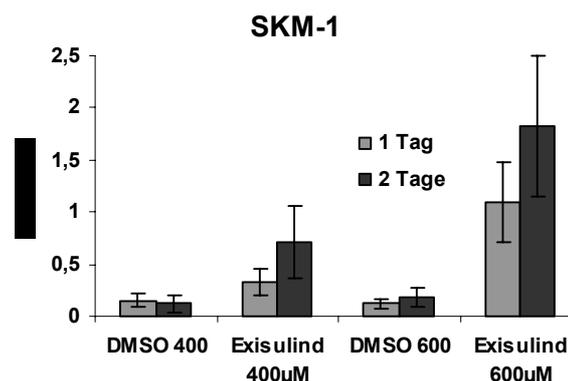
KG-1	DMSO 400		Exisulind 400 μM		Exi. 400 μM / DMSO 400
	Mittelwert	STABW	Mittelwert	STABW	
1 Tag	0,109	0,053	0,711	0,128	2,42
2 Tage	0,246	0,09	1,989	0,76	8,44

KG-1	DMSO 600		Exisulind 600 μM		Exi. 600 μM / DMSO 600
	Mittelwert	STABW	Mittelwert	STABW	
1 Tag	0,32	0,148	0,881	0,312	2,11
2 Tage	0,4	0,192	1,944	0,642	3,34



SKM-1	DMSO 400		Exisulind 400 μM		Exi. 400 μM / DMSO 400
	Mittelwert	STABW	Mittelwert	STABW	
1 Tag	0,15	0,061	0,32	0,128	2,13
2 Tage	0,119	0,088	0,72	0,346	6,05

SKM-1	DMSO 600		Exisulind 600 μM		Exi. 600 μM / DMSO 600
	Mittelwert	STABW	Mittelwert	STABW	
1 Tag	0,119	0,048	1,096	0,382	9,21
2 Tage	0,184	0,089	1,831	0,674	9,95



THP-1	DMSO 400		Exisulind 400µM		Exi. 400µM/ DMSO 400
	Mittelwert	STABW	Mittelwert	STABW	
1 Tag	0,275	0,153	1,475	0,556	5,36
2 Tage	0,24	0,129	2,289	1,06	9,54

THP-1	DMSO 600		Exisulind 600µM		Exi. 600µM/ DMSO 400
	Mittelwert	STABW	Mittelwert	STABW	
1 Tag	0,213	0,148	1,789	0,782	8,40
2 Tage	0,276	0,182	2,799	0,742	10,14

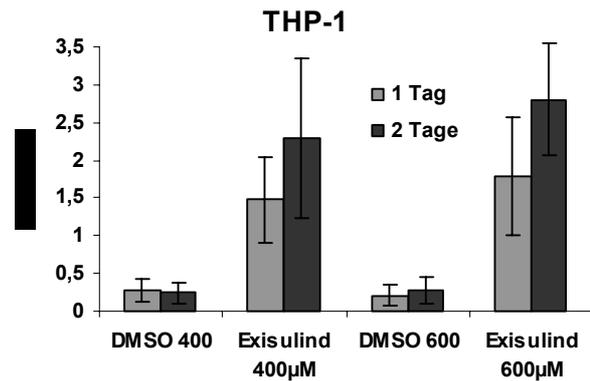


Abb. 3.4 .4 Apoptose-ELISA der KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen $1,5 \times 10^5$ Zellen wurden in ihren spezifischen Wachstumsmedien mit 400 µM und 600 µM Exisulind oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen für 24 und 48 Stunden inkubiert. Zur Messung der Apoptose wurden anschließend, wie unter 2.2.6 beschrieben, die DNA-Fragmente und freigesetzten Histone apoptotischer Zellen bestimmt. Bei den in den Graphen dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten.

3.5 Der Effekt von Exisulind auf den Zellzyklus von KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen

Im Vorangegangenen konnte nachgewiesen werden, dass Exisulind einen Effekt auf die Proliferations- und Apoptoseaktivität der sAML/MDS Zelllinien KG-1 und SKM-1 hat. Als eine weitere Erklärung für diesen Effekt kam neben Nekrose und Apoptose auch eine Veränderung im Zellzyklus in Frage. Um zu prüfen, ob mit der Exisulind-Behandlung auch eine veränderte prozentuale Verteilung der Zellen auf die unterschiedlichen Zellzyklusphasen einhergeht, wurden durchflußzytometrische Zellzyklusuntersuchungen (wie unter 2.2.9 beschrieben) durchgeführt. Dazu wurden KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen für vier und sieben Tage mit 25 µM und 100 µM Exisulind oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen inkubiert und anschließend durchflußzytometrisch nach ihrem DNA-Gehalt sortiert und analysiert.

KG-1 Die KG-1 Zellen zeigten weder nach vier noch nach sieben Tagen eine Veränderung im Zellzyklus. Dies galt sowohl für die Inkubation mit 25 µM als auch mit 100 µM Exisulind verglichen mit den jeweiligen DMSO-Kontrollen. In den mit

Exisulind behandelten Ansätzen zeigten sich in beiden Konzentrationsstufen und zu beiden gewählten Zeitpunkten eine etwa gleiche Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen G1, S und G2 verglichen mit den jeweiligen DMSO-Kontrollen (Abb. 3.5.1).

KG-1

Verteilung der Zellen auf Zellzyklusphasen nach vier Tagen

<i>in Prozent (%)</i>	G1-Phase	S-Phase	G2-Phase
DMSO	44.805	24.555	30.6
Exisulind 25µM	44.72	26.155	29.13
Exisulind 100µM	47.77	22.235	29.995

Verteilung der Zellen auf Zellzyklusphasen nach sieben Tagen

<i>in Prozent (%)</i>	G1-Phase	S-Phase	G2-Phase
DMSO	46.515	20.825	32.66
Exisulind 25µM	49.485	14.465	36.05
Exisulind 100µM	48.125	17.5	34.375

Abb. 3.5.1 FACS Zellzyklus-Analyse der KG-1 Zellen 1,5 x 10⁵ KG-1 Zellen wurden in 2 ml IMDM-Medium mit 20 % FBS mit den angegebenen Konzentrationen Exisulind oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen für vier und sieben Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durchflußzytometrisch nach ihrem DNA-Gehalt sortiert und analysiert. Bei den in der Tabelle dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten.

SKM-1 Bei den SKM-1 Zellen konnte ebenfalls nicht gezeigt werden, dass es durch die Inkubation mit Exisulind zu einer veränderten prozentualen Verteilung der Zellen auf die unterschiedlichen Zellzyklusphasen G-1, S und G2 kommt. Weder nach vier noch nach sieben Tagen, unabhängig ob mit 25 µM oder mit 100 µM Exisulind inkubiert, zeigte sich ein Effekt verglichen mit den jeweiligen Kontrollen. (Abb. 3.5.2).

SKM-1

Verteilung der Zellen auf Zellzyklusphasen nach vier Tagen

<i>in Prozent (%)</i>	G1-Phase	S-Phase	G2-Phase
DMSO	44.515	4.93	50.555
Exisulind 25µM	44.82	4.44	50.74
Exisulind 100µM	46.155	9.5	44.345

Verteilung der Zellen auf Zellzyklusphasen nach sieben Tagen

<i>in Prozent (%)</i>	G1-Phase	S-Phase	G2-Phase
DMSO	53.575	9.52	36.905
Exisulind 25µM	48.535	11.355	40.105
Exisulind 100µM	57.355	12.18	30.47

Abb. 3.5.2 FACS Zellzyklus-Analyse der SKM-1 Zellen $1,5 \times 10^5$ THP-1 Zellen wurden in 2 ml RPMI 1640-Medium mit 15 % FBS mit den angegebenen Konzentrationen Exisulind oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen für vier und sieben Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durchflußzytometrisch nach ihrem DNA-Gehalt sortiert und analysiert. Bei den in der Tabelle dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten.

THP-1 Wie auch bei den KG-1 und SKM-1 Zellen änderte sich die Verteilung der THP-1 Zellen auf die unterschiedlichen Zellzyklusphasen durch die Inkubation mit Exisulind nicht. In den mit Exisulind behandelten Ansätzen zeigten sich in beiden Konzentrationsstufen und zu beiden gewählten Zeitpunkten eine etwa gleiche Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen G1, S und G2 verglichen mit den jeweiligen DMSO-Kontrollen (Abb. 3.5.3).

THP-1

Verteilung der Zellen auf Zellzyklusphasen nach vier Tagen

<i>in Prozent (%)</i>	G1-Phase	S-Phase	G2-Phase
DMSO	47.03	11.29	41.68
Exisulind 25µM	45.68	12.295	42.025
Exisulind 100µM	46.88	10.495	42.625

Verteilung der Zellen auf Zellzyklusphasen nach sieben Tagen

<i>in Prozent (%)</i>	G1-Phase	S-Phase	G2-Phase
DMSO	48.705	22.315	28.98
Exisulind 25µM	40.51	26.05	33.44
Exisulind 100µM	48.94	17.85	33.205

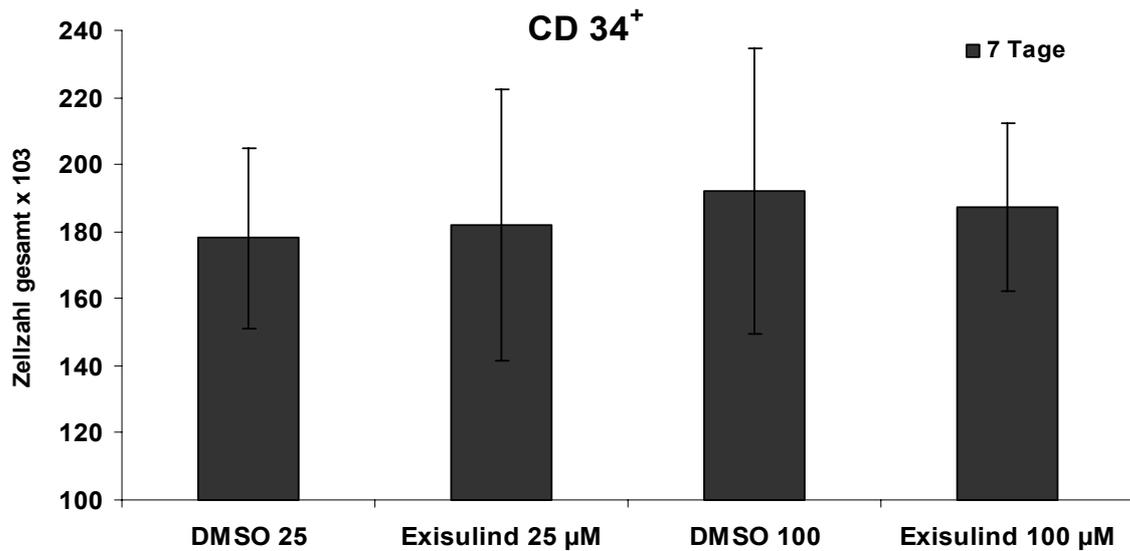
Abb. 3.5.3 FACS Zellzyklus-Analyse der THP-1 Zellen $1,5 \times 10^5$ THP-1 Zellen wurden in 2 ml RPMI 1640-Medium mit 10 % FBS und 0.05 mM 2-mercaptoethanol mit den angegebenen Konzentrationen Exisulind oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen für 24 und 48 Stunden, sowie für vier und sieben Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durchflußzytometrisch nach ihrem DNA-Gehalt sortiert und analysiert. Bei den in der Tabelle dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten.

3.6 Der Effekt von Exisulind auf Zellzahl, Proliferation, Apoptose und Zellzyklus von gesunden CD34+ Zellen

Um den Einfluss von Exisulind auf gesunde hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen zu untersuchen, wurden die oben beschriebenen Assays auch mit CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen (HSZ) des peripheren Blutes gesunder Spender durchgeführt. Die Gewinnung des peripheren Blutes erfolgt bei freiwilligen Probanden, die über das Wesen der Studie, die weitere Verwendung des gewonnenen Materials zu wissenschaftlichen Zwecken und die möglichen, wenn auch geringen Risiken einer peripheren Blutentnahme aufgeklärt wurden. Die Probanden hatten hierzu ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Anschließend waren ihnen etwa 50 ml EDTA-Blut abgenommen worden. CD34+ hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen waren dann, wie unter 2.2.2 beschrieben, über

Dichtegradientenzentrifugation und magnetische Säulenchromatographie isoliert und anschließend durchflußzytometrisch hinsichtlich der Reinheit (2.2.3) überprüft worden. Insgesamt wurden für die folgenden Experimente die CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen von acht gesunden Spendern eingesetzt. Der Anteil von CD34+ Stamm- und Progenitorzellen in der FACS-Durchflußzytometrie lag bei allen acht Separationen bei über 90 % (Mittelwert 92,7%, Standardabweichung 2,25). Bei den dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Häματοzytometrische Analyse: In den sAML/MDS Zelllinien KG-1 und SKM-1 konnte bereits gezeigt werden, dass Exisulind mit zunehmender Inkubationsdauer die Anzahl der Zellen reduziert. Von den untersuchten Inkubationszeiten war dieser zytoreduktive Effekt des Exisulindes nach sieben Tagen am stärksten. Um den Effekt des Exisulindes auf die Anzahl der CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender zu analysieren, wurden die Ansätze nur für sieben Tage inkubiert. Danach zeigte die häματοzytometrische Analyse keine deutlichen Unterschiede der Zellzahlen in den Ansätzen mit 25 µM und 100 µM Exisulind verglichen mit ihren entsprechenden Kontrollen (Abb. 3.6.1). In den Ansätzen mit 25 µM Exisulind wurden nach einer Woche durchschnittlich $1,78 \times 10^5$ Zellen/ml (Standardabweichung $2,7 \times 10^4$) und in den entsprechenden Kontrollen $1,82 \times 10^5$ Zellen/ml (Standardabweichung $4,05 \times 10^4$) gezählt. Der Exisulind-bedingt Änderungsfaktor betrug 1,022 und war damit nicht signifikant. In der höheren Konzentration mit 100 µM Exisulind wurden nach sieben Tagen durchschnittlich $1,92 \times 10^5$ Zellen/ml (Standardabweichung $4,28 \times 10^4$) gegenüber $1,87 \times 10^5$ Zellen/ml (Standardabweichung $2,5 \times 10^4$) in den entsprechenden Kontrollen gezählt. Der Exisulind-vermittelte Änderungsfaktor betrug hier 0,976 und war damit nicht signifikant. Da Exisulind nach sieben Tagen keinen ausgeprägten zytoreduktiven Effekt auf CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender gezeigt hatte, wurden kürzere Inkubationszeiten nicht untersucht.



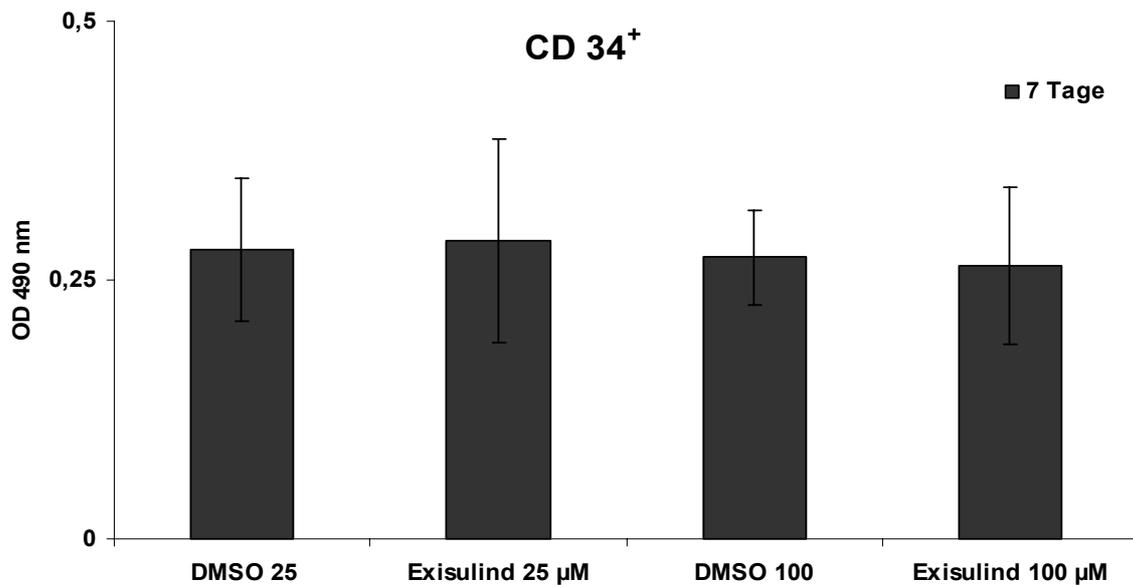
CD 34+	DMSO 25		Exisulind 25µM		Exisulind 25µM / DMSO 25
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
7 Tage	178.000	26.981	182.000	40.472	1,022

CD 34+	DMSO 100		Exisulind 100µM		Exisulind 100µM / DMSO 100
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
7 Tage	192.000	42.755	187.333	24.998	0,976

Abb. 3.6.1 **Hämatozytometrische Analyse gesunder CD34+ HSZ** 2×10^5 CD34+ Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender wurden in 2 ml SFEM-Medium mit 20 µl CC 100 mit den angegebenen Konzentrationen Exisulind oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen für sieben Tage inkubiert. Anschließend wurden mit der Neubauer-Zählkammer die Zellkonzentrationen pro ml Medium ermittelt. Bei den in den Graphen dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Proliferation-Assays: Wie in den vorausgegangenen hämatozytometrischen Analysen schon gezeigt wurde, scheint Exisulind keinen zytoreduktiven Effekt auf gesunde CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender zu haben. Diese Beobachtung konnte durch die Proliferations-Assays im Folgenden bestätigt werden. Hier zeigten die Ansätze mit 25 µM Exisulind nach sieben Tagen im Mittel eine Extinktion von $2,79 \times 10^{-1}$ bei 490 nm (Standardabweichung $6,9 \times 10^{-2}$), gegenüber einer mittleren Extinktion von $2,88 \times 10^{-1}$ bei 490 nm (Standardabweichung $9,9 \times 10^{-2}$) in den entsprechenden Kontrollen. Der durch 25 µM Exisulind bedingte Änderungsfaktor betrug damit 1,033 und war nicht signifikant. In den Ansätzen mit 100 µM betrug die mittlere Extinktion bei 490 nm nach sieben Tagen $2,72 \times 10^{-1}$ (Standardabweichung $4,6 \times 10^{-2}$) und $2,63 \times 10^{-1}$ (Standardabweichung $7,6 \times 10^{-2}$) in den entsprechenden Kontrollen. Der 100 µM Exisulind bedingte Änderungsfaktor betrug 0,968 und war damit nicht signifikant.

Somit konnte mit den Proliferations-Assays für die untersuchten Inkubationszeiten gezeigt werden, dass Exisulind keinen proliferationshemmenden Effekt auf CD34+ hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender hat.



CD 34+	DMSO 25		Exisulind 25µM		Exisulind 25µM / DMSO 25
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
7 Tage	0,279	0,069	0,288	0,099	1,033

CD 34+	DMSO 100		Exisulind 100µM		Exisulind 100µM / DMSO 100
	Mittelwerte	STABW	Mittelwerte	STABW	
7 Tage	0,272	0,046	0,263	0,076	0,968

Abb. 3.6.2 Proliferations-Assays von gesunden CD34+ HSZ 2×10^5 CD34+ Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender wurden in 2 ml SFEM-Medium mit 20 µl CC100 mit den angegebenen Konzentrationen Exisulind oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen für sieben Tage inkubiert. Anschließend wurden mit den Proliferations-Assays die Extinktion bei 490 nm photometrisch gemessen. Bei den in den Graphen dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Apoptose-ELISA: Um zu untersuchen, ob Exisulind einen pro-apoptotischen Effekt auf gesunde CD34+ hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen hat, wurden Apoptose-ELISA durchgeführt. Hier zeigten die Ansätze mit 25 µM Exisulind nach sieben Tagen im Mittel eine Extinktion von $7,62 \times 10^{-1}$ bei 405 nm (Standardabweichung $1,73 \times 10^{-1}$), gegenüber einer mittleren Extinktion von $6,71 \times 10^{-1}$

10^{-1} bei 405 nm (Standardabweichung $1,96 \times 10^{-1}$) in den entsprechenden Kontrollen. Der durch 25 μM Exisulind bedingte Änderungsfaktor betrug $0,881$ und war damit nicht signifikant. In den Ansätzen mit 100 μM betrug die mittlere Extinktion bei 405 nm nach sieben Tagen $4,93 \times 10^{-1}$ (Standardabweichung $1,87 \times 10^{-1}$) und $5,17 \times 10^{-1}$ (Standardabweichung SD $2,21 \times 10^{-1}$) in den entsprechenden Kontrollen. Der 100 μM Exisulind-bedingte Änderungsfaktor betrug $1,047$ und war damit ebenfalls nicht signifikant. Exisulind hat demnach für die untersuchte Inkubationsdauer und in den verwendeten Konzentrationen keinen pro-apoptotischen Effekt auf CD34+ hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender (Abb.3.6.3).

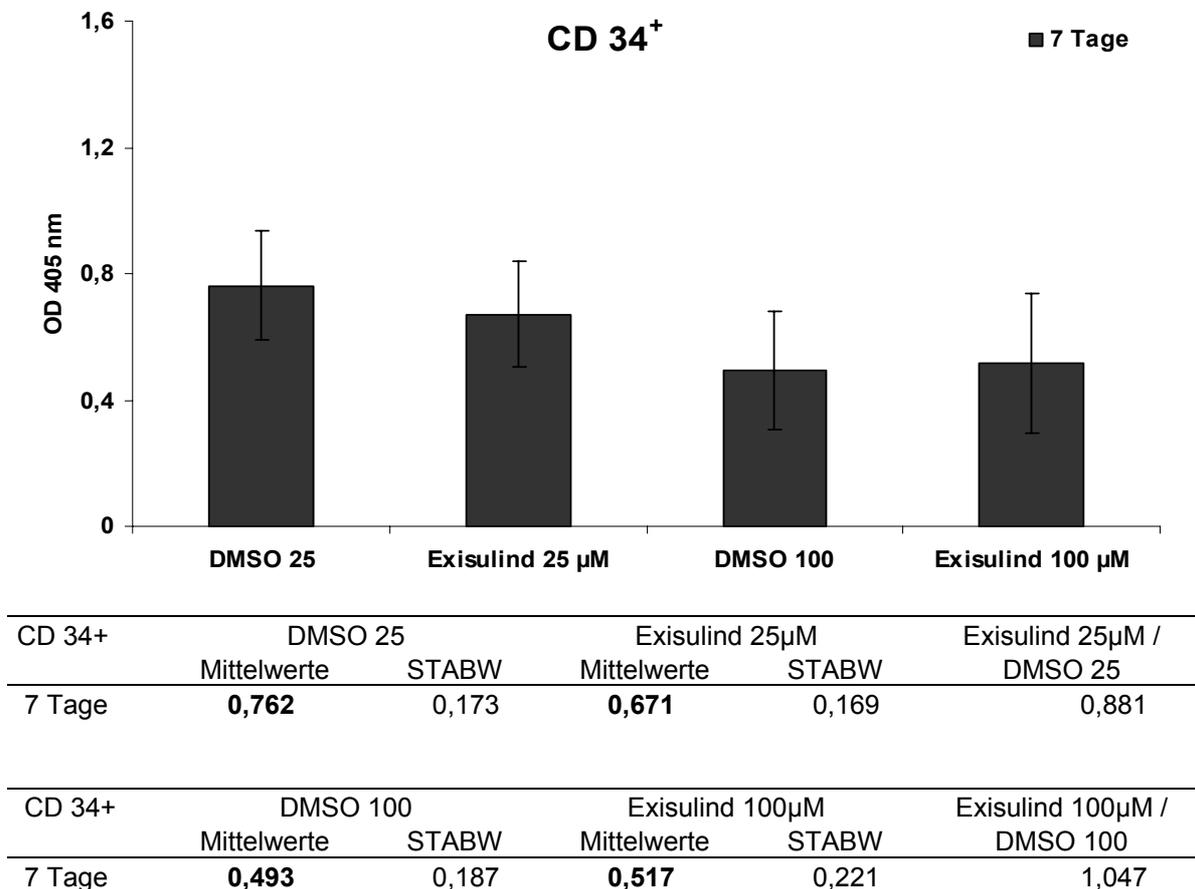


Abb. 3.6.3 Apoptose-ELISA von gesunden CD34+ HSZ 2×10^5 CD34+ Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender wurden in 2 ml SFEM-Medium mit 20 μl CC100 mit den angegebenen Konzentrationen Exisulind oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen für sieben Tage inkubiert. Anschließend wurden nach Apoptose-ELISA die Extinktion bei 405 nm photometrisch gemessen. Bei den in den Graphen dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten.

3.7 Der Effekt von Exisulind auf die c-Jun NH₂-terminale Kinase (JNK) Aktivität der Zelllinien KG-1, SKM-1 und THP-1

Mit dieser Methode wurde die Frage untersucht, ob die Apoptose-Induktion des Exisulindes, die bei den sAML/MDS Zelllinien KG-1 und SKM-1 beobachtet werden konnte, über eine Aktivierung der c-Jun NH₂-terminalen Kinase (JNK) vermittelt wurde. Dazu wurden KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen mit 25 μ M und 100 μ M Exisulind inkubiert. Anschließend wurde mittels SAPK/JNK Assay und Western Blotting die Aktivität der JNK dargestellt. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Exisulind-bedingter Anstieg der JNK-Aktivität in den Ansätzen KG-1 25 μ M und 100 μ M Exisulind, sowie SKM-1 100 μ M Exisulind. Im Gegensatz dazu zeigten die Exisulind-behandelten THP-1 Zellen keinen Anstieg der JNK-Aktivität.

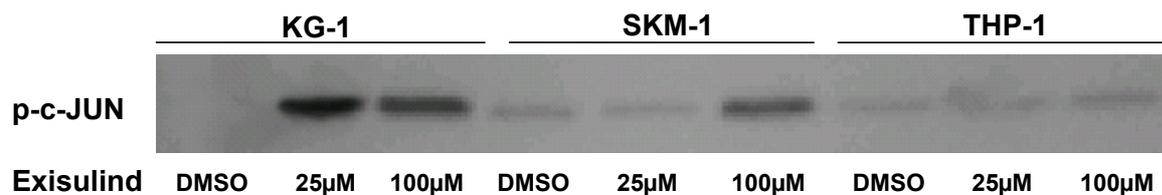


Abb. 3.7.1 JNK-Aktivität Jeweils 2×10^5 KG-1, SKM-1 und THP-1 Zellen wurden in 2 ml ihres spezifischen Wachstumsmediums mit den angegebenen Konzentrationen Exisulind oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen für sieben Tage inkubiert. Anschließend wurde mittels SAPK/JNK Assay und Western Blotting die Aktivität der JNK dargestellt.

3.8 Hemmbarkeit der Exisulind-vermittelten Apoptoseinduktion durch Zugabe eines JNK-Inhibitor

In 3.7 war gezeigt worden, dass in den sAML/MDS Zelllinien KG-1 und SKM-1 durch Inkubation mit Exisulind die Aktivität der JNK induziert worden war. Im Anschluss daran wurde untersucht, ob die Exisulind-vermittelte Apoptose in diesen beiden Zelllinien durch die Zugabe des JNK-Inhibitors JNKII SP600125 abgeschwächt werden könne. Zusätzlich zu den bisherigen Ansätzen der Apoptose-Assays wurden den Wachstumsmedien hier 100 nM des JNK-Inhibitors JNKII SP600125 zugegeben. Wie schon in 3.4 gezeigt worden war, stieg auch hier die Apoptose durch die siebentägige Inkubation mit Exisulind deutlich an, und zwar um die Faktoren 1,8 und

3 in den Ansätzen KG-1 25 μM und 100 μM Exisulind verglichen mit den jeweiligen DMSO-Kontrollen, sowie um die Faktoren 1,8 und 6 in den Ansätzen SKM-1 25 μM und 100 μM Exisulind verglichen mit den jeweiligen DMSO-Kontrollen. Durch den Zusatz des JNK-Inhibitors konnte diese Apoptose-Induktion deutlich abgeschwächt werden. Bei den KG-1 Zellen wurde die Apoptose auf 62 % beziehungsweise 52 % des Ausgangswertes der Ansätze 25 μM und 100 μM Exisulind reduziert. Bei den SKM-1 Zellen wurde die Apoptose auf 66 % beziehungsweise 44 % des Induktionsniveaus der Ansätze 25 μM und 100 μM Exisulind reduziert (Abb. 3.8.1).

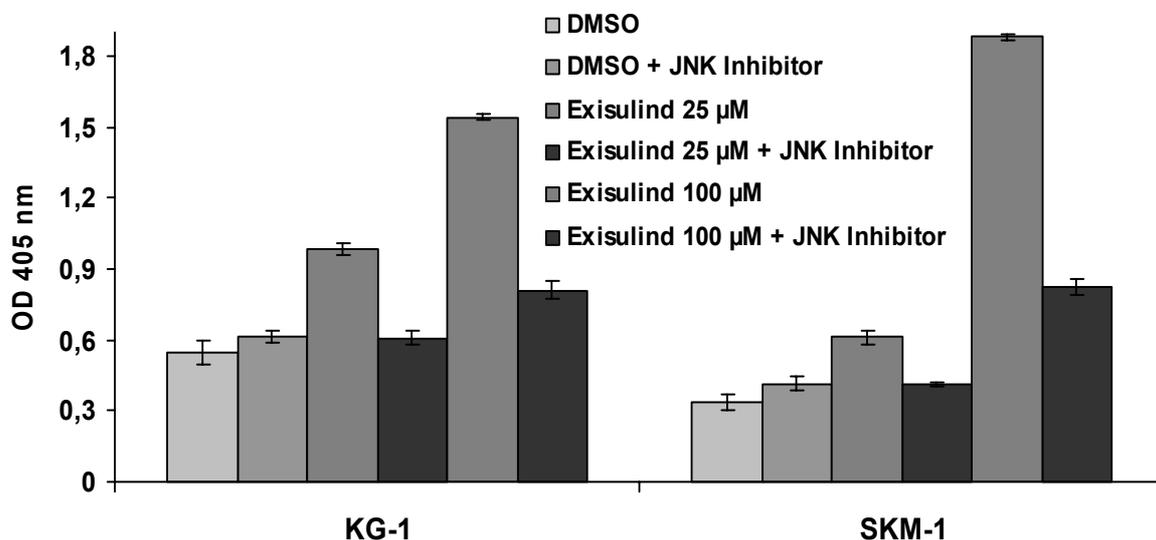


Abb. 3.8.1 Apoptose-ELISA mit Zugabe eines JNK-Inhibitors Jeweils 2×10^5 KG-1 und SKM-1 Zellen wurden in 2 ml ihres spezifischen Wachstumsmediums mit den angegebenen Konzentrationen Exisulind oder den entsprechenden DMSO-Kontrollen, sowie mit oder ohne Zugabe von 100 nM eines JNK-Inhibitors für sieben Tage inkubiert. Anschließend wurde mittels Apoptose-ELISA die Apoptose-Rate photometrisch gemessen. Bei den in den Graphen dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem Dreifach-Ansatz.

3.9 Der Effekt von Exisulind auf die GADD45 α , - β und - γ mRNA-Expression von KG-1 und SKM-1 Zellen

Es ist bekannt, dass die Familie der sogenannten „*stress inducible growth arrest and DNA damage 45*“ Gene (GADD45) die JNK aktivieren und so Apoptose induzieren kann. Aus diesem Grund wurde hier untersucht, ob die GADD45 Gen-Familie in die Exisulind-vermittelte Apoptose-Induktion via JNK-Aktivierung involviert ist. Dazu

wurden aus den Ansätzen KG-1 und SKM-1 nach 24 Stunden Inkubation mit 100 μ M Exisulind oder DMSO 100 mittels quantitativer RT-PCR die mRNA-Expressionsniveaus von GADD45 α , β und γ bestimmt. Es konnte mittels der RT-PCR keine Exisulind-induzierte Änderung der Transkriptionsniveaus von GADD45 α , β oder γ detektiert werden. Dies galt sowohl für die KG-1 Zellen als auch für die SKM-1 Zellen. (Abb. 3.9.1).

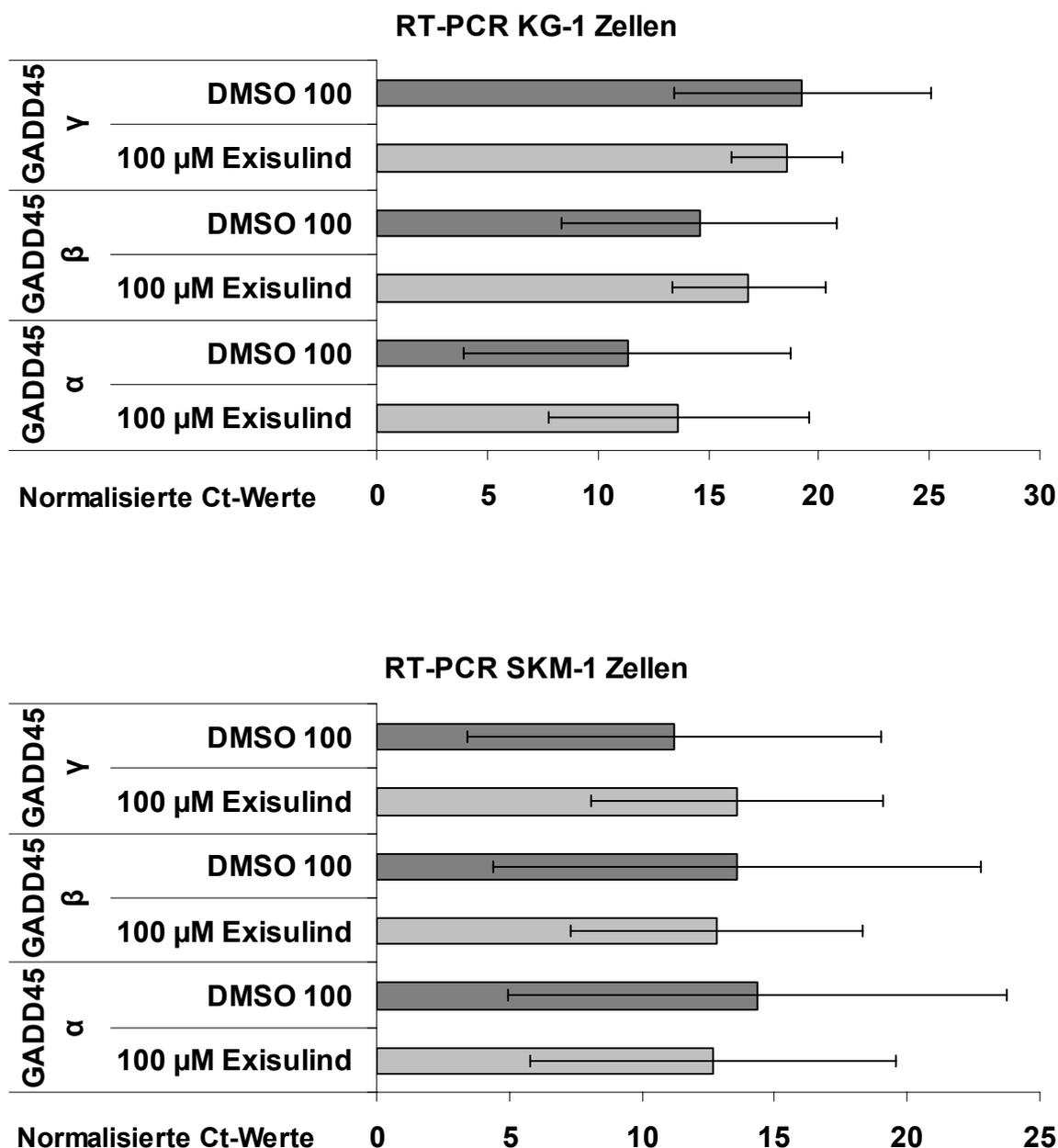


Abb. 3.9.1 RT-PCR von GADD45 α , GADD45 β und GADD45 γ in KG-1 und SKM-1 Zellen Dazu wurden aus den Ansätzen KG-1 und SKM-1 nach 24 Stunden Inkubation mit 100 μ M Exisulind oder DMSO 100 mittels quantitativer RT-PCR die mRNA-Expressionsniveaus von GADD45 α , β und γ bestimmt. Bei den in den Graphen dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte der gegen GAPDH normalisierten Ct-Werte und Standardabweichungen aus Dreifach-Ansätzen.

4. Diskussion

Exisulind induziert Apoptose in zwei unterschiedlichen sekundären akuten myeloischen Leukämiezelllinien. Diese Zelllinien, KG-1 und SKM-1, sind aus klonalen Blasten von Patienten mit akuten myeloischen Leukämien nach myelodysplastischen Syndromen hervorgegangen (sAML/MDS) (Koeffler et al., 1978; Nakagawa et al., 1991). Die Prognose der Patienten mit *higher risk* MDS und sAML/MDS ist mit einer medianen Lebenserwartung von sieben bis 14 Monaten ausgesprochen schlecht (Fukumoto et al., 2005). Es fehlen bis dato gut verträgliche Therapieoptionen, die angesichts des medianen Erkrankungsalters von etwa 70 Jahren und des zumeist reduzierten Allgemeinzustandes der Patienten (Catenacci et al., 2005) befriedigende klinische Erfolge erzielen (Fenaux et al., 2005). Exisulind stellt einen Hauptmetaboliten des nicht-steroidalen Antirheumatikums Sulindac Sulfoxid (Clinoril, Merck, NJ, USA) dar. Seine gute Verträglichkeit bei oraler Gabe wurde in unterschiedlichen klinischen Studien wiederholt nachgewiesen (van Stolk et al., 2000; Witta et al., 2004). Exisulind inhibiert die Cyclooxygenasen (COX) nicht (Piazza et al., 1997 und 2001 und Lim et al., 1999) und könnte deshalb auch bei *higher risk* MDS- und sAML/MDS-Patienten mit erhöhtem Blutungsrisiko aufgrund niedriger Thrombozytenzahlen eingesetzt werden. Um zu untersuchen, ob Exisulind ein therapeutisches Potential in der Behandlung von *higher risk* MDS und sAML/MDS besitzt, wurden in der vorliegenden Arbeit seine Wirkungen auf verschiedene akute myeloische Leukämiezelllinien und gesunde hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen untersucht.

Die Inkubation der sAML/MDS Zelllinien KG-1 und SKM-1 mit 100 μ M Exisulind für die Dauer von elf Tagen reduzierte die Ausbildung von Zellkolonien signifikant. Dies konnte in dreifach-Ansätzen von Methylzellulose-basierten CFU-Assays photomikrographisch dokumentiert werden (Abb.: 3.1.1, 3.1.2). Passend dazu war auch die Anzahl der KG-1 Zellen in der hämatozytometrischen Analyse durch die Inkubation mit 100 μ M Exisulind nach sieben Tagen um 86,2 % reduziert (Abb.: 3.2.1). Die SKM-1 Zellen zeigten bei gleichen Untersuchungsbedingungen eine Exisulind-bedingte Reduktion der Zellzahlen um 46,3 % (Abb.: 3.2.2). Kürzere Inkubationszeiten und die Verwendung von 25 μ M Exisulind zeigten bei KG-1 und

SKM-1 Zellen ebenfalls Exisulind-bedingte Reduktionen der Zellzahlen, waren aber weniger ausgeprägt (Abb.: 3.2.1 und 2). Exisulind hat also einen zytoreduktiven Effekt auf die sAML/MDS Zelllinien KG-1 und SKM-1, welcher mit der Exisulind-Konzentration und -Inkubationsdauer korreliert. Des Weiteren konnte in dreifach-Ansätzen Tetrazolium-basierter Proliferations-Assays gezeigt werden, dass die proliferative Aktivität der sAML/MDS Zelllinien KG-1 und SKM-1 durch Inkubation mit 100 μ M Exisulind nach sieben Tagen um 87,9 % beziehungsweise 57,4 % reduziert wurde (Abb.: 3.3.1 und 2). Kürzere Inkubationszeiten und die Verwendung von 25 μ M Exisulind führten auch in den Proliferations-Assays zu einer Hemmung, waren aber weniger ausgeprägt (Abb.: 3.3.1 und 2). Der proliferationshemmende Effekt des Exisulindes ist somit ebenfalls positiv korreliert mit der Exisulind-Konzentration und der Inkubationsdauer. Die Ergebnisse der Methylzellulose-basierten CFU-Assays wurden mittels konkordanter hämatozytometrischer Analysen und Proliferationsassays verifiziert und quantifiziert. Eine toxisitätsvermittelte Zellnekrose als Ursache dieser Effekte konnte ausgeschlossen werden, da die Exisulind-behandelten Zellen zu keinem Zeitpunkt in den lichtmikroskopischen Untersuchungen Nekrosezeichen gezeigt hatten.

Um zu unterscheiden, ob diese Exisulind-vermittelten zytoreduktiven und anti-proliferativen Effekte auf einer Apoptose-Induktion oder einem Zellzyklus-Arrest beruhen, wurden zunächst Fluoreszenz-durchflußzytometrische Zellzyklus-Analysen durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass durch die Inkubation der KG-1 und SKM-1 Zellen mit Exisulind keine Veränderungen im Zellzyklus auftreten (Abb.: 3.5.1 und 2). Dass Exisulind keinen Einfluß auf den Zellzyklus hat, wurde übereinstimmend von Moon et al. (2002) in chronischen lymphatischen Leukämie-Zelllinien beschrieben. Diese Ergebnisse ließen die Vermutung zu, dass die zytoreduktiven und anti-proliferativen Effekte des Exisulindes in den beiden sAML/MDS Zelllinien KG-1 und SKM-1 auf eine Apoptose-Induktion zurückgehen. Tatsächlich konnten in den ELISA Apoptose-Untersuchungen der KG-1 und SKM-1 Zellen durch die Inkubation mit 100 μ M Exisulind nach sieben Tagen Anstiege der Apoptose-Raten um das 4,3-fache beziehungsweise 6,3-fache detektiert werden (Abb.: 3.4.1 und 2). Auch eine geringere Exisulind-Dosis (25 μ M) und kürzere Inkubationszeiten induzierten Apoptose, wenn auch weniger ausgeprägt (Abb.: 3.4.1 und 2). Die beobachteten zytoreduktiven und antiproliferativen Effekte des Exisulindes gehen also auf eine Apoptose-Induktion zurück. Da es sich bei dem ELISA Apoptose-Assay

um einen quantitativen, sogenannten *sandwich-enzyme-immunoassay* mit klonalen Antikörpern gegen DNA-Fragmente und Histone handelt, detektiert dieser Test spezifisch Apoptose und keine Nekrose. Die hier gewonnenen Ergebnisse bestätigen somit die lichtmikroskopischen Beobachtungen, dass Exisulind keine Toxizitätsvermittelte nekrotische Wirkung auf die sAML/MDS Zelllinien KG-1 und SKM-1 ausübt. Die Apoptose-induzierende Wirkung des Exisulindes auf neoplastische Zellen wurde bereits bei unterschiedlichen Tumorentitäten im Rahmen von präklinischen und klinischen Untersuchungen beschrieben. In präklinischen Arbeiten induzierte Exisulind Apoptose in kolorektalen Karzinomen (Deguchi et al., 2005; Zhu et al., 2005), Prostatakarzinomen (Narayanan et al. 2004), Ösophaguskarzinomen (Joe et al., 2003), Bronchialkarzinomen (Whitehead et al., 2003), hepatozellulären Karzinomen (Liu et al., 2002), malignen Melanomen (Vogt et al., 2001), Harnblasenkarzinomen (Piazza et al., 2001), malignen peripheren Nervenscheidentumoren (MPNSTs) (Frahm et al., 2004) und Mammakarzinomen (Han et al., 1998). In klinischen Studien wurde eine Exisulind-bedingte Apoptose-Induktion in sporadischen adenomatösen Kolonpolypen (Arber et al., 2005) und in kolorektalen Polypen von Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) (Stoner et al., 1999; van Stolk et al., 2000) nachgewiesen. Überraschenderweise finden sich unter den über 100 PubMed-gelisteten Arbeiten (www.ncbi.nlm.nih.gov), welche in-vitro und in-vivo die Wirkung des Exisulindes auf unterschiedliche Tumorentitäten untersuchen, mit einer Ausnahme ausschließlich Arbeiten zu soliden Tumoren. Als einzige Arbeit zu Hämoblastosen untersuchten Moon et al. (2002) die in-vitro-Wirkung des Exisulindes auf chronisch-lymphatische Leukämie (CLL) -Zellen und -Zelllinien. Diese Forschungsgruppe konnte eine Exisulind-bedingte Proliferationshemmung und Apoptose-Induktion in jenen CLL-Zellen nachweisen. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Dosis- und Zeitabhängigkeit der Apoptose-Induktion des Exisulindes deckt sich mit den Beobachtung der in-vitro Untersuchungen von Rahman et al. (2000) und Lim et al. (1999), die diese Abhängigkeiten in hepatozellulären Karzinomzelllinien beziehungsweise Prostatakarzinomzelllinien beschrieben hatten.

Interessanterweise fanden sich in der de-novo AML Zelllinie THP-1, verglichen mit den entsprechenden Kontrollen, weder Exisulind-bedingte Veränderungen im Koloniewachstum (Abb.: 3.1.3) noch in den hämatozytometrischen Analysen (Abb.: 3.2.3). Auch die proliferative und apoptotische Aktivität der THP-1 Zellen konnte durch die Inkubation mit Exisulind nicht messbar verändert werden (Abb.: 3.3.3 und 3.4.3). Exisulind induzierte Apoptose in den beiden sAML/MDS Zelllinien KG-1 sowie SKM-1 und zeigte keinen Effekt auf die de-novo AML-Zelllinie THP-1. Diese Beobachtung weist auf zellbiologische Unterschiede hin, welche zwischen Zellen einer de-novo AML und leukämischen Zellen, die aus myelodysplastischen Syndromen hervorgegangen sind, bestehen. Verglichen mit einer de-novo AML ist die sAML/MDS charakterisiert durch Veränderungen des Immunphänotyps mit einer häufigeren Expression von CD34, CD11b und CD25 (Masuya et al., 1993). Darüber hinaus weist die sAML/MDS eine fehlende Hemmbarkeit der Proliferation leukämischer Progenitorzellen durch TGF β 1 (Masuya et al., 1993) sowie eine vermehrte bcl-2- und p53-Expression (Kurotaki et al., 2000) auf. Die Expression der induzierbaren Nitrooxid-Synthase ist bei de-novo AML Zellen im Gegensatz zu sAML/MDS Zellen nicht nachweisbar (Selleri et al., 1997). Solche grundsätzlichen zellbiologischen Unterschiede spiegeln sich auch in klinisch unterschiedlichen Eigenschaften wider. Beispielsweise sind die Zellen von de-novo AML-Patienten chemosensitiver als die von Patienten mit einer sekundären AML aus MDS (Behringer et al., 2003; Bauduer et al., 1999). Die schlechteren Ansprechraten sind vermutlich durch eine erhöhte Zytostatika-Resistenz, insbesondere durch das vermehrte Ausschleusen der Therapeutika aus den sAML/MDS Zellen, zu erklären. Nachgewiesen wurden eine veränderte Expression des *multidrug resistance-associated protein* (MRP) (Xu et al., 1999) sowie eine höhere Expression des *lung resistance protein* (LRP) (Leith et al., 1999) und höhere Level des *multiple drug resistance protein 1* (MDR1) (List et al., 1996; Campos et al., 1992) in sAML/MDS Zellen.

Neben den klonalen Blasten der drei unterschiedlichen AML-Zelllinien KG-1, SKM-1 und THP-1 wurden auch Fluoreszenz-durchflußzytometrisch separierte CD34+ hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen gesunder Probanden untersucht. Mit ihrer Fähigkeit des *self-renewal* (Satterthwaite et al., 1990) stellen diese unreifen

Vorläuferzellen eine adäquate physiologische Kontroll-Population zu den ungehemmt proliferierenden Blasten der akuten myeloischen Leukämien dar. Das CD34-Antigen ist eines der am besten untersuchten Oberflächenmoleküle menschlicher hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen. Es wird von etwa einem bis vier Prozent der Knochenmarkszellen exprimiert und verliert sich mit zunehmender Differenzierung der Blutvorläuferzellen rasch. Zudem wird es bei Patienten mit AML in etwa einem Drittel der Fälle von den leukämischen Zellen exprimiert. Weniger differenzierte FAB-Subtypen sind dabei häufiger CD34+, während Leukämien mit reiferen Klonen dieses Antigen im Allgemeinen nicht exprimieren (Civin et al., 1984; Tindel et al., 1985). Auch sind CD34+ AML Zellen häufiger bei sAML/MDS als bei de-novo AML beschrieben worden (Masuya et al., 1993). Die Expression dieses Oberflächenmoleküls auf den leukämischen Blasten geht dabei mit einer schlechteren Prognose einher (Tenen et al., 1990; Rasperdori et al., 1997). Von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten AML-Zelllinien exprimiert die sAML/MDS Zelllinie KG-1 dieses hämatopoietische Stamm- und Progenitorzell-Oberflächenantigen CD34 (Tindel et al., 1985).

Mit der Untersuchung der CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen wurde analysiert, ob Exisulind ungeachtet der Dignität auf besonders unreife Zellen wirkt. Die CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen zeigten aber weder Exisulind-bedingte Veränderungen im Koloniewachstum oder der Zellzahl noch in der proliferativen oder apoptotischen Aktivität (Abb.: 3.1.4, 3.6.1 bis 3.6.3). Die Exisulind-vermittelte Apoptose-Induktion korreliert somit nicht mit der CD34-Expression der behandelten Zellen. Dass Exisulind keinen Effekt auf hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen zeigt, deckt sich mit den bisherigen Erfahrungen der klinischen Studien. Hier waren keine Zytopenien als unerwünschte Wirkung der Behandlung mit Exisulind beschrieben worden (Witta et al., 2004).

In den hier untersuchten Zelllinien und Zellen induzierte Exisulind selektiv die Apoptose in den sekundären AML aus MDS Zelllinien KG-1 und SKM-1. Dass die apoptose-induzierende Wirkung des Exisulindes selektiv auf neoplastische Zellen wirkt, wurde bei unterschiedlichen soliden Tumorentitäten beschrieben. Es wurde eine selektive Apoptose-Induktion in Prostatakarzinomen der Maus (Narayanan et al., 2004), in Mammakarzinomen bei Ratten (Thompson et al., 1997), in sporadischen adenomatösen Kolonpolypen beim Menschen (Arber et al., 2005) und in kolorektalen Polypen bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP)

(Stoner et al., 1999; van Stolk et al., 2000) beschrieben. Die Arbeit von Moon et al. (2002) ließ eine adäquate gesunde Kontroll-Population vermissen und konnte daher keine Aussage über eine mögliche selektive Apoptose-Induktion des Exisulindes bei der Hämoblastose chronisch-lymphatischer Leukämie machen.

Um das unterschiedliche Exisulind-vermittelte Apoptoseverhalten zwischen den sAML/MDS-Zelllinien KG-1 sowie SKM-1 einerseits und der de-novo AML-Zelllinie THP-1 andererseits genauer zu verstehen und damit weitere zellbiologische Unterschiede aufzudecken, wurden verschiedene Apoptose-Signaltransduktionswege untersucht. Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase MAPK repräsentiert eine Familie von Serin-Threonin-Kinasen, die zytoplasmatische Proteine phosphorylieren und sie dann vom Zytoplasma in den Nukleus translozieren können. Im Nukleus können diese phosphorylierten Proteine dann ihrerseits direkt die Aktivität von Transkriptionsfaktoren regulieren (Cuschieri et al., 2005). Die c-Jun NH₂-terminale Kinase (JNK) ist ein Substrat einer dieser MAPK, genauer der MTK1/MKK4, einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase Kinase Kinase (Hammaker et al., 2004 und Zerbini et al., 2004). MTK1/MKK4 phosphoryliert c-Jun, ein Molekül, welches seinerseits Bestandteil des Transkriptionsfaktors Aktiviertes Protein 1 (AP-1) ist. AP-1 kann die Apoptose einer Zelle einleiten (Basu et al., 1998). Insgesamt wurden bereits drei JNKs identifiziert: JNK1 und JNK2 (Gupta et al., 1996) sowie JNK3 (Hu et al., 1997). Während JNK1 und JNK2 in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe exprimiert werden, scheint JNK3 in erster Linie in Nerven- und Herzmuskelgewebe vorzukommen (Nishina et al., 2004). Exisulind hemmt die zyklische Guanosinmonophosphat-abhängige Phosphodiesterase (cGMP-PDE), welche oft in verschiedenen Krebsentitäten wie metastasierten Mammakarzinomen (Pusztai et al., 2003 und Singer et al., 1976), Kolon-Adenokarzinomen (Soh et al., 2000 und Thompson et al., 2000), squamösen Blasenkarzinomen (Piazza et al., 2001) und Bronchialkarzinomen (Whitehead et al., 2003) vorkommt. Diese Exisulind-vermittelte Hemmung der cGMP-abhängigen PDEs führt zur JNK-Aktivierung und induziert in menschlichen Kolonkrebszellen die Apoptose (Soh et al., 2000). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die mögliche Aktivierung der JNKs als Ursache für die pro-apoptotische Wirkung des Exisulindes untersucht. Dazu wurden JNK Assays mit anschließendem Western Blotting von phosphoryliertem c-Jun-Proteinen

durchgeführt. Diese Kinase-Assays umfassen die enzymatische Aktivitätsprüfung aller drei Subtypen der JNKs und zeigten, dass in den sAML/MDS-Zelllinien KG-1 und SKM-1 die Aktivität der JNKs durch Exisulind hochreguliert wurde (Abb.: 3.7.1). Es ist bekannt, dass der JNK-Inhibitor JNK II SP 600125 die drei bekannten Isoformen der JNK mit etwa gleicher Potenz hemmt (Bennett et al., 2001). Durch die Zugabe des JNK-Inhibitors JNK II SP 600125 zu Exisulind-behandelten KG-1 und SKM-1 Zellen konnte weiter gezeigt werden, dass der Exisulind-induzierte pro-apoptotische Effekt fast gänzlich aufgehoben werden konnte (Abb.: 3.8.1). Diese Ergebnisse beweisen, dass die Exisulind-induzierte Apoptose in den sAML/MDS Zellen KG-1 und SKM-1 abhängig von der JNK-Aktivität ist. Die Ergebnisse zeigen weiter, dass eben in der Exisulind-bedingten Induzierbarkeit der JNK-Aktivität und der daraus resultierenden Apoptose-Induktion ein molekularbiologischer Unterschied zwischen sekundären und de-novo akuten myeloischen Leukämien liegt. Über die Ursachen, warum die JNK-Aktivität in der de-novo AML Zelllinie THP-1 durch Exisulind nicht induziert wird, kann nur spekuliert werden. Eine mögliche Erklärung wäre eine funktionell relevante Mutation der JNK. Soh et al. haben 2000 gezeigt, daß mit dominant negativen JNKs transfizierte Kolonkarzinomzellen im Gegensatz zu den Kontrollen keine Exisulind-induzierte Apoptose mehr zeigten. Andere Erklärungsansätze für die mangelnde JNK-Aktivierbarkeit in den THP-1 Zellen wären beispielsweise eine aberrante PDE oder ein Defekt der beteiligten Signalkaskade. Die mögliche Rolle der JNKs wie der PDEs bei der Pathophysiologie der akuten myeloischen Leukämie ist allerdings noch weitestgehend unerforscht.

Die Familie der sogenannten *growth arrest and DNA damage 45* (GADD45) Proteine ist in die Regulation von Wachstumsstopp, Apoptose und Proliferation (Zerbini et al., 2004; Chen et al., 1995 und De Smael et al., 2001) involviert. Kürzlich veröffentlichte Studien zeigten die Beteiligung der GADD45 Proteine an der über die MAPK Signalkaskade induzierten Apoptose (Yin et al., 2004). Zudem ist bekannt, dass die GADD45-Gene JNK aktivieren und so Apoptose induzieren können (Zerbini et al., 2004 und 2005, sowie Mita et al., 2002). Aus diesem Grund wurde hier untersucht, ob die GADD45-Genfamilie an der Exisulind-vermittelten Apoptose-Induktion via JNK-Aktivierung beteiligt ist. Die durchgeführten quantitativen RT-PCRs konnten allerdings keine erhöhten mRNA-Level der GADD45-Gene in den mit Exisulind behandelten KG-1 und SKM-1 Zellen nachweisen (Abb.: 3.9.1). Die GADD45-Gene

spielen daher vermutlich keine Rolle bei der Exisulind-vermittelten JNK-Aktivierung in den untersuchten sAML/MDS Zelllinien.

Zeitgleich mit der Publikation der vorliegenden Arbeit beschrieben Dai et al. (2005) eine Apoptose-Induktion in leukämischen Zellen durch Inkubation mit dem Farnesyltransferase-Inhibitor L744832 in Gegenwart des Chk1-Inhibitors UCN-01. Hier korrelierte die Apoptose-Induktion ebenfalls mit einer Aktivierung der JNK. Darüber hinaus konnten Dai et al. zeigen, daß die Down-Regulation der JNK1 mittels siRNA diesen pro-apoptotischen Effekt signifikant reduzierte. Ob sich diese Reduktion durch zusätzliche Down-Regulation der JNK2 und JNK3 noch weiter steigern ließe, wurde nicht untersucht.

Eine weitere Arbeitsgruppe, welche eine Medikamenten-induzierte Aktivierung der JNK und eine damit verbundene Apoptose-Induktion im AML-Zellen beschrieben hat, waren Zhang et al. (2003). Zhang und Mitarbeiter konnten zeigen, daß das neue Retinoid 3-CL-AHPC für seine pro-apoptotische Wirkung in Transretinsäure-resistenten AML-Zelllinien KG-1, M07e und HL-60R sowie in Transretinsäure-resistenten primären AML-Blasten einer JNK-Aktivierung bedarf.

Welche therapeutischen Perspektiven ergeben sich aus den hier präsentierten in-vitro Daten für die Behandlungen von Hämoblastosen wie den *higher risk* MDS und den akuten myeloischen Leukämien? Wie bereits oben erwähnt, wurde in einer Vielzahl unterschiedlicher in-vitro und Tiermodell-Studien eine Exisulind-vermittelte Apoptose-Induktion in neoplastischen Zellen beschrieben. Diese Daten ließen sich allerdings in den späteren klinischen Studien nicht immer in signifikante therapeutische Effekte übersetzen (Ratner et al., 1990; Bunn et al., 2002; Garcia et al., 2005). In einem großen Teil jener präklinischen Arbeiten waren Exisulind-Konzentrationen zwischen 100 μM und 1.000 μM untersucht worden, wobei in Ratten-Modellen bei oraler Gabe Exisulind-Plasmapiegel von 247 μM bis 392 μM gemessen worden waren (Piazza et al., 1997). Beispiele dafür waren die Arbeiten von Lim et al. (1999) zu Prostatakarzinomzellen, Whitehead et al. (2003) zu Lungenkarzinomzellen und Deguchi et al. (2004) zu kolorektalen Karzinomzellen. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Exisulind-Konzentrationen von 400 μM und 600 μM sowohl in den beiden sAML/MDS-Zelllinien KG-1 und SKM-1 als auch in der de-novo AML-Zelllinie THP-1 nach 48 Stunden zu

signifikanten Apoptose-Induktionen führten (Abb.: 3.4.4). Die Arbeiten von Ray et al. (1995) und van Stolk et al. (2000) haben jedoch beschrieben, dass bei oraler Gabe von Exisulind im menschlichen Organismus eine Plasmakonzentration von 100 μM nicht überschritten wird. Um dieser Tatsache gerecht zu werden, wurde in der vorliegenden Arbeit lediglich die Wirkung der pharmakologisch erreichbaren Exisulind-Konzentrationen 25 μM und 100 μM genauer untersucht. Mit keiner dieser beiden Exisulind-Konzentrationen konnte in den THP-1 Zellen ein messbarer Anstieg der Apoptose induziert werden. Die Apoptose-induzierende Wirkung des Exisulindes ist stark dosisabhängig und die hier untersuchten AML-Zelllinien zeigen eine sehr unterschiedliche Sensitivität gegenüber dem Wirkstoff. Dass die Tumorentitäten, welche in den präklinischen Arbeiten durch 100 μM bis 1.000 μM Exisulind Apoptose-Induktion gezeigt hatten, in den klinischen Studien zum Teil nicht das erhoffte therapeutische Ansprechen zeigten, kann an diesen beiden Faktoren gelegen haben: Die hohen Plasmakonzentrationen jener präklinischen Untersuchungen wurden nicht erreicht und die einzelnen Tumorentitäten sind gegenüber Exisulind unterschiedlich sensitiv. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass mit pharmakologisch erreichbaren Exisulind-Konzentrationen selektiv Apoptose in den sAML/MDS-Zelllinien KG-1 und SKM-1 induziert werden konnte. Diese Ergebnisse legen nahe, das Potential des Exisulindes als neue, pro-apoptotische Therapie für Patienten mit *higher risk* MDS und sAML/MDS in klinischen Studien zu untersuchen. Weiter zeigt diese Arbeit, dass eben diese Apoptose-Induktion über eine Aktivierung der JNK vermittelt wird. Die Bedeutung der JNK in der Pathophysiologie von *higher risk* MDS und akuten myeloischen Leukämien sollte weiter untersucht werden. Vor allem sollte daher untersucht werden, ob hier einem der drei bis dato bekannten Isotypen der JNK eine besonders dominierende Rolle zukommt. Eine spezifischere Aktivierung der relevanten JNK-Isoform könnte den pro-apoptotischen Effekt und damit möglicherweise auch die therapeutischen Erfolg weiter steigern. Zudem wäre zu diskutieren, ob die klonalen Blasten der *higher risk* MDS- und AML-Patienten vor einer Therapie mit Exisulind auf die JNK-Aktivierbarkeit hin untersucht werden sollten. Möglicherweise stünde damit ein positiver Prädiktor für ein therapeutisches Ansprechen dieser pro-apoptotischen Behandlung zur Verfügung. Der Ansatz der Apoptose-Induktion in der Behandlung von *higher risk* MDS und der akuten myeloischen Leukämien ist dabei nicht neu. Über weitgehend unbekanntes Signalkaskaden vermittelt Arsentrioxid (Trisenox®) in myeloischen Blasten eine

Proliferations-hemmung und Apoptose-Induktion (Jabbour et al., 2005). Die klinischen Studien zeigten bislang allerdings verhaltene therapeutische Erfolge: List et al. (2003) und Vey et al. (2003) beobachteten bei 18 % bis 26 % der behandelten *higher risk* MDS-Patienten Verbesserungen des peripheren Blutbildes. Parmar et al. (2004) zeigen in der Behandlung von Patienten mit therapierefraktärer de-novo AML oder sAML/MDS ein medianes Überleben von 2,25 Monaten, wobei alle Patienten eine Progression der Erkrankung aufwiesen. Trotz relativ guter Verträglichkeit wurde jedoch, basierend auf diesen klinischen Daten, von einer Monotherapie der AML mit Arsentrioxid abgeraten.

Es bleibt zu prüfen, inwiefern Exisulind als Monotherapeutikum oder als Kombinationspartner in der Behandlung von sAML/MDS klinisch wirksam ist. Insbesondere stellt sich die Frage, ob Exisulind in der Lage ist, sich mit anderen pro-apoptotischen Agenzien in der Wirkung zu potenzieren.

5. Zusammenfassung

Die Behandlung von Patienten mit prognostisch ungünstigen Formen des myelodysplastischen Syndroms (*higher risk* MDS) oder mit sekundärer akuter myeloischer Leukämie nach MDS (sAML/MDS) ist schwierig. Nur wenige Patienten können in kurativer Intention behandelt werden. Palliative Therapeutika mit guten Ansprechraten und günstigem Nebenwirkungsprofil fehlen weitgehend. Auf der Suche nach neuen Therapieoptionen wurden in der vorliegenden Arbeit Zelllinien von Patienten mit sAML/MDS einer in-vitro Behandlung mit einer bei *higher risk* MDS und sAML/MDS bislang noch nicht geprüften Substanz unterzogen: Exisulind. Exisulind ist ein oral verfügbares und gut verträgliches Apoptose-induzierendes Medikament. Aus diesem Grund wurde hier sein Einfluß auf Proliferation, Differenzierung, Zellzyklus und Apoptose in zwei sAML/MDS Zelllinien, einer de-novo AML Zelllinie sowie gesunden CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen untersucht. Die Behandlung der sAML/MDS Zellen mit Exisulind inhibierte die Ausbildung von Kolonien in den CFU-Assays. Interessanterweise beeinflusste Exisulind den Zellzyklus der sAML/MDS Zellen nicht, reduzierte aber deren Proliferation, indem es Apoptose induzierte. Für die Proliferationshemmung und Apoptose-Induktion ließ sich eine Dosis-Wirkungsbeziehung nachweisen. Exisulind zeigte keine Effekte auf de-novo AML- oder gesunde CD34+ Zellen. Es konnte nachgewiesen werden, dass in sAML/MDS Zellen, die mit Exisulind behandelt wurden, eine erhöhte Phosphorylierung und damit Aktivierung der c-jun NH₂-terminalen Kinase (JNK) vorlag. Wurde Exisulind-behandelten sAML/MDS Zellen zusätzlich ein JNK-Inhibitor zugegeben, wurde die Apoptose fast gänzlich verhindert. Dies beweist, dass Exisulind-vermittelte Apoptose in sAML/MDS Zellen abhängig von der Phosphorylierung der JNK ist. Die erhobenen Daten deuten darauf hin, dass Exisulind selektiv Apoptose in sAML/MDS Zellen induziert und die JNK eine der Mediatoren dieser Exisulind-vermittelten Apoptose ist. Deshalb sollte der mögliche Einsatz von Exisulind als selektive pro-apoptotische Substanz bei der Behandlung von Patienten mit *higher risk* MDS und sAML/MDS in klinischen Studien geprüft werden.

6. Appendix

6.1.1 KG-1 Hämozytometer-Analysen

KG-1	DMSO 25 Zellzahl	Exisulind 25 µM Zellzahl
<i>1 Tag</i>	195.000	165.000
	150.000	145.000
	225.000	195.000
<i>2 Tage</i>	370.000	235.000
	325.000	305.000
	360.000	290.000
<i>4 Tage</i>	685.000	375.000
	550.000	420.000
	910.000	320.000
<i>7 Tage</i>	2.140.000	920.000
	2.010.000	825.000
	2.240.000	1.430.000

	DMSO 100 Zellzahl	Exisulind 100 µM Zellzahl
<i>1 Tag</i>	210.000	170.000
	190.000	175.000
	235.000	120.000
<i>2 Tage</i>	420.000	260.000
	335.000	405.000
	460.000	300.000
<i>4 Tage</i>	1.100.000	295.000
	990.000	465.000
	1.180.000	305.000
<i>7 Tage</i>	2.220.000	180.000
	2.310.000	390.000
	1.610.000	280.000

6.1.2 SKM-1 Hämozytometer-Analysen

SKM-1	DMSO 25 Zellzahl	Exisulind 25 µM Zellzahl
<i>1 Tag</i>	125.000	170.000
	240.000	205.000
	180.000	150.000
<i>2 Tage</i>	780.000	720.000
	625.000	410.000
	580.000	680.000
<i>4 Tage</i>	1.560.000	1.420.000
	1.180.000	805.000
	1.025.000	1.180.000
<i>7 Tage</i>	3.240.000	2.750.000
	3.980.000	2.370.000
	4.120.000	2.280.000

	DMSO 100 Zellzahl	Exisulind 100 µM Zellzahl
<i>1 Tag</i>	195.000	180.000
	220.000	175.000
	205.000	150.000
<i>2 Tage</i>	825.000	540.000
	360.000	405.000
	740.000	640.000
<i>4 Tage</i>	1.250.000	1.100.000
	1.350.000	1.020.000
	980.000	1.365.000
<i>7 Tage</i>	4.100.000	2.680.000
	3.600.000	1.660.000
	4.480.000	2.205.000

6.1.3 THP-1 Hämozytometer-Analysen

<i>THP-1</i>	DMSO 25 Zellzahl	Exisulind 25 µM Zellzahl
<i>1 Tag</i>	335.000	335.000
	225.000	170.000
	250.000	360.000
<i>2 Tage</i>	205.000	350.000
	265.000	170.000
	355.000	380.000
<i>4 Tage</i>	610.000	620.000
	720.000	595.000
	1.020.000	990.000
<i>7 Tage</i>	1.650.000	1.570.000
	2.020.000	1.890.000
	1.980.000	2.025.000

	DMSO 100 Zellzahl	Exisulind 100 µM Zellzahl
<i>1 Tag</i>	270.000	335.000
	150.000	150.000
	160.000	125.000
<i>2 Tage</i>	380.000	270.000
	190.000	250.000
	395.000	420.000
<i>4 Tage</i>	1.020.000	870.000
	530.000	690.000
	960.000	925.000
<i>7 Tage</i>	1.800.000	1.900.000
	2.340.000	2.410.000
	1.905.000	1.875.000

6.2.1 KG-1 Proliferationsanalysen

KG-1	DMSO 25			Exisulind 25µM		
	OD	BLANK	OD _{korregiert}	OD	BLANK	OD _{korregiert}
1 Tag	0,164	0,0675	0,0965	0,168	0,0675	0,1005
	0,258	0,071	0,187	0,198	0,071	0,127
	0,304	0,102	0,202	0,312	0,102	0,21
2 Tage	0,284	0,0675	0,2165	0,266	0,071	0,195
	0,351	0,071	0,28	0,288	0,0675	0,2205
	0,494	0,085	0,409	0,458	0,085	0,373
4 Tage	0,74	0,092	0,648	0,544	0,071	0,473
	0,912	0,0665	0,8455	0,628	0,092	0,536
	0,96	0,071	0,889	0,87	0,0665	0,8035
7 Tage	0,472	0,0685	0,4035	0,256	0,0685	0,1875
	0,62	0,122	0,498	0,46	0,122	0,338
	0,878	0,071	0,807	0,462	0,071	0,391

	DMSO 100			Exisulind 100µM		
	OD	BLANK	OD _{korregiert}	OD	BLANK	OD _{korregiert}
1 Tag	0,306	0,071	0,235	0,228	0,071	0,157
	0,31	0,102	0,208	0,344	0,102	0,242
	0,316	0,0675	0,2485	0,422	0,0675	0,3545
2 Tage	0,338	0,071	0,267	0,254	0,0675	0,1865
	0,434	0,085	0,349	0,395	0,085	0,31
	0,446	0,0675	0,3785	0,498	0,071	0,427
4 Tage	0,652	0,092	0,56	0,284	0,092	0,192
	0,696	0,071	0,625	0,392	0,0665	0,3255
	0,878	0,0665	0,8115	0,428	0,071	0,357
7 Tage	0,418	0,0685	0,3495	0,1052	0,0685	0,0367
	0,5695	0,071	0,4985	0,1525	0,071	0,0815
	0,792	0,122	0,67	0,188	0,122	0,066

6.2.2 SKM-1 Proliferationsanalysen

SKM-1	DMSO 25			Exisulind 25µM		
	OD	BLANK	OD _{korregiert}	OD	BLANK	OD _{korregiert}
1 Tag	0,512	0,102	0,41	0,442	0,071	0,371
	0,584	0,0675	0,5165	0,68	0,0675	0,6125
	0,722	0,071	0,651	0,738	0,102	0,636
2 Tage	1,266	0,071	1,195	1,168	0,0675	1,1005
	1,688	0,085	1,603	1,502	0,085	1,417
	2,06	0,0675	1,9925	1,892	0,071	1,821
4 Tage	1,62	0,071	1,549	1,686	0,0665	1,6195
	1,98	0,0665	1,9135	1,868	0,092	1,776
	2,44	0,092	2,348	2,154	0,071	2,083
7 Tage	0,436	0,071	0,365	0,675	0,0685	0,6065
	0,612	0,0685	0,5435	0,924	0,122	0,802
	0,74	0,122	0,618	1,352	0,071	1,281

	DMSO 100			Exisulind 100µM		
	OD	BLANK	OD _{korrigiert}	OD	BLANK	OD _{korrigiert}
1 Tag	0,632	0,0675	0,5645	0,568	0,0675	0,5005
	0,74	0,102	0,638	0,693	0,102	0,591
	0,876	0,071	0,805	0,985	0,071	0,914
2 Tage	0,82	0,0675	0,7525	1,087	0,085	1,002
	1,518	0,085	1,433	1,494	0,0675	1,4265
	1,906	0,071	1,835	1,916	0,071	1,845
4 Tage	1,897	0,0665	1,8305	1,63	0,0665	1,5635
	2,46	0,092	2,368	1,86	0,071	1,789
	2,618	0,071	2,547	2,315	0,092	2,223
7 Tage	0,984	0,0685	0,9155	0,548	0,122	0,426
	1,816	0,122	1,694	0,562	0,071	0,491
	1,154	0,071	1,083	0,725	0,0685	0,6565

6.2.3 THP-1 Proliferationsanalysen

THP-1	DMSO 25			Exisulind 25µM		
	OD	BLANK	OD _{korrigiert}	OD	BLANK	OD _{korrigiert}
1 Tag	0,734	0,071	0,663	0,686	0,071	0,615
	0,922	0,0675	0,8545	0,863	0,102	0,761
	1,198	0,102	1,096	1,128	0,0675	1,0605
2 Tage	0,368	0,071	0,297	0,592	0,071	0,521
	0,612	0,0675	0,5445	0,712	0,0675	0,6445
	0,694	0,085	0,609	1,058	0,085	0,973
4 Tage	1,934	0,092	1,842	1,626	0,092	1,534
	1,96	0,071	1,889	1,82	0,0665	1,7535
	2,149	0,0665	2,0825	1,887	0,071	1,816
7 Tage	0,804	0,071	0,733	1,145	0,0685	1,0765
	1,234	0,122	1,112	1,291	0,071	1,22
	1,656	0,0685	1,5875	1,614	0,122	1,492

	DMSO 100			Exisulind 100µM		
	OD	BLANK	OD _{korrigiert}	OD	BLANK	OD _{korrigiert}
1 Tag	0,582	0,102	0,48	0,519	0,102	0,417
	0,937	0,071	0,866	0,746	0,0675	0,6785
	0,964	0,0675	0,8965	1,028	0,071	0,957
2 Tage	0,789	0,0675	0,7215	0,749	0,085	0,664
	0,878	0,085	0,793	0,814	0,0675	0,7465
	0,996	0,071	0,925	0,834	0,071	0,763
4 Tage	1,56	0,071	1,489	1,139	0,071	1,068
	1,896	0,0665	1,8295	1,46	0,092	1,368
	2,26	0,092	2,168	1,598	0,0665	1,5315
7 Tage	1,543	0,0685	1,4745	1,572	0,071	1,501
	1,824	0,071	1,753	1,616	0,122	1,494
	1,372	0,122	1,25	1,862	0,0685	1,7935

6.3.1 KG-1 Apoptose-Analysen

KG-1	DMSO 25			Exisulind 25µM		
	OD	BLANK	OD _{korregiert}	OD	BLANK	OD _{korregiert}
1 Tag	0,158	0,084	0,074	0,128	0,059	0,069
	0,17	0,057	0,113	0,163	0,084	0,079
	0,244	0,059	0,185	0,19	0,057	0,133
2 Tage	0,136	0,062	0,074	0,163	0,062	0,101
	0,174	0,084	0,09	0,201	0,084	0,117
	0,276	0,057	0,219	0,226	0,057	0,169
4 Tage	0,219	0,064	0,155	0,574	0,064	0,51
	0,332	0,061	0,271	0,616	0,061	0,555
	0,56	0,067	0,493	0,822	0,067	0,755
7 Tage	0,168	0,065	0,103	0,281	0,065	0,216
	0,181	0,071	0,11	0,402	0,079	0,323
	0,333	0,079	0,254	0,578	0,071	0,507

	DMSO 100			Exisulind 100µM		
	OD	BLANK	OD _{korregiert}	OD	BLANK	OD _{korregiert}
1 Tag	0,101	0,057	0,044	0,166	0,057	0,109
	0,159	0,084	0,075	0,188	0,084	0,104
	0,184	0,08	0,104	0,24	0,059	0,181
	0,262	0,059	0,203	0,526	0,08	0,446
2 Tage	0,168	0,057	0,111	0,204	0,062	0,142
	0,182	0,068	0,114	0,237	0,057	0,18
	0,202	0,062	0,14	0,267	0,068	0,199
4 Tage	0,129	0,061	0,068	0,758	0,067	0,691
	0,444	0,064	0,38	0,914	0,064	0,85
	0,56	0,067	0,493	1,128	0,061	1,067
7 Tage	0,238	0,065	0,173	0,892	0,079	0,813
	0,256	0,071	0,185	0,926	0,065	0,861
	0,361	0,079	0,282	1,164	0,071	1,093

6.3.2 SKM-1 Apoptose-Analysen

SKM-1	DMSO 25			Exisulind 25µM		
	OD	BLANK	OD _{korregiert}	OD	BLANK	OD _{korregiert}
1 Tag	0,124	0,084	0,04	0,149	0,084	0,065
	0,104	0,057	0,047	0,112	0,057	0,055
	0,182	0,059	0,123	0,135	0,059	0,076
2 Tage	0,098	0,084	0,014	0,121	0,084	0,037
	0,128	0,059	0,069	0,086	0,057	0,029
	0,139	0,057	0,082	0,164	0,059	0,105
4 Tage	0,169	0,061	0,108	0,316	0,061	0,255
	0,212	0,067	0,145	0,231	0,067	0,164
	0,234	0,064	0,17	0,253	0,064	0,189
7 Tage	0,242	0,079	0,163	0,381	0,079	0,302
	0,178	0,057	0,121	0,469	0,057	0,412
	0,279	0,071	0,208	0,498	0,071	0,427

	DMSO 100			Exisulind 100µM		
	OD	BLANK	OD _{korregiert}	OD	BLANK	OD _{korregiert}
1 Tag	0,134	0,057	0,077	0,234	0,057	0,177
	0,153	0,084	0,069	0,379	0,059	0,32
	0,195	0,059	0,136	0,394	0,084	0,31
2 Tage	0,091	0,062	0,029	0,183	0,057	0,126
	0,166	0,057	0,109	0,185	0,062	0,123
	0,259	0,068	0,191	0,476	0,068	0,408
4 Tage	0,156	0,067	0,089	0,277	0,061	0,216
	0,175	0,064	0,111	0,343	0,064	0,279
	0,198	0,061	0,137	0,412	0,067	0,345
7 Tage	0,156	0,079	0,077	0,997	0,079	0,918
	0,275	0,071	0,204	1,256	0,057	1,199
	0,346	0,057	0,289	1,549	0,071	1,478

6.3.3 THP-1 Apoptose-Analysen

THP-1	DMSO 25			Exisulind 25 µM		
	OD	BLANK	OD _{korregiert}	OD	BLANK	OD _{korregiert}
1 Tag	0,184	0,078	0,106	0,197	0,062	0,135
	0,294	0,084	0,21	0,386	0,084	0,302
	0,379	0,062	0,317	0,492	0,078	0,414
2 Tage	0,244	0,078	0,166	0,179	0,078	0,101
	0,357	0,084	0,273	0,224	0,084	0,14
	0,442	0,062	0,38	0,244	0,062	0,182
4 Tage	0,375	0,061	0,314	0,422	0,061	0,361
	0,426	0,064	0,362	0,464	0,064	0,4
	0,719	0,067	0,652	0,819	0,067	0,752
7 Tage	0,443	0,068	0,375	0,346	0,071	0,275
	0,614	0,079	0,535	0,554	0,068	0,486
	0,765	0,071	0,694	0,787	0,079	0,708

	DMSO 100			Exisulind 100 µM		
	OD	BLANK	OD _{korregiert}	OD	BLANK	OD _{korregiert}
1 Tag	0,094	0,057	0,037	0,244	0,057	0,187
	0,178	0,059	0,119	0,333	0,084	0,249
	0,41	0,084	0,326	0,427	0,059	0,368
2 Tage	0,209	0,057	0,152	0,236	0,057	0,179
	0,287	0,062	0,225	0,267	0,062	0,205
	0,559	0,068	0,491	0,462	0,068	0,394
4 Tage	0,362	0,061	0,301	0,43	0,061	0,369
	0,319	0,064	0,255	0,483	0,064	0,419
	0,724	0,067	0,657	0,759	0,067	0,692
7 Tage	0,358	0,079	0,279	0,26	0,079	0,181
	0,415	0,071	0,344	0,396	0,068	0,328
	0,762	0,068	0,694	0,515	0,071	0,444

6.4.1 CD34+ Hämozytometer-Analysen

<i>CD 34+</i>	DMSO 25		Exisulind 25µM	
	Zellzahl		Zellzahl	
<i>7 Tage</i>	212.000		233.000	
	176.000		179.000	
	146.000		134.000	
<i>CD 34+</i>	DMSO 25		Exisulind 25µM	
	Zellzahl		Zellzahl	
<i>7 Tage</i>	240.000		222.000	
	178.000		176.000	
	158.000		164.000	

6.4.2 CD 34+ Proliferationsanalysen

<i>CD 34+</i>	DMSO 25			Exisulind 25µM		
	OD	BLANK	OD _{korregiert}	OD	BLANK	OD _{korregiert}
<i>7 Tage</i>	0,412	0,066	0,346	0,418	0,066	0,352
	0,352	0,07	0,282	0,417	0,079	0,338
	0,287	0,079	0,208	0,244	0,07	0,174
<i>CD 34+</i>	DMSO 100			Exisulind 100µM		
	OD	BLANK	OD _{korregiert}	OD	BLANK	OD _{korregiert}
<i>7 Tage</i>	0,384	0,066	0,318	0,419	0,079	0,34
	0,342	0,07	0,272	0,328	0,066	0,262
	0,305	0,079	0,226	0,258	0,07	0,188

6.4.3 CD 34+ Apoptose-Analysen

<i>CD 34+</i>	DMSO 25			Exisulind 25µM		
	OD	BLANK	OD _{korregiert}	OD	BLANK	OD _{korregiert}
<i>7 Tage</i>	0,957	0,065	0,892	0,927	0,065	0,862
	0,899	0,071	0,828	0,689	0,079	0,61
	0,645	0,079	0,566	0,613	0,071	0,542
<i>CD 34+</i>	DMSO 100			Exisulind 100µM		
	OD	BLANK	OD _{korregiert}	OD	BLANK	OD _{korregiert}
<i>7 Tage</i>	0,757	0,065	0,692	0,819	0,079	0,74
	0,539	0,071	0,468	0,577	0,065	0,512
	0,399	0,079	0,32	0,369	0,071	0,298

7. Literaturverzeichnis

- Aivado M**, Rong A, Germing U, Gattermann N, Kobbe G, Rieth C, Haas R, Aul C: Long-term remission after intensive chemotherapy in advanced myelodysplastic syndromes is generally associated with restoration of polyclonal haemopoiesis. *Br J Haematol*. 2000 Sep; 110(4): 884-6.
- Arber N**, Kuwada S, Leshno M, Sjudahl R, Hultcrantz R, Rex D: Sporadic adenomatous polyp regression with Exisulind is effective but toxic: a randomized, double-blind, placebo- controlled, dose-response study. *Gut*. 2005 Sep 8; [Epub ahead of print]
- Aul C**, Gattermann N, Schneider W. Age-related incidence and other epidemiological aspects of myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1992; 82: 358-67.
- Barltrop**, J.A. et al.(1991) 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazoly)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazoly)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple watersoluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 1, 611.
- Basu S**, Kolesnick R. Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase. *Oncogene* 1998; 17: 3277-85.
- Bauduer F**, Ducout L, Dastugue N, Capdupuy C, Renoux M. De novo and secondary acute myeloid leukemia in patients over the age of 65: a review of fifty-six successive and unselected cases from a general hospital. *Leuk Lymphoma*. 1999 Oct; 35(3-4): 289-96.
- Behringer B**, Pitako JA, Kunzmann R, Schmoor C, Behringer D, Mertelsmann R, Lubbert M. Prognosis of older patients with acute myeloid leukemia receiving either induction or noncurative treatment: a single-center retrospective study. *Ann Hematol*. 2003 Jul; 82(7):381-9. Epub 2003 May 20.
- Bennett BL**, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20; 98(24): 13681-6.
- Bennett J**: The World Health Organization (WHO) classification of the acute leukemias and the myelodysplastic syndromes. *Intern J Hematol* 2000; 72: 131–133.
- Bennett JM**, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C: Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982; 51: 189.
- Bernstein ID**, Andrew RG, Zsebo KM. Recombinant human stem cell factor enhances the formation of colonies by CD34+ and CD34+lin- cells, and the generation of colony-forming cell progeny from CD34+lin- cells cultured with

Interleukin-3, granulocyte colony-stimulating factor, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1991; 77: 2316-2321.

- Berridge**, M.V. and Tan, A.S. (1993) 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.* 303, 474–82.
- Bøyum** A (1968): Separation of leucocytes from blood and bone marrow. *Scand J. Clin. Lab. Invest.* 21, Suppl. 97.
- Bunn** PA Jr, Chan DC, Earle K, Zhao TL, Helfrich B, Kelly K, Piazza G, Whitehead CM, Pamukcu R, Thompson W, Alila H: Preclinical and clinical studies of docetaxel and exisulind in the treatment of human lung cancer. *Semin Oncol.* 2002 Feb; 29(1 Suppl 4): 87-94. Review.
- Campos** L, Guyotat D, Archimbaud E, Calmard-Oriol P, Tsuruo T, Troncy J, Treille D, Fiere D. Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis. *Blood.* 1992 Jan 15; 79(2): 473-6.
- Catenacci** DV, Schiller GJ. Myelodysplastic syndromes: a comprehensive review. *Blood Rev.* 2005 Nov; 19(6): 301-19.
- Chen** IT, Smith ML, O'Connor PM, Fornace AJ Jr. Direct interaction of Gadd45 with PCNA and evidence for competitive interaction of Gadd45 and p21Waf1/Cip1 with PCNA. *Oncogene* 1995; 11: 1931-7.
- Civin** CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* 1984 Jul; 133(1): 157-65.
- Cory**, A.H. et al.(1991) Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 3, 207–12.
- Cuschieri** J, Maier RV. Mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Crit Care Med.* 2005 Dec; 33(12 Suppl): S417-9. Review.
- Dai** Y, Rahmani M, Pei XY, Khanna P, Han SI, Mitchell C, Dent P, Grant S. Farnesyltransferase inhibitors interact synergistically with the Chk1 inhibitor UCN-01 to induce apoptosis in human leukemia cells through interruption of both Akt and MEK/ERK pathways and activation of SEK1/JNK. *Blood.* 2005 Feb 15;105(4):1706-16.
- Davis** PJ, Guenther LE. Sulindac oxidation/reduction by microbial cultures; microbial models of mammalian metabolism. *Xenobiotica*, 1985; 15: 845-57.
- De Smaele** E, Zazzeroni F, Papa S, Nguyen DU, Jin R, Jones J, Cong R, Franzoso G. Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature* 2001; 414: 308-13.

- de Witte T**, Hermans J, Vossen J, Bacigalupo A, Meloni G, Jacobsen N, Ruutu T, Ljungman P, Gratwohl A, Runde V, Niederwieser D, van Biezen A, Devergie A, Cornelissen J, Jouet JP, Arnold R, Apperley J: Haematopoietic stem cell transplantation for patients with myelo-dysplastic syndromes and secondary acute myeloid leukaemias: a report on behalf of the Chronic Leukaemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Br J Haematol.* 2000 Sep; 110(3): 620-30.
- de Witte T**, Suci S, Verhoef G, Labar B, Archimbaud E, Aul C, Selleslag D, Ferrant A, Wijermans P, Mandelli F, Amadori S, Jehn U, Muus P, Boogaerts M, Zittoun R, Gratwohl A, Zwierzina H, Hagemeyer A, Willemze R: Intensive chemotherapy followed by allogeneic or autologous stem cell transplantation for patients with myelodysplastic syndromes (MDSs) and acute myeloid leukemia following MDS. *Blood.* 2001 Oct 15; 98(8):2326-31.
- de Wynter EA**, Coutinho LH, Pei X, Marsh JCW, Hows J, Luft T, Testa NGF (1995): Comparison of Purity and Enrichment of CD34+ Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord and Peripheral Blood (Primed for Apheresis) Using Five Separation Systems. *Stem Cells* 13: 524-532. [144]
- Deguchi A**, Thompson WJ, Weinstein IB. Activation of protein kinase G is sufficient to induce apoptosis and inhibit cell migration in colon cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64: 3966-73.
- Deguchi A**, Xing SW, Shureiqi I, Yang P, Newman RA, Lippman SM, Feinmark SJ, Oehlen B, Weinstein IB. Activation of protein kinase G up-regulates expression of 15-lipoxygenase-1 in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 2005 Sep 15; 65(18): 8442-7.
- Denzlinger C**, Bowen D, Benz D, Gelly K, Brugger W, Kanz L: Low-dose melphalan induces favourable responses in elderly patients with high-risk myelodysplastic syndromes or secondary acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2000 Jan; 108(1): 93-5.
- Eaves CJ**: Assays of hematopoietic progenitor cells. *Williams Hematology*, 5 (eds. E Beutler, MA Lichtman, BS Coller, TJ Kipps), McGraw-Hill, Inc., pp L22-6, 1995
- Fenaux P**. Response assessments in low-risk and high-risk myelodysplastic syndromes (MDS). *Semin Oncol.* 2005 Aug; 32(4 Suppl 5): S11-5. Review.
- Frahm S**, Kurtz A, Kluwe L, Farassati F, Friedrich RE, Mautner VF. Sulindac derivatives inhibit cell growth and induce apoptosis in primary cells from malignant peripheral nerve sheath tumors of NF1-patients. *Cancer Cell Int.* 2004 May 17; 4(1): 4.
- Fukumoto JS**, Greenberg PL: Management of patients with higher risk myelodysplastic syndromes. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005 Nov; 56(2): 179-92.
- Galmarini CM**: OSI-461 (OSI). *Curr Opin Investig Drugs.* 2004 Jun; 5(6): 648-56. Review.

- Garcia AA, Iqbal S, Quinn D, Edwards S, Lenz HJ, Weber J.** Phase I clinical trial of weekly docetaxel and exisulind, a novel inducer of apoptosis. *Invest New Drugs*. 2005 Nov 8; [Epub ahead of print]
- Germing U, Gattermann N, Strupp C, Aivado M, Aul C.** Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients. *Leuk Res*. 2000 Dec; 24(12): 983-92.
- Giagounidis AAN, Germing U, Heinsch M, Schroeder M, Aul C:** Heterogeneity of the 5q- anomaly: Results of a retrospective single-institution study of 32 patients. *Onkologie* 2000, 23: (Suppl 1) A122.
- Goluboff ET, Prager D, Rukstalis D, Giantonio B, Madorsky M, Barken I, Weinstein IB, Partin AW, Olsson CA; UCLA Oncology Research Network:** Safety and efficacy of exisulind for treatment of recurrent prostate cancer after radical prostatectomy. *J Urol*. 2001 Sep; 166(3): 882-6.
- Goluboff ET:** Exisulind, a selective apoptotic antineoplastic drug. *Expert Opin Investig Drugs*. 2001 Oct; 10(10): 1875-82. Review.
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J:** International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89: 2079.
- Griffiths GJ:** Exisulind Cell Pathway. *Curr Opin Investig Drugs*. 2000 Nov; 1(3): 386-91. Review.
- Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, Davis RJ.** Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J*. 1996 Jun 3; 15(11): 2760-70.
- Haanen C:** Sulindac and its derivatives: a novel class of anticancer agents. *Curr Opin Investig Drugs*. 2001 May; 2(5): 677-83. Review.
- Hambleton J, Weinstein SL, Lem L, DeFranco AL.** Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 2; 93(7): 2774-8.
- Hammaker DR, Boyle DL, Chabaud-Riou M, Firestein GS.** Regulation of c-Jun N-terminal kinase by MEKK-2 and mitogen-activated protein kinase kinases in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2004; 172: 1612-8.
- Han EK, Arber N, Yamamoto H, Lim JT, Delohery T, Pamukcu R, Piazza GA, Xing WQ, Weinstein IB:** Effects of sulindac and its metabolites on growth and apoptosis in human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines. *Breast Cancer Res Treat*. 1998 Apr; 48(3): 195-203.
- Harris R & Ukayiofo EV (1969):** Rapid preparation for lymphocytes for tissue typing. *Lancet* 327, 7615.

- Hasegawa D**, Manabe A, Kubota T, Kawasaki H, Hirose I, Ohtsuka Y, Tsuruta T, Ebihara Y, Goto Y, Zhao XY, Sakashita K, Koike K, Isomura M, Kojima S, Hoshika A, Tsuji K: Methylation status of the p15 and p16 genes in paediatric myelodysplastic syndrome and juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2005 Mar; 128(6):805-12.
- Heaney ML**, Golde DW: Myelodysplasia. *N Engl J Med.* 1999 May 27; 340(21):1649-60. Review.
- Hellstrom-Lindberg E**, Gulbrandsen N, Lindberg G, Ahlgren T, Dahl IM, Dybedal I, Grimfors G, Hesse-Sundin E, Hjorth M, Kanter-Lewensohn L, Linder O, Luthman M, Lofvenberg E, Oberg G, Porwit-MacDonald A, Radlund A, Samuelsson J, Tangen JM, Winquist I, Wisloff F; Scandinavian MDS Group: A validated decision model for treating the anaemia of myelodysplastic syndromes with erythropoietin + granulocyte colony-stimulating factor: significant effects on quality of life. *Br J Haematol.* 2003 Mar;120(6):1037-46.
- Hirai H**: Molecular pathogenesis of MDS. *Int J Hematol.* 2002 Aug; 76 Suppl 2:213-21. Review.
- Hosokawa Y**, Kawaguchi R, Hikiji K, Yamada M, Suzuki K, Nakagawa T, Yoshihara T, Yamaguchi K. Cloning and characterization of four types of cDNA encoding myeloperoxidase from human monocytic leukemia cell line, SKM-1. *Leukemia.* 1993 Mar; 7(3): 441-5.
- Hu MC**, Qiu WR, Wang YP. JNK1, JNK2 and JNK3 are p53 N-terminal serine 34 kinases. *Oncogene.* 1997 Nov 6; 15(19): 2277-87.
- Jabbour EJ**, Giles FJ. New agents in myelodysplastic syndromes. *Curr Hematol Rep.* 2005 May; 4(3): 191-9. Review.
- Joe AK**, Liu H, Xiao D, Soh JW, Pinto JT, Beer DG, Piazza GA, Thompson WJ, Weinstein IB. Exisulind and CP248 induce growth inhibition and apoptosis in human esophageal adenocarcinoma and squamous carcinoma cells. *J Exp Ther Oncol.* 2003 Mar-Apr; 3(2): 83-94.
- Kanter-Lewensohn L**, Hellstrom-Lindberg E, Kock Y, Elmhorn-Rosenborg A, Ost A. Analysis of CD34-positive cells in bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia and in normal individuals: a comparison between FACS analysis and immunohistochemistry. *Eur J Haematol* 1996; 56: 124-9.
- Kawaguchi R**, Hosokawa Y, Komine A, Tsutsumi M, Hikiji K, Ishida-Okawara A, Suzuki K, Nakagawa T, Yamaguchi K. The monocytic cell line SKM-1 strongly expresses the myeloperoxidase gene. *Leukemia.* 1992 Dec; 6(12): 1296-301.
- Kim KP**, Whitehead C, Piazza G, Wargovich MJ: Combinatorial chemoprevention: efficacy of lovostatin and exisulind on the formation and progression of aberrant crypt foci. *Anticancer Res.* 2004 May-Jun; 24(3a): 1805-11.

- Koeffler HP, Golde DW.** Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science*. 1978 Jun 9; 200(4346): 1153-4.
- Koeffler HP, Golde DW.** Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood*. 1980 Sep; 56(3): 344-50. Review.
- Kurotaki H, Tsushima Y, Nagai K, Yagihashi S.** Apoptosis, bcl-2 expression and p53 accumulation in myelodysplastic syndrome, myelodysplastic-syndrome-derived acute myelogenous leukemia and de novo acute myelogenous leukemia. *Acta Haematol*. 2000; 102(3): 115-23.
- Laemmli UK:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
- Lansdorp PM, Dragowska W.** Long-term erythropoiesis from constant numbers of CD34+ cells in serum-free cultures initiated with highly purified progenitor cells from human bone marrow. *J Exp Med* 175:1501-1509, 1992.
- Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, Eijdens L, Slovak ML, McConnell TS, Head DR, Weick J, Grever MR, Appelbaum FR, Willman CL.** Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood*. 1999 Aug 1; 94(3): 1086-99.
- Leone G, Teofili L, Voso MT, Lubbert M:** DNA methylation and demethylating drugs in myelodysplastic syndromes and secondary leukemias. *Haematologica*. 2002 Dec; 87(12): 1324-41. Review.
- Li H, Liu L, David ML, Whitehead CM, Chen M, Fetter JR, Spertl GJ, Pamukcu R, Thompson WJ:** Pro-apoptotic actions of exisulind and CP461 in SW480 colon tumor cells involve beta-catenin and cyclin D1 down-regulation. *Biochem Pharmacol*. 2002 Nov 1; 64(9): 1325-36.
- Lim JT, Piazza GA, Han EK, Delohery TM, Li H, Finn TS, Buttyan R, Yamamoto H, Spertl GJ, Brendel K, Gross PH, Pamukcu R, et al.** Sulindac derivatives inhibit growth and induce apoptosis in human prostate cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 1999; 58: 1097-107.
- Lim JT, Piazza GA, Pamukcu R, Thompson WJ, Weinstein IB:** Exisulind and related compounds inhibit expression and function of the androgen receptor in human prostate cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2003 Oct 15; 9(13): 4972-82.
- List A, Beran M, DiPersio J, Slack J, Vey N, Rosenfeld CS, Greenberg P.** Opportunities for Trisenox (arsenic trioxide) in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 2003; 17: 1499-507.
- List AF, Spier CS, Grogan TM, Johnson C, Roe DJ, Greer JP, Wolff SN, Broxterman HJ, Scheffer GL, Scheper RJ, Dalton WS.** Overexpression of the major vault transporter protein lung-resistance protein predicts treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Blood*. 1996 Mar 15; 87(6): 2464-9.

- Liu** JJ, Wang JY, Hertervig E, Nilsson A, Duan RD. Sulindac induces apoptosis, inhibits proliferation and activates caspase-3 in Hep G2 cells. *Anticancer Res.* 2002 Jan-Feb; 22(1A): 263-6.
- Lubbert** M, Wijermans P, Kunzmann R, Verhoef G, Bosly A, Ravoet C, Andre M, Ferrant A: Cytogenetic responses in high-risk myelodysplastic syndrome following low-dose treatment with the DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. *Br J Haematol.* 2001 Aug; 114(2): 349-57.
- Lubbert** M, Jonas D, Miller CW, Herrmann F, Mertelsmann R, McCormick F, Koeffler HP. Retrospective analysis of ras gene activation in myeloid leukemic cells. *Oncogene.* 1990 Apr; 5(4): 583-7.
- Mahmoud** NN, Boolbol SK, Dannenberg AJ, Mestre JR, Bilinski RT, Martucci C, Newmark HL, Chadburn A, Bertagnolli MM: The sulfide metabolite of sulindac prevents tumors and restores enterocyte apoptosis in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis.* 1998 Jan; 19(1): 87-91.
- Massa** M, Rosti V, Ramajoli I, Campanelli R, Pecci A, Viarengo G, Meli V, Marchetti M, Hoffman R, Barosi G. Circulating CD34+, CD 133+, and vascular endothelial growth factor receptor-2 positive endothelial progenitor cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J Clin Onco.* 2005; 23(24): 5688-95.
- Masuya** M, Kita K, Shimizu N, Ohishi K, Katayama N, Sekine T, Otsuji A, Miwa H, Shirakawa S. Biologic characteristics of acute leukemia after myelodysplastic syndrome. *Blood.* 1993 Jun 15;81(12):3388-94.
- Maudrell** K, Antonsson B, Magnenat E, Camps M, Muda M, Chabert C, Gillieron C, Boschert U, Vial-Knecht E, Martinou JC, Arkinstall S: Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1. *J Biol Chem.* 1997 Oct 3; 272(40): 25238-42.
- Miller** KB, Kim K, Morrison FS, Winter JN, Bennett JM, Neiman RS, Head DR, Cassileth PA, O'Connell MJ: The evaluation of low-dose cytarabine in the treatment of myelodysplastic syndromes: a phase-III intergroup study. *Ann Hematol.* 1992 Oct;65(4):162-8. Erratum in: *Ann Hematol* 1993 Mar; 66(3): 164.
- Misawa** S, Horiike S, Kaneko H, Kashima K: Genetic aberrations in the development and subsequent progression of myelodysplastic syndrome. *Leukemia.* 1997 Apr;11 Suppl 3:533-5.
- Mita** H, Tsutsui J, Takekawa M, Witten EA, Saito H. Regulation of MTK1/MEKK4 kinase activity by its N-terminal autoinhibitory domain and GADD45 binding. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 4544-55.
- Moon** EY, Lerner A. Benzylamide sulindac analogues induce changes in cell shape, loss of microtubules and G(2)-M arrest in a chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell line and apoptosis in primary CLL cells. *Cancer Res.* 2002 Oct 15; 62(20): 5711-9.

- Morel P, Hebbar M, Lai JL:** Cytogenetic analysis has a strong independent prognostic value in de novo myelodysplastic syndromes and can be incorporated in a new scoring system: a report on 408 cases. *Leukemia* 1993; 7: 1315.
- Mosmann, T.** (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Nakagawa T, Saitoh S, Imoto S, Itoh M, Tsutsumi M, Hikiji K, Nakao Y, Fujita T.** Loss of multiple point mutations of RAS genes associated with acquisition of chromosomal abnormalities during disease progression in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 1991 Feb; 77(2): 250-2.
- Narayanan BA, Narayanan NK, Pittman B, Reddy BS.** Regression of mouse prostatic intraepithelial neoplasia by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the transgenic adenocarcinoma mouse prostate model. *Clin Cancer Res.* 2004 Nov 15; 10(22): 7727-37.
- Nicol, A; Nieda, M; Donaldson, C; Denning-Kendall, P; Bradley, B; Hows, J** (1995) Analysis of Cord Blood CD34 Cells Purified After Cryopreservation. *Exp. Hematology* 23: 1589-1549. [173]
- Nishina H, Wada T, Katada T.** Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway. *J Biochem (Tokyo).* 2004 Aug; 136(2): 123-6. Review.
- Niu C, Yan H, Yu T, Sun HP, Liu JX, Li XS, Wu W, Zhang FQ, Chen Y, Zhou L, Li JM, Zeng XY, et al.** Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: remission induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients. *Blood* 1999; 94: 3315-24.
- Ollivier V, Parry GC, Cobb RR, de Prost D, Mackman N.** Elevated cyclic AMP inhibits NF-kappaB-mediated transcription in human monocytic cells and endothelial cells. *J Biol Chem.* 1996 Aug 23; 271(34): 20828-35.
- Omoto E, Deguchi S, Takaba S, Kojima K, Yano T, Katayama Y, Sunami K, Takeuchi M, Kimura F, Harada M, Kimura I:** Low-dose melphalan for treatment of high-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 1996 Apr; 10(4): 609-14.
- Oosterveld M, de Witte T:** Intensive treatment strategies in patients with high-risk myelodysplastic syndrome and secondary acute myeloid leukemia. *Blood Rev.* 2000 Dec; 14(4): 182-9. Review.
- Padua RA, Guinn BA, Al-Sabah AI, Smith M, Taylor C, Pettersson T, Ridge S, Carter G, White D, Oscier D, Chevret S, West R:** RAS, FMS and p53 mutations and poor clinical outcome in myelodysplasias: a 10-year follow-up. *Leukemia.* 1998 Jun; 12(6): 887-92.
- Parmar S, Rundhaugen LM, Boehlke L, Riley M, Nabhan C, Raji A, Frater JL, Tallman MS.** Phase II trial of arsenic trioxide in relapsed and refractory acute

- myeloid leukemia, secondary leukemia and/or newly diagnosed patients at least 65 years old. *Leuk Res.* 2004 Sep; 28(9): 909-19.
- Penrose** JF, Spector J, Baldasaro M, Xu K, Boyce J, Arm JP, Austen KF, Lam BK. Molecular cloning of the gene for human leukotriene C4 synthase. Organization, nucleotide sequence, and chromosomal localization to 5q35. *J Biol Chem.* 1996 May 10; 271(19): 11356-61.
- Petzer** AL, Hogge DE, Lansdorp PM, Reid DS, Eaves CJ. Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long term culture-initiating cells) in vitro and their expansion in defined medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1470-1474, 1996.
- Piazza** GA, Alberts DS, Hixson LJ, Paranka NS, Li H, Finn T, Bogert C, Guillen JM, Brendel K, Gross PH, Sperl G, Ritchie J, et al. Sulindac sulfone inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats without reducing prostaglandin levels. *Cancer Res* 1997; 57: 2909-15.
- Piazza** GA, Thompson WJ, Pamukcu R, Alila HW, Whitehead CM, Liu L, Fetter JR, Gresh WE Jr, Klein-Szanto AJ, Farnell DR, Eto I, Grubbs CJ. Exisulind, a novel proapoptotic drug, inhibits rat urinary bladder tumorigenesis. *Cancer Res.* 2001 May 15; 61(10): 3961-8.
- Pusztai** L, Zhen JH, Arun B, Rivera E, Whitehead C, Thompson WJ, Nealy KM, Gibbs A, Symmans WF, Esteva FJ, Booser D, Murray JL, Valero V, Smith TL, Hortobagyi GN: Phase I and II study of exisulind in combination with capecitabine in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2003 Sep 15; 21(18): 3454-61.
- Rahman** MA, Dhar DK, Masunaga R, Yamanoi A, Kohno H, Nagasue N. Sulindac and exisulind exhibit a significant antiproliferative effect and induce apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 2000 Apr 15; 60(8): 2085-9.
- Raspadori** D, Lauria F, Ventura MA, Rondelli D, Visani G, de Vivo A, Tura S. Incidence and prognostic relevance of CD34 expression in acute myeloblastic leukemia: analysis of 141 cases. *Leuk Res.* 1997 Jul; 21(7): 603-7.
- Ratner** M. Cancer pathways' target not validated by clinical results. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 220.
- Ray** GF, Lanman RC, Fu CJ, Paranka NS, Pamukcu R, Wheeler SC. Determination of FGN-1 (an active metabolite of sulindac) in human plasma, urine, and feces by HPLC. *J Pharm Biomed Anal.* 1995 Dec; 14(1-2): 213-20.
- Raza** A, Meyer P, Dutt D, Zorat F, Lisak L, Nascimben F, du Randt M, Kaspar C, Goldberg C, Loew J, Dar S, Gezer S, et al. Thalidomide produces transfusion independence in long-standing refractory anemias of patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 2001; 98: 958-65.
- Raza** A. Anti-TNF therapies in rheumatoid arthritis, Crohn's disease, sepsis, and myelodysplastic syndromes. *Microsc Res Tech* 2000; 50: 229-35.

- Rice** PL, Kelloff J, Sullivan H, Driggers LJ, Beard KS, Kuwada S, Piazza G, Ahnen DJ: Sulindac metabolites induce caspase- and proteasome-dependent degradation of beta-catenin protein in human colon cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2003 Sep; 2(9): 885-92.
- Riss**, T.L. and Moravec, R.A. (1993) Comparison of MTT, XTT, and a novel tetrazolium compound for MTS for in vitro proliferation and chemosensitivity assays. *Mol. Biol. Cell (Suppl.)*3, 184a.
- Rosenfeld** C, Kantarjian H. Is myelodysplastic related acute myelogenous leukemia a distinct entity from de novo acute myelogenous leukemia? Potential for targeted therapies. *Leuk Lymphoma.* 2001 May; 41(5-6): 493-500. Review.
- Ryan** CW, Stadler WM, Vogelzang NJ: Docetaxel and exisulind in hormone-refractory prostate cancer. *Semin Oncol.* 2001 Aug;28(4 Suppl 15):56-61.
- Satterthwaite** AB, Borson R, Tenen DG. Regulation of the gene for CD34, a human hematopoietic stem cell antigen, in KG-1 cells. *Blood.* 1990 Jun 15; 75(12): 2299-304.
- Selleri** C, Sato T, Raiola AM, Rotoli B, Young NS, Maciejewski JP. Induction of nitric oxide synthase is involved in the mechanism of Fas-mediated apoptosis in haemopoietic cells. *Br J Haematol.* 1997 Dec; 99(3): 481-9.
- Shureiqi** I, Chen D, Lotan R, Yang P, Newman RA, Fischer SM, Lippman SM: 15-Lipoxygenase-1 mediates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis independently of cyclooxygenase-2 in colon cancer cells. *Cancer Res.* 2000 Dec 15; 60(24): 6846-50.
- Silverman** LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, Stone RM, Nelson D, Powell BL, DeCastro CM, Ellerton J, Larson RA, Schiffer CA, Holland JF: Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol.* 2002 May 15;20(10):2429-40.
- Singer** AL, Sherwin RP, Dunn AS, Appleman MM. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in neoplastic and nonneoplastic human mammary tissues. *Cancer Res* 1976; 3660-6.
- Soh** JW, Mao Y, Kim MG, Pamukcu R, Li H, Piazza GA, Thompson WJ, Weinstein IB: Cyclic GMP mediates apoptosis induced by sulindac derivatives via activation of c-Jun NH2-terminal kinase 1. *Clin Cancer Res.* 2000 Oct;6(10):4136-41. Erratum in: *Clin Cancer Res* 2000 Dec; 6(12): 4967.
- Soh** JW, Mao Y, Liu L, Thompson WJ, Pamukcu R, Weinstein IB: Protein kinase G activates the JNK1 pathway via phosphorylation of MEKK1. *J Biol Chem.* 2001 May 11; 276(19): 16406-10. Epub 2001 Mar 14.

- Steensma DP, Tefferi A:** The myelodysplastic syndrome(s): a perspective and review highlighting current controversies. *Leuk Res.* 2003 Feb; 27(2): 95-120. Review.
- Stoner GD, Budd GT, Ganapathi R, DeYoung B, Kresty LA, Nitert M, Fryer B, Church JM, Provencher K, Pamukcu R, Piazza G, Hawk E, Kelloff G, Elson P, van Stolk RU.:** Sulindac sulfone induced regression of rectal polyps in patients with familial adenomatous polyposis. *Adv Exp Med Biol.* 1999; 470: 45-53.
- Strupp C, Germing U, Aivado M, Misgeld E, Haas R, Gattermann N.** Thalidomide for the treatment of patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2002; 16: 1-6.
- Tenen DG, Satterthwaite AB, Borson R, Simmons D, Eddy RL, Shows TB.** Chromosome 1 localization of the gene for CD34, a surface antigen of human stem cells. *Cytogenet Cell Genet.* 1990; 53(1): 55-7.
- Thiele, J; Wickenhauser, C; Baldus, SE; Kuemmel, T; Zirbes, TK; Drebber, U; Wirtz, R; Thiel, A; Hansmann, ML (1995)** Characterization of CD34+ Human Hematopoietic Progenitor Cells from the Peripheral Blood: Enzyme-, Carbohydrate- and Immunocytochemistry, Morphometry, and Ultrastructure. *Leuk. Lymph.* 16: 483-491. [143]
- Thompson HJ, Briggs S, Paranka NS, Piazza GA, Brendel K, Gross PH, Sperl GJ, Pamukcu R, Ahnen DJ:** Inhibition of mammary carcinogenesis in rats by sulfone metabolite of sulindac. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Aug 16; 87(16): 1259-60.
- Thompson HJ, Jiang C, Lu J, Mehta RG, Piazza GA, Paranka NS, Pamukcu R, Ahnen DJ.** Sulfone metabolite of sulindac inhibits mammary carcinogenesis. *Cancer Res.* 1997 Jan 15; 57(2): 267-71.
- Thompson WJ, Piazza GA, Li H, Liu L, Fetter J, Zhu B, Sperl G, Ahnen D, Pamukcu R.** Exisulind induction of apoptosis involves guanosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase inhibition, protein kinase G activation, and attenuated beta-catenin. *Cancer Res* 2000; 60: 3338-42.
- Thorsby E & Bratlie A (1970):** A rapid method for preparation of pure lymphocyte suspensions. *Histocompatibility Testing 1970*, ed. P.I. Terasaki, p. 655 Munksgaard, Copenhagen.
- Tindle RW, Nichols RA, Chan L, Campana D, Catovsky D, Birnie GD.** A novel monoclonal antibody BI-3C5 recognises myeloblasts and non-B non-T lymphoblasts in acute leukaemias and CGL blast crises, and reacts with immature cells in normal bone marrow. *Leuk Res.* 1985; 9(1): 1-9.
- Ting A & Morris PJ (1971):** A technique for lymphocyte preparation from stored heparinized blood. *Vox Sang.* 20, 561.
- Toyama K, Ohyashiki K, Yoshida Y, Abe T, Asano S, Hirai H, Hirashima K, Hotta T, Kuramoto A, Kuriya S, Miyazaki T, Kakishita E, Mizogushi H, Okada M, Shirakawa S, Takaku F, Tomonaga M, Uchino H, Yasanuga K, Nomura T:** Clinical

- implication of chromosomal abnormalities in 401 patients with myelodysplastic syndromes: a multicentric study in Japan. *Leukemia* 1993; 7: 499.
- Tsuchiya S**, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, Tada K. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* 1982 Apr; 42(4): 1530-6.
- Tsuchiya S**, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer.* 1980 Aug; 26(2): 171-6.
- Uchida T**, Kinoshita T, Nagai H, Nakahara Y, Saito H, Hotta T, Murate T: Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1997 Aug 15;90(4):1403-9.
- van Dijk JP**, de Witte T. Monitoring treatment efficiency in MDS at the molecular level; possibilities now and in the future. *Leuk Res* 2004; 28: 101-8.
- van Stolk R**, Stoner G, Hayton WL, Chan K, DeYoung B, Kresty L, Kemmenoe BH, Elson P, Rybicki L, Church J, Provencher K, McLain D, Hawk E, Fryer B, Kelloff G, Ganapathi R, Budd GT: Phase I trial of exisulind (sulindac sulfone, FGN-1) as a chemopreventive agent in patients with familial adenomatous polyposis. *Clin Cancer Res.* 2000 Jan; 6(1): 78-89.
- Vey N**. Arsenic trioxide for the treatment of myelodysplastic syndromes. *Expert Opin Pharmacother* 2004; 5: 613-21.
- Vogt T**, McClelland M, Jung B, Popova S, Bogenrieder T, Becker B, Rumpler G, Landthaler M, Stolz W: Progression and NSAID-induced apoptosis in malignant melanomas are independent of cyclooxygenase II. *Melanoma Res.* 2001 Dec; 11(6): 587-99.
- Warren MK**, Rose WL, Beall LD, Cone J. CD34+ cell expansion and expression of lineage markers during liquid culture of human progenitor cells. *Stem Cells.* 1995 Mar; 13(2): 167-74.
- Whitehead CM**, Earle KA, Fetter J, Xu S, Hartman T, Chan DC, Zhao TL, Piazza G, Klein-Szanto AJ, Pamukcu R, Alila H, Bunn PA Jr, Thompson WJ. Exisulind-induced apoptosis in a non-small cell lung cancer orthotopic lung tumor model augments docetaxel treatment and contributes to increased survival. *Mol Cancer Ther.* 2003 May; 2(5): 479-88.
- Wilfinger WW**, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques.* 1997 Mar; 22(3): 474-6, 478-81.
- Witta SE**, Gustafson DL, Pierson AS, Menter A, Holden SN, Basche M, Persky M, O'Bryant CL, Zeng C, Baron A, Long ME, Gibbs A, Kelly K, Bunn PA Jr, Chan DC, Pallansch P, Eckhardt SG: A phase I and pharmacokinetic study of exisulind and docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2004 Nov 1; 10(21): 7229-37.

- Xu D**, Arestrom I, Virtala R, Pisa P, Peterson C, Gruber A. High levels of lung resistance related protein mRNA in leukaemic cells from patients with acute myelogenous leukaemia are associated with inferior response to chemotherapy and prior treatment with mitoxantrone. *Br J Haematol*. 1999 Sep; 106(3): 627-33.
- Yamamoto K**, Ichijo H, Korsmeyer SJ: BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol*. 1999 Dec; 19(12): 8469-78.
- Yin F**, Bruemmer D, Blaschke F, Hsueh WA, Law RE, Herle AJ. Signaling pathways involved in induction of GADD45 gene expression and apoptosis by troglitazone in human MCF-7 breast carcinoma cells. *Oncogene* 2004;23:4614-23.
- Yin**, AH; Miraglia, S; Zanjani, ED; Almeida-Porada, G; Ogawa, M; Leary, AG; Olweus, J; Kearney, J; Buck, DW. (1997). AC133, A Novel Marker For Human Hematopoietic Stem And Progenitor Cells. *Blood* 90: 5002-5012. [383]
- Zhang Y**, Dawson MI, Ning Y, Polin L, Parchment RE, Corbett T, Mohamed AN, Feng KC, Farhana L, Rishi AK, Hogge D, Leid M, Peterson VJ, Zhang XK, Mohammad R, Lu JS, Willman C, VanBuren E, Biggar S, Edelstein M, Eilender D, Fontana JA. Induction of apoptosis in retinoid-refractory acute myelogenous leukemia by a novel AHPN analog. *Blood*. 2003 Nov 15; 102(10): 3743-52.
- Zerbini LF**, Wang Y, Cho JY, Libermann, TA. Constitutive activation of nuclear factor kappaB p50/p65 and Fra-1 and JunD is essential for deregulated interleukin 6 expression in prostate cancer. *Cancer Res*, 2003; 63: 2206-15.
- Zerbini LF**, Wang Y, Czibere A, Correa RG, Cho JY, Ijiri K, Wei W, Joseph M, Gu X, Grall F, Goldring MB, Zhou J.R, et al. NF-kappa B-mediated repression of growth arrest- and DNA-damage-inducible proteins 45alpha and gamma is essential for cancer cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 13618-23.
- Zhu B**, Vemavarapu L, Thompson WJ, Strada SJ. Suppression of cyclic GMP-specific phosphodiesterase 5 promotes apoptosis and inhibits growth in HT29 cells. *J Cell Biochem*. 2005 Feb 1; 94(2): 336-50.

8. Abkürzungsverzeichnis

ALIP	<i>Abnormal localizaisation of immature progenitors</i>
AML	Akute myeloische Leukämie
AP-1	Aktivator Protein 1
ATP	Adenosin-Triphosphat
BSA	Rinderserum-Albumin
CFU	<i>Colony forming unit</i>
cGMP-PDE	zyklisches Guanosinmonophosphat abhängige Phosphodiesterase
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
COX	Cyclooxygenase
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
EPO	Erythropoetin
FAB	<i>French American British</i>
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	Fetales Rinderserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G-CSF	Granulozytenkolonie-Stimulierungsfaktor
GMP	Guanosin-Monophosphat
HSCT	Hämatopoietische Stammzell-Transplantation
HSZ	Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzelle
IPSS	<i>International prognostic score system</i>
JNK	c-jun NH ₂ -terminale Kinase
KG-1	sAML/MDS Zelllinie
KM	Knochenmark
MAP	Mitogen-aktivierte Protein
MDS	Myelodysplastische Syndrome
MEKK-1	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase 1
min.	Minute
MPNST	Maligne periphere Nervenscheidentumore
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum
NSCLC	Nichtkleinzelliges Bronchialzellkarzinom
PB	Peripheres Blut
PBMNC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PKG	Proteinkinase G
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RA	Refraktäre Anämie
RAEB	Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss
RARS	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
RNA	Ribonukleinsäure
RRP	Radikale Prostatektomie

SAAND	Selektive apoptotische anti-neoplastische Medikamente
sAML	Sekundäre akute myeloische Leukämie
sAML/MDS	Sekundäre akute myeloische Leukämie, hervorgegangen aus myelodysplastischen Syndromen
siRNA	small interfering RNA
SCLC	Kleinzelliges Bronchialzellkarzinom
SEK	Streß-aktivierten Protein Kinase 1
SKM-1	sAML/MDS Zelllinie
STABW	Standardabweichung
THP-1	De-novo AML Zelllinie
U/min.	Umdrehungen pro Minute
VASP	Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein
WHO	Welt-Gesundheitsorganisation

9. Danksagung

Ich danke allen Menschen und Umständen, die zum Zustandekommen, der weiteren Entwicklung und dem erfolgreichen Abschluß dieser Arbeit beigetragen haben. Ich empfinde auch tiefste Dankbarkeit für all diejenigen, die mich während dieser Zeit neben der Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Norbert Gattermann für die warmherzige Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die professionelle Führung durch diese Dissertation.

Meine tiefste Dankbarkeit gilt Herrn Dr. med. Manuel Aivado, der mich und meine Arbeit beständig gefördert hat, mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mir in all den Jahren der Zusammenarbeit ein enger Freund geworden ist.

Herrn Prof. Dr. Rainer Haas danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie. Er hat als Direktor dieser Klinik ein in hohem Maße inspirierendes wissenschaftliches Umfeld geschaffen und mit großem Interesse die Entwicklung dieser Arbeit verfolgt.

Sehr zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Dr. Franck Grall PharmD PhD, der mir mit viel Hingabe die Welt der Grundlagenforschung und Transkriptionsfaktoren näher brachte. Er war stets darauf bedacht, meinen methodischen Horizont zu erweitern und meinen wissenschaftlichen Sachverstand zu schärfen.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Towia A. Libermann, PhD für die Möglichkeit danken, in seinem ausnehmend stimulierenden Umfeld wissenschaftlich arbeiten zu dürfen.

Ich danke Herrn PD Dr. med. Ulrich Germing für seine ständige Hilfsbereitschaft.

Ich danke Frau Dr. med. Corinna Strupp. Sie hatte initial für das Zustandekommen der Arbeitsgruppe und die daraus erwachsene erfreuliche Entwicklung Sorge getragen.

10. Lebenslauf

Personalien

Name: Wolf Christian Prall
 Adresse: Angerstr. 37, 40593 Düsseldorf
 Geburtstag: 31.03.1977
 Geburtsort: Heidelberg
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

1983 – 1987 Gemeinschaftsgrundschule Garatherstraße, Düsseldorf

1987 – 1997 Annette-von-Droste-Hülshoff Gymnasium, Düsseldorf

1994 – 1997 Erster Schülersprecher des Annette-von-Droste-Hülshoff Gymnasiums, Düsseldorf

Juni 1997 Abitur

1997 – 1998 Grundwehrdienst beim 2. Gebirgsjägerbataillon 231, Bad Reichenhall (W 10)

1998 – 2005 Ordentlicher Student der Humanmedizin an der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf (HHU Düsseldorf)

2000 Ärztliche Vorprüfung

seit 2001 Doktorand an der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie, HHU Düsseldorf

2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulatur: Pädiatrische Abteilung des Whittington Hospitals, London, Großbritannien

Studentische Hilfskraft am Institut für Anatomie, HHU Düsseldorf

2002 Studentische Hilfskraft am Institut für Pathologie, HHU Düsseldorf

Famulatur: Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie, HHU Düsseldorf

Famulatur: Labor für molekulare Hämatologie, Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie, HHU Düsseldorf

Famulatur: Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie, Charité, Universitätsklinikum der Humboldt-Universität, Berlin

2003

Gynäkologisches Praktikum, Klinikum Neukölln, Berlin

Hausärztliches Praktikum in Klausen, Italien

Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. T. A. Libermann am BIDMC Genomics Center, Harvard Medical School, Boston, MA, USA (sechsmonatiges „visiting research fellowship“)

2004

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2004 / 2005

Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Düsseldorf UKD

14.6.2005

Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

29.6.2005

Approbation

Beruf

Seit 1.7.2005

Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie, HHU Düsseldorf

Drittmittel

2005

Stiftung für Altersforschung, Prof. Dr. G. Strohmeyer, HHU Düsseldorf (Vorhaben-Nr.: 701 800 417)

Publikationen (Manuskripte)

Prali WC*, Czibere A*, Zerbini LF, Grall F, Craigie EC, Ulrich SD, Giagounidis AAN, Haas R, Libermann TA, Aivado M. The Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Exisulind Selectively Induces Apoptosis via JNK in Secondary Acute Myeloid Leukemia after Myelodysplastic Syndrome. *Cell Cycle*, Juni 2005, *) geteilte Erstautorenschaft

Grall FT, **Prali WC**, Wei W, Gu X, Cho JY, Choy BK, Zerbini LF, Inan MS, Goldring SR, Gravallesse EM, Goldring MB, Oettgen P, Libermann TA. The Ets transcription factor ESE-1 mediates induction of the COX-2 gene by LPS in monocytes. *FEBS J.*, April 2005, 272(7): 1676-87

Aivado M, Spentzos D, Alterovitz G, Otu HH, Grall F, Giagounidis AAN, Wells M, Cho JY, Germing U, Czibere A, **Prali WC**, Porter C, Ramoni MF, Libermann TA. Optimization and evaluation of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS) with reversed-phase protein arrays for protein profiling. *Clin Chem Lab Med.* 2005; 43(2):133-40

Aivado M, Spentzos D, Germing U, Meng XY, Grall F, Giagounidis AAN, Klement G, Steidl U, Otu HH, Iking-Konert C, Czibere A, **Prali WC**, Shayne M, Gattermann N, Mitsiades CS, Haas R, Fung ET, Libermann TA. A serum proteome profile detects myelodysplastic syndromes. [Manuskript wurde zur Publikation eingereicht bei PNAS, Dezember 2005]

Kongressbeiträge (Poster)

Prali WC, Czibere A, Aivado M, Grall F, Giagounidis AAN, Junge B, Otu HH, Libermann TA, Gattermann N, Germing U, Haas R. IEX-1-RNA and protein levels are decreased in CD34+ bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndrome. 8th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes, Nagasaki, Japan, Mai 2005

Prali WC, Czibere A, Zerbini LF, Grall F, Craigie EC, Ulrich SD, Giagounidis AAN, Haas R, Libermann TA and Aivado M. Das nicht-steroidale Antiphlogistikum Exisulind induziert über die Phosphorylierung der c-jun Kinase selektiv die Apoptose in sAML/MDS-Zellen. Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses, HHU Düsseldorf, Juni 2005

Czibere A, **Prali WC**, Zerbini LF, Haas R, Libermann TA, and Aivado M. Exisulind selectively induces apoptosis via c-Jun NH2-terminal kinase activation in sAML/MDS. 8th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes, Nagasaki, Japan, Mai 2005

Czibere A, Zerbini LF, **Prali WC**, Haas R, Libermann TA. Die durch nicht-steroidale Antiphlogistika vermittelten proliferationshemmenden Effekte auf Krebszellen sind

abhängig von der Aktivierung der GADD45 Gene. Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses, HHU Düsseldorf, Juni 2005

Grall FT, Wei W, Gu X, **Prali WC**, Cho JY, Choy BK, Zerbini LF, Inan MS, Goldring SR, Gravallesse EM, Goldring MB, Oettgen P, Libermann TA. Regulation of the Inducible COX-2 gene in monocytic cells by the Ets transcription factor ESE-1. Research Day, BIDMC, Boston, MA, USA, Oktober 2003

Aivado M, Spentzos D, Alterovitz G, Grall F, Out HH, **Prali WC**, Czibere A, Cho JY, Ramoni MF, Haas R, Libermann TA. Optimierung und Standardisierung von SELDI-TOF MS-Protein Profilen von hydrophoben ProteinChip™ Arrays. DGHO, ÖGHO, SGH und SGMO Jahrestagung, Innsbruck, Österreich, Oktober 2004

Aivado M, Spentzos D, Germing U, Alterovitz G, Meng XY, Grall F, Giagounidis AAN, Klement G, Steidl U, Otu HH, Iking-Konert C, Czibere A, **Prali WC**, Shayne M, Ramoni MF, Gattermann N, Mitsiades CS, Haas R, Fung ET, Libermann TA. Serum Protein Profiling with Mass Spectrometry for the Diagnosis of Myelodysplastic Syndromes. ASH The American Society of Hematology, 46th Annual Meeting, San Diego, CA, USA, Dezember 2004